

Eficiencia en Fijación Biológica de Nitrógeno de Genotipos de Frijol Cultivado y Silvestre Biological Nitrogen Fixation Efficiency of Cultivated and Wild Bean Genotypes

Rogelio Lépez-Ildelfonso^{1†} , José de Jesús López-Alcocer¹ ,
Diego Raymundo González-Eguiarte¹ , Ramón Rodríguez-Macías¹ y
Eduardo López-Alcocer¹

¹ Universidad de Guadalajara (UDG), Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), Profesor Investigador. Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez, No. 2100. Las Agujas. 45200 Nextipac, Zapopan, Jalisco, México; (R.L.I.), (J.J.L.A.), (D.R.G.E.), (R.R.M.), (E.L.A.).

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

RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es un proceso natural que puede suministrar hasta el 90% del nitrógeno necesario para algunas leguminosas, por lo que representa una opción sustentable para reducir los efectos adversos de fertilizantes químicos en la agricultura. Para evaluar la eficiencia en FBN de cinco cultivares de frijol de hábito arbustivo, cinco de hábito enredador y 10 poblaciones de frijol silvestre, se inocularon plántulas con un compuesto de tres cepas de *Rhizobium* spp. Se usó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones y se registraron ocho variables cuantitativas. Se hicieron análisis de varianza, se obtuvieron índices de eficiencia en nodulación y fijación de nitrógeno y se realizaron análisis de componentes principales (CP). Los análisis de varianza y los índices de eficiencia en nodulación y fijación mostraron diferencias entre genotipos. Las variedades Peruano 16, Cuarenteño y Pinto Saltillo de hábito arbustivo fueron eficientes en nodulación y en fijación de nitrógeno. Las poblaciones silvestres ROL 633 y ROL 486, fueron eficientes en nodulación y de baja eficiencia en fijación. Los contrastes ortogonales de las variables número y peso seco de nódulos, nitrógeno total y contenido de clorofila y los índices de eficiencia en nodulación y fijación de nitrógeno ambos por grupos de genotipos, permiten afirmar que las variedades de frijol arbustivo mostraron un comportamiento sobresaliente, superando de manera general a las variedades cultivadas de hábito trepador y a los genotipos silvestres. El CP1 separó a los genotipos por longitud de vástago y raíz y el CP2 por número y peso seco de nódulos. Los resultados confirman variabilidad entre genotipos de frijol en FBN, la existencia de cultivares de hábito arbustivo eficientes en nodulación y fijación y que existe potencial para selección de genotipos de frijol eficientes en FBN.

Palabras clave: contrastes ortogonales, índices de eficiencia, nodulación, *Phaseolus vulgaris* L.

SUMMARY

Biological nitrogen fixation (BNF) is a natural process that can supply up to 90% of nitrogen needed for some legumes, thus it represents a sustainable option to reduce the adverse effects of chemical fertilizers in agriculture. To evaluate the BNF efficiency of five bush bean cultivars, five bean cultivars of climbing habits and 10 wild bean populations, seedlings were inoculated with a composite of three strains of *Rhizobium* spp. A completely randomized design with five replicates was used and eight quantitative variables were recorded. Analyses of variance were performed, nodulation and nitrogen fixation efficiency indices were obtained, and principal component analyses (CP) were conducted. The analyses of variance and the



check for
updates

Cita recomendada:

Lépez-Ildelfonso, 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. e1082. <https://doi.org/10.28940/terra.v42i0.1082>

Recibido: 3 de diciembre de 2021.

Aceptado: 31 de mayo de 2024.

Artículo. Volumen 42.

Julio de 2024.

Editor de Sección:
Dr. Fernando Ayala Niño

Editor Técnico:
Dr. David Cristóbal Acevedo



Copyright: © 2024 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/>).

nodulation and fixation efficiency indices showed differences between genotypes. Peruano 16, Cuarenteño and Pinto Saltillo bush habit varieties were efficient in nodulation and nitrogen fixation. The wild populations ROL 633 and ROL 486 were efficient in nodulation and showed low efficiency in fixation. The orthogonal contrasts of the variables number and dry weight of nodules, total nitrogen and chlorophyll content, and nodulation and nitrogen fixation efficiency indices both by groups of genotypes, allow us to affirm that varieties of bush bean showed an outstanding behavior, overall surpassing the cultivated varieties of climbing habit and the wild genotypes. CP1 separated genotypes by stem and root length and CP2 by number and dry weight of nodules. The results confirm variability among bean genotypes in BNF, the existence of bush habit cultivars efficient in nodulation and fixation, and that there is potential for selection of efficient bean genotypes in BNF.

Index words: *orthogonal contrasts, efficiency indices, nodulation, Phaseolus vulgaris L.*

INTRODUCCIÓN

En la región occidente de México así como en la mayoría de las áreas agrícolas, los fertilizantes nitrogenados son un insumo importante en la producción de cosechas (Farid y Navabi, 2015). Sin embargo, el abuso de los fertilizantes químicos y otras acciones antrópicas, contribuyen a la contaminación por nitratos de los ecosistemas terrestres y acuáticos y de óxido de nitrógeno en la atmósfera (Fernández-Pascual, María y Felipe, 2002; Apáez-Barrios, Escalante, Sosa, Rodríguez y Apáez, 2014). Los efectos indeseables antes mencionados se pueden disminuir al reducir las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados; una opción real para lograr dicho objetivo es la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN), la cual representa una tecnología más sustentable (Olivares, Bedmar y Sanjuán 2013).

