

Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de *Rhizobium* spp. recolectadas en frijol cultivado y silvestre

Biological nitrogen fixation efficiency in strains of *Rhizobium* spp. collected in cultivated and wild bean

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

¹ Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara. Camino Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac. 44600 Zapopan, Jalisco, México.

* Autor para correspondencia (rogelio.lepiz@academicos.udg.mx)

RESUMEN

Se evaluó la eficiencia en fijación biológica de nitrógeno (FBN) de 27 cepas de *Rhizobium* spp. recolectadas en frijol silvestre y cultivado del occidente de México, al utilizar como hospedero la variedad de frijol Cuarenteño. El trabajo se realizó bajo malla sombra, se usó un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones y se evaluaron longitud de vástago (LV) y de raíz (LR), peso seco de vástago (PSV) y de raíz (PSR), número de nódulos (NN) y peso seco de nódulos (PSN), nitrógeno total del vástago (NT) y contenido de clorofila (CL). Se realizaron análisis de varianza y de componentes principales; se obtuvieron índices de eficiencia por variable y por grupos de variables. Se detectaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en seis de las ocho variables registradas. Por el valor *per se* de las variables, se seleccionaron Rhizojal VC3 colectada en frijol silvestre y Rhizojal ZCB3, Rhizojal ZCB1, Rhizojal TP2 y Rhizojal TP3 obtenidas en frijol cultivado. Por índices de eficiencia simples y por grupos de variables, se escogieron Rhizojal VC3, Rhizojal ZCB3 y Rhizojal TP2. El análisis de componentes principales separó a la mayoría de las cepas en dos grupos: cepas procedentes de la forma silvestre de frijol y cepas colectadas en frijol cultivado. Las cepas Rhizojal ZCB3, Rhizojal TP2 y Rhizojal TP3, mostraron los mayores valores en la escala del CPI; la cepa Rhizojal VC3, se ubicó del lado de los aislados de origen cultivado.

Considerando los análisis realizados, las cepas identificadas como mejores en FBN fueron Rhizojal VC3 de frijol silvestre y Rhizojal ZCB3 y Rhizojal TP2 de origen cultivado. Los resultados indican que los índices de eficiencia contribuyen a la evaluación y selección de cepas por FBN y que existe potencial para identificar cepas de *Rhizobium* eficientes en FBN en la región occidente de México.

Palabras clave: componentes principales, índices de eficiencia, materia seca, nodulación, *Phaseolus vulgaris* L.

SUMMARY

To assess efficiency in biological nitrogen fixation (BNF) of 27 *Rhizobium* spp. strains from plants of cultivated and wild bean from the western region of Mexico, a trial was conducted in mesh shade using a variety of bean Cuarenteño as host. A completely randomized experimental design was used with five replications and eight variables were recorded: stem length (SL) and root (RL), dry weight of stem (DSW) and root (DRW), number (NN) and dry weight of nodules (NDW), total nitrogen (TN) stem and chlorophyll content (CL). Analyses of variance and principal components were performed; efficiency indices were obtained by variable and groups of variables. Highly significant differences ($P \leq 0.01$) were detected in six of the eight variables recorded. By variable value *per se*,

Cita recomendada:

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

Recibido: 11 de octubre de 2019.

Aceptado: 14 de mayo de 2020.

Publicado en *Terra Latinoamericana* 38: 831-852.

Rhizojal VC3 collected in wild bean and Rhizojal ZCB3, Rhizojal ZCB1, Rhizojal TP2 and Rhizojal TP3 obtained in cultivated beans were selected. Rhizojal VC3, Rhizojal ZCB3 and Rhizojal TP2 were chosen by simple and group variable efficiency indexes. The analysis of main components separated most of the strains into two groups: strains from wild bean and strains collected in cultivated beans. Strains Rhizojal ZCB3, Rhizojal TP2 and Rhizojal TP3 showed higher values on the scale of the CPI; strain Rhizojal VC3, stood on the side of cultivated origin isolates. Considering the analyses performed, the strains identified as best in BNF were Rhizojal VC3 of wild bean and Rhizojal ZCB3 and Rhizojal TP2 of cultivated origin. The results indicated that the efficiency indices contributed to strain evaluation and selection by BNF and that the potential exists to identify efficient *Rhizobium* strains in BNF in the western region of Mexico.

Index words: principal component analysis, efficiency index, dry matter, nodulation, *Phaseolus vulgaris* L.

INTRODUCCIÓN

La simbiosis leguminosa-*Rhizobium* es el proceso biológico capaz de convertir nitrógeno atmosférico elemental (N_2) en amonio (NH_4^+), forma aprovechable por las plantas. Los rizobios de los nódulos reducen entre 50 y 70% del nitrógeno biológicamente fijado en el mundo y aportan hasta 65% del nitrógeno utilizado en la agricultura (Simon *et al.*, 2014). Se estima que los niveles de fijación biológica del nitrógeno (FBN) a través de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium*, puede variar desde 24 hasta 584 kg N ha⁻¹, proceso que puede ser capaz de abastecer en algunos casos hasta 90% de las necesidades de las plantas (Ángeles-Núñez y Cruz-Acosta, 2015).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una leguminosa poco eficiente en fijación biológica de nitrógeno (Gómez *et al.*, 1998; Granda *et al.*, 2009; Yadegari, 2014). 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-cepa de *Rhizobium* eficiente en FBN (Acuña y Uribe, 1996; Granda *et al.*, 2014; Farid y Navabi, 2015). En frijol, Ferrera-Cerrato *et al.* (1990) reportan diferencias en los niveles de fijación de nitrógeno entre variedades, desde 7.1 hasta 106.5 kg ha⁻¹.

Los trabajos de investigación encaminados a evaluar cepas de *Rhizobium* en diferentes leguminosas de importancia agrícola, entre ellas el frijol común, han sido orientados a la selección de cepas de mayor eficiencia en el proceso de fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Granda *et al.*, 2014). Desde 1988 a 1992 el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) realizó trabajos sobre FBN en la Zona Andina con el objetivo de aumentar la producción y productividad del frijol solo y asociado con maíz, mediante la selección y uso de cepas de *Rhizobium* eficientes en la fijación de N_2 , con capacidad competitiva contra las cepas nativas y con un rango amplio de adaptación. Esta investigación se realizó en laboratorio, invernadero y en campos de agricultores de la sierra peruana, donde se seleccionaron cuatro cepas con las características deseadas: CIAT 7001, Cusco 10, CIAT 2 y Cajamarca 13. En los ensayos de campo se lograron incrementos de 22 % en el rendimiento de frijol (Pineda, 1992).

