

Interacción Simbiótica Entre Genotipos de Frijol Común y Cepas de (*Rhizobium* spp.) Symbiotic Interaction Between Common Bean Genotypes and (*Rhizobium* spp.) Strains

Rogelio Lépiz-Ildefonso^{1‡}, José de Jesús López-Alcocer²,
William David Rodríguez² y Eduardo Rodríguez-Guzmán¹

¹ Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Producción Agrícola. ² Departamento de Desarrollo Rural Sustentable. ³ Departamento de Salud Pública Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac. 44600 Las Agujas, Zapopan, Jalisco, México; (R.L.I.), (J.J.L.A.), (W.D.R.), (E.R.G.).

‡ Autor para correspondencia: rogelio.lepiz@academicos.udg.mx

RESUMEN

La asociación leguminosa-*Rhizobium* es un proceso de alta eficiencia en fijación biológica de nitrógeno que puede suministrar hasta 90% del elemento nutricional necesario en algunas especies. Para evaluar la respuesta simbiótica de 10 genotipos de frijol cultivado y silvestre inoculados con 10 cepas de *Rhizobium* aislados de nódulos de frijoles domesticados y silvestres, se cultivaron e inocularon plántulas de frijol en condiciones de invernadero en Zapopan, Jalisco, México. En la etapa de inicio de floración del frijol se registraron las variables asociadas a la fijación de nitrógeno atmosférico: número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN), porcentaje de nitrógeno total en el vástago (NT) y contenido de clorofila en las hojas (CL) en unidades SPAD. El análisis multivariado detectó diferencias para genotipos de frijol, cepas de *Rhizobium* y para la interacción genotipos x cepas. Los genotipos de frijol cultivado superaron de manera general a los genotipos de frijol silvestre en su respuesta a las variables registradas. De la misma forma, las cepas aisladas de frijoles cultivados en general fueron mejores que las procedentes de frijoles silvestres. El dendrograma circular separó a los binomios genotipo-cepa primero por acervos genéticos de frijol andino y mesoamericano, segundo por formas de frijol domesticado y silvestre y tercero dentro de cada una de las formas. La gráfica del análisis canónico de coordenadas principales mostró interacción positiva de los binomios frijol cultivado-cepa, en las cuatro variables estudiadas. Destacan las interacciones específicas de P Saltillo y Peruano 16 en NT y PSN en simbiosis con la mayoría de las cepas; de G Zarco en NN en simbiosis con seis de los rizobios; la interacción de Apetito en CL con seis de las cepas; las combinaciones de P saltillo, Peruano 16 y G Zarco con la cepa RhGz2 en la variable NT.



Cita recomendada:

Lépiz-Ildefonso, R., López-Alcocer, J. J., David Rodríguez, W., & Rodríguez-Guzmán, E. (2025). Interacción Simbiótica Entre Genotipos de Frijol Común y Cepas de *Rhizobium*. *Terra Latinoamericana*, 43, 1-9. e1065. <https://doi.org/10.28940/terra.v43i.1065>

Recibido: 18 de junio de 2024.

Aceptado: 9 de octubre de 2024.

Artículo. Volumen 43.

Enero de 2025.

Editor de Sección:

Dr. Roberto Gregorio Chiquito Contreras

Editor Técnico:

Dr. Marco Antonio Camacho Escobar

Palabras clave: análisis multivariado, diseño factorial, formas silvestre y cultivada, *Phaseolus vulgaris* L., rizobios nativos.

SUMMARY

The legume-*Rhizobium* association is a high-efficiency process in biological nitrogen fixation that can supply up to 90% of the nitrogen needed in some species. To evaluate the symbiotic response of 10 cultivated and wild bean genotypes inoculated with 10 strains of *Rhizobium* isolated from domesticated and wild bean nodules, seedlings were grown and inoculated under greenhouse conditions in Zapopan, Jalisco, Mexico. At the beginning of the bean flowering, the variables associated with atmospheric nitrogen fixation were recorded: number of nodules (NN), dry weight of nodules (PSN), percentage of total nitrogen in the stem (NT) and chlorophyll content



Copyright: © 2025 by the authors.

Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC ND) License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

in the leaves (CL) in SPAD units. Multivariate analysis detected differences for bean genotypes, *Rhizobium* strains, and for genotype \times strain interaction. Cultivated bean genotypes generally outperformed wild bean genotypes in their response to the recorded variables. Similarly, isolates from cultivated beans were generally better than those from wild beans. The circular dendrogram separated the genotype-strain binomials first by gene pools of Andean and Mesoamerican beans, second by domesticated and wild bean forms, and third within each of the forms. The graph of the canonical analysis of principal coordinates showed a positive interaction of the cultivated bean-strains binomials with the four variables studied. The positive interactions of P Saltillo and Peruano 16 in NT and PSN in symbiosis with most of the strains stand out; of G Zarco in NN in symbiosis with six of the rhizobia; the interaction of Apetito in CL with six of the strains; the combinations of P Saltillo, Peruano 16 and G Zarco with the RhGz2 strain in the NT variable.

Index words: multivariate analysis, factorial design, wild and cultivated forms, *Phaseolus vulgaris* L., native rhizobia.

INTRODUCCIÓN

En la agricultura el uso de los fertilizantes nitrogenados contribuye de manera importante a la producción de alimentos, pero incrementa los costos de producción y la contaminación por nitratos en los ecosistemas terrestres y acuáticos (Fernández-Pascual, María y Felipe, 2002; Apáez-Barrios, Escalante, Sosa, Rodríguez y Apáez, 2014; Habete y Buraka, 2016). Una opción para reducir las aplicaciones de estos fertilizantes químicos, es mediante la fijación biológica de nitrógeno (FBN) a través de la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, donde se consignan fijaciones de nitrógeno entre 24 kg ha⁻¹ y 584 kg ha⁻¹ por año (FAO, 1984; van Kessel y Hartley, 2000). La literatura señala también que el proceso puede ser capaz de abastecer, en algunos casos, hasta 90% de las necesidades de las plantas (Ángeles-Núñez y Cruz-Acosta, 2015).

