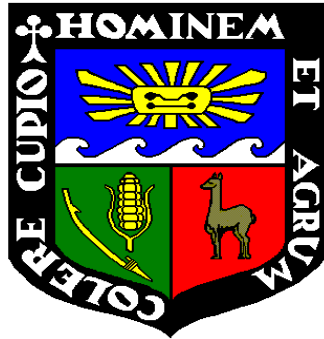


**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMÍA



**“EFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE DOS CEPAS DE
Rhizobium sp. EN CUATRO VARIEDADES DE FRIJOL
COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.) EN CONDICIONES DE
COSTA CENTRAL”**

Presentado por:

HÉCTOR BARONI CANTARO SEGURA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

Lima-Perú

2015

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMÍA

**“EFECTIVIDAD SIMBIÓTICA DE DOS CEPAS DE *Rhizobium sp.* EN
CUATRO VARIEDADES DE FRIJOL COMÚN (*Phaseolus vulgaris* L.)
EN CONDICIONES DE COSTA CENTRAL”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

HÉCTOR BARONI CANTARO SEGURA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Constantino Calderón Mendoza

PRESIDENTE

Ing. Mg. Sc. Amelia Huaranga Joaquín

PATROCINADORA

Ing. Mg. Sc. Julián Chura Chuquiya

MIEMBRO

Dra. Doris Zúñiga Dávila

MIEMBRO

Lima-Perú

2015

*“Nunca tengas certeza
de nada, porque la
sabiduría comienza con
la duda”*

Sigmund Freud

DEDICATORIA

El presente trabajo de tesis está dedicado a Dios porque gracias a él he culminado una etapa muy importante de mi vida, el cual es una representación de años de dedicación y ganas de superación personal, que no hubiera sido posible sin la intervención y soporte de él y de las personas que comparten mi vida diaria, mi familia.

A mis padres: Virginia Segura Yance y Héctor Cantaro Cano, porque desde pequeño me inculcaron el deseo de superación, por apoyarme y saberme guiar con sus sabios consejos durante mi vida estudiantil y por no abandonarme en aquellos días que pensaba difíciles. Son mis principales fuentes de inspiración y amor que me da fuerza para enfrentarme a la vida y seguir adelante.

A mi hermano: José, por creer en mí y en mis sueños, por su apoyo, confianza y comprensión. Gracias por estar a mi lado, brindándome y aconsejándome siempre

A mi familia por su apoyo brindado que hace crecer en mí el entusiasmo, la esperanza, el optimismo y la fé en el futuro.

AGRADECIMIENTO

- A la Ing. Mg. Sc. Amelia Huaranga Joaquín, patrocinadora de la presente tesis por su orientación constante e invaluable apoyo en la ejecución y culminación del presente trabajo.

- Al Programa de Investigación y Proyección Social en Leguminosas y Oleaginosas, por su orientación en la culminación de mi tesis.

- A los miembros del jurado:

Al Dr. Constantino Calderón, la Dra. Doris Zúñiga Dávila y al Mg Sc. Julián Chura, a quienes agradezco eternamente, por su apoyo y asesoramiento en la culminación de mi trabajo.

- A la Oficina Académica de Investigación y al Vicerrectorado Académico de la Universidad Nacional Agraria la Molina, por haberme subvencionado parte de mi tesis y hacer realidad mi más caro anhelo.

- A la Ing. Diana Castro Álvarez y al Dr. Jorge Aliaga Gutiérrez, por su apoyo incondicional durante mi estadía universitaria y su apoyo en la realización de diversas metas y proyectos logrados.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	13
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. EL CULTIVO DEL FRIJOL	4
2.1.1. Generalidades.....	4
2.1.2. Importancia.....	6
2.1.3. Propiedades nutritivas y usos del frijol	7
2.1.4. Situación actual del Frijol	9
2.1.5. Filogenia y Distribución.....	10
2.1.6. Botánica.....	14
2.1.7. Variedades.....	17
2.1.8. Fisiología del Frijol	18
2.1.9. Etapas del desarrollo de la planta	24
2.1.10. Ecología del cultivo.....	26
2.1.11. Rendimiento	31
2.2. EL NITRÓGENO	32
2.2.1. Importancia.....	32
2.2.2. Origen de nitrógeno en el suelo.....	33
2.2.3. Fuentes de N en el suelo.....	34
2.2.4. Absorción y Transporte de N inorgánico en la planta.....	34
2.2.5. Absorción orgánica del nitrógeno	37
2.2.6. Asimilación del nitrógeno	38
2.2.7. Abastecimiento del nitrógeno.....	40
2.3. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN)	40
2.3.1. Generalidades.....	40
2.3.2. Cantidad fijada de N ₂ por la FBN	41
2.3.3. Sistemas biológicos fijadores de nitrógeno	42
2.3.4. Bioquímica de la fijación de nitrógeno	45
2.3.5. Sistemas simbióticos (Fijación simbiótica de nitrógeno).....	48
2.3.6. Efectos de los nutrientes que no sean nitrógeno.....	65
2.3.7. Efecto del Nitrógeno Mineral.....	70
2.3.8. Efectos Ambientales.....	72

2.3.9.	La Inoculación de la leguminosa.....	74
2.3.10.	Antecedentes	75
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	77
3.1.	UBICACIÓN DEL CAMPO EXPERIMENTAL	77
3.2.	HISTORIAL DE CAMPO	77
3.3.	MATERIALES	77
3.3.1.	Análisis Físicoquímico del Suelo	77
3.3.2.	Condiciones meteorológicas	78
3.3.3.	Material biológico de estudio.....	79
3.3.4.	Inoculantes de <i>Rhizobium</i>	80
3.4.	METODOLOGÍA	81
3.4.1.	Tratamientos en estudio	81
3.4.2.	Características del campo experimental.....	82
3.4.3.	Diseño experimental.....	83
3.4.4.	Conducción del Experimento	84
3.5.	CRONOGRAMA DEL EXPERIMENTO	86
3.6.	VARIABLES EVALUADAS EN EL EXPERIMENTO	87
3.6.1.	Variables morfofisiológicas	87
3.6.2.	Variables de nodulación.....	87
3.6.3.	Variables de rendimiento	89
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	90
4.1.	VARIABLES MORFOFISIOLÓGICAS	90
4.1.1.	Días a la floración	90
4.1.2.	Altura de planta (cm).....	94
4.1.3.	Peso fresco de follaje (g).....	96
4.1.4.	Peso seco de follaje (g).....	98
4.1.5.	Peso fresco de raíces (g).....	99
4.1.6.	Peso seco de raíces (g)	101
4.2.	VARIABLES DE NODULACIÓN	103
4.2.1.	Número de nódulos	103
4.2.2.	Posición de los nódulos	108
4.2.3.	Tamaño de nódulos (mm)	108
4.2.4.	Forma de nódulos	110

4.2.5.	Color interno del nódulo	110
4.2.6.	Peso fresco de nódulos (g)	110
4.2.7.	Peso seco de nódulos (g)	112
4.3.	Variables de rendimiento	113
4.3.1.	Número de vainas por planta.....	113
4.3.2.	Número de granos por vaina	120
4.3.3.	Peso de cien semillas (g)	121
4.3.4.	Índice de cosecha (%)	123
4.3.5.	Rendimiento grano seco (kg/ha).....	1266
V.	CONCLUSIONES	1300
VI.	RECOMENDACIONES	1311
VII.	BIBLIOGRAFÍA	1322

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Contenido de fitoquímicos nutraceuticos en ppm en frijol	9
Cuadro 2. Principales especies cultivadas del genero <i>Phaseolus</i>	13
Cuadro 3. Composición de tejidos del frijol y costos de la biosíntesis	20
Cuadro 4. Cantidades de N ₂ fijado por diferentes agentes en sistemas agrícolas	42
Cuadro 5. Ejemplos del rango de géneros bacteriales que pueden fijar nitrógeno en sistemas agrícolas	44
Cuadro 6. Algunas especies de rizobios y sus leguminosas hospedantes	50
Cuadro 7. Parámetros climatológicos de la zona de La Molina en el periodo experimental Julio-Noviembre 2013	78
Cuadro 8. Clave y descripción de los tratamientos en estudio.	81
Cuadro 9. Resultados promedios de las variables morfofisiológicas	91
Cuadro 10. Análisis de Varianza de las variables morfofisiológicas	92
Cuadro 11. Resumen de la prueba Duncan en las variables morfofisiológicas para el factor variedad.	93
Cuadro 12. Resumen de la prueba Duncan en las variables morfofisiológicas para el factor fuente de nitrógeno.	93
Cuadro 13. Resultados promedios de las variables de nodulación	104
Cuadro 14. Análisis de Varianza de las variables de nodulación	105
Cuadro 15. Resumen de la prueba Duncan en las variables de nodulación para el factor variedad.	106
Cuadro 16. Resumen de la prueba Duncan en las variables de nodulación para el factor fuente de nitrógeno	106
Cuadro 17. Resultados promedios de las variables de rendimiento	115
Cuadro 18. Análisis de Varianza de las variables de rendimiento	116
Cuadro 19. Resumen de la prueba Duncan en las variables de rendimiento para el factor variedad.	117
Cuadro 20. Resumen de la prueba Duncan en las variables de rendimiento para el factor fuente de nitrógeno	117
Cuadro 21. Análisis de efectos simples de la variable Número de vainas por planta	118
Cuadro 22. Análisis de efectos simples de la variable Índice de Cosecha	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de <i>P. vulgaris</i> L. silvestre en América Latina	12
Figura 2. Representación esquemática del suministro de energía y las principales reacciones del sistema nitrogenasa	46
Figura 3. Eventos en la corteza durante la inducción de un nódulo indeterminado	57
Figura 4. Endosimbiontes fijadores de nitrógeno en la simbiosis	61
Figura 5. Regulación del oxígeno en leguminosas de nódulos indeterminados	63
Figura 6. Esquema simplificado de la relación entre la fijación de N ₂ y absorción de N del suelo y fertilizantes en leguminosas noduladas	70
Figura 7. Diagrama de Gantt del experimento	86
Figura 8. Interacción de las fuentes de N en los días de floración (días) en cuatro variedades de frijol común.	90
Figura 9. Interacción de las fuentes de N en la altura de planta (cm) en cuatro variedades de frijol común.	94
Figura 10. Efectos principales para la variable altura	95
Figura 11. Interacción de las fuentes de N en el peso fresco de follaje (g) en cuatro variedades de frijol común.	96
Figura 12. Efectos principales para la variable peso fresco de follaje (g)	97
Figura 13. Interacción de las fuentes de N en el peso seco de follaje (g) en cuatro variedades de frijol común.	98
Figura 14. Efectos principales para la variable peso seco de follaje (g)	99
Figura 15. Interacción de las fuentes de N en el peso fresco de raíces (g) en cuatro variedades de frijol común.	100
Figura 16. Efectos principales para la variable peso fresco de raíces (g)	100
Figura 17. Interacción de las fuentes de N en el peso seco de raíces (g) en cuatro variedades de frijol común.	102
Figura 18. Efectos principales para la variable peso seco de raíces (g)	102
Figura 19. Interacción de las fuentes de N en el número de nódulos en cuatro variedades de frijol común.	103
Figura 20. Efectos principales para la variable número de nódulos	107
Figura 21. Interacción de las fuentes de N en el tamaño de nódulos en cuatro variedades de frijol común.	109
Figura 22. Efectos principales para la variable tamaño de nódulos	109
Figura 23. Interacción de las fuentes de N en el peso fresco de nódulos (g) en cuatro variedades de frijol común.	111
Figura 24. Efectos principales para la variable peso fresco de nódulos (g)	111
Figura 25. Interacción de las fuentes de N en el peso seco de nódulos (g) en cuatro variedades de frijol común.	112
Figura 26. Efectos principales para la variable peso seco de nódulos (g)	113
Figura 27. Interacción de las fuentes de N en el número de vainas por planta	114