A través de la relación simbiótica leguminosa-rizobio, proceso biológico capaz de convertir nitrógeno atmosférico elemental (N_2) en amonio (NH_4^+), cuya forma es aprovechable por las plantas. Se consignan fijaciones de nitrógeno (N) en un rango de 24 hasta 584 kg ha⁻¹ por año de N (FAO, 1984; Van Kessel and Hartley, 2000; Ángeles-Núñez y Cruz, 2015) y se afirma que el proceso puede ser capaz de abastecer en algunos casos hasta el 90% de las necesidades de las plantas (Ángeles-Núñez y Cruz, 2015).

Los trabajos en FBN de rizobio en frijol, consideran a esta especie pobre en fijación de nitrógeno en comparación con otras leguminosas, con valores de fijación entre 7.1 y 106.5 kg ha⁻¹ de nitrógeno por ciclo de cultivo (Ferrera-Cerrato, Almaraz, Rodríguez y Espinosa, 1990; Farid y Navabi, 2015). Sin embargo, diversos estudios en este campo consideran que existe potencial para lograr un incremento en la fijación de nitrógeno a través de la selección de un binomio planta de frijol-rizobio eficiente en FBN (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990; Acuña y Uribe, 1996; Granda, Ochoa, Ruilova, Guamán y Torres, 2014).

Entre algunas causas de la baja eficiencia en FBN, se asienta que el frijol común es una planta promiscua de ciclo corto que puede formar nódulos con un amplio rango de cepas de *Rhizobium*, muchas de ellas poco eficientes en fijación de N (Rahmani, Räsänen, Afshari y Lindström, 2011; Argaw y Tsigie, 2015); que el mejoramiento genético del cultivo se practica bajo niveles altos de fertilizantes nitrogenados y que los rizobios nativos presentes en el suelo son muy competitivos, pero pobres en eficiencia en FBN (Rahmani *et al.*, 2011; Hungria, Noriega y Silva, 2013).

La variabilidad genética en fijación biológica de nitrógeno en frijol común encontrada por Farid y Navabi (2015) apoya la idea que esta puede ser mejorada por selección de genotipos eficientes en nodulación y por su habilidad en la fijación del N en simbiosis con bacterias de rizobios. Ferrera-Cerrato *et al.* (1990), evaluaron 98 aislados de *Rhizobium* colectados en la mesa central y norte-centro de México en variedades de frijol cultivado de diferente hábito de crecimiento. Los autores reportan diversidad genética entre las cepas de *Rhizobium*, mejor nodulación de las bacterias en variedades de hábito indeterminado y especificidad del binomio cepa-variedad. Por otro lado, Ferrera-Cerrato *et al.* (1990) y Gómez, Hernández, Sánchez, Toscano y Sánchez (1998) argumentan que es factible incrementar la fijación de nitrógeno del frijol en el campo, mediante la selección combinada de cepas efectivas y competitivas y variedades de frijol con alta capacidad de nodular y fijar nitrógeno en simbiosis con el *Rhizobium*.

En este sentido, Romero-Rosales y Acosta (2013) mencionan que en los centros de diversidad genética de frijol, también existe una gran diversidad de cepas de *Rhizobium*, que existen variedades de frijol que pueden nodular con un gran número de cepas de *Rhizobium* y cepas de *Rhizobium* con capacidad de nodular a un gran número de variedades de frijol. También señalan que el trabajo debe orientarse a buscar el mejor binomio para incrementar la capacidad de fijación de nitrógeno y por tanto, el rendimiento de grano.

Tomando en cuenta la importancia del cultivo de frijol en la región occidente de México (88 414 ha), la gran variabilidad genética de la forma silvestre de *Phaseolus vulgaris* (Lépiz-Ildefonso y Ramírez, 2010), la necesidad de utilizar tecnologías más sustentables para reducir los efectos indeseables del uso de los fertilizantes químicos en la agricultura (Olivares *et al.*, 2013) y la posibilidad de identificar opciones más eficientes en fijación simbiótica de nitrógeno, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de genotipos de frijol cultivado y silvestre, inoculados con un compuesto de cepas de *Rhizobium* seleccionadas por su eficiencia en nodulación, ambos organismos originarios de la región occidente de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

La FBN se evaluó en 10 genotipos de frijol cultivado (cinco de hábito arbustivo y cinco de hábito enredador) y 10 de frijol silvestre, todos originarios de la región Occidente de México (Cuadro 1). El experimento se realizó en condiciones de malla sombra en Zapopan, Jalisco, México. La inoculación de las plantas se realizó con un compuesto de tres cepas nativas de rizobios: Rhizojal VC3, Rhizojal ZCB3 y Rhizojal ZGZ3, seleccionadas por eficiencia en nodulación en una evaluación previa (López-Alcocer, Lépiz, González, Rodríguez y López, 2020). El inoculante se incrementó en medio CELM esterilizado en tubos de vidrio de 10 mL (Ángeles-Núñez y Cruz, 2015).

Las bacterias se colocaron en agitación a 180 rpm por dos días, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento (10^8 UFC mL⁻¹) de acuerdo con la escala McFarland (McFarland, 1970). Las semillas de frijol se lavaron con una solución de jabón, se esterilizaron en etanol al 70% por un minuto, el enjuague fue con agua destilada estéril en tres ocasiones consecutivas, se transfirieron a una solución de cloro al 10% durante tres minutos y se realizó un lavado final con agua destilada por cinco veces (Rodríguez, 1993). La semilla de frijol silvestre se escarificó con lija calibre 150 para acelerar y uniformizar el proceso de germinación.