Los trabajos de investigación de *Rhizobium* en frijol común, inicialmente se orientaron a la selección de cepas de mayor eficiencia en FBN (Graham, 1990; Ferrera-Cerrato, Almaraz, Rodríguez y Espinosa, 1990; Granda-Mora, Ochoa, Ruilova, Guamán y Torres, 2014; López-Alcocer, Lépiz, González, Rodríguez y López, 2020). Graham (1990), señala que el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) hizo colecciones de *Rhizobium* en México, Brasil, Ecuador y Argentina, y evaluó un gran número de cepas. Reporta que en 1978 y 1979 se realizó un ensayo internacional (IBIT) de 10 cepas previamente evaluadas (Graham *et al.*, 1981) donde se seleccionó CIAT 640. La cepa CIAT 640 fue efectiva en amplio rango de suelos y climas. Graham (1990) menciona que posteriormente se identificó y distribuyó la cepa CIAT 899 con tolerancia a suelos ácidos. Ambas cepas se han utilizado como inoculante comercial en Centroamérica y África (Vlassak, Vanderley y Avilio, 1996; Morón *et al.*, 2005) y como organismos modelo para el estudio de diversas propiedades simbióticas (Martínez-Romero, 2003; Graham *et al.*, 1994). En México Ferrera-Cerrato *et al.* (1990), evaluaron 98 cepas de *Rhizobium* colectadas en frijol de las regiones centro y norte. Encontraron variabilidad y mejor nodulación en variedades de hábito indeterminado.

Un segundo tema de investigación en *Rhizobium* es la evaluación y selección de variedades de frijol eficientes para fijación de nitrógeno en simbiosis con la bacteria (Rosas y Bliss, 1986; Graham, 1990; Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990; Gómez, Hernández, Sánchez, Toscano y Sánchez, 1998; Hardarson *et al.*, 1993; Romero-Rosales y Acosta, 2013; Farid y Navabi, 2015; Kawaka *et al.*, 2018). Graham (1990) documenta trabajos de nodulación y fijación de nitrógeno en cultivares nativos de frijol; señala amplia variabilidad y que las tasas de fijación variaron desde 3 kg de N ha⁻¹ hasta 125 kg de N ha⁻¹; asienta que las variedades de hábito determinado fueron pobres en fijar N₂. Informa que en la Universidad de Wisconsin realizaron trabajos de mejoramiento genético para transferir la capacidad de fijar N₂ del cultivar Puebla 152 a progenitores seleccionados; señala que se obtuvieron líneas con alta capacidad de fijación y buen rendimiento de grano. Hardarson *et al.* (1993) evaluaron en experimentos de campo 20 variedades y líneas de frijol en siete países para determinar su potencial en fijación de nitrógeno. Observaron diferencias en fijación entre genotipos, con 35% promedio de N derivado de la atmósfera. Identificaron genotipos de frijol con altos niveles de fijación de nitrógeno. Farid y Navabi (2015) evaluaron el potencial de fijación de nitrógeno de genotipos andinos y mesoamericanos. Encontraron variación entre genotipos. Afirman que los genotipos andinos fueron superiores en nodulación y los del acervo genético mesoamericano, mejores en fijación de nitrógeno.

Por otra parte, la literatura señala que en los estudios orientados a incrementar la FBN, debe buscarse la interacción efectiva entre los dos simbiontes (Rosas, Nolt, Henson y Bliss, 1987; Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990; Tajini, Drevon, Lamouchi, Aouani y Trabelsi, 2008; Romero-Rosales y Acosta, 2013; Gunnabo *et al.*, 2019; Milcheski, Senff, Orsi, Botelho y Fioreze, 2022). En este campo, Ferrera-Cerrato *et al.* (1990) reportan interespecificidad entre cepas de *Rhizobium* y variedades de frijol; señalan que 37.5% de las cepas evaluadas fueron efectivas en más de una variedad, 10% en tres variedades y sólo una mostró efectividad en las cuatro variedades incluidas. Gunnabo *et al.* (2019) en combinaciones factoriales entre cepas y variedades de frijol andinos y mesoamericanos de África Oriental, encontraron que CFN 42 de *R. etli* y CIAT 899 de *R. tropici*, mostraron nodulación efectiva en todos los genotipos y NAK 91 mostró interacción positiva con dos variedades de frijol. Milcheski *et al.*, (2022) encontraron interacción significativa entre cepas y genotipos en las variables masa total de nódulos y peso seco de la parte aérea. La cepa CIAT 899 promovió la nodulación efectiva, el peso seco del vástago y la acumulación de N en el vástago.

Con base en la variabilidad genética de frijol común (Lépiz-Ildefonso y Ramírez, 2010a) y de *Rhizobium* (López-Alcocer *et al.*, 2017) en la región occidente de México y los antecedentes revisados, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la interacción simbiótica en fijación de nitrógeno atmosférico de 10 genotipos de frijol común (cinco cultivados y cinco silvestres), inoculados cada uno de ellos con 10 cepas de *Rhizobium* (siete colectadas en nódulos en variedades domesticadas y tres en la forma silvestre) a través de las variables asociadas a la fijación biológica de nitrógeno número de nódulos, peso seco de nódulos, nitrógeno total en el vástago y contenido de clorofila en las hojas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación por eficiencia simbiótica a través de un diseño de tratamientos factorial de 10 genotipos de frijol común (cinco cultivados y cinco silvestres) y 10 cepas de *Rhizobium* spp. (siete colectadas en frijol cultivado y tres procedentes de frijol silvestre), materiales biológicos originarios de la región Occidente de México (Cuadro 1), se realizó en condiciones de invernadero en Zapopan, Jalisco, México. El inoculante se incrementó en medio CELM esterilizado en tubos de vidrio de 10 mL (Ángeles-Núñez y Cruz-Acosta, 2015). Las bacterias se colocaron en agitación a 180 rpm por dos días, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento de 10^8 UFC mL⁻¹, de acuerdo con la escala McFarland (McFarland, 1970). Las semillas de frijol se lavaron con jabón, se esterilizaron en etanol al 70% por un minuto, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril, se transfirieron a solución de cloro al 10% durante 3 min y finalmente se lavaron por cinco veces con agua destilada (Rodríguez, 1993). La semilla de frijol silvestre se escarificó con lija calibre 150 para acelerar y uniformizar el proceso de germinación. La escarificación se realizó en el dorso de la semilla hasta que se hizo visible la masa cotiledonar.