en cuatro variedades de frijol común.	
Figura 28. Efectos principales para la variable número de vainas por planta	119
Figura 29. Interaccion de las fuentes de N en el número de granos por vaina en cuatro variedades de frijol común.	120
Figura 30. Efectos principales para la variable número de vainas por planta	121
Figura 31. Interaccion de las fuentes de N en el peso de cien semillas (g) en cuatro variedades de frijol común.	122
Figura 32. Efectos principales para la variable peso de cien semillas (g)	123
Figura 33. Interaccion de las fuentes de N en el índice de cosecha (%) en cuatro variedades de frijol común.	124
Figura 34. Efectos principales para la variable índice de cosecha (%)	126
Figura 35. Interaccion de las fuentes de N en el rendimiento grano seco (kg/ha) en cuatro variedades de frijol común.	127
Figura 36. Efectos principales para la variable rendimiento grano seco (kg/ha)	129

ÍNDICE DE VISTAS FOTOGRÁFICAS

Foto N° 1. Nódulos de la variedad Blanco Molinero	146
Foto N° 2. Vainas de la variedad Blanco Molinero	146
Foto N° 3. Vaina que contiene 6 semillas de la variedad Blanco Molinero	146
Foto N° 4. Nódulos distribuidos en la variedad Canario Centenario	147
Foto N° 5. Nódulos en todas partes de la raíz de la variedad Canario Centenario	147
Foto N° 6. Vista lateral del campo experimental de la variedad Canario Centenario	147
Foto N° 7. Nódulos distribuidos en las raíces laterales de la variedad Canario CIFAC	148
Foto N° 8. Peso de los nódulos de la variedad Canario CIFAC	148
Foto N° 9. Vista frontal del campo experimental de la variedad Canario CIFAC	148
Foto N° 10. Vista a nivel del suelo de la variedad Rojo Molinero	149
Foto N° 11. Etapa de llenado de vainas de la variedad Rojo Molinero	149
Foto N° 12. Vainas de la variedad Rojo Molinero	149

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N°1. Estadísticas del Cultivo de Frijol en el Año 2013	151
Anexo N°2. Valores de los coeficientes de correlación de Pearson entre las variables experimentales	152
Anexo N°3. Análisis fisicoquímico del suelo	153

SUMMARY

A field experiment was conducted to investigate the *Rhizobium*-legume symbiosis effectiveness. Four commercial common bean cultivars (Canario Centenario, Canario CIFAC, Blanco Molinero and Rojo Molinero) were studied in order to characterize the cultivars' variability in symbiotic characters using two *Rhizobium sp.* strains (LMT 10 and LMT15) and the indigenous soil strain, and an N-fertilization rate. As indicators of effectiveness, the variables were grouped into three classes. Days to flowering, height, fresh and dry's foliage weight, fresh and dry's roots weight were taken as the morpho-physiological variables. Number, position, size, shape, inner colour, fresh and dry's nodules weight were taken as the variables of nodulation. Pods number per plant, seed number per pod, 100 seed weight, harvest index, dry bean yield were taken as the variables of plant yield. ANOVA indicates that there are significant differences among varieties, but no in nitrogen sources, indicating that the inoculated strains had the same effectiveness as the native soil strains and N-fertilization. The varieties with the highest yields were Canario Centenario with N-fertilization (3062.19 kg.ha⁻¹), Blanco Molinero with indigenous soil strain (2835.57 kg.ha⁻¹) and Blanco Molinero with LMT 10 strain (2815.11 kg.ha⁻¹). A significant interaction of bean variety x nitrogen source was found for pods number per plant (p <0.05) and harvest index (p <0.01), where the best treatment was Canario Centenario with N-fertilization, 21.44 pods per plant and 64.97% respectively. Blocks did not show highly significant statistical differences. Among varieties, Canario CIFAC had the best performance for morpho-physiological variables, Blanco Molinero for the nodulation and Canario Centenario for yield variables. Among the nitrogen sources, LMT 10 strain was the best performance for morpho-physiological variables, LMT 15 strain for the nodulation and yield variables, although the native strain obtained the highest values in number and fresh weight of nodules, dry bean yield, which describes the competitiveness with regard to inoculated strains.

Key words: *Rhizobium*, symbiosis, effectiveness, common bean, varieties, nitrogen fertilization

RESUMEN

El presente trabajo de investigación evaluó la efectividad de la simbiosis *Rhizobium*-frijol. Cuatro variedades comerciales de frijol (Canario Centenario, Canario CIFAC, Blanco Molinero y Rojo Molinero) fueron estudiados con dos cepas de *Rhizobium sp.* (LMT 10 and LMT15) y las cepas nativas en el suelo y una fertilización nitrogenada. Como indicadores de la efectividad se evaluaron tres variables morfofisiológicas; días a la floración, altura de planta, peso fresco y seco de follaje, peso fresco y seco de raíces; de nodulación: número, posición, tamaño, forma, color interno, peso fresco y peso seco de nódulos; de rendimiento: número de vainas por planta, número de granos por vaina, peso de cien semillas, índice de cosecha, rendimiento grano seco. El análisis de varianza nos indica que existen diferencias significativas entre variedades, pero no entre fuentes de nitrógeno, lo que indica que las cepas inoculadas tuvieron la misma efectividad que las cepas naturales del suelo y la fertilización mineral. Las variedades que presentaron los más altos rendimientos fueron Canario Centenario con fertilización nitrogenada (3062.19 kg.ha⁻¹), Blanco Molinero con cepa nativa del suelo (2835.57 kg.ha⁻¹) y Blanco Molinero con LMT 10 (2815.11 kg.ha⁻¹). En las variables número de vainas por planta ($p < 0.05$) e índice de cosecha ($p < 0.01$), la interacción variedad x fuente de nitrógeno fue significativa, donde Canario Centenario con fertilización nitrogenada fue el mejor tratamiento con 21.44 vainas por planta y 64.97%, respectivamente. Los bloques no presentaron diferencias estadísticas. Dentro de las variedades, Canario CIFAC destacó para las variables morfofisiológicas, Blanco Molinero para las variables de nodulación y Canario Centenario para las variables de rendimiento. Dentro de las fuentes de N, la cepa LMT 10 se comportó mejor para las variables morfofisiológicas, la cepa LMT 15 se comportó mejor en las variables de nodulación y de rendimiento, aunque la cepa nativa obtuvo los más altos valores en número y peso fresco de nódulos, rendimiento grano seco, lo que muestra su competitividad frente a las cepas inoculadas.

Palabras claves: *Rhizobium*, simbiosis, efectividad, frijol, variedades, fertilización nitrogenada

I. INTRODUCCIÓN

Las leguminosas (Leguminosae)¹⁴³ representan la segunda familia más grande de plantas superiores en el mundo, después de las gramíneas (Poaceae) en importancia agrícola⁶⁹, debido a que sus especies se usan como alimento (*Glycine*, *Phaseolus*, *Vicia*, *Pisum*, *Cicer*), forraje (*Trifolium*, *Melilotus*, *Medicago*)⁷⁸, combustible (*Prosopis*, *Acacia*, *Havardia*, *Ebenopsis*), carbón (*Prosopis*, *Ebenopsis*), y en la industria química (*Acacia*, *Coronilla*, *Indigofera*)⁶⁹. Agrupa alrededor de 20.000 especies distribuido en 700 géneros que tradicionalmente han sido dividido en tres subfamilias (*Caesalpinoideae*, *Mimosoideae*, y *Papilionoideae*), basado en gran medida en sus características florales. La subfamilia *Papilionoideae* es la mayor de las tres subfamilias con 476 géneros y cerca de 14.000 especies¹⁴³.

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano más importante en el mundo, ya que representa el 87% de las leguminosas consumidas a nivel global¹⁸⁸ y cuya importancia resalta en el Perú y Latinoamérica en donde tiene la más alta producción y consumo debido a que reúne buenas cualidades agronómicas (precocidad, buen potencial de rendimiento, buena adaptación para la costa y valles interandinos cálidos, utilidad en programas de rotación), mejorador de suelos (por su propiedad de fijar nitrógeno mediante la simbiosis con *Rhizobium*); y nutricionales (22-28 % de proteínas, 59-60% de carbohidratos, vitaminas, minerales y fibras solubles), constituyendo la mayor fuente de proteínas por encima de las fuentes animales, para la población de escasos recursos económicos; por lo cual comúnmente se le etiqueta como “la carne de los pobres”, pero hoy es más valorado como complemento de dietas basadas en carbohidratos¹³¹. Por lo tanto, este cultivo constituye un alivio del principal problema que el país enfrenta, la desnutrición, y urgente se debe generar nuevo conocimiento y tecnología para que se mejore el cultivo y se obtengan mayores rendimientos y mejores ingresos, ya que este cultivo es un gran generador de empleo para un amplio sector de la población rural, siendo una gran fuente de divisas para el país y los agricultores que mejoran su calidad de vida con este cultivo.