Ferrera-Cerrato *et al.* (1990), evaluaron 98 aislados colectados en raíces de frijol cultivado de nueve estados de la Mesa Central y del Norte-Centro de México en variedades de frijol de diferente hábito de crecimiento. Por número de nódulos efectivos y producción de materia seca, encontraron que 37.5% de las cepas estudiadas se comportaron como efectivas en más de una variedad, el 26% como efectiva en dos variedades, 10% en tres variedades y únicamente la cepa EL 63 resultó efectiva en todas las variedades de frijol común. Esta variabilidad fue evidente en fijación entre las cepas de *Rhizobium* y una mejor nodulación en variedades de hábito indeterminado. Estos autores también afirman que es factible incrementar la fijación de nitrógeno del frijol en el campo, mediante la selección de cepas efectivas y competitivas, capaces de sobrevivir y adaptarse a las condiciones del suelo, así como la selección de variedades de frijol con alta capacidad de fijar nitrógeno en simbiosis con *Rhizobium*.

Acuña *et al.* (2001) realizaron estudios en validación de inoculantes con cepas de *Rhizobium* en Centro América en 45 sitios de Panamá, Costa Rica, Nicaragua y el Salvador, con el objetivo de evaluar el efecto de los inoculantes en la producción comercial de frijol, considerando cuatro tratamientos: testigo absoluto (sin fertilización ni inoculación), inoculado, fertilización nitrogenada intermedia más inóculo y fertilización recomendada localmente. En Panamá la fertilización recomendada presentó los mayores

rendimientos, seguida del tratamiento fertilización intermedia más inoculo. En Costa Rica y Nicaragua se obtuvieron los mayores rendimientos con fertilización intermedia más inoculo y fertilización recomendada. En El Salvador los mayores rendimientos de frijol se lograron con la fertilización intermedia más inoculo. Los autores concluyen que, no obstante, la buena respuesta del frijol al tratamiento combinado de fertilización nitrogenada intermedia más *Rhizobium* o fertilización recomendada, por menor costo de inversión el tratamiento seleccionado como mejor en el 80% de los casos, fue el de solo inoculante.

Mostasso *et al.* (2002), evaluaron 36 aislados y dos cepas comerciales de *Rhizobium* en dos variedades de frijol, con el objetivo de seleccionar cepas eficientes en fijación de nitrógeno. Reportaron que 10 de los aislados mostraron igual o mayor capacidad de fijación de nitrógeno en comparación con la cepa comercial CIAT 899, en ambas variedades. Concluyeron que los aislados seleccionados pueden ser utilizados como inoculantes para reducir el uso de fertilizante nitrogenado.

En los trabajos de evaluación y selección de cepas de *Rhizobium* eficientes en fijación biológica de nitrógeno atmosférico, la mayoría de los investigadores han considerado como variables importantes el número y peso seco de nódulos y peso seco de la parte aérea en ensayos de invernadero. Índices de eficiencia han sido poco utilizados en la evaluación y selección de cepas, índices que combinen más de una variable y que permitan hacer una mejor discriminación y distinción de cepas efectivas. Bécquer *et al.* (2013), utilizaron dos índices: índice de nodulación (IN) e índice de eficiencia de la inoculación (IEI) para selección de cepas de *Bradyrhizobium* de *Centrocema* spp. El IN lo estimaron dando valores numéricos (3, 2 o 1) al tamaño, color y cantidad de nódulos y multiplicando los tres valores obtenidos en cada aislado. El IEI se calculó usando el peso seco del vástago y la fórmula: (tratamiento inoculado - tratamiento no inoculado) / tratamiento no inoculado, todo multiplicado por 100.

La presencia en el suelo de cepas nativas poco eficientes y muy competitivas, así como algunos aspectos abióticos del suelo que afectan el proceso de infección, contribuyen a la baja eficiencia en la fijación de N₂ del binomio frijol-*Rhizobium* (Mora,

1995; Martínez-Romero, 2001; Castro *et al.*, 2006). Estos autores afirman que la selección de cepas eficientes y competitivas debe realizarse directamente en el área de producción, donde como primer paso se deben de colectar rizobios nativos y como segundo, evaluarlos por eficiencia en fijación en las variedades locales y bajo las condiciones de clima y suelo del área de producción. Esta estrategia puede fructificar en un incremento en la tasa de fijación (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990; Granda *et al.*, 2014).

Con base en la variabilidad genética del frijol (Lépiz y Ramírez, 2010) y del *Rhizobium* (López *et al.*, 2017) en la región occidente de México, el presente trabajo tuvo el objetivo de evaluar la eficiencia en FBN de 27 cepas de *Rhizobium* procedentes de nódulos colectados en plantas de frijol cultivado y silvestre de los estados mexicanos de Jalisco y Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se condujo bajo malla sombra en el municipio de Zapopan, Jalisco, México. Se emplearon 27 cepas de *Rhizobium* (Cuadro 1), nueve procedentes de raíces de plantas de frijol silvestre y 18 de frijol cultivado, colectadas en los estados de Jalisco y Michoacán (Cuadro 2). El trabajo de colección, aislamiento, purificación, conservación e incremento de las cepas en el laboratorio, se describe por López *et al.* (2017). Como hospedero se utilizó la variedad de frijol cultivado Cuarenteño de hábito determinado, cultivar con antecedentes de eficiencia en la producción de nódulos (Com. Pers.¹).

Las cepas se incrementaron en medio CELM (Ángeles-Núñez y Cruz-Acosta, 2015) en tubos de vidrio de 10 mL puestos en agitación a 180 rpm, hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento de 10⁸ UFC mL⁻¹, de acuerdo con la escala de McFarland (McFarland, 1970). Las semillas de frijol se lavaron con jabón, se esterilizaron en etanol al 70% por un minuto, se enjuagaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril, se transfirieron a una solución de hipoclorito de sodio al 10% durante tres minutos y finalmente se lavaron cinco veces con agua destilada estéril (Rodríguez, 1993).

¹ Rogelio Lépiz-Ildefonso, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara.