El experimento se estableció en invernadero. Los 100 tratamientos se evaluaron con un diseño experimental completamente al azar y tres repeticiones. Se sembraron cuatro semillas de frijol por contenedor de plástico de 1.0 L de capacidad, en sustrato de jal (arena gruesa) tamizado en zaranda de 4 mm × 4 mm y desinfectado con bromometano; se aplicó riego con agua destilada. Después de la emergencia se dejaron dos plantas de frijol por contenedor y se aplicaron 2 mL del inóculo. Durante el ensayo se aplicaron tres riegos por semana con solución nutritiva de Jensen (Jensen y Collins, 1985) libre de nitrógeno.

En la etapa de floración del frijol, se registraron las variables número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN), nitrógeno total (%) en el vástago (NT) y contenido de clorofila en las hojas (CL) en unidades SPAD (Soil Plant Analysis Development), (Gholizadeh, Soom, Rahim y Wayayok, 2011). En las variables NN y PSN, se registró el promedio de dos plantas por contenedor; para NT se extrajo una muestra de biomasa por contenedor y para CL fue el promedio de tres lecturas en la lámina foliar. El contenido de clorofila se estimó con medidor portátil Konica Minolta 502 Plus y el nitrógeno total mediante el método Kjeldhal.

Se hizo análisis multivariado permutado de la varianza (PERMANOVA), que permite la investigación de modelos complejos que incluyen interacciones (Anderson, 2001; McArdle y Anderson, 2001). El análisis incluyó distancias Bray-Curtis y 10 000 permutaciones. Se elaboró dendrograma circular para observar las agrupaciones de los genotipos-cepas con el índice de conglomeración Ward.D2 (0.98) (Murtagh y Legendre, 2014) y el método de distancias euclidianas para la matriz de distancias (Maechler, Rousseeuw, Struyf, Hubert y Hornik, 2022). Además, se llevó a cabo análisis canónico de coordenadas principales (ACC) basado en la matriz de distancias de Bray-Curtis y 1000 permutaciones (Anderson y Willis, 2003), para explorar las relaciones de 10 genotipos de frijol y 10 cepas de *Rhizobium* entre las variables NT y CL con el PSN y NN. Los análisis se realizaron con los paquetes cluster 2.1.4. (Maechler *et al.*, 2022), factoextra 1.0.7 (Kassambara y Mundt, 2020), ggplots2 (Wickham, 2016), MASS 7.3-58.2 (Ripley, 2022), purrr 1.0.2 (Wickham y Henry, 2023) y Vegan 2.2-1 (Oksanen, Simpson, Guillaume, Kindt y Legendre, 2022), en R Studio 4.2.3 (R Core Team, 2023).

Cuadro 1. Origen y ubicación geográfica de los 10 genotipos de frijol y 10 cepas de *Rhizobium* spp. utilizadas en el ensayo de interacción simbiótica.

Table 1. Origin and geographic location of the 10 bean genotypes and 10 *Rhizobium* spp. strains used in the symbiotic interaction assay.

No.	Genotipo	Forma	Hábito	Origen	Longitud	Latitud	Altitud
FRIJOL							
1	P. Saltillo	C	Tipo III	Proyecto Frijol CUCBA	103° 51'	20° 74'	1658
2	Peruano 16	C	Tipo I	Proyecto Frijol CUCBA	103° 51'	20° 74'	1658
3	G. Zarco	C	Tipo IV	Proyecto Frijol CUCBA	103° 51'	20° 74'	1658
4	Flor de Mayo	C	Tipo IV	Proyecto Frijol CUCBA	103° 51'	20° 74'	1658
5	Apetito	C	Tipo IV	Proyecto Frijol CUCBA	103° 51'	20° 74'	1658
6	ROL 633	S	Tipo IV	Zapotlán el Grande, Jal.	103° 33'	19° 37'	2215
7	ROL 486	S	Tipo IV	Vista Hermosa, Mich.	102° 21'	20° 08'	1536
8	ROL 497	S	Tipo IV	Tacámbaro, Mich.	103° 30'	20° 44'	1583
9	ROL 517	S	Tipo IV	Chilchota, Mich.	102° 08'	19° 51'	1773
10	ROL 242	S	Tipo IV	Magdalena, Jal.	104° 05'	20° 58'	1366
CEPAS							
	En frijol:						
1	RhV1	S	Tipo IV	Nevado de Colima	103° 37'	19° 37'	2168
2	RhV3	S	Tipo IV	Nevado de Colima	103° 37'	19° 37'	2168
3	RhMa1	C	Tipo IV	Zapopan, Jalisco	103° 30'	20° 44'	1580
4	RhMa2	C	Tipo IV	Zapopan, Jalisco	103° 30'	20° 44'	1580
5	RhAt	C	Tipo III	Zapopan, Jalisco	103° 30'	20° 44'	1580
6	RhCb3	C	Tipo I	Zapopan, Jalisco	103° 30'	20° 44'	1580
7	RhSa1	S	Tipo IV	Ciudad Guzmán, Jalisco	103° 27'	19° 49'	1605
8	RhGz2	C	Tipo IV	Zapopan, Jalisco	103° 30'	20° 44'	1580
9	RhGz3	C	Tipo IV	Zapopan, Jalisco	103° 30'	20° 44'	1580
10	RhC2	C	Tipo I	Cojumatlán, Michoacán	102° 52'	20° 08'	1520

ROL = clave del colector del frijol silvestre; C = cultivado; S = silvestre; Tipo I = arbustivo determinado erecto; Tipo III = arbustivo indeterminado postrado; Tipo IV = indeterminado enredador.