El rendimiento de los cultivos depende de muchos factores, pero principalmente de tres insumos principales; la captura de la energía solar en forma de energía química a través de la fotosíntesis, una fuente de agua, y de la disponibilidad de una fuente de nitrógeno fijado

(ya sea mineral u orgánico). Un enorme reservorio de nitrógeno reside en la atmósfera (78%) como nitrógeno gaseoso (N_2), sin embargo, este es el nitrógeno atmosférico no directamente utilizable, siendo uno de los factores que más limita la producción en los campos de cultivo. Sólo se convierte en disponible para la biosfera a través de la fijación biológica de nitrógeno (FBN), un proceso que sólo los microorganismos más simples han desarrollado. A través de asociaciones con estos microorganismos fijadores de nitrógeno, las plantas pueden, a su vez, derivar una parte importante de sus requerimientos de nitrógeno fijado para el crecimiento de la FBN. Dentro de las asociaciones agrícolas más importantes son las de los cultivos de leguminosas, como el frijol, con la bacteria *Rhizobium*, donde se produce una estrecha relación simbiótica dentro de un órgano especialmente desarrollado, el nódulo, por lo general en las raíces de las plantas. La FBN es un proceso metabólico clave para la producción de alimentos y el mantenimiento de la vida en el planeta^{100, 254}.

La forma común que emplean los agricultores para suministrar nitrógeno a sus campos de cultivo, es mediante los fertilizantes nitrogenados inorgánicos. En el 2008, se reportó que el consumo mundial de úrea fue aproximadamente de 67 millones de toneladas y en los países latinoamericanos esto representó un 5,4%¹²³. La producción de fertilizantes nitrogenados es sumamente costosa, para producir una tonelada de estos se requiere el quemado de aproximadamente 1.7 t de combustibles fósiles⁷⁵. Otro problema ambiental es la pérdida de nitrato de los campos a través de la lixiviación debido al movimiento de las aguas superficiales. Este nitrato contamina los manantiales y los ríos, y eventualmente afectando los estuarios y ecosistemas marinos. Además, el nitrato puede filtrarse hacia aguas subterráneas, contaminando así las reservas de aguas para el consumo humano generando un problema permanente para la salud. Ejemplos de enfermedades son la metahemoglobinemia causada por exceso de NO_3 y NO_2 , el cáncer causado por nitrosaminas y las enfermedades respiratorias causadas por NO_2 y HNO ⁸⁸. Estos problemas ambientales y sanitarios, originados por el aporte excesivo de fertilizantes nitrogenados en los cultivos, junto al incremento del coste energético de la síntesis de fertilizantes, hacen que la fijación biológica de nitrógeno atmosférico sea una alternativa económica y ecológicamente limpia frente a la fijación química. Además, la fijación biológica desempeña un papel muy importante en la economía del N en la práctica agrícola, ya que la

cantidad de N disponible en la mayor parte de los suelos cultivados es escasa, y en la actualidad no puede ser suplementada a escala mundial mediante la producción de fertilizantes⁵. Pimentel et al.¹⁹⁶, estimo que la FBN, en sistemas naturales y agrícolas, rinde entre 140 y 170 millones de t/año de nitrógeno disponible, con un valor de US\$ 90000 millones. De esta manera, la FBN representa un 3,07% de los beneficios económicos que la sociedad mundial podría percibir a través de la biodiversidad¹⁵⁵.

Ciertas especies de *Rhizobium* se asocian con determinadas especies leguminosas estableciendo los llamados grupos de inoculación cruzada más o menos específicos. La eficiencia simbiótica de *Rhizobium* es determinante en la fijación de nitrógeno y la sobrevivencia de la bacteria, para lo cual intervienen diversos factores como el genotipo de la bacteria y las condiciones climáticas, así como interacciones entre la bacteria y la planta hospedante.

Teniendo en cuenta esta problemática, el presente trabajo está orientado a cumplir los siguientes objetivos:

1. Evaluar la efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium sp.*, en cuatro variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en costa central.
2. Probar la simbiosis de las cepas de *Rhizobium sp.* de las variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en condiciones de costa central.
3. Determinar el efecto de la fijación biológica del nitrógeno en las características morfofisiológicas y el rendimiento de grano seco de cuatro variedades de frijol.
4. Comparar el efecto de la fertilización nitrogenada en la capacidad simbiótica de las cepas de *Rhizobium sp.* y el rendimiento en las cuatro variedades de frijol.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. EL CULTIVO DEL FRIJOL

2.1.1. Generalidades

Los frijoles generalmente se refieren a las leguminosas del género *Phaseolus*, familia Leguminosae, subfamilia Papilionoideae, tribu Phaseoleae, subtribu Phaseolinae⁹⁶. El género *Phaseolus* es uno de los cultivos más antiguos del nuevo mundo y junto con el maíz y la yuca han sido un alimento básico en las altitudes bajas y medias de América por milenios²⁶. El género *Phaseolus* contiene unas 50 especies de crecimiento salvajes distribuidos únicamente en las América⁹⁶. Agrupa cultivos extremadamente diversos en términos de ciclo de vida, hábitos de crecimiento, sistemas reproductivos, métodos de cultivo, usos, gama de ambientes a los que han sido adaptadas, y la variabilidad morfológica. Se encuentran desde el nivel del mar hasta los 3.000 msnm, se cultiva en monocultivo, en asociaciones, o en las rotaciones^{26, 57, 99}. El género *Phaseolus* contiene cinco especies domesticadas: por orden de importancia decreciente, frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), pallar (*P. lunatus* L.), frijol ayocote (*P. coccineus* L.), frijol tepary (*P. acutifolius* A. Gray), y frijol de toda la vida (*P. polyanthus* Greenman), con distintas adaptaciones y sistemas reproductivos: semi-húmedo y templado, predominantemente autopolinización; cálido y húmedo, predominantemente autopolinizadas; caliente y seco, cleistogamia; fresco y húmedo, polinización cruzada; y fresco y húmedo, la polinización cruzada, respectivamente. El pallar es filogenéticamente más distante de las otras especies domesticadas, que son especies hermanas y constituyen un singameon⁹⁶.

La principal especie conocida económica y científicamente es el frijol común, también conocido como frejol, frijol común, judía verde, ejote, alubia, poroto y caraota, es una planta herbácea anual de la familia Leguminosae, junto con arveja, soya, habas y lentejas con alrededor de 19400 especies. Esta especie cultivada hace 8000 años es originaria de América Central y del Sur, donde su progenitor silvestre (*P. vulgaris* var. *mexicanus* y var. *aborigineus*) tiene una amplia distribución que van desde el norte de México hasta el noroeste de Argentina⁹⁶, siendo nuestro país uno de los **centros de origen y domesticación del frijol**¹⁷⁵. Grandes colecciones de germoplasma de formas domésticas y silvestres se encuentran en el CIAT, Cali, Colombia y USDA, Pullman, Washington, EE.UU.⁹⁶

Por su versatilidad para sus diferentes formas de consumo, el frijol es la legumbre más consumida en el mundo, proporcionando hasta un 15% del total de las calorías diarias y el 36% de la proteína diaria total en partes de África y las Américas. Más de 200 millones de personas en el África subsahariana dependen del frijol común como un alimento básico²²⁷. El cultivo es consumido principalmente por sus frijoles secos (maduros), o todavía en vaina verde comestible (vainita). Cuando se consume en forma de semilla, los frijoles constituyen una importante fuente de proteínas de la dieta (22% del peso de la semilla) que complementa los cereales para más de medio billón de personas principalmente en América Latina. La FAO estima que la producción comercial total de frijoles secos (que incluye numerosas variedades de *P. vulgaris*, pero también incluye algunos granos de otras especies, incluyendo *P. lunatus*, pero no incluye judías verdes) fue 23,23 millones de toneladas en todo el mundo en 2010, cosechada a partir de 29,92 millones de hectáreas y un rendimiento promedio de 700 kg.ha⁻¹, aunque los rendimientos en algunos países llega a 2,000 ± 3,000 kg.ha⁻¹. India fue el principal productor, responsable del 21% de la producción total, seguido por Brasil, Myanmar, China, los EE.UU. y México^{86, 255}.

Existen más de 70 variedades de frijol que varían comercialmente según tamaño de semillas e intensidad de color, dentro de estos últimos se encuentran frijoles negros, amarillos, blancos, morados, pintos, bayos y moteados¹³¹. La preferencia de consumo según el color del frijol varía entre las poblaciones, incluso dentro de un mismo país, siendo el ‘canario’ preferido en la Costa Norte y Central⁷⁷. Los cultivares de frijol común derivan de al menos dos domesticaciones diferentes, con el desarrollo de un tipo de semilla grande, desarrollado en Perú hace unos 8.000 años y un tipo más pequeño preclasificado, desarrollado en México hace alrededor de 7.000 años. En cambio, sus progenitores silvestres respectivos en estas dos regiones tienen un ancestro común en el Ecuador y el norte de Perú. En el momento en que llegaron los europeos, el frijol se cultivaba en todo el Nuevo Mundo, en América del Norte, así como en América Central y del Sur. Este conocimiento de la evolución de frijol común, combinado con los recientes avances en el estudio de la filogenia del género constituye uno de los principales lugares de interés actuales de los granos como organismos genéticos.

El frijol común fue utilizado para derivar principios importantes en genética. Mendel utilizó granos para confirmar sus resultados obtenidos en las arvejas. Johannsen utilizó frijoles para ilustrar la naturaleza cuantitativa de la herencia de ciertas características como peso de la semilla. Sax estableció la metodología básica para identificar locus de caracteres cuantitativos o QTL (para peso de la semilla) a través de la co-segregación con marcadores mendelianos (color de la semilla y el patrón de color)⁹⁶.

2.1.2. Importancia

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa cultivada más importante del mundo y fuente vital de nutrición¹⁹⁸. La FAO reporta que la mitad de la producción mundial de frijol común se produce en los países de bajos ingresos, con déficit de alimentos, donde el cultivo básico asegura la estabilidad económica de muchas familias y la seguridad alimentaria del país. La otra mitad se produce en países desarrollados como EEUU, donde el frijol es un cultivo económicamente importante con 769000 ha de frijol seco y como vainita en 2012, generando ingresos de \$1.5 billones²⁵⁵. El valor del cultivo del frijol supera al de todas las otras leguminosas cultivadas, como garbanzo, lentejas, arvejas y frijol caupí, dando una idea de su futuro potencial económico de este cultivo. Sin embargo, su consumo varía según el grado de desarrollo de los países, en los países en desarrollo su consumo es muy alto y sigue aumentando; y en países desarrollados ha ido disminuyendo desde el 1960, siendo América Latina y África, los de mayor consumo y Europa, el de menor consumo comparado a otras zonas del mundo, debido principalmente a los cambios en las preferencias de los consumidores y por razones sociales y culturales¹⁸⁸.