Los genotipos se evaluaron en un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. Se sembraron cuatro semillas por contenedor de plástico de 1.0 L de capacidad, en sustrato de jal (arena gruesa) tamizado en zaranda de 4×4 mm y desinfectado con Bromometano (340 g m⁻¹ por 4 días) y se aplicó riego con agua destilada. Después de la emergencia se dejaron dos plantas de frijol por contenedor y se adicionaron 2 mL del inóculo de *Rhizobium*. La solución preparada se colocó en un matrás volumétrico de 500 mL y con una probeta de 5 mL se aplicaron 2 mL por contenedor. Durante el ensayo se aplicaron tres riegos por semana con solución nutritiva de Jensen libre de nitrógeno (Ferrera-Cerrato, González y Rodríguez, 1993).

El registro de las variables se realizó durante la etapa de prefloración. La longitud del vástago (LV, cm) se obtuvo midiendo la altura del tallo principal de las plantas y la longitud de raíz (LR, cm) misma que se midió después de extraer y lavar con agua las dos raíces de cada contenedor. Para el registro del número de nódulos (NN), después de lavar las raíces, se desprendieron y contaron independientemente de su tamaño. Para el registro del peso seco del vástago (PSV, g), peso seco de la raíz (PSR, g) y peso seco de los nódulos (PSN, g), las muestras se deshidrataron en una estufa marca Binder (D-78532 Germany) a 40 °C por tres días hasta peso constante. Para NT (%), se extrajo una muestra de biomasa de tallos y hojas por contenedor, el contenido de clorofila (CL) se registró en unidades SPAD (Soil Plant Analysis Development) (Gholizadeh, Amin, Anuar, Aimrun y Saberioon, 2011). Para el valor de las variables LV, PSV, LR, PSR, NN y PSN, se registró el promedio de dos plantas por contenedor. El contenido de clorofila se estimó mediante el promedio de tres lecturas en la lámina foliar de cada contenedor, con un medidor portátil Konica Minolta 502 Plus y el nitrógeno total mediante el método Kjeldhal (Cruz, 2013).

Los datos de las ocho variables se sometieron a análisis de varianza y se usó la prueba de Tukey ($P = 0.05$) para la comparación de promedios. Con los valores NN, PSN, NT y CL se realizó análisis de varianza de contrastes ortogonales para comparación de grupos de genotipos y un análisis de agrupamiento de componentes principales. Se obtuvieron índices de eficiencia individual (IEVi) para los 20 genotipos e índices de eficiencia compuestos por grupos de variables, como índice de eficiencia en nodulación (IEN) con las variables NN y PSN, índice de eficiencia en fijación (IEF) con las variables NT y CL e índice de eficiencia general (IEG) al considerar el conjunto de las cuatro variables. Los índices expresan el porcentaje del valor *per se* de cada variable o de grupos de variables en relación al promedio respectivo. No hay unidades de medición y se pueden hacer comparaciones entre genotipos y variables (López-Alcocer *et al.*, 2020).

El índice de eficiencia para un genotipo y para una variable (IEVi), se calculó mediante la expresión siguiente (López-Alcocer *et al.*, 2020):

$$IEVi = (Vi/\bar{X}vi)100 \quad (1)$$

Cuadro 1. Origen y ubicación geográfica de los 20 genotipos de frijol cultivado y silvestre utilizados en el ensayo de evaluación por FBN.
Table 1. Origin and geographical location of the 20 genotypes of cultivated and wild beans used in the BNF assessment trial.

No.	Genotipo	Forma	Hábito	Origen	Longitud	Latitud	Altitud
							m
1	Cuarenteño	C	Tipo I	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
2	Peruano 16	C	Tipo I	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
3	Azufrado Tapatío	C	Tipo III	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
4	Mulato	C	Tipo II	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
5	Pinto Saltillo	C	Tipo III	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
6	Flor de Mayo	C	Tipo IV	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
7	Apetito Jiménez	C	Tipo IV	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
8	Burro	C	Tipo IV	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
9	Garbancillo Zarco	C	Tipo IV	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
10	Morado de Agua	C	Tipo IV	Proyecto Frijol UDG	103° 51'	20° 74'	1658
11	ROL 452	S	Tipo IV	Teuchitlán, Jal.	103° 50'	20° 40'	1273
12	ROL 228	S	Tipo IV	Etzatlán, Jal.	104° 03'	20° 48'	1472
13	ROL 241	S	Tipo IV	Jala, Nay.	104° 26'	21° 05'	1161
14	ROL 633	S	Tipo IV	Zapotlán el Grande, Jal.	103° 33'	19° 37'	2215
15	ROL 486	S	Tipo IV	Vista Hermosa, Mich.	102° 21'	20° 08'	1536
16	ROL 242	S	Tipo IV	Magdalena, Jal.	104° 05'	20° 58'	1366
17	ROL 497	S	Tipo IV	Tacámbaro, Mich.	103° 30'	20° 44'	1583
18	ROL 322	S	Tipo IV	Acatic, Jal.	102° 58'	20° 48'	1633
19	ROL 629	S	Tipo IV	Ameca, Jal.	104° 02'	20° 23'	1781
20	ROL 517	S	Tipo IV	Chilchota, Mich.	102° 08'	19° 51'	1773

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

ROL = collector key; C = cultivated; S = wild; Type I = bushy erect determined habit; Type II = bushy erect indeterminate habit; Type III = bushy indeterminate habit prostrated; Type IV = pole bean.