ROL = wild bean collector key; C = cultivated; S = wild; Type I = erect determinate shrub; Type III = prostrate indeterminate shrub; Type IV = climbing.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis multivariado de PERMANOVA para número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN), nitrógeno total en planta (NT) y contenido de clorofila (CL) detectó diferencias significativas para los factores genotipos de frijol, cepas de *Rhizobium* y para la interacción genotipo × cepa. Los valores de SC, R2 y F muestran que los efectos de la inoculación de las cepas sobre los genotipos medidos a través de las variables NN, PSN, NT y CL, fueron mayores que el de las cepas *per se* y de la interacción genotipo-cepa (Cuadro 2).

El modelo del ACC fue altamente significativo (*p*-value = 0.001) y los dos ejes principales explican 86% de la variabilidad, mostrando diferencias estadísticamente significativas para los genotipos de frijol y las cepas en las variables: NN (*p*-value = 0.001), PSN (*p*-value = 0.037), NT (*p*-value = 0.001) y CL (*p*-value = 0.001), (Figura 2).

Los genotipos de frijol en simbiosis con las cepas de *Rhizobium* mostraron diferencias significativas entre sí, a través de las variables NN, PSN, NT y CL. Los resultados son similares a los reportados por Rosas y Bliss (1986); Graham, (1990); Ferrera-Cerrato *et al.* (1990); Hardarson *et al.*, (1993); Gómez *et al.*, (1998); Romero-Rosales y Acosta, (2013); Farid y Navabi, (2015); Kawaka *et al.*, (2018); Lépiz-Ildefonso, López, González, Rodríguez y López (2024).

Cuadro 2. Análisis de PERMANOVA de las variables agronómicas número de nódulos (NN), peso seco de nódulos (PSN), nitrógeno total (NT) y contenido de clorofila (CL) en genotipos de frijol y cepas de *Rhizobium* spp.**Table 2. PERMANOVA analysis of the agronomic variables number of nodules (NN), dry weight of nodules (PSN), total nitrogen (NT) and chlorophyll content (CL) in genotypes of beans and *Rhizobium* spp. strains.**

Fuente de variación	GL	SC	R2	F	p-value
Genotipo	9	4.9391	0.5432	56.47	1e-04***
Cepa	9	0.3832	0.0421	4.38	1e-04***
Genotipo × cepa	81	1.8267	0.2001	2.32	1e-04***
Residual	200	1.9435	0.2137		
Total	299	9.0925	1.000		

***Diferencias altamente significativas para las variables agronómicas NN, PSN, NT y CL en los factores genotipos de frijol, cepas de *Rhizobium* y para la interacción genotipo por cepas.

***Highly significant differences for the agronomic variables NN, PSN, NT and CL in the genotype factors of beans, *Rhizobium* strains and for the genotype interaction by strains.

En genotipos de frijol para la variable NN, las variedades cultivadas Peruano 16 (arbustivo), G Zarco y Apetito (arbustivo) formaron el grupo de mayor valor, y cuatro de los seis silvestres integraron el grupo de menor número de nódulos. La variedad P Saltillo genotipo menos nodulador de los cultivados, se ubicó entre el grupo de los silvestres. En NT el grupo de genotipos cultivados resultó mejor al de los silvestres. P Saltillo (arbustivo) fue superior, seguido de Peruano 16. En CL el grupo de genotipos cultivados resultó mejor que el grupo de genotipos silvestres; la variedad Apetito registró el mayor valor. Los resultados son similares a los encontrados por Lépiz-Ildefonso *et al.* (2024), quienes reportan que variedades cultivadas de hábito arbustivo, fueron mejores en las variables NN, PSN, NT y CL en relación a los genotipos de hábito enredador cultivados y silvestres.

Las cepas de *Rhizobium* mostraron diferencias altamente significativas para las variables NN, NT y CL. Para NN seis cepas (RhGz3, RhV1, RhMa1, RhC2, RhV3, RhAt) integraron el grupo de mayor valor, cuatro pertenecen a rizobios colectados en frijoles cultivados (RhGz3, RhMa1, RhC2, RhAt). En NT la cepa RhSa1 proveniente de frijol silvestre, que registró el menor NN, fue estadísticamente superior a todas; seis cepas formaron el segundo grupo de igualdad estadística, cuatro de origen cultivado y dos de origen silvestre. Para la variable CL el grupo de mayor valor lo integraron cinco rizobios; encabezó el grupo RhSa1 de origen silvestre. La cepa RhSa1 fue de menor valor en NN y de mayor valor en NT y CL.

Diferencias entre cepas de *Rhizobium* en variables relacionadas con la fijación de nitrógeno similares a las encontradas en el presente trabajo, se han reportado por muchos investigadores (Rosas y Bliss, 1986; Graham, 1990; Ferrera-Cerrato *et al.* 1990; Hardarson *et al.*, 1993; Gómez *et al.*, 1998; Romero-Rosales y Acosta, 2013; Farid y Navabi, 2015; Kawaka *et al.*, 2018; López-Alcocer *et al.*, 2020). López-Alcocer *et al.* (2020) en su evaluación de 27 cepas, consignan diferencias significativas entre rizobios en nodulación y fijación de N, y señalan que dos cepas procedentes de frijol cultivado y una colectada en frijol silvestre, fueron mejores en nodulación y en fijación de N.

De los resultados obtenidos en esta investigación y de los numerosos trabajos reportados en la literatura sobre evaluación de genotipos de frijol y cepas de *Rhizobium*, se puede aseverar que existen diferencias significativas entre ambos simbiontes en las variables asociadas a la fijación de nitrógeno, número de nódulos, peso seco de nódulos, contenido total de nitrógeno en el vástago y contenido de clorofila en las hojas.