Se ha previsto que para el año 2050 se debe aumentar en un 30% los rendimientos del frijol a nivel mundial para satisfacer la demanda de la población que habrá crecido enormemente¹⁸⁵. Otra de las preocupaciones a lo cual nos enfrentamos es el cambio climático, con un aumento de 1.4 y 3°C para el 2050^{122, 214} y sequías que afectara a las dos terceras partes de las zonas productoras de frijol en el mundo¹², tendrán efectos perjudiciales sobre la productividad del frijol común y afectará el desarrollo de enfermedades en el cultivo. Para cumplir con este reto además de aumentar los rendimientos se debe buscar reducir las pérdidas en la agricultura de los países de bajos insumos. También se deben hacer mejoramiento del frijol buscando en los parientes

silvestres del cultivo como una nueva fuente de varianza genética frente al ya tradicional mejoramiento a partir de variedades locales o mejoradas, los genes que nos permitan obtener variantes genéticas novedosas, como la resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia al estrés abiótico, etc³.

Debido al cambio climático, en algunas zonas del mundo se está cambiando la producción del frijol común por otras especies estrechamente relacionadas como el pallar (*Phaseolus lunatus* L.) en el noreste semiárido de Brasil y el frijol tepary (*Phaseolus acutifolius* L.) en las tierras áridas y semiáridas de Centroamérica y Kenya²³⁰. Aunque por sus características agronómicas, el frijol tepary puede ser un cultivo ideal para el oriente medio y el pallar en el sur de Asia, aunque los dos pueden crecer muy bien en América tropical, el Caribe y África.

2.1.3. Propiedades Nutritivas y Usos del Frijol

Diversos autores ^{121, 193, 218, 228}, han destacado las propiedades nutritivas que posee el frijol, de manera fundamental por su alto contenido en proteínas y en menor medida en carbohidratos. Esto evidencia por qué las culturas mesoamericanas, desde tiempos inmemoriales basaron su alimentación en el frijol y el maíz. Mientras las gramíneas de grano comestible, como el maíz, carecen de aminoácidos (lisina y triptófano) indispensables en la actividad orgánica del ser humano, el frijol los tiene en altas proporciones. Por ejemplo, en 100 g de harina de frijol canario, es posible obtener la cantidad de aminoácidos que una persona adulta requiere para su dieta diaria¹⁸⁰. Por su parte, Kohashi¹³⁵ establece que, mientras el frijol aporta en su mayor parte proteínas y una parte de carbohidratos, el maíz proporciona en su mayoría carbohidratos.

Las leguminosas producen metabolitos primarios y secundarios y otros fitoquímicos tales como nutracéuticos, farmacéuticos, pesticidas y productos industriales¹⁶⁴.

Se ha determinado que el frijol no sólo suministra proteínas y carbohidratos, también tiene cantidades importantes de vitaminas y minerales. Serrano y Goñi²¹⁸ descubrieron que con la ingesta diaria de 70.5 g de frijol negro se puede obtener un 134% (0.447 mg) de ácido fólico; 19.1% (4.82 mg) de hierro; 35.5% (195.6 mg) de magnesio y 15.9% (3.96 mg) de zinc. Al evaluar los componentes nutrimentales de dos genotipos y diecisiete líneas

endogámicas de frijol, encontraron además otras propiedades de esta leguminosa. **Salinas**¹⁹³ destacan la presencia de antocianinas, indispensables en la prevención de enfermedades, entre ellas el cáncer de colon, la arterosclerosis y las inflamaciones intestinales. El frijol contiene un rango de proteínas en la semilla de 17700 ppm a 224000 ppm¹⁶⁴. Dentro de las propiedades nutraceuticas y farmacéuticas, el frijol contiene leucina e isoleucina que son probablemente efectivos para encefalopatía hepática¹⁹⁷ y tirosina que es conocido por ser efectivo para fenilketonuria²⁶⁰ y posiblemente efectivo para mejorar las defensas, la arginina que es un tratamiento potencial para fallas de congestión cardiaca¹⁰⁷, también contiene otros elementos como calcio, magnesio, zinc y manganeso con propiedades nutraceuticas, que se muestran en el Cuadro 1.

A pesar de los beneficios asociados al consumo del frijol se han encontrado ciertas desventajas relacionadas con la presencia de factores antinutricionales que alteran el aprovechamiento de otros elementos: inhibidores enzimáticos, hemaglutininas o lectinas, taninos, ácido fítico y flatulencia¹²¹. Compuestos que en altas concentraciones pueden limitar la asimilación de algunos nutrientes al hacer más difícil la solubilidad de fibras o causar trastornos intestinales.

El frijol es una rica fuente de proteínas e hidratos de carbono, además de ser una buena fuente de vitamina del complejo B como es la niacina, la riboflavina, el ácido fólico y la tiamina. Igualmente proporciona hierro, cobre, zinc, fósforo, potasio, magnesio y calcio y tiene un alto contenido en fibra. También es una excelente fuente de ácidos grasos poliinsaturados.

Además de su efecto reductor del colesterol en la sangre, las leguminosas de grano generalmente también tienen un efecto hipoglucemiante. Las legumbres son, por lo tanto, incluido en la dieta de los diabéticos dependientes de insulina¹²⁷. Algunas legumbres, sin embargo, producir factores antinutricionales, tales como inhibidores de tripsina y fitohemaglutininas y alérgenos, siendo este último un grave problema en maní²³⁸.

Cuadro 1. Contenido de fitoquímicos nutraceuticos en ppm en frijol¹⁶⁴

Nutraceutico	Uso	Rango nutraceutico en frijol comun (ppm)
Leucina	Probablemente efectivo para encefalopatía hepática	17,250–19,386
Tirosina	Efectivo para fenilketonuria, ademas mejora el estado de alerta	6,080–6,833
Arginina	Posiblemente efectivo para fallas de congestión cardíaca	13,370–15,026
Ácido glutámico	Posiblemente efectivo para mucositis inducido por quemoterapia	32,940–37,019
Isoleucina	Probablemente efectivo para encefalopatía hepática	9,540–10,722
Lisina	Posiblemente efectivo para reducir infecciones labiales por herpes simple	14,830–16,667
Ácidos grasos monoinsaturados	Probablemente efectivo como un laxante suave	1,230–1,382
	Posiblemente efectivo para reducir serum colesterol	
	Posiblemente efectivo para mejorar la presión sanguínea	
Calcio	Posiblemente efectivo para reducir el riesgo de cancer de mama	510–3,295
	Efectivo para el tratamiento y la prevención de hipocalcemia	
Magnesio	Efectivo para el tratamiento y la prevención de hipomangeseemia	510–3,430
Zinc	Efectivo para el tratamiento y la prevencion de deficiencia de zinc	19–50
Manganeso	Efectivo para el tratamiento y la prevención de deficiencia de manganeso	2–24

Fuente: Morris (2013)

2.1.4. Situación actual del Frijol

El área cultivada con el frijol en nuestro país alcanza las 82200 ha de un total de 29 millones de ha en el mundo, con una producción de 92952 t, de un total de 23.6 millones de toneladas en el mundo, con un rendimiento promedio de 1144 kg.ha⁻¹ comparado con un rendimiento mundial de 1336 kg.ha⁻¹, debido a que los países desarrollados tienen un alto rendimiento^{86, 162}. La producción es especialmente importante en América Latina y el este de África, regiones que representan el 47 y 24%, respectivamente, de la producción mundial de frijol seco¹⁸². Para aquellos países en los frijoles son un cultivo importante,

rendimiento varía significativamente. Como era de esperar, en promedio, el rendimiento de los países desarrollados, 1.944 kg.ha⁻¹, es significativamente superiores a los de los países en desarrollo, 1.035 kg.ha⁻¹. La situación es más drástica para los países menos adelantados que dependen en gran medida de las habas como alimento fuente. En Burundi, Ruanda y Uganda los rendimientos son 918, 671, y 638 kg.ha⁻¹, respectivamente⁹⁴.

En el caso del Perú (**Anexo 1**), en el 2013, la mayor área sembrada se encuentra en la sierra (53.7%), seguido por la selva (24.1%) y luego la costa (22.2%). La sierra ocupa el primer lugar en cuanto la producción (55.60%) esto debido a su rendimientos unitarios, la costa ocupa el segundo lugar (25.32%) y la selva el tercer lugar con 19.08% de la producción nacional. El rendimiento promedio de la costa es 1363.6 kg.ha⁻¹, de la sierra es 1337.2 kg.ha⁻¹ y en la selva 1036.4 kg.ha⁻¹ ¹⁶². El precio promedio nacional en el 2013 es de S/3.52, variando de un mínimo en la selva de S/ 1.77 en Loreto, un precio máximo de S/5.45 en Ica y Lima y un precio medio en la sierra es de S/ 3.50 ¹⁶².

2.1.5. Filogenia y Distribución

La familia de las leguminosas (Leguminosae) es muy grande con 643 géneros (18000 especies) agrupados en 40 tribus que son encontrados en ambientes tropicales y templados¹⁴⁰. Hay dos grupos principales de especies cultivadas en la Papilionoideae: las tropicales o leguminosas faseoloides (incluyendo *Phaseolus*, *Vigna*, *Glicina*, y *Cajanus*) y las templadas o legumbres galegoides (incluidos los *Melilotus*, *Trifolium*, *Medicago*, *Pisum*, *Vicia*, *Lotus*, *Cicer*, *Lens*, y *Lathyrus*)⁶⁹. La tribu *Phaseoleae*, que contiene el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol caupí (*Vigna unguiculata*), y la soja (*Glycine max*), son de lejos el más importante grupo económico, y contiene el 75% de las legumbres comercializadas en el mundo. Dentro de estas tribus, la leguminosa *Medicago truncatula* es actualmente la especie modelo para toda la familia de las leguminosas, y se discute si es que puede aportar información útil y relevante para legumbres tropicales^{22, 275}.

Se ha determinado que el frijol proviene de un ancestro salvaje y no de malezas cultivadas fugitivas como ocurre en otras especies como sorgo (*Sorghum bicolor*), remolacha (*Beta vulgaris*) y la avena (*Avena sativa*) ²⁴⁸. El rango de altitud de frijoles silvestres se extiende desde 700 m en Tucumán, Argentina a 2.900 m en Cuzco, Perú, pero debido a la geografía,

el hábitat de *P. vulgaris* silvestre se ha separado en los valles interandinos hacia la vertiente oriental⁹¹, mientras que en Ecuador y el noroeste de Perú se distribuye hacia la vertiente occidental⁵⁶. Por otra parte, en los Andes, el nicho ecológico de *P. vulgaris* silvestre es mucho más estrecho en longitud en comparación con Mesoamérica; (2) la distribución fragmentada de más de 8000 km del frijol silvestre se refleja en su composición genética (e.g. faseolinas)^{91, 198}, probablemente como resultado de las expansiones y las extinciones de las poblaciones naturales de la zona, a lo largo de miles de años, mucho antes de que la humanidad entró en América a través de Bering⁴⁸.