Cuadro 1. Características morfológicas de las 27 cepas de *Rhizobium* spp. utilizadas en el estudio de fijación biológica de nitrógeno (FBN).**Table 1. Morphological characteristics of the 27 strains of *Rhizobium* spp. used in the study of biological nitrogen fixation (BNF).**

Número cepa	Código de cepa	Sitio de origen	Forma de frijol	Características				
				Forma	Color	Aspecto	Borde	Textura
1	Rhizojal VC1	Nevado de Colima	S	Convexa	blanco	traslúcida	liso	gomosa
2	Rhizojal VC2	Nevado de Colima	S	Convexa	blanco	traslúcida	liso	gomosa
3	Rhizojal VC3	Nevado de Colima	S	Convexa	blanco	traslúcida	liso	gomosa
4	Rhizojal BH1	Huentitán	S	Convexa	blanco	traslúcida	liso	gomosa
5	Rhizojal BH2	Huentitán	S	Convexa	blanco	traslúcida	liso	gomosa
6	Rhizojal BH3	Huentitán	S	Convexa	blanco	traslúcida	liso	gomosa
7	Rhizojal SA1	San Andrés	S	Cupular	blanco	traslúcida	liso	acuosa
8	Rhizojal SA2	San Andrés	S	Cupular	blanco	traslúcida	liso	acuosa
9	Rhizojal SA3	San Andrés	S	Cupular	blanco	traslúcida	liso	acuosa
10	Rhizojal ZMA1	Zapopan	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
11	Rhizojal ZMA2	Zapopan	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
12	Rhizojal ZMA3	Zapopan	D	Convexa	blanco	opaca	liso	acuosa
13	Rhizojal ZGZ1	Zapopan	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
14	Rhizojal ZGZ2	Zapopan	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
15	Rhizojal ZGZ3	Zapopan	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
16	Rhizojal ZAT1	Zapopan	D	Cupular	blanco	traslúcida	liso	acuosa
17	Rhizojal ZAT2	Zapopan	D	Cupular	blanco	traslúcida	liso	acuosa
18	Rhizojal ZAT3	Zapopan	D	Cupular	blanco	traslúcida	liso	acuosa
19	Rhizojal ZCB1	Zapopan	D	cupular	blanco	traslúcida	liso	acuosa
20	Rhizojal ZCB2	Zapopan	D	cupular	blanco	traslúcida	liso	acuosa
21	Rhizojal ZCB3	Zapopan	D	Cupular	blanco	traslúcida	liso	acuosa
22	Rhizojal TP1	Tizapán	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
23	Rhizojal TP2	Tizapán	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
24	Rhizojal TP3	Tizapán	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
25	Rhizomich CR1	Cojumatlán	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
26	Rhizomich CR2	Cojumatlán	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa
27	Rhizomich CR3	Cojumatlán	D	Convexa	blanco	opaca	liso	gomosa

S = frijol silvestre; D = frijol domesticado.

S = wild bean; D = domesticated beans.

Las 27 cepas y dos tratamientos testigo (absoluto sin fertilización ni inoculación y fertilizado con 30 kg ha⁻¹ de N) se evaluaron en un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. Se sembraron cuatro semillas

de frijol por contenedor de plástico de 1 L con arena (jal) tamizada en una zaranda de 4 × 4 mm, lavada y desinfectada con Bromometano (80 g m⁻³ y 48 horas de exposición; evitar su inhalación); después de

la emergencia se dejaron dos plantas por contenedor y se aplicaron 2 mL de inóculo. Durante el ensayo se aplicaron riegos con solución nutritiva de Jensen libre de nitrógeno, tres veces por semana. El registro de las variables se realizó en la etapa de prefloración del frijol.

Se midieron longitud de vástago, considerado como altura de planta (LV), longitud de raíz (LR), número de nódulos (NN), peso seco del vástago (PSV), peso seco de raíz (PSR), peso seco de nódulos (PSN), nitrógeno total (%) en el vástago (NT) y contenido de clorofila (CL) en unidades SPAD (Soil Plant Analysis Development) (Gholizadeh *et al.*, 2011). Para el registro de las variables LV, LR, PSV, PSR, NN y PSN se usó el promedio de dos plantas por contenedor. Para número de nódulos, las raíces se lavaron en un contenedor con agua por dos veces, se separaron y se contaron. Para NT se extrajo una muestra de biomasa de tallos y hojas por contenedor. Para obtener el peso seco, las muestras de biomasa y los nódulos se colocaron en una

estufa marca Binder (D-78532 Germany) a 40 °C hasta que se observó peso constante. El nitrógeno total se evaluó con base en el método Kjeldhal (AOAC, 1990). El contenido de clorofila (CL) se determinó como el promedio de tres lecturas en la lámina foliar de cada contenedor y se utilizó un medidor portátil Konica Minolta® 502 Plus.

Los datos obtenidos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA). En las variables con diferencias significativas se realizó la comparación de medias Tukey ($P \leq 0.05$). Los análisis de varianza y la prueba de medias se realizaron con el programa de cómputo SAS® Ver. 9.4. Se realizó un análisis de componentes principales con el programa Past3exe. Además, se obtuvieron índices de eficiencia de las cepas para cada una de las variables (IEVi) que resultaron con diferencias significativas. Con los valores de NN y PSN se estimó el índice de eficiencia en nodulación (IEN) y con las variables PSV, PSR y NT se calculó

Cuadro 2. Ubicación geográfica de los sitios de recolecta de 27 cepas de *Rhizobium* spp. utilizados en el estudio de fijación biológica de nitrógeno.

Table 2. Geographical location of the collection sites of 27 strains of *Rhizobium* spp. used in the study of biological nitrogen fixation.