En el dendrograma circular (Figura 1) los puntos corresponden a los 100 binomios genotipo-cepa. El agrupamiento de los binomios frijol-cepa estuvo determinado por el genotipo que presentó mayor valor de respuesta a la inoculación en las cuatro variables registradas, que por las cepas *per se* (Cuadro 2). En el primer nivel de agrupamiento, el dendrograma separa al genotipo B (Peruano 16, color azul) perteneciente al Acervo Genético Andino, de los nueve materiales del Acervo Genético Mesoamericano. La separación de genotipos entre acervos genéticos de frijol, está documentada no solo para nodulación y fijación de nitrógeno (Farid y Navaby, 2015), sino para otras características como tamaño de grano, color del grano, contenido de faseolina, forma del foliolo central y forma de bracteolas (Singh, Gepts y Debouck, 1991; Lépiz *et al.*, 2010b).

En un segundo nivel de agrupamiento, el dendrograma separa a los genotipos mesoamericanos en silvestres (color amarillo) y cultivados (colores tinto y lila). Se han reportado diferencias morfológicas entre las dos formas de frijol en tamaño de semilla, longitud del foliolo central, longitud de vaina, hábito de crecimiento, dehiscencia (Lépiz *et al.*, 2010b) y genéticas a través de marcadores moleculares (Castellanos-Hernández, Lépiz, Castellanos, Rodríguez y Torres, 2017). El dendrograma muestra relación directa con lo encontrado en los efectos simples, donde de manera general los frijoles cultivados mostraron mayor valor que los frijoles silvestres en las variables NN, PSN, NT y CL.

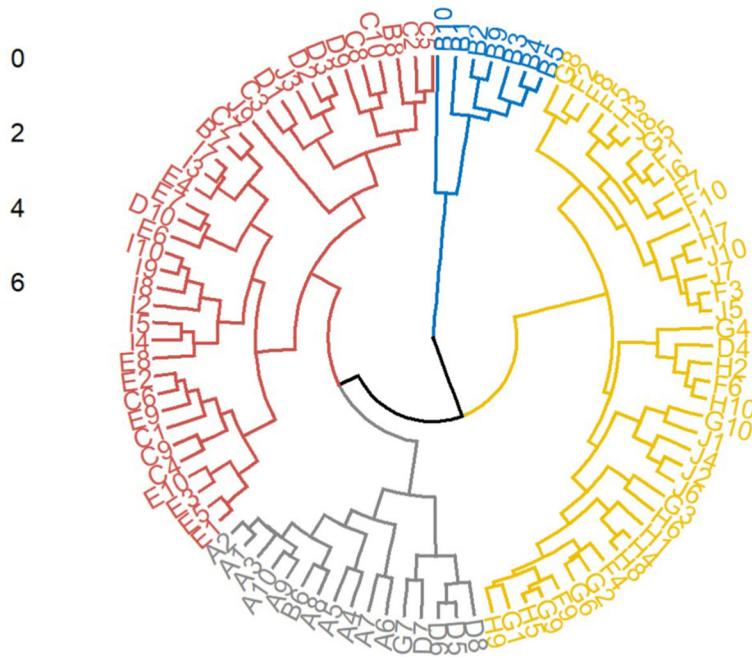


Figura 1. Agrupación jerárquica. Dendrograma circular donde cada punto es una combinación de genotipo (letra) y cepa (número). A = P. Saltillo; B = Peruano 16; C = G. Zarco; D = Flor de Mayo; E = Apetito; F = ROL 633; G = ROL 486; H = ROL 497; I = ROL 517; J = ROL 242. Cepas = 1) RhV1; 2) RhV3, 3) RhMa1, 4) RHMa2, 5) RhAt, 6) RHCb3, 7) RhSa1, 8) RhGz2, 9) RhGz3, 10) RhC2.

Figure 1. Hierarchical clustering. Circular dendrogram where each dot is a combination of genotype (letter) and strains (number). A = P. Saltillo; B = Peruano 16; C = G. Zarco; D = Flor de Mayo; E = Apetito; F = ROL 633; G = ROL 486; H = ROL 497; I = ROL 517; J = ROL 242. Strains = 1) RhV1, 2) RhV3, 3) RhMa1, 4) RHMa2, 5) RhAt, 6) RHCb3, 7) RhSa1, 8) RhGz2, 9) RhGz3, 10) RhC2.

En tercer nivel de agrupamiento, los frijoles cultivados se separan en dos conjuntos: en color lila A (P Saltillo) y en color tinto C (G Zarco), D (Flor de Mayo) y E (Apetito). Esta separación está definida principalmente por la variable NN: P Saltillo de baja nodulación y G Zarco, Flor de Mayo y Apetito, noduladores. El genotipo I (ROL 517) de la forma silvestre e híbrido natural entre las dos formas, se ubica en el área de los cultivados noduladores. En el tercer nivel, los silvestres forman dos conjuntos: F (ROL 633) y J (ROL 242) por un lado y por el otro G (ROL 486) y H (ROL 497). La separación de los genotipos silvestres tiene también relación con los efectos simples en las variables NN, NT y CL, donde los dos primeros genotipos registraron valores mayores, en relación a los dos segundos.

El análisis canónico de coordenadas principales (ACC) basado en la matriz de distancias de Bray-Curtis y 1000 permutaciones, que explora las relaciones entre NT y CL con PSN y NN de los 100 binomios genotipo de frijol y cepas de *Rhizobium* spp. (Figura 2), mostró interacción genotipo-cepa en las cuatro variables agronómicas ($p\text{-value} < 0.001$) y asociación positiva de los genotipos cultivados con las variables NN, PSN, NT y CL. Los genotipos domesticados P Saltillo (A) y Peruano 16 (B) en simbiosis con la mayoría de las cepas, muestran interacción positiva en las variables NT y PSN. De manera similar, G Zarco (C) en simbiosis con seis de las cepas, presenta interacción positiva en las variables NN y PSN. En la variable CL Apetito exhibe interacción positiva con seis de las cepas y ROL 517 de origen silvestre e híbrido natural entre las dos formas, muestra interacción positiva en cinco casos.