Estudios en cpDNA⁶¹ y sus secuencias⁶² han establecido una filogenia para todo el género. Una especie basal ha sido identificada, *P. microcarpus*²⁶. El frijol común, *P. vulgaris* pertenece a un complejo de especies, en la cual datos moleculares han confirmado que todas estas especies pueden estar entrecruzados, aunque el grado de dificultad y viabilidad de los cruces recíprocos varían. Usando secuencias ITS (Internal Transcribed Spacer) recuperadas de GenBank y la edad de divergencia para leguminosas establecida por Lavin¹⁴⁰. Chacon³⁷ estima que *P. vulgaris* se separó de sus especies hermanas hace 1.3 millones de años y que el segundo linaje divergió hace 0.6 millones de años. Gepts⁹⁷ estima que la separación de *P. vulgaris* de sus especie hermana *P. coccineus* se produjo hace 2 millones de años atrás y la separación de las pozas génicas Mesoamericana y Andina ocurrió hace 0.5 millones de años y la divergencia post-domesticación dio lugar a cuatro centros de diversidad en América y 3 ó 4 razas domesticadas en cada uno de estos dos acervos génicos^{98, 232}, véase la Figura 1. Las estimaciones preliminares muestran un tiempo de divergencia de unos 500 000 años entre estos dos acervos génicos¹⁹⁸. Por lo tanto, *P. vulgaris* es, en esta etapa, único entre los cultivos en que los dos linajes evolutivos se remontan a las mismas poblaciones ancestrales que han sido identificados²⁶.

El género *Phaseolus* es Neotropical en origen. No se sabe claramente cuántas especies de *Phaseolus* existen²⁶. El género se estimó que poseía 180 especies y una antigüedad de 7000 años²⁷², aunque una estimación razonable sería 50 a 60 especies, en espera de exploraciones de germoplasma adicionales en América Central⁵⁸. Las excavaciones han demostrado la existencia del frijol común desde 8000 años en el Perú, 7000 años en México y 2000 años en el sudoeste de EE.UU., refiriéndose al descubrimiento más reciente. En el Perú se ha

encontrado restos con una antigüedad de 2000 años A.C. en Huaca Prieta y frijoles completamente domesticados en el valle de Nazca con 2,500 años A.C. La comprensión de las relaciones entre las especies es una cuestión de importancia práctica en la búsqueda de una mayor variabilidad.

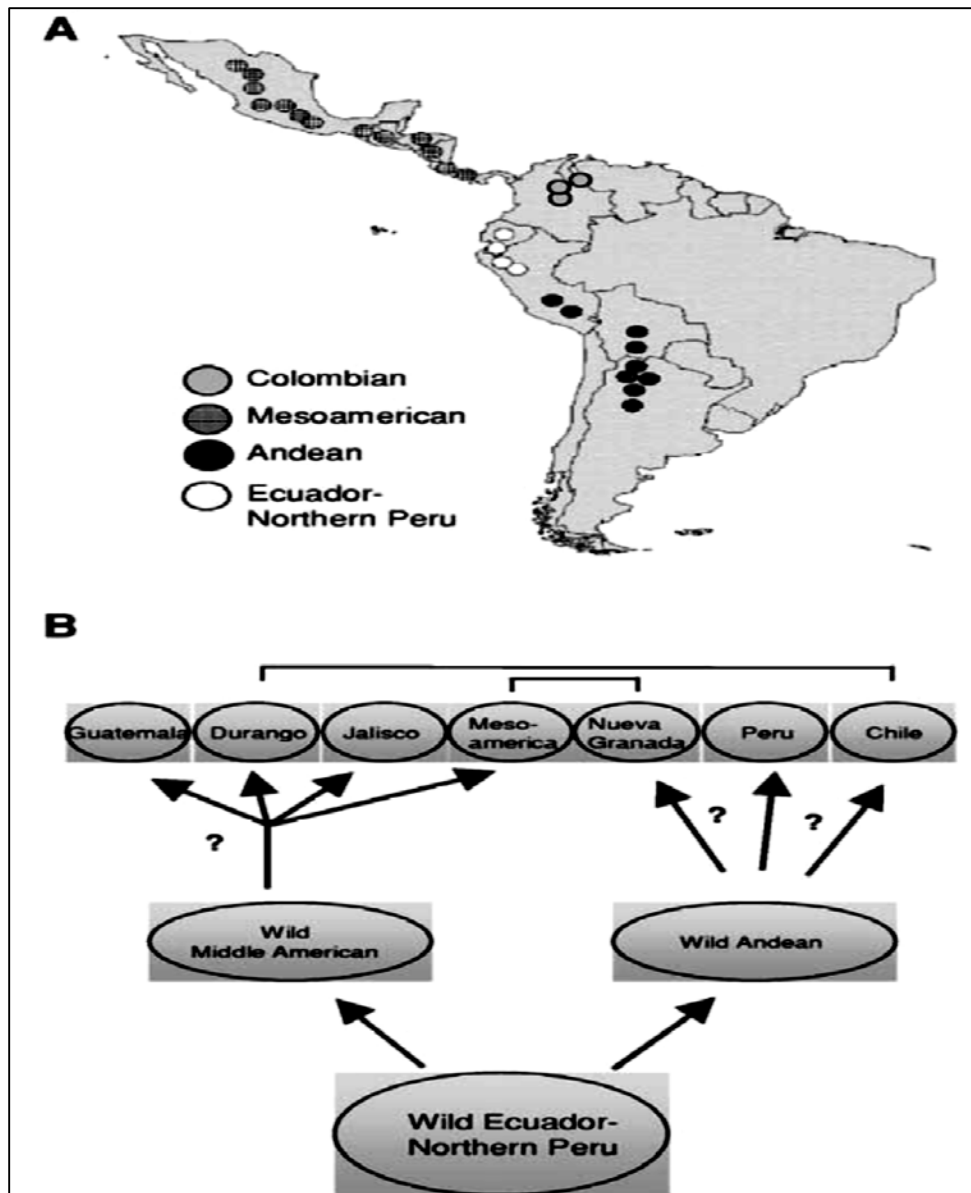


Figura 1. Distribución de *P. vulgaris* L. silvestre en América Latina. (A) Es posible distinguir cuatro centros de diversidad: el Andino, el Colombiano, el Ecuatoriano/Norteño de Perú, y el Mesoamericano. Además, existen importantes centros secundarios de diversidad en África, Brasil, Europa, el Medio Oriente, así como en América del Norte. (B) La domesticación de los acervos genéticos Andino y Mesoamericano condujeron a cuatro razas en el acervo genético mesoamericano y tres razas en el acervo genético andino. La introgresión entre los genotipos que representan a las distintas razas es mostrado [adaptado de Beebe et al., (2000) y Gepts (1998)].

Recientes estudios filogenéticos que incluían tanto especies silvestres como domesticadas de *Phaseolus* han confirmado que el género es monofilético⁵⁷. Dos a nueve sub-clados pueden existir en el nivel sub-genérico⁶². Un linaje incluye el frijol común, mientras que otro engloba *P. lunatus*⁸⁵. Tres especies, *P. coccineus*, *P. polyanthus*.

De los 50 a 60 especies silvestres de *Phaseolus* de origen americano sólo cinco han sido domesticados, el frijol común (*Phaseolus vulgaris*), frijol de toda la vida (*P. polyanthus*), frijol ayocote (*P. coccineus*), frijol tepary (*P. acutifolius*), y pallar (*P. lunatus*). Cada especie domesticada constituye una reserva genética primaria con su forma ancestral salvaje^{62,98}. Todas las especies del género son diploides y la mayoría tienen 22 cromosomas ($2n=2x=22$). Unas pocas especies muestran una reducción aneuploide a 20 cromosomas. Entre las especies reconocidas como principales cultivos por el USDA, el tamaño del genoma del frijol (450-650 MBp/genoma haploide) es pequeño¹³ y comparable a la de arroz (340-560 MBp/genoma haploide) que es generalmente considerado por ser la planta económicamente importante con el genoma más pequeño. Estas especies varían en algunas características como altitud, temperatura, precipitación pluvial, ciclo biológico y rendimiento, como se puede ver en el Cuadro 2. Pueden existir acervos génicos secundarios y terciarios para todas las especies domesticadas, dependiendo de los eventos filogenéticos que conducen a la formación de las especies biológicas⁵⁷. Recientemente, una nueva especie silvestre, *P. costaricensis* fue demostrado que pertenecen al acervo génico secundario de *P. vulgaris*.; *P. costaricensis* sólo se conoce en Costa Rica y Panamá. Hay más de 29 000 accesiones domesticadas y más de 1.300 accesiones silvestres de *P. vulgaris* alojada en el banco de germoplasma del CIAT, Cali, Colombia, y en otras partes. En el CIAT, el número de accesiones que pertenecen a los acervos génicos secundarios y terciarios, respectivamente, son 1049 y 335²⁶.

Cuadro 2. Principales especies cultivadas del genero *Phaseolus*⁵⁶

Especie	Altitud (m)	Temperatura (°C)	Precipitación (mm/año)	Ciclo biológico (días)	Rdto (kg/ha)
<i>Phaseolus coccineus</i>	1400-2800	12-22	400-2600	90-365	400-4000
<i>Phaseolus acutifolius</i>	50-1900	20-32	200-400	60-110	400-2000
<i>Phaseolus lunatus</i>	50-2800	16-26	0-2800	90-365	400-5000
<i>Phaseolus polyanthus</i>	800-2600	14-24	1000-2600	110-365	300-3500
<i>Phaseolus vulgaris</i>	50-3000	14-26	400-1600	70-330	400-5000

A pesar de esta diversidad, la base genética de cultivares comercial de clases específicas de mercados es estrecho. De hecho, sólo una pequeña porción (<5% de la diversidad genética disponible) se han utilizado a nivel mundial a pesar de casi un siglo de mejoramiento genético del frijol²⁶. Las nuevas formas de mejorar la introgresión (Retrocruzamiento por congruencia, descendencia a partir de una sola semilla, y selección recurrente) prometen restaurar la fertilidad, así como para aumentar la frecuencia de genes deseables en la población reproductora.