Donde: $IEVi$, índice de eficiencia de un genotipo para la variable i ; Vi , valor de la variable i de un genotipo; $\bar{X}vi$, promedio de la variable i de todos los genotipos.

El índice de eficiencia de un genotipo para más de una variable (IE), se obtuvo con la expresión siguiente:

$$IE = \sum_{i=1}^n [(Vi/\bar{X}vi)/n] 100 \quad (2)$$

Donde: IE, índice de eficiencia de un genotipo para más de una variable; Vi , valor de la variable i ; $\bar{X}vi$, promedio de la variable i de todos los genotipos; n , número de variables consideradas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables de Planta

Los análisis de varianza mostraron diferencias altamente significativas en las ocho variables cuantificadas. El Cuadro 2 muestra los valores promedio de las ocho variables de los 20 genotipos, así como los valores máximo, mínimo, coeficientes de variación y el valor de la prueba de Tukey para la comparación de medias por variable. También muestra los valores promedio de las variables por grupo de genotipos. Los altos coeficientes de variación obtenidos especialmente en número y peso seco de nódulos se deben en parte a la dificultad en el registro del número de nódulos por lo pequeño de muchos de ellos.

Cuadro 2. Valores promedio de variables evaluadas en genotipos de frijol por FBN.
Table 2. Mean values and statistical parameters of evaluated variables in bean genotypes by BNF.

No	Genotipos	LV	PSV	LR	PSR	NN	PSN	NT	CL
		cm	g	cm	g		mg	%	
1	Cuarenteño	37.7 e	0.97 ab	22.3 ab	0.35 cde	331 bcd	92.03 abc	4.06 e	33.13 a
2	Peruano 16	39.8 e	1.22 ab	23.3 ab	0.43 abcde	407 abc	128.32 a	5.06 a	28.07 abcde
3	Azufrado Tapatío	58.0 de	0.71 b	24.2 ab	0.24 de	126 efgh	65.68 abcd	4.51 b	28.53 abcde
4	Mulato	55.0 de	1.16 ab	24.1 ab	0.45 abcde	179 defgh	69.58 abcd	4.39 c	32.93 a
5	Pinto Saltillo	91.8 cde	1.04 ab	24.0 ab	0.34 cde	246 cdefg	123.24 ab	4.05 e	30.57 abc
6	Flor de Mayo	177.6 ab	1.65 a	26.0 a	0.69 a	201 defgh	66.36 abcd	3.90 f	29.03 abcde
7	Apetito Jiménez	180.0 ab	1.48 a	22.6 ab	0.68 a	237 defg	57.24 bcd	3.69 g	30.97 ab
8	Burro	170.9 abc	1.26 ab	21.6 ab	0.56 abc	147 efgh	42.46 cd	4.24 d	28.10 abcde
9	Garbancillo Zarco	148.9 abc	1.02 ab	19.4 b	0.63 ab	207 defgh	68.86 abcd	4.38 c	29.73 abcd
10	Morado de Agua	153.2 abc	1.50 a	25.9 a	0.56 abc	196 defgh	49.84 cd	3.66 gh	30.07 abc
11	ROL 452	126.7 bcd	0.64 b	21.4 ab	0.23 e	59 h	12.48 d	3.91 f	26.17 abcde
12	ROL 228	171.3 abc	1.16 ab	24.0 ab	0.40 bcde	153 efgh	52.22 cd	3.89 f	23.10 cde
13	ROL 241	171.3 abc	1.15 ab	21.5 ab	0.51 abc	87 gh	18.08 d	3.69 g	28.23 abcde
14	ROL 633	196.7 ab	1.19 ab	25.7 a	0.39 bcde	545 a	128.74 a	3.68 gh	24.23 bcde
15	ROL 486	196.7 ab	1.35 ab	24.9 ab	0.43 abcde	420 ab	95.91 abc	3.59 h	23.80 bcde
16	ROL 242	196.3 ab	1.07 ab	22.5 ab	0.40 bcde	294 bcde	64.76 abcd	3.35 i	22.46 de
17	ROL 497	205.7 ab	1.22 ab	24.7 ab	0.40 bcde	259 bcdef	78.52 abcd	3.44 ij	26.60 abcde
18	ROL 322	205.2 ab	1.57 a	23.2 ab	0.49 abcd	102 fgh	44.68 cd	3.49 i	26.03 abcde
19	ROL 629	213.4 a	1.47 a	22.0 ab	0.47 abcde	119 fgh	33.40 cd	3.16 k	28.07 abcde
20	ROL 517	199.4 ab	1.65 a	25.2 ab	0.53 abc	253 bcdef	90.12 abc	3.73g	22.03 e
	Media general	149.8	1.22	23.4	0.459	228	69.12	3.89	27.59
	Valor máximo	213.4	1.65	26.0	0.69	545	128.74	5.06	33.13
	Valor mínimo	37.7	0.64	19.4	0.19	59	12.48	3.16	22.03
	CV (%)	23.5	25.95	11.5	24.29	30.99	42.17	0.77	8.57
	Tukey 0.05	80.7	0.72	6.15	0.24	162.41	68.74	0.10	7.32

Medias con las mismas letras en cada columna son estadísticamente iguales. ROL= clave del colector; LV = longitud vástago; PSV = peso seco del vástago; LR = longitud de raíz; PSR = peso seco de raíz; NN = número de nódulos; PSN = peso seco de nódulos; NT = nitrógeno total del vástago; CL = contenido de clorofila en unidades SPAD.