Los resultados revelan que los genotipos de frijol interaccionan de manera diferente con las cepas de *Rhizobium* en las variables registradas. Lo mismo se observa en las cepas en simbiosis con los genotipos de frijol. En trabajos similares (Rosas *et al.*, 1987, Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990; Gunnabo *et al.*, 2019) señalan que además de identificar cepas de *Rhizobium* y genotipos de frijol eficientes en fijar nitrógeno, debe buscarse interacción positiva entre los dos simbiontes para incrementar la fijación. Ferrera-Cerrato *et al.* (1990), en la evaluación de cepas y variedades de frijol con las variables número de nódulos y materia seca de la planta, reportan que 37.5% de las cepas se comportaron como efectivas en más de una variedad, 10% en tres variedades y sólo una mostró efectividad en las cuatro variedades utilizadas. Gunnabo *et al.* (2019), estudiaron la interacción factorial de diversos genotipos rizobianos y variedades de frijol común de África Oriental a través de la variable nodulación. Encontraron que la cepa CFN 42 de *Rhizobium etli* y la cepa de *Rhizobium tropici* CIAT 899, fueron efectivas en todos los genotipos de frijol y que NAK 91 mostró evidencia de interacción positiva con dos genotipos específicos de frijol.

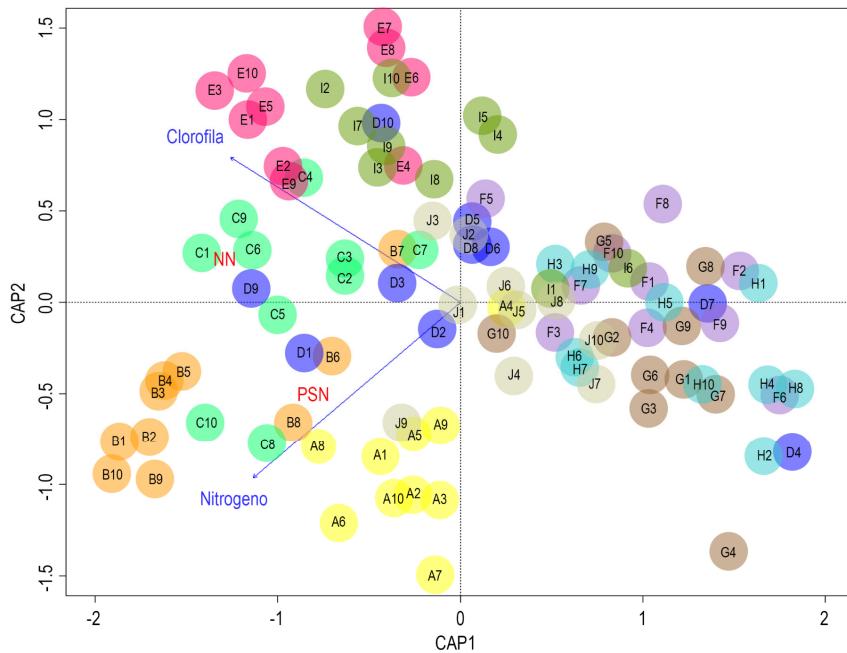


Figura 2. Gráfica del análisis de coordenadas principales. Genotipos: A = P. Saltillo; B = Peruano 16; C = G. Zarco; D = Flor de Mayo; E = Apetito; F = ROL 633; G = ROL 486; H = ROL 497; I = ROL 517; J = ROL 242. Cepas = 1) RhV1, 2) RhV3, 3) RhMa1, 4) RhMa2, 5) RhAt, 6) RhCb3, 7) RhSa1, 8) RhGz2, 9) RhGz3, 10) RhC2. En los puntos de la figura, la letra indica el genotipo y el número la cepa inoculada. Las letras en rojo son: número de nódulos (NN) y peso seco de nódulos (PSN).

Figure 2. Graph of the main coordinate analysis. Genotypes: A = P. Saltillo, B = Peruano 16; C = G. Zarco, D = Flor de Mayo; E = Apetito; F = ROL 633; G = ROL 486; H: ROL 497; I = ROL 517; J = ROL 242. Strains = 1) RhV1, 2) RhV3, 3) RhMa1, 4) RhMa2, 5) RhAt, 6) RhCb3, 7) RhSa1, 8) RhGz2, 9) RhGz3, 10) RhC2. At the points in the figure, the letter indicates the genotype and the number of the inoculated strain. The letters in red are: number of nodules (NN) and dry weight of nodules (PSN).

En el presente trabajo destacan las variedades P Saltillo (A) y Peruano 16 (B) por mostrar asociación positiva con la mayoría de las cepas en las variables NT y PSN; G Zarco (C) con seis cepas en NN; Apetito con seis de las cepas en la variable CL. De manera particular destacan otros binomios con interacción específica. Las combinaciones de A8, B8 y C8 (P Saltillo, Peruano 16 y G Zarco) con la cepa RhGz2 en la variable NT. Los binomios B6 y B8 (Peruano 16 y cepas RhCb3 y RhGz2) en la variable PSN y las combinaciones C1, C6 (G. Zarco con RhV1 y RhCb3) en NN. Finalmente destaca la combinación de Peruano 16 (B) con la cepa RhSa1 (7).

Los resultados permiten confirmar la existencia de interacción entre los binomios genotipo frijol-cepa de *Rhizobium* a través de las variables número de nódulos por planta, peso seco de nódulos, nitrógeno total en la planta y contenido de clorofila en los foliolos. Permiten también identificar binomios con interacción específica para una o más variables asociadas a la fijación de nitrógeno.