Cepas	Forma	Sitio	Tipo de suelo	Tipo de vegetación	Longitud	Latitud	Altitud
							m
Rhizojal VC1, VC2, VC3	S	Nevado de Colima, Jalisco	Leptosol orgánico	Encino	103° 37'	19° 37'	2168
Rhizojal BH1, BH2, BH3	S	Barranca Huentitán, Jalisco	Leptosol pedregoso	Leguminosas	103° 17'	20° 43'	1326
Rhizojal SA1, SA2, SA3	S	San Andrés, Jalisco	Leptosol pedregoso	Encino y leguminosas	103° 27'	19° 49'	1605
Rhizojal ZMA1, ZMA2, ZMA3	C	Zapopan, Jalisco	Regosol cultivado	Cultivos	103° 30'	20° 44'	1580
Rhizojal ZGZ1, ZGZ2, ZGZ3	C	Zapopan, Jalisco	Regosol Cultivado	Cultivos	103° 30'	20° 44'	1580
Rhizojal ZAT1, ZAT2, ZAT3	C	Zapopan, Jalisco	Regosol cultivado	Cultivos	103° 30'	20° 44'	1580
Rhizojal ZCB1, ZCB2, ZCB3	C	Zapopan, Jalisco	Regosol cultivado	Cultivos	103° 30'	20° 44'	1580
Rhizojal TP1, TP2, TP3	C	Tizapán el Alto, Jalisco	Phaeozem cultivado	Cultivos	102° 36'	20° 02'	1532
Rhizomich CR1, CR2, CR3	C	Cojumatlán, Michoacán	Phaeozem cultivado	Cultivos	102° 52'	20° 08'	1520

S = frijol silvestre; D = frijol domesticado.

S = wild bean; D = domesticated beans.

el índice de eficiencia en fijación de nitrógeno (IEF). Asimismo, se obtuvo el índice de eficiencia general (IEG) para una cepa, considerando las cinco 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 cepas y variables.

El índice de eficiencia para una cepa y para una variable ($IEVi$), se calculó utilizando la siguiente Ecuación 1:

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

donde: $IEVi$ = índice de eficiencia de una cepa para la variable i ; Vi = valor de la variable i de una cepa; \bar{X}_{vi} = promedio de la variable i de todas las cepas.

El índice de eficiencia para más de una variable (IE), se obtuvo con la Ecuación 2:

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

donde: IE = índice de eficiencia de una cepa para más de una variable; Vi = valor de la variable i ; \bar{X}_{vi} = promedio de la variable i de todas las cepas; n = número de variables consideradas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Variables Cuantitativas

Se detectaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre cepas de *Rhizobium* en seis de las ocho variables cuantificadas; las excepciones fueron longitud de raíz y contenido de clorofila. El Cuadro 3 muestra los valores promedio de cada variable en las 27 cepas y los dos tratamientos testigo incluidos, así como las comparaciones de promedios (Tukey 0.05).

Longitud de vástago. En LV la cepa Rhizojal SA3 (37.2 cm) fue superior al testigo absoluto (28.1 cm) e igual al testigo fertilizado (32.1 cm). Cinco cepas iguales a Rhizojal SA3 mostraron alturas mayores a los 35 cm: Rhizojal VC3, Rhizojal BH1 y Rhizojal BH3 de origen silvestre y Rhizojal ZAT2 y Rhizomich CR1 de origen cultivado (Cuadro 2). Otros trabajos también consignan diferencias entre cepas en esta variable (Mayz *et al.*, 2010; Liriano *et al.*, 2012).

Longitud de raíz. Aunque existen antecedentes sobre efectos positivos de algunas cepas sobre la longitud de raíz (Karaca y Uyanöz, 2012); en la presente investigación no se detectaron efectos de las cepas sobre esta variable, probablemente por la poca profundidad del contenedor utilizado (14 cm).

Peso seco de vástago. En PSV Rhizojal ZCB3 (1.25 g) y Rhizojal TP3 (1.25 g) ambas de origen cultivado, superaron al testigo absoluto (0.97 g). La cepa Rhizojal ZCB1 (1.21 g) también de frijol cultivado, mostró alto valor en esta variable. En evaluación de cepas por FBN, la variable PSV ha sido uno de los parámetros más utilizados y confiables (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990; Hernández *et al.*, 1999; Mayz *et al.*, 2010; Rahmani *et al.*, 2011).

Peso seco de raíz. En esta variable sólo la cepa Rhizojal BH3 de origen silvestre con peso seco de 0.86 g, fue superior a los dos tratamientos testigo (TA, 0.48 g y TF, 0.47 g); Rhizojal ZMA1, Rhizojal ZCB1 y Rhizojal CR1 de frijol cultivado, fueron iguales a Rhizojal BH3.

Número de nódulos. Seis cepas superaron al testigo absoluto en NN (162 nódulos), sobresalieron Rhizojal CV3 colectado en frijol silvestre y Rhizojal ZGZ3 y Rhizojal ZCB3 obtenidos en frijol cultivado, con más de 340 nódulos por planta. Esta variable se considera importante en la evaluación de cepas por FBN (Kenení *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2011; Liriano *et al.*, 2012; Granda *et al.*, 2014).

Peso seco de nódulos. La cepa Rhizojal ZCB3 presentó 137 mg de PSN, colectada en frijol cultivado, fue superior al tratamiento testigo fertilizado con 65 mg; cepas iguales a Rhizojal ZCB3 y con valores altos, fueron Rhizojal VC3, Rhizojal ZAT1 y Rhizojal TP2. El análisis de varianza registró un alto coeficiente de variación (30.8%), situación que restringió una mejor discriminación en PSN entre las cepas evaluadas.

Nitrógeno total. En porcentaje de nitrógeno total del vástago, 25 cepas superaron al testigo absoluto (3.49%) y cuatro fueron estadísticamente iguales al testigo fertilizado (4.38%): Rhizojal BH1 de origen silvestre y Rhizojal ZGZ2, Rhizojal TP3 y Rhizomich CR2 de frijol cultivado. Esta variable también ha sido utilizada por muchos investigadores, quienes consignan valores entre 4.1 a 5.39% (Ferrera-Cerrato *et al.*, 1990), que son similares a lo obtenido en la presente investigación.

Cuadro 3. Valores promedio y parámetros estadísticos de las variables registradas en la evaluación de 27 cepas de *Rhizobium* spp. por fijación biológica de nitrógeno (FBN).**Table 3. Average values and statistical parameters of the variables recorded in the evaluation of 27 strains of *Rhizobium* spp. by biological nitrogen fixation (BNF).**