Means with the same letters in each column are statistically equal. ROL= collector key; LV = stem length; PSV = dry weight of the stem; LR = root length; PSR = dry weight of root; NN = number of nodules; PSN = dry weight of nodules; NT = total stem nitrogen; CL = chlorophyll content in SPAD units.

En los indicadores longitud de vástago (LV) y peso seco del vástago (PSV), ($r = 0.558$), se encontró similitud entre ellas y mayor variabilidad en peso seco del vástago. Como se esperaba, en LV los genotipos de hábito indeterminado enredador cultivados y silvestres fueron superiores al frijol de hábito arbustivo. La diferencia en altura de planta entre las variedades de hábito arbustivo y enredadores (cultivados y silvestres) se debe a la diferente capacidad genética de producción de nudos y entrenudos del tallo principal (8 a 15 nudos en las variedades arbustivas y 16 a 18 en las variedades cultivadas enredadoras) (Debouck e Hidalgo, 1985). En la variable peso seco del vástago (PSV), la mayoría de los genotipos mostraron igualdad estadística. Se esperaba que los genotipos de mayor altura de planta mostraran también mayor peso seco del vástago. El resultado obtenido puede explicarse por la turgencia de tallos y hojas en la parte superior de la planta en los genotipos guidores al momento de muestreo, ya que en la etapa de prefloración estas plantas aún estaban en crecimiento vegetativo, con alto porcentaje de agua y poca materia seca en la parte superior.

En las variables longitud de raíz (LR) y peso seco de raíz (PSR), los genotipos mostraron poca variación. En LR 19 de los 20 genotipos integraron el primero de los dos grupos de igualdad estadística. En peso seco de raíz se presentó mayor variabilidad. Los cinco genotipos cultivados de hábito enredador, dos de frijol arbustivo y cuatro de hábito silvestre, integraron el grupo de mayor peso seco de raíz con igualdad estadística entre sí. En la investigación se utilizaron contenedores pequeños, factor que pudo haber afectado el desarrollo y peso seco de la raíz. En un estudio previo, no se encontraron diferencias en longitud de raíz por efecto de las cepas de *Rhizobium* de una sola variedad de frijol como hospedero y con el mismo tipo de contenedor (López-Alcocer *et al.*, 2020).

El número de nódulos (NN) por planta presentó amplia variabilidad. La mayor variación se observó entre el frijol silvestre con un rango entre 59 y 545 nódulos por planta. Destacaron tres genotipos con más de 400 nódulos: ROL 633 (545 nódulos) y ROL 486 (420 nódulos) de la forma silvestre y Peruano 16 (407 nódulos) de frijol cultivado arbustivo, sin diferencias significativas entre ellos. La variedad Cuarenteño de frijol arbustivo también registró un alto número de nódulos (331). En frijol cultivado, se observaron dos grupos de igualdad estadística: Peruano 16 y Cuarenteño de hábito determinado (Tipo I), fueron iguales entre sí y superiores estadísticamente a las ocho variedades de frijol de hábito indeterminado (Tipos II, III y IV). No obstante, con respecto al NN hubo una clara tendencia de mayor a menor entre grupos de genotipos: cultivados arbustivos (257.8), silvestres (229.1) y cultivados trepadores (197.6). El análisis de varianza por contrastes ortogonales no detectó diferencias significativas entre grupos de genotipos.

Con respecto al peso seco de nódulos (PSN), el resultado fue similar a lo observado en NN, mostrándose una correlación positiva entre las dos variables ($R^2 = 0.854$). La mayor variabilidad en PSN se observó también en el grupo de los genotipos silvestres. Por mayor valor en PSN, destacaron tres genotipos de la forma cultivada de hábito arbustivo: Peruano 16 (128.32 mg), P. Saltillo (123.24 mg), Cuarenteño (92.3 mg) y dos poblaciones de frijol silvestre: ROL 633 (128.74 mg) y ROL 486 (95.91 mg). El análisis de contrastes ortogonales detectó diferencias significativas entre grupos de genotipos. El grupo de variedades de frijol arbustivo (95.77 mg) fue estadísticamente superior a los frijoles silvestres (61.89 mg) y cultivados enredadores (56.95 miligramos).

El resultado anterior en las variables número y peso seco de nódulos, es novedoso y diferente a lo que consignan algunos autores, quienes afirman que los frijoles cultivados de hábito enredador superan en nodulación al frijol de hábito arbustivo (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990; Farid y Navabi, 2015). El resultado obtenido puede atribuirse al origen del germoplasma utilizado en su formación y al ambiente de baja fertilidad manejado durante el proceso de evaluación y selección de los materiales cultivados.

En nitrógeno total del vástago (NT) se observó variación con valores mínimos y máximos de 3.16 y 5.06% respectivamente. Tres variedades de frijol arbustivo (Peruano 16, Azufrado Tapatío y Mulato) y un cultivar enredador (Garbancillo Zarco) registraron los valores mayores de nitrógeno en el vástago. El análisis de varianza detectó diferencias significativas entre grupos. Nuevamente destacan los genotipos cultivados arbustivos con promedio de 4.41%, los cultivados trepadores registraron 3.97% y los silvestres 3.59 por ciento.