CONCLUSIONES

Se detectaron diferencias significativas para la interacción genotipo × cepa entre 10 genotipos de frijol en simbiosis con 10 cepas de *Rhizobium*, en las variables asociadas a la fijación de nitrógeno atmosférico número de nódulos, peso seco de nódulos, contenido total de nitrógeno en la planta y contenido de clorofila en las hojas. Los genotipos de frijol cultivado y las cepas colectadas en frijol domesticado, en general fueron mejores a los genotipos silvestres y a las cepas provenientes de frijoles silvestres, respectivamente. El dendrograma separó a los binomios genotipo-cepa, por acervos genéticos de frijol (andinos y mesoamericanos); a los genotipos mesoamericanos por formas de frijol (silvestres y cultivados) y por genotipos dentro de cada una de las formas. El análisis de coordenadas principales encontró interacción positiva de los genotipos cultivados con las cepas de *Rhizobium* para las cuatro variables registradas. Se identificaron interacciones específicas de los binomios genotipo-cepa para una variable o más de una variable.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los datos utilizados o analizados durante el estudio actual están disponibles del autor correspondiente, a solicitud razonable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

FINANCIACIÓN

La investigación fue financiada con fondos internos de la Universidad de Guadalajara.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: R.L.I. y J.J.L.A. Metodología: J.J.L.A. y R.L.I. Análisis estadístico: W.D.R., R.L.I. y E.R.G. Validación: R.L.I. Análisis formal: R.L.I. y W.D.R. Investigación: J.J.L.A. y R.L.I. Curación de datos: J.J.L.A., R.L.I. y E.R.G. Preparación del borrador original: R.L.I., W.D.R. y J.J.L.A. Revisión y edición: R.L.I., E.R.G. y W.D.R. Visualización: R.L.I. y E.R.G. Supervisión: R.L.I. Administración del proyecto: R.L.I. Adquisición de fondos: R.L.I.

AGRADECIMIENTOS

No aplicable.

LITERATURA CITADA

Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology*, 26(1), 32-46. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x>

Anderson, M. J., & Willis, T. J. (2003). Canonical analysis of principal coordinates: an ecologically meaningful approach for constrained ordination. *Ecology*, 84(2), 511-525. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2003\)084\[0511:CAOPCA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[0511:CAOPCA]2.0.CO;2)

Angeles-Núñez, J. G., & Cruz-Acosta, T. (2015). Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(5), 929-942.

Apáez-Barrios, P., Escalante-Estrada, J. A., Sosa-Montes, E., Rodríguez-González, M. A., & Apáez-Barrios, M. (2014). Fenología, producción y calidad nutrimental del frijol chino en función de la biofertilización y fertilización foliar. *Interciencia*, 39(12), 857-862.

Castellanos-Hernández, O. A., Lépiz-Ildefonso, R., Castellanos-Enríquez, G. E., Rodríguez-Sahagún, A., & Torres-Morán, M. I. (2017). Relaciones genéticas basadas en marcadores ISTR entre formas silvestres, cultivadas e intermedias de frijol de guía colectado en Jalisco, México. *Acta Botánica Mexicana*, 118, 53-63. <https://doi.org/10.21829/abm118.2017.1200>

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (1984). *Legume inoculants and their use. Nitrogen Fixation for Tropical Agricultural Legumes (NiftAL) Project*, USA. Roma, Italia: FAO ISBN: 92-500-0320-0

Farid, M., & Navabi, A. (2015). N_2 fixation ability of different dry bean genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 95(6), 1243-1257. <https://doi.org/10.4141/cjps-2015-084>

Fernández-Pascual, M., María, N. D., & Felipe, M. (2002). Fijación biológica de nitrógeno: factores limitantes. En F. Valladares (Ed.). *Ciencia y Medio Ambiente* (pp. 195-202). España: CCMA-CSIC.

Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suarez, J. J., Rodríguez-Mendoza, M. N., & Espinosa-Victoria, D. (1990). Fijación simbiótica de nitrógeno en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Terra Latinoamericana*, 8(3), 35-70.

Gholizadeh, A., Soom, M. A. M., Rahim, A. A., & Wayayok, A. (2011). Using soil plant analysis development chlorophyll meter for two growth stages to assess grain yield of Malaysian rice (*Oryza sativa*). *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 6(2), 209-213. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.209.213>

Gómez, A. L., Hernández, G., Sánchez, T., Toscano, V., & Sánchez, M. (1998). Interacción genotipo de frijol común-cepa de Rhizobium. *Agronomía Mesoamericana*, 9(1), 93-97.

Graham, P. H., Apolitano, C., Ferrera-Cerrato, R., Halliday, J., Lépiz, R., Méndez, O., ... & Viteri, S. (1981). The international bean inoculation trial (IBIT): results for the 1978-1979 trial. In: Graham, P. H., & Harris, S. (Eds.). *Biological Nitrogen Fixation. Technology for tropical agriculture* (pp. 223-229). Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

Graham, P. H. (1990). Problemas de la nodulación y fijación de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L. Una reevaluación. *Terra Latinoamericana*, 8(3), 71-82.

Graham, P. H., Draeger, K. J., Ferrey, M. L., Conroy, M. J., Hammer, B. E., Martinez, E., ... & Quinto, C. (1994). Acid pH tolerance in strains of Rhizobium and Bradyrhizobium, and initial studies on the basis for acid tolerance of Rhizobium tropici UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(3), 198-207. <https://doi.org/10.1139/m94-033>

Granda-Mora, K. I., Ochoa, M. A., Rui洛va, V., Guamán, D., & Torres, G. (2014). Evaluación de cepas nativas de Rhizobium sobre parámetros fenotípicos en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro de Biotecnología*, 3, 25-37.

Gunnabu, A. H., Geurts, R., Wolde-meskel, E., Degefu, T., Giller, K. E., & Van Heerwaarden, J. (2019). Genetic interaction studies reveal superior performance of Rhizobium tropici CIAT899 on a range of diverse East African common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(24), e01763-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01763-19>

Habete, A., & Buraka, T. (2016). Effect of Rhizobium inoculation and nitrogen fertilization on nodulation and yield response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at Boloso Sore, Southern Ethiopia. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 6(13), 72-75.

Hardarson, G., Bliss, F. A., Cigales-Rivero, M. R., Henson, R. A., Kipe-Nolt, J. A., Longerí, L., ... & Tsai, S. M. (1993). Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant and Soil*, 152, 59-70.