Sobre la base de la morfología, la variación de las proteínas almacenadas en las semillas, marcadores moleculares y bioquímicos, la domesticación de *P. vulgaris* ocurrió independientemente en las áreas Mesoamericana y Andina que dan lugar a dos muy diferenciados acervos génicos domesticados ^{95, 98, 257} que se caracterizan por el aislamiento reproductivo geográfico y parcial¹⁸⁶.

El progenitor silvestre y los descendientes cultivados generalmente dan progenes viables y fértiles y muestran diferencias contrastantes para muchos rasgos que constituyen el síndrome de domesticación de cultivos¹⁰¹. Los frijoles cultivados muestran un hábito de crecimiento más compacto en comparación con sus progenitores silvestres⁹⁵. En su forma más evolucionada bajo domesticación, este hábito de crecimiento se caracteriza por una combinación de rasgos que comprenden determinación, ramas no trezadas, pocos nudos vegetativos, y muchos entrenudos. Hábitos de crecimiento menos evolucionadas pueden mostrar algunos o sólo uno de estos rasgos. La selección por los seres humanos también ha llevado a vainas y semillas más grandes ('Gigantismo') y mostrar diferentes o no pigmentación. En concierto con los cambios en los hábitos de crecimiento y sensibilidad al fotoperíodo, los cultivares de frijol en general florecen antes que sus ancestros silvestres²⁶.

2.1.6. Botánica

2.1.6.1. Clasificación Taxonómica

Marechal et al. ¹⁵¹ y **Delgado**⁶⁰, señala la siguiente clasificación para el frijol común:

Reino : Vegetal

Clase : Dicotiledoneae

Sub-clase	: Rosidae
Orden	: Fabales
Familia	: Leguminosa (Papilionaceae)
Sub-familia	: Litoidea (Papilionoideas)
Tribu	: Phaseoleae
Sub Tribu	: Phaseolinae
Género	: <i>Phaseolus</i>
Especie	: <i>Phaseolus vulgaris</i> L.

Nombres Comunes: fríjol, frisol, fréjol, frejol, habichuela, poroto, caraota, chuwi, habilla, judía, alubia, habichuela, feijao, fagiol, bean, common bean, string bean, field bean, flageolet bean, French bean, garden bean, haricot bean, pop bean, snap bean. El más difundido es “frijol”, término que se usa desde México hasta Panamá, en Cuba y en parte del Perú²⁹. En Perú se le denomina ahuihua, alorba, ama poroto, biik (aguaruna-huambisa), chanca, chancha, chaucha, chooch (amuesha), frejol, purutu (quechua, cocama y ticuna), yunya^{24, 258}.

En algunos países en los que se produce esta leguminosa comestible, se utiliza de forma indistinta el término fríjol, lo que ha originado cierta confusión al registrar, en las bases de datos estadísticas las diferentes especies como una sola. Un ejemplo claro de ello consiste en el caso de Paraguay o Nicaragua, en los que según registros de la FAO, se produce *Phaseolus vulgaris*, cuando en realidad su producción corresponde a la especie *Vigna unguiculata*, llamado comúnmente “frijol castilla”²⁷².

2.1.6.2. Morfología

2.1.6.2.1. Características morfológicas:

El frijol es una planta herbácea anual con raíces fasciculadas, fibrosas o pivotantes, presencia de la cofia, nódulos presentes. Tallo herbáceo erecto, semipostrado o postrado, cilíndrico o angular, subglabro o pubescente, tallos menores a 1 m de altura, tallos de 1-2 m

de altura, tallos sólidos, tallos o ramas jóvenes escasamente a densamente peluda, con presencia de pelos uncinulados, de colores verde, rosado o morado. Hojas primarias simples, opuestas, cordiformes, unifoliadas, auriculadas y acuminadas, con estipulas bífidas. Hojas verdaderas compuestas pinnado- 3 folioladas (trifolioladas), alternas, peciolo 4-9 cm de largo y raquis acanalado, foliolos simétrico y acuminado, foliolos enteros ovalados, triangulares o cordiformes, sin aurículas, glabros o subglabros. Poseen **peciolulos** de 1.5 a 2.5 mm de largo que pueden ser considerados como pulvínulos y poseen **estipelas** de 4 mm de largo; dos en el foliolo terminal y una en cada foliolo lateral, colocados en la base de los peciolulo, estipulas persistentes. Inflorescencias axilares o terminales, 1-3- flores, pedúnculo de 0-5 cm de largo, brácteas conspicuamente presentes de 3 mm de largo; bractéolas de 5-6 mm de largo. Flores zigomórficas, pedicelo glabro o subglabro de 3-10 mm de largo, cáliz gamosépalo, campanulado, pubescente con 2 bractéolas ovoides y multinerviales, corola pentámera, papilionácea con estandarte, alas y quilla, 2 pétalos soldados en la base y 3 no soldados, pétalo color blanco, verde, rosado o purpura. Androceo formado por 9 estambres, estambres diadelfos, 9 unidos y 1 gratis, filamentos glabros. Gineceo súpero, ovario unilocular comprimido, estilos cilíndricos, encorvados, estigma interno lateral terminal, con pelos en forma de brocha. Fruto es una legumbre, vainas glabras o subglabros con pelos muy pequeños, epidermis cerosa, fruta explosivamente o elásticamente dehiscente, fruta muy curvada, encorvado, doblado o semilunar. Semilla exoalbuminosa de 1-1.2 mm de largo, cilíndricas, ovoides o redondeadas, superficie lisa, de diferentes colores ^{43, 76, 77}.

2.1.6.2.2. Hábitos de crecimiento

El hábito de crecimiento es la presentación de la planta en el espacio como consecuencia de su crecimiento⁴¹.

El comportamiento agronómico de la planta está íntimamente relacionado con el hábito de crecimiento de los diferentes cultivares. Los hábitos de crecimiento que presentan las plantas se agrupan en cuatro tipos principales²³²:

- **Tipo I:** Determinado erecto o arbustivo.

El tallo principal y las ramas laterales, terminan en una inflorescencia desarrollada y entonces el crecimiento se detiene, donde alcanza una altura entre 30 y 50 cm. Etapa de floración corta y madurez sincronizada en las vainas²⁹.

- **Tipo II:** Indeterminado erecto arbustivo.

Plantas con tallo erecto sin aptitud para trepar, aunque termina en una guía corta, pocas ramas cortas (más numerosas que el tipo I), sin guías y continúan creciendo durante la etapa de floración, aunque a un ritmo menor²⁹.

- **Tipo III:** Indeterminado, postrado no trepador o enredadera, semitrepadora.

Plantas postradas o semipostradas con ramificación bien desarrollada. Altura de planta superior a las del tipo I (mayor a 80 cm), debido a mayor número de nudos de tallo, ramas y longitud de entrenudos, con presencia de guías terminales. En las plantas tipos III existen dos subdivisiones, el tipo IIIa que son plantas totalmente postradas, mientras que el tipo IIIb, tienen el tallo y las ramas con aptitud trepadora, aunque no muy desarrollados²⁹.

- **Tipo IV:** Indeterminado, fuertemente trepadores.

Plantas típicas trepadoras y usadas en asociación maíz-frijol. La capacidad trepadora se debe a la doble capacidad de torsión desarrollada a partir de la primera hoja trifoliada. Amas muy pocas desarrolladas, tallo con 20 a 30 nudos, alcanzando una altura mayor a los 2 m. Etapa de floración larga y madurez asincrónica de vainas. También existen dos subdivisiones, IVa cuando las vainas se distribuyen uniformemente a lo largo de la planta y IVb si las vainas se concentran en la parte superior de la planta²⁹.

2.1.7. Variedades

Las variedades del frijol se pueden clasificar de acuerdo a los siguientes criterios²⁹:

a. Por la forma de consumo

Existen variedades de bajo contenido de fibra exclusivamente desarrolladas para consumo como habichuela o vainita (vaina verde). Estas en su mayoría provienen de EEUU y Europa. Se agrupan en las siguientes categorías:

- Como grano seco: de color blanco, tipo alubia, canario, bayo, caraota, panamito, de tipo I, II y III, con un periodo vegetativo de 105 a 270 días.
- Como grano tierno o verde: grano al estado de madurez fisiológica o grano verde como Blanco Larán, Blanco Larán mejorado y Blanco Molinero
- Como vainas verdes (vainita)
- Como grano tostado (ñuña o poroto): tienen la capacidad de reventar cuando son calentadas.

b. Por la duración del periodo entre siembra y cosecha

Las variedades tienen un amplio rango de duración de ciclo vegetativo, desde 70 a más de 270 días, y según este criterio se clasifica como:

- Precoz: tipo I, II y IIIa
- Tardío: tipo IIIb, tipo IVa y tipo IVb

c. Por su reacción a la duración del día

El frijol es una planta de días cortos (alrededor de 12 h de duración del día), sin embargo hay variedades sensibles e insensibles al fotoperiodo, según su respuesta a este fenómeno.

d. Por las características del grano

Aquí se pueden considerar cuatro criterios: tamaño (pequeño, mediano, grande), forma (redondo, ovalado, cuboide, arriñonado, truncado), color (banco, crema, amarillo, pardo, marrón, rosado, rojo, morado y negro) y la combinación de todas en las clases comerciales de frijol.

2.1.8. Fisiología del Frijol

2.1.8.1. PROCESOS FISIOLÓGICOS

Los procesos fisiológicos en una planta pueden ser clasificados en eventos metabólicos como fotosíntesis y respiración que tienen un efecto directo sobre el crecimiento y la morfogénesis que cambian la forma o desarrollo de la planta. Los dos grupos de procesos interactúan fuertemente⁴⁶.

A. Procesos de crecimiento

Los procesos de crecimiento pueden ser medidos de varias maneras (elongación de tallo, acumulación de nudos, expansión de hojas, etc.) pero se enfatiza en los procesos que afectan la acumulación de materia seca y su distribución, ya que el rendimiento es la última expresión de estos procesos. La acumulación de materia seca en las plantas de frijol es una consecuencia directa del balance entre la fotosíntesis, respiración y las pérdidas debido a la senescencia y abscisión. La distribución por otra parte, establece un equilibrio entre el crecimiento vegetativo y reproductivo integrado sobre el desarrollo de frijoles, resultados en un producto final del rendimiento⁴⁶.

i. Fotosíntesis

Como en otras leguminosas de grano, los frijoles son plantas C3. Estimaciones de tasas máximas de fotosíntesis en las hojas (AP) a concentraciones ambientales de CO₂ han variado de 12 mg CO₂ dm⁻² h⁻¹ a 35 mg CO₂ dm⁻² h⁻¹. Recientes estimaciones han sido relativamente altas, presumiblemente debido a una mejora de las técnicas, pero todavía son más bajas que la soya, que puede alcanzar 45 a 60 mg CO₂ dm⁻² h⁻¹ ²²⁹.