Cepa	Código	LV	LR	PSV	PSR	NN	PSN	NT	CL
		----- cm -----		----- g -----			mg	%	SPAD
1	Rhizojal VC1	28.7 abc	17.7	0.89 de	0.47 bc	279 abcd	68 bc	4.00 ghi	39.0
2	Rhizojal VC2	32.9 abc	16.9	0.97 bcde	0.53 bc	217 bcd	49 c	3.90 ijk	37.1
3	Rhizojal VC3	35.1 abc	17.4	1.01 abcde	0.42 c	395 a	120 ab	4.10 defgh	40.5
4	Rhizojal BH1	35.8 abc	20.2	1.00 abcde	0.47 bc	274 abcd	60 bc	4.37 a	41.7
5	Rhizojal BH2	32.7 abc	18.5	0.85 e	0.54 bc	180 cd	65 bc	3.68 lm	36.1
6	Rhizojal BH3	35.6 abc	17.6	0.99 abcde	0.86 a	177 cd	63 bc	4.02 fghi	37.4
7	Rhizojal SA1	32.0 abc	20.3	0.95 bcde	0.52 bc	268 abcd	58 ab	3.82 jkl	39.2
8	Rhizojal SA2	31.2 abc	20.8	0.97 bcde	0.62 abc	312 abc	86 abc	4.20 bcd	34.9
9	Rhizojal SA3	37.2 a	18.3	0.94 bcde	0.52 bc	239 bcd	87 abc	3.68 lm	39.0
10	Rhizojal ZMA1	33.1 abc	19.3	1.00 abcde	0.65 abc	323 abc	102 abc	3.67 lm	36.3
11	Rhizojal ZMA2	33.6 abc	20.0	1.03 abcde	0.49 bc	285 abcd	76 abc	4.01 fghi	40.0
12	Rhizojal ZMA3	32.1 abc	19.2	1.11 abcde	0.46 bc	277 abcd	92 abc	3.94 hij	36.8
13	Rhizojal ZGZ1	31.8 abc	18.4	0.95 bcde	0.55 bc	230 bcd	87 abc	3.73 klm	40.3
14	Rhizojal ZGZ2	33.9 abc	18.8	0.92 cde	0.48 bc	285 abcd	70 abc	4.26 ab	36.5
15	Rhizojal ZGZ3	33.2 abc	18.1	1.07 abcde	0.39 c	342 ab	101 abc	3.69 lm	39.5
16	Rhizojal ZAT1	32.5 abc	18.4	1.07 abcde	0.55 bc	214 bcd	121 ab	4.18 bcde	38.3
17	Rhizojal ZAT2	35.1 abc	18.6	1.18 abc	0.41 c	314abc	102 abc	3.45 o	41.1
18	Rhizojal ZAT3	31.7 abc	18.3	1.12 abcd	0.46 bc	190 cd	65 bc	3.89 ij	42.1
19	Rhizojal ZCB1	28.9 abc	20.0	1.21 ab	0.66 abc	214 bcd	74 abc	3.60 mn	40.6
20	Rhizojal ZCB2	28.1 bc	18.9	1.15 abcd	0.60 abc	209 bcd	91 abc	4.04 efgh	41.5
21	Rhizojal ZCB3	27.2 c	18.7	1.25 a	0.55 bc	341 ab	137 a	4.19 bcde	43.2
22	Rhizojal TP1	31.5 abc	17.6	1.12 abcde	0.49 bc	240 bcd	81 abc	4.14 bcdef	41.2
23	Rhizojal TP2	31.5 abc	19.8	1.20 ab	0.56 bc	266 abcd	123 ab	4.17 bcde	39.1
24	Rhizojal TP3	31.7 abc	19.1	1.25 a	0.52 bc	282 abcd	110 abc	4.26 ab	37.0
25	Rhizomich CR1	36.4 ab	19.7	1.04 abcde	0.7 ab	199 bcd	113 abc	4.10 cdefg	37.8
26	Rhizomich CR2	31.8 abc	19.0	0.97 bcde	0.47 bc	287 abcd	100 abc	4.24 abc	39.5
27	Rhizomich CR3	29.5 abc	20.0	1.10 abcde	0.55 bc	233 bcd	94 abc	3.97 ghi	40.8
	Testigo absoluto (TA)	28.09 bc	18.2	0.97 bcde	0.48 bc	162 d	90 abc	3.49 no	39.4
	Testigo fertilizado (TF)	32.1 abc	19.3	1.13 abcd	0.47 bc	195 bcd	65 bc	4.38 a	37.1
	Valor máximo	37.2	20.8	1.25	0.86	395	137	4.38	43.2
	Valor mínimo	27.2	17.4	0.85	0.39	162	49	3.45	34.9
	Promedio	32.2	18.9	1.05	0.53	256	87.85	3.97	39.1
	CV (%)	10.65	8.9	10.39	20.15	23.18	30.83	0.98	8.4
	Tukey 0.05	7.87	NS	0.25	0.25	136.2	62.1	0.13	NS

LV = longitud del vástago; LR = longitud de raíz; PSV = peso seco del vástago; PSR = peso seco de raíz; NN = número de nódulos; PSN = peso seco de nódulos; NT = porcentaje de nitrógeno total; CL = contenido de clorofila (valores SPAD). SPAD = Soil Plant Analysis Development. Letras diferentes en cada columna denotan diferencias estadísticamente significativas con base en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). LV = stem length; LR = root length; PSV = stem dry weight; PSR = root dry weight; NN = number of nodules; PSN = dry weight of nodules; NT = percentage of total nitrogen; CL = chlorophyll content (SPAD values). SPAD = Soil Plant Analysis Development. Different letters in each column denote statistically significant differences based on Tukey's test ($P \leq 0.05$).

Contenido de clorofila. No se encontraron diferencias significativas entre cepas, sin embargo, se detectaron diferencias en producción de materia seca y porcentaje de nitrógeno total, y aunque se esperaban diferencias significativas en el contenido de clorofila por estar relacionada directamente con el contenido de nitrógeno, sin embargo, la medición de esta variable es indirecta mediante unidades de intensidad de coloración.

El análisis de resultados de las variables con diferencias significativas, permitió identificar las cepas con valores altos en cada caso. Las cepas seleccionadas en más de tres ocasiones, fueron Rhizojal VC3 y Rhizojal SA2 colectadas en frijol silvestre y Rhizojal ZCB3, Rhizojal TP2 y Rhizojal CR1 obtenidas en frijol cultivado.