Jensen, M. H., & Collins, W. L. (1985). Hydroponic vegetable production. *Horticultural Reviews*, 7, 483-559. <https://doi.org/10.1002/9781118060735.ch10>

Kawaka, F., Makonde, H., Dida, M., Opala, P., Ombori, O., Maingi, J., & Muoma, J. (2018). Genetic diversity of symbiotic bacteria nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris*) in western Kenya. *PLoS One*, 13(11), e0207403. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207403>

Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.7. Consultado el 13 de febrero, 2024, desde <https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/index.html>

Lépiz-Ildefonso, R., & Ramírez-Delgadillo, R. (2010a). *Los parientes silvestres del frijol común en el occidente de México*. Guadalajara, Jalisco, México: Orgánica Editores.

Lépiz-Ildefonso, R., López-Alcocer, J. J., Sánchez-González, J. J., Santacruz-Ruvalcaba, F., Nuño-Romero, R., Rodríguez-Guzmán, E. (2010b). Características morfológicas de formas cultivadas, silvestres e intermedias de frijol común de hábito trepador. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33(1), 21-28. <https://revfitotecnia.mx/index.php/RFM/article/view/651/617>

Lépiz-Ildefonso, R., López-Alcocer, J. J., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macías, R., & López-Alcocer, E. (2024). Eficiencia en Fijación Biológica de Nitrógeno de Genotipos de Frijol Cultivado y Silvestre. *Terra Latinoamericana*, 42, 1-10. <https://doi.org/10.28940/terra.v42i0.1082>

López-Alcocer, J. D. J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macías, R., López-Alcocer, E., & Olalde-Portugal, V. (2017). Caracterización morfológica y bioquímica de cepas de Rhizobium colectadas en frijol común silvestre y domesticado. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(1), 73-81.

López-Alcocer, J. J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macías, R., & López-Alcocer, E. (2020). Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* spp. recolectadas en frijol cultivado y Silvestre. *Terra Latinoamericana*, 38, 841-852. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i4.654>

Maechler, M., Rousseeuw, P., Struyf, A., Hubert, M., & Hornik, K. (2022). *Cluster Analysis Basics and Extensions*. R package version 2.1.4. Consultado el 13 de febrero, 2024, desde <https://CRAN.R-project.org/package=cluster>

Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of Rhizobium-*Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252, 11-23. <https://doi.org/10.1023/A:1024199013926>

McArdle, B. H., & Anderson, M. J. (2001). Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis. *Ecology*, 82(1), 290-297. <https://doi.org/10.2307/2680104>

McFarland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal American Medical Association*, 49, 1176-1178. <https://doi.org/10.1001/jama.1907.25320140022001>

Milcheski, V. D. F., Senff, S. E., Orsi, N., Botelho, G. R., & Fioreze, A. C. D. C. L. (2022). Influence of common bean genotypes and rhizobia interaction for nodulation and nitrogen fixation. *Revista de Ciências Agroveternárias*, 21(1), 8-15. <https://doi.org/10.5965/223811712112022008>

Morón, B., Soria-Díaz, M. E., Ault, J., Veroirois, G., Noreen, S., Rodríguez-Navarro, D. N., ... & Sousa, C. (2005). Low pH changes the profile of nodulation factors produced by Rhizobium tropici CIAT899. *Chemistry & Biology*, 12(9), 1029-1040. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2005.06.014>

Murtagh, F., & Legendre, P. (2014). Ward's Hierarchical Agglomerative Clustering Method: Which Algorithms Implement Ward's Criterion? *Journal of Classification*, 31, 274-295.

Oksanen, J., Simpson, G. L., Guillaume, F., Kindt, R., & Legendre, P. (2022). *Vegan: community ecology package*. R package version 2.6-4. Consultado el 15 de julio, 2023, desde <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

R Core Team (2023). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria: R Core Team.

Ripley, B. (2022). *MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS*. Consultado el 15 de julio, 2023, desde <http://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>

Rodríguez, M. M. N. (1993). Asociación Rhizobium-leguminosa. In: R. Ferrera, M. C. A. González, & M. N. Rodríguez (Eds.). *Manual de Agromicrobiología*. (pp. 11-51). México: Editorial Trillas.

Romero-Rosales, N. M. G., & Acosta-Duran, C. M. (2013). Selección individual de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) para mejorar la capacidad de fijación de nitrógeno con *Rhizobium* sp. *Investigación Agropecuaria*, 2, 173-186.

Rosas, J. C., & Bliss, F. A. (1986). Improvement of the nitrogen fixation potential of common beans in Latin American. *Ceiba*, 27(2), 245-259.

Rosas, J. C., Nolt, J. K., Henson, R. A., & Bliss, F. A. (1987). Estrategias de mejoramiento para incrementar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno del frijol común en América Latina. *Ceiba*, 28(1), 39-57.

Singh, S. P., Gepts, P., & Debouck, D. G. (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). *Economic Botany*, 45, 379-396.

Tajini, F., Drevon, J. J., Lamouchi, L., Aouani, M. E., & Trabelsi, M. (2008). Response of common bean lines to inoculation: comparison between the Rhizobium tropici CIAT899 and the native Rhizobium etli 12a3 and their persistence in Tunisian soils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 407-417. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9490-8>

van Kessel, C., & Hartley, C. (2000). Agricultural management of grain legumes: Has it led to an increase in nitrogen fixation? *Field Crops Research*, 65(2), 165-181. [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(99\)00085-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(99)00085-4)

Vlassak, K., Vanderleyden, J., & Franco, A. (1996). Competition and persistence of Rhizobium tropici and Rhizobium etli in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. *Biology and Fertility of Soils*, 21, 61-68. <https://doi.org/10.1007/BF00335994>

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York, NY, USA: Springer-Verlag.

Wickham, H., & Henry, L. (2023). *purrr: Functional Programming Tools*. R package version 1.0.2. Consultado el 15 de julio, 2023, desde <https://CRAN.R-project.org/package=purrr>