El contenido de clorofila (CL) medida en los folíolos mostró poca variabilidad entre los genotipos, con un rango entre 22.03 y 33.13 unidades SPAD. Los resultados en esta variable mostraron similitud parcial con lo observado en NT, con una correlación entre las dos variables de 0.402. Las cinco variedades arbustivas, cinco variedades enredadoras y dos genotipos silvestres integraron el grupo de mayor contenido de clorofila con igualdad estadística. Las variedades arbustivas Cuarenteño y Mulato registraron los valores numéricos mayores con 33.13 y 32.93 unidades SPAD respectivamente. Como grupo por tipo de frijol, los genotipos cultivados arbustivos (30.65) y trepadores (29.58) estadísticamente iguales entre sí, mostraron de manera significativa mayor promedio en unidades SPAD que los silvestres (25.58).

Los resultados de la evaluación de genotipos por parámetros asociados a la eficiencia en fijación de nitrógeno y con apoyo del análisis de contrastes entre grupos permiten afirmar que en las variables NN, PSN (nodulación) y NT y CL (fijación de N), las variedades de frijol cultivado arbustivo fueron sobresalientes, superando de manera general a las variedades cultivadas de hábito trepador y a los genotipos silvestres. Este resultado, es diferente a lo señalado en la literatura revisada, donde se afirma que las variedades de hábito enredador son superiores en FBN (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990; Farid y Navabi, 2015). También se señala que el mejoramiento genético del cultivo practicado en niveles altos de fertilizantes nitrogenados ha desarrollado variedades arbustivas ineficientes en FBN (Rahmani *et al.*, 2011; Hungria *et al.*, 2013). El resultado también confirma la existencia de variabilidad

genética entre genotipos de frijol común en el proceso de FBN, como lo argumentan Ferrera-Cerrato *et al.* (1990), Romero-Rosales y Acosta (2013), Granda *et al.*, (2014) y Farid y Navabi (2015).

Índices de Eficiencia

Se construyeron índices de eficiencia individuales y por grupos de variables para el conjunto de 20 genotipos, para las variables NN, PSN (nodulación) y NT y CL (fijación), aceptando que estos caracteres no están directamente influenciados por el hábito de crecimiento de los genotipos, como las otras variables evaluadas. Los índices se obtuvieron con los promedios de las variables.

Los índices de eficiencia mostraron variabilidad genética entre los genotipos de frijol (Cuadro 3). Por índice de eficiencia en nodulación individual y compuesto (IEN) elaborados con las variables NN y PSN, destacaron las

Cuadro 3. Índices de eficiencia individuales y por grupos de variables de genotipos de frijol.
Table 3. Individual efficiency indices and by groups of variables of bean genotypes.

No.	Genotipo	IENN	IEPSN	IEN	IENT	IECL	IEF	IEG
1	Cuarenteño	145	133	139	104	120	112	126
2	Peruano 16	178	186	182	130	102	116	149
3	Azufrado Tapatío	55	95	75	116	103	110	92
4	Mulato	78	101	90	113	119	116	103
5	Pinto Saltillo	108	178	143	104	111	108	125
	Promedio cultivados arbustivos	113	139	126	113	111	112	119
6	Flor de Mayo M	88	96	92	100	105	103	97
7	Apetito Jiménez	104	83	93	95	112	104	98
8	Burro	64	61	63	109	102	105	84
9	Garbancillo Zarco	91	100	95	113	108	110	103
10	M. de Agua	86	72	79	94	109	102	90
	Promedio cultivados enredadores	87	82	84	102	107	105	95
11	ROL 452	26	18	22	101	95	98	60
12	ROL 228	67	76	71	100	84	92	82
13	ROL 241	38	26	32	95	102	99	65
14	ROL 633	239	186	212	95	88	91	152
15	ROL 486	184	139	161	92	86	89	125
16	ROL 242	129	94	111	86	81	84	97
17	ROL 497	113	114	113	88	96	92	103
18	ROL 322	45	65	55	90	94	92	73
19	ROL 629	52	48	50	81	102	91	71
20	ROL 517	111	130	121	96	80	88	104
	Promedio frijoles silvestres	100	90	95	92	91	92	93

ROL = clave del colector; IENN = índice de eficiencia en número de nódulos; IEPSN = índice de eficiencia en peso seco de nódulos; IENT = índice de eficiencia en contenido de nitrógeno total; IECL = índice de eficiencia en contenido de clorofila. IEN = índice de eficiencia en nodulación; IEF = índice de eficiencia en fijación; IEG = índice de eficiencia general en fijación biológica de nitrógeno.

ROL = collector key; IENN = efficiency index in number of nodules; IEPSN = efficiency index in dry weight of nodules; IENT = total nitrogen content efficiency index; IECL = chlorophyll content efficiency Index. IEN = nodulation efficiency index; IEF = fixation efficiency index; IEG = general efficiency index in biological nitrogen fixation.

variedades arbustivas Cuarenteño, Peruano 16 y Pinto Saltillo y los genotipos silvestres ROL 633 y ROL 486. Estas variedades también fueron identificadas como mejores por los valores *per se* de número y peso seco de nódulos (Cuadro 2). De manera similar a lo observado con los valores *per se*, hubo una relación de mayor a menor por grupos de frijol: cultivados arbustivos (126), genotipos silvestres (95) y cultivados enredadores (84).