Índices de Eficiencia

Los índices de eficiencia por cepa y variable (índices simples) y por grupos de variables (índices compuestos), se muestran en el Cuadro 4. Por índices de eficiencia simples, al seleccionar las cuatro cepas con los valores mayores en cada variable, Rhizojal ZCB3 se escogió en cuatro ocasiones y Rhizojal VC3, Rhizojal ZCB1, Rhizojal TP2 y Rhizojal TP3 en dos casos cada una. De la misma manera, al seleccionar las cuatro cepas con los valores mayores en los índices compuestos, en índice de eficiencia en nodulación (IEN) fueron mejores Rhizojal VC3, Rhizojal ZGZ3, Rhizojal ZCB3 y Rhizojal TP2; por índice de eficiencia en fijación (IEF), fueron seleccionadas Rhizojal BH3, Rhizojal ZCB3, Rhizojal TP2 y Rhizomich CR1 y por índice de eficiencia general, Rhizojal VC3, Rhizojal ZCB3 y Rhizojal TP2 y Rhizojal TP3.

Utilizando índices de eficiencia y la metodología de selección practicada, se aprecia que las cepas Rhizojal VC3 de origen silvestre, Rhizojal ZCB3 y Rhizojal TP2 de frijol cultivado, están presentes tanto en la selección por índices simples, como en los tres casos de índices compuestos, excepto Rhizojal VC3 que no fue incluida en IEF. Rhizojal VC3 mostró alta eficiencia en nodulación, atributo que no se tradujo en alta eficiencia en fijación por su bajo valor en PSR. El resultado sugiere que la buena nodulación de una cepa, no siempre se traduce en alta eficiencia en FBN, por lo que deben considerarse variables como PSV, PSR y NT. El resultado del análisis por índice

de eficiencia general (IEG), indica que las mejores cepas en FBN fueron Rhizojal VC3 (113) de origen silvestre y Rhizojal ZCB3 (122) y Rhizojal TP2 (113) colectadas en variedades de frijol cultivado. Estas cepas también pertenecen al grupo de cinco rizobios seleccionados por su valor *per se* en las variables de efectos significativos (Cuadro 3).

El Cuadro 4 muestra también los promedios de los índices de eficiencia simples y por grupos, para el conjunto de cepas colectadas en frijol silvestre y en frijol cultivado. Se aprecia una tendencia de mayor eficiencia en las cepas de frijol cultivado, especialmente en los índices individuales PSN y PSV, así como en los índices compuestos IEN e IEG. Los índices de eficiencia han sido poco utilizados hasta ahora en la evaluación y selección de cepas de *Rhizobium*. Bécquer *et al.* (2012) utilizaron los índices de nodulación (IN) e índice de eficiencia de la inoculación (IEI); en el primero usó datos de nodulación y en el segundo utilizó el peso seco del vástago. La ventaja de trabajar con índices carentes de unidades de medición, permite hacer comparaciones y discriminación entre cepas para variables individuales y por grupos de variables de interés, como se hizo en el trabajo presente. Igualmente, la combinación de lo observado en la respuesta de las cepas por su valor *per se* para las variables registradas y por su valor en los índices de eficiencia individuales o compuestos, permite generar resultados más confiables.

Componentes Principales

El análisis de componentes principales (CP) de las 27 cepas de *Rhizobium* y las ocho variables registradas, mostró que los tres primeros explicaron 62.22% de la varianza total, donde el CP1 aportó 27.83% y el CP2 contribuyó con 18.45%. El análisis gráfico de los valores del CP1 y CP2 de mayor contribución a la varianza total, se muestra en la Figura 1. Al observar los valores del CP1, las cepas se separaron en dos conglomerados principales; del lado negativo y con menor valor en la escala, se ubicaron todas las cepas procedentes de la forma silvestre de frijol, excepto la número 3 (Rhizojal VC3) y número 8 (Rhizojal SA2) situadas del lado positivo; del lado positivo se ubicó la mayoría de los rizobios colectados en raíces de frijol cultivado, excepto los identificados con los números 10, 13, 14 y 25.

Cuadro 4. Índices de eficiencia en fijación biológica de nitrógeno (FBN) por variable y grupos de variables en 27 cepas de *Rhizobium* spp. recolectadas en frijol silvestre y cultivado.**Table 4. Efficiency indices in biological nitrogen fixation (BNF) by variable and groups of variables in 27 *Rhizobium* spp. strains collected in wild and cultivated beans.**

Número cepa	Cepa	NN	PSN	PSV	PSR	NT	IEN	IEF	IEG
1	Rhizojal VC1	107	77	85	88	101	92	91	91
2	Rhizojal VC2	83	55	93	99	98	69	97	86
3	Rhizojal VC3	151	135	97	78	103	143	93	113
4	Rhizojal BH1	105	68	96	88	110	86	98	93
5	Rhizojal BH2	69	73	81	101	93	71	92	83
6	Rhizojal BH3	68	71	95	160	101	69	119	99
7	Rhizojal SA1	102	65	91	97	96	84	95	90
8	Rhizojal SA2	119	97	93	116	106	108	105	106
9	Rhizojal SA3	91	98	90	97	93	95	93	94
10	Rhizojal ZMA1	123	115	96	121	92	119	103	109
11	Rhizojal ZMA2	109	86	99	91	101	97	97	97
12	Rhizojal ZMA3	106	104	106	86	99	105	97	100
13	Rhizojal ZGZ1	88	98	91	102	94	93	96	95
14	Rhizojal ZGZ2	109	79	88	89	107	94	95	94
15	Rhizojal ZGZ3	131	114	102	73	93	122	89	102
16	Rhizojal ZAT1	82	136	102	102	105	109	103	106
17	Rhizojal ZAT2	120	115	113	76	87	117	92	102
18	Rhizojal ZAT3	73	73	107	86	98	73	97	87
19	Rhizojal ZCB1	81	83	116	123	91	82	110	99
20	Rhizojal ZCB2	80	103	110	112	102	91	108	101
21	Rhizojal ZCB3	130	154	120	102	105	142	109	122
22	Rhizojal TP1	92	91	107	91	104	91	101	97
23	Rhizojal TP2	102	139	115	104	105	120	108	113
24	Rhizojal TP3	108	124	120	97	107	116	108	111
25	Rhizomich CR1	76	127	100	130	103	102	111	107
26	Rhizomich CR2	110	113	93	88	107	111	96	102
27	Rhizomich CR3	89	106	97	102	100	97	100	99
	Media silvestres	99	82	91	103	100	91	98	95
	Media cultivados	101	109	105	99	100	105	101	102
	Media general	100	100	100	100	100	100	100	100

LV = longitud del vástago; LR = longitud de raíz; PSV = peso seco del vástago; PSR = peso seco de raíz; NN = número de nódulos; PSN = peso seco de nódulos; NT = porcentaje de nitrógeno total; IEN = índice de eficiencia en nodulación; IEF = índice de eficiencia en fijación de nitrógeno; IEG = índice de eficiencia general en fijación biológica de nitrógeno.