AP varía grandemente con la edad de la hoja y condiciones medioambientales. Las hojas incrementan su capacidad fotosintética a medida que se expanden, manteniendo un máximo para un periodo variable, dependiendo del cultivar y la posición de la hoja; y declinan a medida que la hoja senece⁸⁹. Esta declinación en AP aparentemente resulta de la pérdida de la capacidad fotosintética, pero también involucra incremento de la resistencia estomatal⁵⁴. Se detectó una significativa correlación positiva entre contenido de nitrógeno y AP en hojas a edades en donde se tiene la máxima tasa, sugiriendo que la pérdida de la capacidad fotosintética está relacionado a la remobilización del nitrógeno²⁴⁴.

Máximas tasas fotosintéticas en frijoles se lograron con 300 W.m⁻², el mismo nivel reportado para soya²²⁹. Se encontró evidencia de que AP varía con la posición de la hoja dentro de la canopia, y alcanzó su máximo valor cuando se inició el llenado de vainas²⁷. Se demostró diferencia en la respuesta a AP en dos cultivares de frijol²⁷ con óptimos que varían de 21 a 31°C. No existen efectos del déficit de presión de vapor (VPD) sobre AP usando 50 kLx de iluminación a 22°C. Una posible explicación es que hay efectos de interacción entre la radiación, temperatura y HR sobre la apertura estomática, como fue reportada en otras especies⁴⁶.

Diferentes fuentes de nitrógeno afectan AP, aparentemente a través de efectos sobre las fotorreacciones afectando el metabolismo del nitrógeno. Complicaciones posteriores resultan de la posibilidad de que otras partes de la planta pueden regular la fotosíntesis independiente de los efectos de agua y nutrientes. Se detectaron efectos de las raíces sobre la fotosíntesis en hojas primarias³². Investigaciones en soya sugieren que si la demanda de tejidos en crecimiento es insuficiente (e.g. como caída de vainas artificial), la fotosíntesis puede ser inhibida. Acumulación de almidón en los cloroplastos pueden jugar un rol clave, ya que se encontraron que células del mesófilo de frijoles pueden ser capaces de acumular grandes cantidades de almidón sin ruptura de cloroplastos³². El contenido de almidón en

hojas esta negativamente correlacionada con la enzima sucrosa-P-sintasa en soya, y se cree que en el proceso metabólico de leguminosas en general.

Las vainas fijan CO₂ a tasas más bajas que las hojas adyacentes, y la tasa decrece con la edad de la vaina²⁴⁴. Las vainas reciclan cantidades sustanciales de CO₂ liberado internamente, pero no son fuente fotosintética importante de materia seca para el desarrollo de semillas⁵¹. La fotorrespiración en frijoles varía con las condiciones ambientales y con el cultivar. El frijol puede orientar sus hojas con la posición del sol en el cielo para incrementar la intercepción lumínica. Sato y Gotoh et al.²²³ mostraron que la orientación de las hojas responde a la luz, los sensores están contenidos en pulvínulos y folíolos.

ii. Respiración

Aunque bioquímicamente no existe una separación entre fotosíntesis y respiración, esta última es más fácilmente considerada que está compuesto de dos componentes. Uno es llamado “**respiración para mantenimiento**”, y representa la respiración atribuida a actividades asociadas con el mantenimiento de las funciones tisulares. La “**respiración para crecimiento**” es el otro componente y representa la respiración asociada con el transporte y la biosíntesis en la construcción de nuevos tejidos durante el crecimiento. La respiración para mantenimiento es similar al metabolismo basal en animales, y se piensa que varía con la composición de los tejidos y la temperatura. **Austin y McLean**⁸ encontraron que las raíces del frijol en el estado de hoja primaria tuvieron tasas de respiración aproximadamente dos veces más que las hojas y el tallo, y las tasas se duplicaron con un incremento de 10°C en la temperatura.

Cuadro 3. Composición de tejidos del frijol y costos de la biosíntesis²³¹.

	Hoja	Raíz	Tallo	Vainas
	% de Materia Seca			
Carbohidratos	61.7	78.9	77.4	60.9
Proteínas	20.8	9.5	11.9	30.2
Lípidos	7.7	0.9	0.6	1.5
Lignina	4.0	7.0	7.0	4.0
Ceniza	5.8	3.7	3.2	3.4
	g CH₂O g⁻¹ tejido			
Costo de la biosíntesis*	1.50	1.28	1.32	1.52

*Fuente: **White (1981)**

Estimaciones de las tasas de respiración en el crecimiento fueron obtenidos de los costos de la biosíntesis²⁸³. Usando datos de composición tisular de frijoles de varias fuentes (Cuadro 3), se sabe que las vainas son las más costosas debido a su alto contenido proteínico, mientras que las raíces y tallos requieren menos debido a su alto contenido de carbohidratos (Cuadro 3).

Para la formación de los diferentes órganos de la planta del frijol, el requerimiento de los carbohidratos varia, dependiendo de la composición química de los tejidos. Por ejemplo, si la semilla de frijol contiene 70% de carbohidratos, 3% de aceites y grasas, 2% de lignina y 25% de proteína, si requerimiento energético total seria de 1.47 g de carbohidrato por gramo de semilla producida. Comparado con el Cuadro 3, se puede observar que a mayor contenido de proteína, mayor requerimiento energético. Por lo tanto, la diferencia entre los requerimientos energéticos en los cultivos explica la variación de los rendimientos. Esto explica porque el frijol no tiene rendimientos como el arroz o el trigo, pero no explica porque rinde menos que la soja y el maní, cuyas semillas tienen mayores contenidos de proteína y de aceite.

iii. Metabolismo del nitrógeno

El alto contenido proteico de la semilla explica la particular importancia del metabolismo del nitrógeno en la fisiología del frijol. En las semillas, un contenido proteico de 20 a 24% implica un contenido de nitrógeno de aproximadamente 4%, que a su vez significa que cada 1000 kg de grano implica una necesidad de 40 kg de N, sin incluir cantidades necesarias para reemplazar las perdidas debido a la lixiviación o N residual de otros tejidos. Se ha encontrado que hasta 80% del N foliar es remobilizado a otras partes de la planta antes del comienzo de la caída de hojas¹²⁴. Y esto nos recuerda que el contenido de N de hojas es alto y varia con la ontogenia, y eso puede mostrar directa correlación con AP.

Aunque el N puede ser introducido vía foliar, la vía normal de absorción es a través de las raíces, como nitrato o N_2 , que es convertido en los nódulos a iones amonio. Las diferentes vías metabólicas requeridas con las diferentes fuentes de N parece que tienen efecto sobre la eficiencia de la distribución del N en la planta²⁷⁹. En las hojas, la actividad de la enzima nitrato reductasa es grande en los tejidos de la hoja, cuya actividad varia grandemente con la edad de la hoja y el estado de crecimiento del cultivo¹⁷⁹ y algún nivel de actividad es mantenido incluso cuando el nitrato es excluido como fuente de nitrógeno.

B. Procesos de desarrollo

A medida que una planta crece, esto conlleva cambios en el tamaño, pero cambios en la forma están asociados con la formación de flores y vainas y eventualmente el rendimiento. Estos cambios son el resultado de procesos de desarrollo como la elongación de tallos, diferenciación floral de las yemas y el crecimiento de vainas. Las tasas de desarrollo son sensibles al fotoperiodo y la temperatura.

1. Germinación

Durante la fase seca asociado con la maduración de vainas, una semilla entra en un estado de metabolismo reducido caracterizado por cambios en deshidratación de membranas celulares y una severa reducción de la tasa respiratoria. Esta condición es mantenida mientras que el contenido de humedad de la semilla es bajo. Después del contacto con un medio de suficiente disponibilidad de agua, la semilla se imbebe de agua y la tasa respiratoria se incrementa dramáticamente y se da inicio a la germinación⁴⁶.

2. Crecimiento vegetativo

Después del establecimiento de las plántulas, el frijol bajo condiciones no estresantes sigue una fase de crecimiento exponencial hasta el inicio del crecimiento rápido de vainas. El crecimiento luego desacelera, algunos cultivos alcanzan nulo crecimiento y luego declinan en peso, y otros obtienen su máximo peso muy cerca a la madurez. Máximas tasas de crecimiento del cultivo (CGR) reportados para frijol arbustivo fue de 14 a 18 g m⁻² día⁻¹. Frijoles trepadores alcanzaron tasas de 20 g m⁻² día⁻¹, las tasas más altas presumiblemente reflejan una mejor estructura del follaje y una menor inversión en soporte de tejidos. Estos valores son menores que la mitad de valores reportados para otros cultivos C₃.

Tasa de asimilación neta (NAR) usualmente declina con la edad del cultivo. Típicos valores durante la floración son de 4 a 7 g m⁻² día⁻¹. Altos valores de NAR pueden reflejar la compensación para un área foliar limitada (e.g. debido a hábitos de crecimiento determinado) antes que alta eficiencia fotosintética ya que NAR durante la floración y el índice de área foliar (LAI) de la emergencia al inicio de floración puede estar negativamente correlación entre diferentes cultivares

LAI se incrementa con el crecimiento del cultivo, y también con CGR, alcanzando un pico alrededor del inicio de rápido crecimiento de vainas, la detención de la producción de hojas presumiblemente refleja incrementos en la demanda para el nitrógeno en vainas en

crecimiento. LAI en frijoles determinados pueden dejar de aumentar a un estado relativamente temprano debido a la falta de nudos para producir hojas adicionales. La mayoría de plantas de frijol experimentan una casi completa senescencia de hojas antes de la madurez. Pero algunos cultivos no presentan senescencia de hojas debido a un bajo cuajado o llenado de semilla, entonces la falta de senescencia probablemente refleja debilidad en la demanda de los órganos sumideros. En regiones templadas, tal patrón puede involucrar problemas en adaptación a las temperaturas y el fotoperiodo, particularmente crecimientos lentos con temperaturas bajas⁴⁶.

Área específica foliar (SLA= Área foliar/materia seca foliar) usualmente es baja al inicio, se incrementa hasta un máximo alrededor de la floración y luego declina hacia la madurez. Bajo condiciones no limitantes, la iniciación floral comienza a los 10 días después de la siembra²⁷⁴.