Al observar los índices de eficiencia en fijación individuales y el índice compuesto IEF elaborados con las variables NT y CL, las variedades con los valores más altos fueron Peruano 16, Cuarenteño, Azufrado Tapatío y Mulato de hábito arbustivo, así como Garbancillo Zarco de hábito enredador. Los genotipos silvestres mostraron los promedios menores. Los valores promedio por grupos de frijol de eficiencia en fijación de nitrógeno presentan una relación similar a lo apreciado en los promedios de nitrógeno total (NT) y contenido de clorofila (CL): arbustivos cultivados (112), cultivados enredadores (105) y silvestres (92) (Cuadro 3). Por su parte el índice de eficiencia general (IEG) elaborado con las cuatro variables, señala como mejores por este parámetro, a las variedades Cuarenteño, Peruano 16 y Pinto Saltillo de hábito arbustivo y a los frijoles silvestres ROL 633 y ROL 486.

Al comparar los resultados de las evaluaciones considerando los valores de las variables *per se* y los índices de eficiencia simples y compuestos construidos con las variables NN, PSN, NT y CL, se aprecia alta correspondencia. En ambos casos, las variedades de mayor eficiencia en FBN inoculadas con un compuesto de tres cepas de *Rhizobium* (Rhizojal VC3, Rhizojal ZCB3 y Rhizojal ZGZ3) seleccionadas por eficiencia en nodulación en una evaluación previa (López-Alcocer *et al.*, 2020), fueron Peruano 16, Cuarenteño y Pinto Saltillo de frijol cultivado arbustivo. De manera similar a lo observado con los valores *per se*, el grupo de genotipos de hábito arbustivo mostró una tendencia clara de mayor eficiencia en FBN, en relación a los genotipos de hábito enredador cultivados y silvestres.

El resultado obtenido en el presente estudio donde las variedades de frijol arbustivo Peruano 16, Cuarenteño y Pinto Saltillo fueron mejores en FBN que las variedades de hábito enredador, mientras que las variedades del grupo de frijol arbustivo mostraron mayor eficiencia en relación a los dos grupos de genotipos cultivados enredadores y silvestres. Este es un resultado diferente a lo consignado en la literatura, donde se señala que el frijol arbustivo es menos eficiente en FBN que el frijol de hábito indeterminado (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990; Farid y Navabi, 2015). Rahmani *et al.* (2011) y Hungria *et al.* (2013), señalan también que el mejoramiento genético del cultivo practicado en niveles altos de fertilizantes nitrogenados ha desarrollado variedades arbustivas ineficientes en FBN. El resultado es diferente a lo encontrado en la literatura y puede atribuirse al nivel de fertilidad de los suelos donde se practicó la selección de las variedades arbustivas como Peruano 16, Cuarenteño y Pinto Saltillo, cultivares propios para siembras de temporal, o bien, al origen genético de los primeros dos genotipos señalados, que en su genealogía incluyen progenitores del Acervo Genético Andino.

Componentes Principales

El análisis de componentes principales (CP) de todas las variables sostiene que los tres primeros obtuvieron el 82.35% de la varianza total, el CP1 aportó el 35.40% y el CP2 el 28.27%. Las variables importantes asociadas al CP1, fueron longitud de vástago, peso seco de vástago y peso seco de raíz. Las variables importantes asociadas al CP2 fueron longitud de raíz, número de nódulos y peso seco de nódulos.

En el análisis "Biplot" se separaron los genotipos en dos grupos principales, con valores del CP1 de mayor contribución a la varianza total (Figura 1), del lado negativo, se ubicaron los cinco genotipos cultivados de hábito arbustivo y dos de hábito trepador (genotipos 9 y 11). Del lado positivo se ubicaron la mayoría de variedades cultivadas de hábito trepador, así como los genotipos silvestres y enredadores. Esta separación se explica por las variables importantes asociadas al CP1, como longitud de vástago, peso seco del vástago y peso seco de raíz, variables de menor valor en el frijol de tipo arbustivo (Cuadro 2).

Al considerar los valores del CP2, en la sección positiva del biplot se ubicaron los genotipos más eficientes en nodulación (1, 2, 5, 14, 15 y 20) y en la parte negativa, los genotipos menos eficientes como 11, 13, 18 y 19 (Cuadros 2). Esta separación explica las variables asociadas al CP2, principalmente NN y PSN. Al observar la posición de los vectores variable y los ángulos entre ellos que definen el grado de correlación, destacan las correlaciones entre NT y CL, NN y PSN, así como LV y PSV. Estas asociaciones concuerdan con los datos de las variables *per se*. También la ausencia de correlación lógica entre NT, LV y PSV, así como entre CL, LV y PSV.

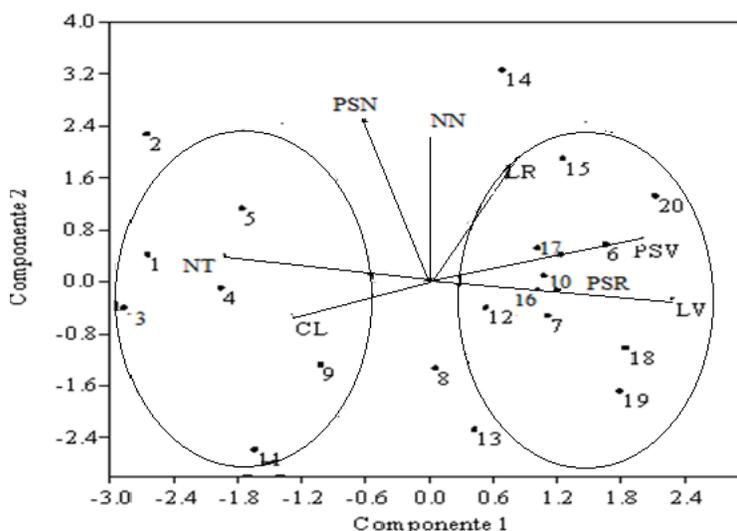


Figura 1. Ubicación de los genotipos y comportamiento de los vectores-variable con base en el análisis de componentes principales (CP) de 8 variables cuantitativas. LV = longitud del vástago; LR = longitud de raíz; NN = número de nódulos; PSV = peso seco del vástago; PSR = peso seco de raíz; PSN = peso seco de nódulos; NT = nitrógeno total; CL = contenido de clorofila.
Figure 1. Location of genotypes and behavior of variable vectors based on principal component analysis (CP) of 8 quantitative variables. LV = stem length; LR = root length; NN = number of nodules; PSV = dry weight of the stem; PSR = dry weight of root; PSN = dry weight of nodules; NT = total nitrogen; CL = chlorophyll content.