LV = stem length; LR = root length; PSV = stem dry weight; PSR = root dry weight; NN = number of nodules; PSN = dry weight of nodules; NT = percentage of total nitrogen; IEN = efficiency index in nodulation; IEF = nitrogen fixation efficiency index; IEG = index of general efficiency in biological nitrogen fixation.

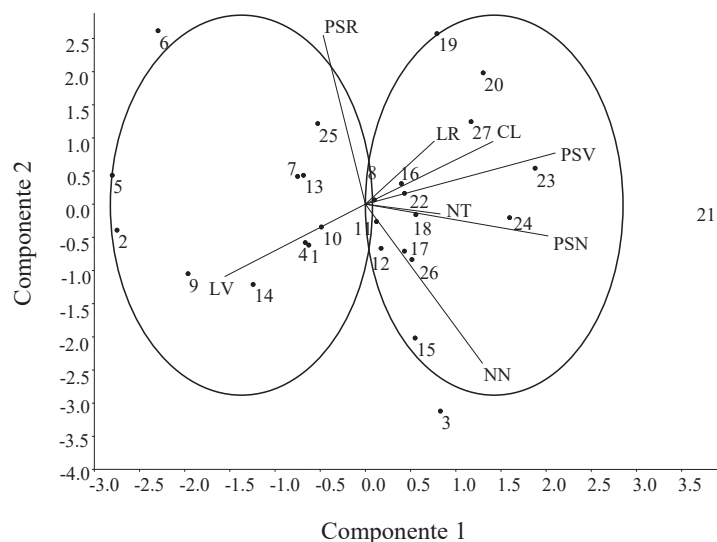


Figura 1. Ubicación de las 27 cepas y comportamiento de los vectores-variable con base en el análisis de componentes principales (CP) de ocho variables cuantitativas de *Rhizobium*.

Figure 1. Location of the 27 strains and behavior of the vector-variables based on the principal component analysis (PC) of eight quantitative variables of *Rhizobium*.

Las variables asociadas de forma importante al CP1 fueron PSV y PSN; variables asociadas al CP2, fueron NN y PSR. En la Figura 1 y del lado positivo del CP1, se observa un grupo de vectores-variable conformado por LR, CL, PSV, NT y PSN, por el ángulo agudo formado por sus líneas, se puede afirmar que muestran correlación positiva alta. La figura muestra también que las variables NN, PSN y PSV estuvieron bien representadas, NT y LR mal representadas y que la variable LV fue poco relevante en este estudio.

CONCLUSIONES

Los resultados mostraron diferencias significativas entre las 27 cepas de *Rhizobium* spp. en seis de las ocho variables registradas para evaluar la fijación biológica de nitrógeno. Los índices de eficiencia por variable y por grupos de variables, también mostraron diferencias entre las cepas evaluadas. El componente principal 1 separó a la mayoría de los rhizobios en dos grupos; del lado negativo se ubicaron las cepas de frijol silvestre y del lado positivo las de frijol cultivado. Los resultados mostraron evidencia de mayor eficiencia general en FBN, de las cepas obtenidas en frijol cultivado. Las cepas seleccionadas por su valor *per se* en las variables

de efectos significativos y por índices de eficiencia en la fijación biológica del nitrógeno, fueron Rhizojal VC3 de frijol silvestre y Rhizojal ZCB3 y Rhizojal TP2 de frijoles cultivados. Los índices de eficiencia por variable y por grupos de variables, mostraron ser útiles en la evaluación e identificación de cepas de *Rhizobium* eficientes en fijación biológica del nitrógeno. Los resultados sugieren que existe potencial para identificar cepas de *Rhizobium* eficientes en la FBN para su uso en el frijol cultivado, en la región occidente de México.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

Los conjuntos de 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.

FONDOS

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

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: Rogelio Lépiz-Ildefonso, Eduardo López-Alcocer, José de Jesús López-Alcocer. Metodología: José de Jesús López-Alcocer, Eduardo López-Alcocer, Rogelio Lépiz-Ildefonso. Software: José de Jesús López-Alcocer, Rogelio Lépiz-Ildefonso. Validación: Rogelio Lépiz-Ildefonso, Diego Raymundo González-Eguiarte, Ramón Rodríguez-Macías, Eduardo López-Alcocer. Análisis formal: José de Jesús López-Alcocer, Rogelio Lépiz-Ildefonso. Investigación: José de Jesús López-Alcocer, Rogelio Lépiz-Ildefonso. Recursos; Curación de datos: José de Jesús López-Alcocer, Rogelio Lépiz-Ildefonso. Preparación del borrador original: José de Jesús López-Alcocer, Rogelio Lépiz-Ildefonso. Revisión y edición: Rogelio Lépiz-Ildefonso, Diego Raymundo González-Eguiarte, Ramón Rodríguez-Macías, Eduardo López-Alcocer. Visualización: Rogelio Lépiz-Ildefonso, Diego Raymundo González-Eguiarte. Supervisión: Rogelio Lépiz-Ildefonso, Diego Raymundo González-Eguiarte. Administración del proyecto: Rogelio Lépiz-Ildefonso. Adquisición de fondos: Rogelio Lépiz-Ildefonso.