CONCLUSIONES

Los resultados del trabajo mostraron variación de los genotipos de frijol en número de nódulos, peso seco de nódulos, nitrógeno total y contenido de clorofila.

Los parámetros asociados a la eficiencia en fijación de nitrógeno, permiten afirmar que las variedades de frijol cultivado de hábito arbustivo fueron sobresalientes, superando de manera general a las variedades cultivadas de hábito enredador y a los genotipos de frijol silvestre.

Las variedades de frijol cultivado de hábito arbustivo Peruano 16, Cuarenteño y Pinto Saltillo, fueron mejores en nodulación y eficiencia en fijación de nitrógeno.

Los resultados confirman la existencia de variabilidad genética entre genotipos de frijol, revelan la presencia de cultivares de hábito arbustivo eficientes en nodulación y fijación y muestran la existencia de potencial para selección de genotipos de frijol eficientes en fijación biológica de nitrógeno.

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

AGRADECIMIENTOS

No aplicable.

LITERATURA CITADA

- Acuña, O., & Uribe, L. (1996). Inoculación de frijol común con tres cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv *Phaseoli*. *Agronomía Mesoamericana*, 7, 35-40.
- Ángeles-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. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i5.588>.
- Apáez-Barrios, P., Escalante-Estrada, J. A. S., Sosa-Montes, E., Rodríguez-González, M. T., & 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.
- Argaw, A., & Tsigie, A. (2015). Indigenous rhizobia population influences the effectiveness of Rhizobium inoculation and need of inorganic N for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) production in eastern Ethiopia. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 2, 1-13.
- Cruz, G. (2013). Boric acid in Kjeldahl analysis. *Journal of Chemical Education*, 90(12), 1645-1648. <https://doi.org/10.1021/ed4003767>
- Debouck, D., & Hidalgo, R. (1985). Morfología de la planta de frijol común. En M. F. López, A. Fernández, & Schoonhoven (Eds). *Frijol: Investigación y Producción* (pp. 7-41). Cali, Colombia: CIAT.
- 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.
- Farid, M., & Navabi, A. (2015). N₂ fixation ability of different dry bean genotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 95(6), 1243-1257.
- Fernández-Pascual, M., María, N., & Felipe, M. R. (2002). Fijación biológica de nitrógeno: factores limitantes. En *Ciencia y Medio Ambiente* (pp. 195-202) México: Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA).
- Ferrera-Cerrato, R., Almaraz, J. J., Rodríguez, M. N., & Espinosa, D. (1990). Fijación simbiótica de nitrógeno en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Terra*, 8, 35-70.
- Ferrera-Cerrato, R., González, M., & Rodríguez, M. (1993). *Manual de Agromicrobiología*. México: Editorial Trillas.
- Gholizadeh, A., Amin, M. S. M., Anuar, A. R., Aimrun, W., & Saberioon, M. M. (2011). Temporal variability of SPAD chlorophyll meter readings and its relationship to total Nitrogen in neaves within a Malaysian paddy field. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5, 236-245.
- Granda-Mora, K., Ochoa-Tapia, M., Ruilova-Vasquez, V., Guamán-Díaz, F., & Torres-Gutiérrez, R. (2014). Evaluación de cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro de Biotecnología*, 3, 25-37.
- Gómez, A. L., Hernández, G., Sánchez, T., Toscano, V., & Sánchez, M. (1998). Interacción genotipo de frijol común-cepa de *Rhizobium*. *Agronomía Mesoamericana*, 9, 93-97. <https://doi.org/10.15517/am.v9i1.24648>
- Hungria, M., Noriega, M. A., & Silva R. (2013). Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirillum: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soil*, 49, 791-801.
- Lépiz-Ildefonso, R., & Ramírez-Delgadillo, R. (2010). *Los parientes silvestres del frijol común en el occidente de México*. Guadalajara, Jalisco, México: Universidad de Guadalajara.
- López-Alcocer, J. D. J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macías, R., & López-Alcocer, E. (2020). Biological nitrogen fixation efficiency in strains of *Rhizobium* spp. collected in cultivated and wild bean. *Terra Latinoamericana*, 38(4), 841-852. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i4.654>
- McFarland, J. (1970). 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(14), 1176-1178.
- Olivares, J., Bedmar, E. J., & Sanjuán, J. (2013). Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), 486-494.
- Rahmani, H. A., Räsänen, L. A., Afshari, M., & Lindström, K. (2011). Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in soils of Iran. *Applied Soil Ecology*, 48(3), 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.04.010>
- Rodríguez, M. M. N. (1993). Asociación *Rhizobium*-leguminosa In R. Ferrera-Cerrato, M. C. 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.
- Van Kessel, C., & Hartley, C. (2000). Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation?. *Field Crops Research*, 65(2-3), 165-181.