LITERATURA CITADA

- Acuña, O. y L. Uribe. 1996. Inoculación de frijol común con tres cepas seleccionadas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. *Agron. Mesoam.* 7: 35-40. doi: <https://doi.org/10.15517/am.v7i1.24786>.
- Acuña O., E. Rodríguez, A. Llano, V. R. Calderón, G. Flores, A. Viana y R. Lépiz I. 2001. Validación técnica de inoculantes en frijol con cepas de *Rhizobium* eficientes en fijación de nitrógeno en Centroamérica. *Agron. Mesoam.* 12: 25-32.
- Ángeles-Núñez, J. G. y T. Cruz-Acosta. 2015. Aislamiento, caracterización molecular y evaluación de cepas fijadoras de nitrógeno en la promoción del crecimiento de frijol. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 6: 929-942.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official methods of analysis. AOAC. Arlington, VA, USA. ISBN: 0-935584-42-0.
- Bécquer, C. J., J. A. Nápoles, O. Álvarez, Y. Ramos y L. A. Palmero. 2012. Comportamiento de la simbiosis leguminosa-rizobio en *Centrosema plumieri* inoculada con *Bradyrhizobium*. *Ensayo de Campo. Pastos Forrajes* 35: 175-186.
- Bécquer, C. J., D. Prévost, C. Gauvin y A. Beadouni. 2013. Eficiencia simbiótica de rizobios nativos de Sancti Spiritus, Cuba, inoculados en *Centrosema molle*. *Pastos Forrajes* 3: 322-328.
- Castro, S., G. Cerioni, O. Giayetto y A. Fabra. 2006. Contribución relativa del nitrógeno del suelo y del fijado biológicamente a la economía de la nutrición nitrogenada de maní (*Arachis hypogaea* L.) en diferentes condiciones de fertilidad. *AgriScientia* 13: 55-66. doi: <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v23.n2.2692>.
- Cardoso, J. D., M. Hungria, and D. S. Andrade. 2011. Polyphasic approach for the characterization of rhizobial symbionts effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Appl. Gen. Mol. Biotechnol.* 93: 2035-2049. doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3708-2>.
- Farid, M. and A. Navabi. 2015. N₂ fixation ability of different dry bean genotypes. *Can. J. Plant Sci.* 95: 1243-1257. doi: <https://doi.org/10.4141/cjps-2015-084>.
- Ferrera-Cerrato, R., J. J. Almaraz, M. N. Rodríguez y D. Espinosa. 1990. Fijación simbiótica de nitrógeno en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). *Terra* 8: 35-70.
- Gholizadeh, A., M. A. M. Soom, A. A. Rahim, and A. Wayayok. 2011. Using soil plant analysis development chlorophyll meter for two growth stages to assess grain yield of Malaysian rice (*Oryza sativa*). *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 6: 209-213. doi: <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2011.209.213>.
- Gómez, L. A., G. Hernández, T. Sánchez, V. Toscano y M. Sánchez. 1998. Interacción genotipo de frijol común-cepa de *Rhizobium*. *Agron. Mesoam.* 9: 93-97. doi: <https://doi.org/10.15517/am.v9i1.24648>.
- Granda M., K. I., A. Cólás, R. Cupull, Y. Gutiérrez y R. Torres. 2009. Caracterización e identificación genética de aislados de *Rhizobium* en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Agríc.* 36: 5-14.
- Granda M., K., M. Ochoa, V. Ruilova, F. Guamán y R. Torres. 2014. Evaluación de cepas nativas de *Rhizobium* sobre parámetros fenotípicos en fréjol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Centro Biotecnol.* 3: 25-37.
- Hernández, G., M. Sánchez, V. Toscano, N. Méndez y M. Mullings. 1999. Efecto de inóculo de *Rhizobium* en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). *Agron. Mesoam.* 10: 59-62. doi: <https://doi.org/10.15517/am.v10i1.19414>.
- Karaca, Ü. and R. Uyanöz. 2012. Effectiveness of native *Rhizobium* on nodulation and growth properties of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Afr. J. Biotechnol.* 11: 8986-8991. doi: <https://doi.org/10.5897/AJB11.4087>.
- Keneni, A., F. Assefa, and P. C. Prabu. 2010. Characterization of acid and salt tolerant rhizobial strains isolated from faba bean fields of Wollo, Northern Ethiopia. *J. Agric. Sci. Technol.* 12: 365-376.
- Lépiz I., R. y R. Ramírez D. 2010. Los parientes silvestres del frijol común en el occidente de México. Universidad de Guadalajara. Orgánica Ed. Guadalajara, Jalisco, México. ISBN: 978-607-00-2595-2.

- Liriano G., R., D. B. Núñez y R. Barceló. 2012. Efecto de la aplicación de *Rhizobium* y Micorriza en el crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad CC-25-9 negro. Centro Agríc. 39:17-20.
- López A., J. J., R. Lépiz I., D. R. González E., R. Rodríguez M., E. López A. y V. Olalde P. 2017. Caracterización de aislados de *Rhizobium* colectados en frijol silvestre y domesticado. Rev. Fitotec. Mex. 40: 73-81.
- Martínez-Romero, E. 2001. Poblaciones de rhizobia nativas de México. Acta Zool. Mex. Número Especial 1: 29-38.
- Mayz, J., A. Lárez y N. Alcorcés. 2010. Efectividad de cepas rizobianas nativas de sabana en *Vigna unguiculata* L. Walp. Cultivar C4A-3. Rev. Colomb. Biotecnol. 12: 194-202.
- McFarland, J. 1970. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. pp: 435-437. In: H. D. Campbell, S. J. Garvey, E. N. Cremer, and H. D. Sussdorf (eds.). Methods in immunology. Benjamin. New York, NY, USA.
- Mora, F. 1995. Selección de cepas nativas de *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli eficientes en fijación biológica de nitrógeno en suelos de Costa Rica. Agron. Mesoam. 6: 68-74.
- Mostasso, L., F. L. Mostasso, B. G. Dias, M. A. T. Vargas, and M. Hungria. 2002. Selection of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. Field Crops Res. 73: 121-132. doi: [https://doi.org/10.1016/S0378-4290\(01\)00186-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4290(01)00186-1).
- Pineda, P. 1992. Mejoramiento de la fijación biológica de nitrógeno en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Perú. Documento de Trabajo No 118. CIAT. Cali, Colombia.
- Rahmani, H. A., L. A. Räsänen, M. Afshari, and K. Lindström. 2011. Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. grown in soils of Iran. Appl. Soil Ecol. 48: 287-293. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.04.010>.
- Rodríguez-Mendoza, M. N. 1993. Asociación Rhizobium-leguminosa. pp. 11-51. In: R. Ferrera C., M. C. Á. González Ch. y M. N. Rodríguez M. (eds.). Manual de agromicrobiología. Trillas. México. ISBN: 9789682446603.
- Simon, Z., K. Mtei, A. Gessesse, and P. A. Ndakidemi. 2014. Isolation and characterization of nitrogen fixing rhizobia from cultivated and uncultivated soils of Northern Tanzania. Am. J. Plant Sci 5: 40.50-4067. doi: <https://doi.org/10.4236/ajps.2014.526423>.
- Yadegari, M. 2014. Inoculation of beans (*Phaseolus vulgaris*) seeds with *Rhizobium phaseoli* and plant growth promoting Rhizobacteria. Adv. Environ. Biol. 8: 419-424.