3. Crecimiento reproductivo

Los frijoles usualmente se autopolinizan. La dehiscencia de anteras ocurre antes de la apertura de la yema usualmente en la noche. El crecimiento del tubo polínico y la fertilización ocurren dentro de 12 horas, el ovulo más cercano al estilo es fertilizado primero. Generalmente se observan tres fases distintas en el crecimiento reproductivo: crecimiento de las paredes de la vaina, crecimiento de la semilla y desecación. Las vainas alcanzan la madurez aprox. 48 días después de la apertura floral, la máxima longitud de la vaina es alcanzada en 24 días y el peso fresco de las vainas cae solo en los últimos 6 a 8 días, aunque el peso de la semilla continua incrementándose hasta la última fase⁴⁶.

4. Senescencia y abscisión

Después de la fotosíntesis y la respiración, los procesos de senescencia y abscisión juegan roles importantes en la determinación del crecimiento de la planta. Algún tejido puede sufrir senescencia, especialmente folíolos, peciolos, flores y vainas, este proceso es usualmente acompañado por un programa establecido de abscisión. Sin embargo los tejidos donde la senescencia aparece que son de mayor importancia son en hojas, flores y vainas. Las hojas se caen cuando no fijan suficiente CO₂ (cerca al punto de compensación de CO₂). Las hojas se pueden caer debido a una remobilización del N a vainas en crecimientos, o las hojas pierden su eficiencia debido al sombreado por una gran cantidad de hojas en la canopia. La abscisión de vainas se da desde la antesis hasta 45 días después¹²⁵. Las vainas

más antiguas pueden caer si no hay una adecuada asimilación de carbohidratos. También juegan un rol protagónico, el ácido abscísico y el etileno como inductores de la senescencia.

2.1.9. Etapas del desarrollo de la planta

Desde la siembra hasta la cosecha, la planta de frijol pasa por varias etapas de desarrollo; la rapidez con que pasa de una etapa a otra es variable y depende principalmente del genotipo, hábito de crecimiento, la temperatura y el suelo. Cada etapa de desarrollo está asociada con cambios en tamaño, morfología, composición química, composición hormonal, etc. de la planta, los cuales pueden influir en forma distinta en la respuesta de la misma a los factores ambientales; la reacción de la planta a problemas y prácticas como enfermedades, sequía, fertilización y defoliación entre otros, es distinta según sea la etapa de desarrollo en que ella se encuentre. El desarrollo de la planta de frijol se divide en dos fases sucesivas: la fase vegetativa y la fase reproductiva. A lo largo de las fases vegetativa y reproductiva se han identificado 10 etapas bien definidas de desarrollo, las cuales conforman la escala⁴².

2.1.9.1. Fase Vegetativa

Se inicia en el momento que la semilla dispone de condiciones favorable para la germinación y termina cuando aparecen los primeros botones florales y comprende cinco etapas, las cuales resaltaremos las características más importantes:

- *ETAPA V0 (Germinación)*: La semilla tiene humedad suficiente para el comienzo de la germinación⁴². Aumento en la respiración de la semilla debido a la remobilización de nutrimentos y al inicio de la formación de nuevos tejidos. El peso seco declina aunque los tejidos aumentan bastante en volumen⁴⁴.
- *ETAPA VI (Emergencia)*: se inicia cuando los cotiledones del 50% de las plántulas del cultivo aparecen al nivel del suelo. El hipocótilo se endereza y crece hasta alcanzar su tamaño máximo; las hojas primarias, ya formadas en el embrión de la semilla, crecen y se despliegan⁴². Se da inicio a la diferenciación floral y se pueden observar botones florales microscópicos⁴⁴.
- *ETAPA V2 (Aparición de hojas primarias)*: Esta etapa se inicia cuando están desplegadas las hojas primarias del 50% de las plantas del cultivo. Al comienzo de

esta etapa, la yema terminal del tallo principal se puede distinguir entre las dos hojas primarias⁴².

- ETAPA V3 (Primera hoja trifoliada): Esta etapa se inicia al desplegarse la primera hoja trifoliada en el 50% de las plantas del cultivo. Se puede observar en esta etapa la segunda hoja trifoliada de tamaño muy reducido todavía; los cotiledones se han secado completamente, y por lo regular se han caído. Al final, se empieza a formar la primera rama, generalmente a partir de la yema de la primera hoja trifoliada⁴².
- Etapa V4 (Tercera hoja trifoliada): Cuando el 50% de las plantas del cultivo ha desplegado su tercera hoja trifoliada. En la axila de cada hoja se encuentra una tríada de yemas que originan estructuras vegetativas y/o reproductivas. Es la etapa más larga de la fase vegetativa⁴².

2.1.9.2. Fase Reproductiva

Se inicia con la aparición de los primeros botones o racimos florales y termina cuando el grano alcanza el grado de madurez necesario para la cosecha; a pesar de ser esta fase eminentemente reproductiva, durante ella las variedades indeterminadas (Tipos II, III y IV) continúan, aunque con menor intensidad, produciendo estructuras vegetativas⁴².

Comprende cinco etapas y son:

- ETAPA R5 (Prefloración): se inicia cuando en el 50% de las plantas aparecen los primeros botones florales en variedades tipo I o los primeros racimos en las de hábito de crecimiento indeterminado. Al finalizar la prefloración, los pedúnculos de los racimos se alargan y la corola aparece entre las bractéolas, adquiriendo la pigmentación característica de la variedad⁴².
- ETAPA R6 (Floración): Se inicia cuando está abierta la primera flor en el 50% de las plantas del cultivo. En variedades tipo I, la floración empieza en el último nudo del tallo principal y continúa en forma descendente, mientras que en las variedades indeterminadas empieza en la parte baja de la planta y continúa en forma ascendente⁴².
- ETAPA R7 (Formación de Vainas): se inicia cuando aparece la primera vaina en el 50% de las plantas del cultivo. La corola puede estar desprendida o puede colgar aun del extremo inferior de las vainas. Termina cuando las vainas han alcanzado su máxima longitud⁴².

- ETAPA R8 (Llenado de Vainas): empieza cuando en el 50% de las plantas del cultivo la primera vaina cesa de alargarse y empieza a llenarse debido al crecimiento de las semillas. En esta etapa termina el desarrollo vegetativo de las variedades indeterminadas, también se observa el inicio de la defoliación de las plantas⁴².
- ETAPA R9 (Maduración): Se inicia cuando la primera vaina del 50% de las plantas de un cultivo cambia su color verde por amarillo o pigmentado; las hojas, empezando por las inferiores, adquieren un color amarillo y se caen. El contenido de humedad baja hasta el 15 % en donde el grano adquiere su coloración típica⁴².

2.1.10. Ecología del Cultivo

2.1.10.1. Temperatura (T°)

El frijol es una planta anual herbácea, muy cultivada desde el trópico hasta la zona templada, por lo tanto tiene un rango amplio de adaptación a las temperaturas⁷⁷. La temperatura óptima para el desarrollo del cultivo de frijol esta entre 18 a 21°C, aunque se puede extender hasta los 26°C en climas cálidos²⁵⁷. Las temperaturas mínimas que pueden soportar el cultivo para su desarrollo normal está relacionado a las diferentes etapas del periodo vegetativo, así se tienen: para la germinación 8 a 12°C, para la floración de 15 a 18°C y para la maduración y desarrollo de vainas de 18 a 20°C ^{40, 138}, siendo su temperatura base de 10°C. El frijol para conseguir una germinación homogénea y normal necesita T° mayor a 14 °C⁵². Existe una cierta asociación entre el color y el comportamiento respecto a la temperatura. En un trabajo efectuado en ocho localidades, las variedades de color café y crema destacan entre 17 a 20°C; las variedades de grano rojo destacan más en regiones con temperaturas superiores en promedio a los 25°C, las variedades de grano negro destacaron en zonas con temperaturas de 20 a 25°C²⁷³. Las T° excesivamente altas superiores a 28°C unidas a regímenes de HR bajas pueden provocar la caída de las flores, incluso las vainas recién cuajadas. Puede soportar periodos cortos de temperatura de 5 a 40°C, pero si se prolonga ocurren daños irreversibles como la falta de floración o problemas de esterilidad¹⁷³.

2.1.10.2. Humedad

El agua es importante para el crecimiento y desarrollo final del cultivo de frijol, este depende mucho de la disponibilidad del agua. El frijol no tolera ni excesos ni deficiencias

de humedad¹⁷³. A continuación, se menciona la humedad relativa y la del suelo y su relación con el adecuado desarrollo del cultivo.

2.1.10.2.1. Humedad relativa (HR)

La temperatura y humedad están íntimamente relacionadas. La caída de flores está asociada con altas temperaturas y baja HR (el efecto negativo depende del momento en que ocurre y la intención de duración); el periodo crítico corresponde a las primeras etapas de floración que desarrolla el mayor porcentaje de vainas¹⁷³, por lo tanto, en el periodo de floración la HR debe ser superior a 50% para favorecer la formación e instalación de las vainas del frijol. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que una alta humedad en el suelo o en el aire inducen intumescencia en cultivares de frijol con follaje abundante y con vainas no expuestas directamente al sol.

2.1.10.2.2. Humedad del suelo

El frijol no tolera exceso ni deficiencia de humedad¹⁵⁸. Los excesos producen encharcamiento del terreno y por ende producen el marchitamiento de las plantas. El frijol es una planta sensible al anegamiento cuyas raíces experimentan estrés por falta de oxígeno que se traduce en una disminución de la tasa fotosintética²²¹, conductancia estomatal, respiración y un incremento de mecanismos de fotoprotección, generación de ROS a consecuencia de una alta disponibilidad de energía luminosa⁴ y se observa un incremento de la actividad de la enzima ADH (Alcohol Deshidrogenasa) en las raíces³⁶. La disminución de la fotosíntesis es independiente de las características estomáticas, se debe más a una baja síntesis de las enzimas fotosintéticas²³⁵, baja concentración de N foliar¹⁰⁹ o daño solar por exceso de energía lumínica¹⁵⁶. En frijoles, la proporción de energía lumínica absorbida destinada a las reacciones químicas fotosintéticas es menor comparado con especies tolerantes al anegamiento. Cuando el suelo está inundado constantemente, las reservas de carbohidratos pueden ayudar a las células a respirar anaeróbicamente, pero cuando se agota el ATP se observa un hinchamiento de las mitocondrias en cuestión de minutos⁷⁰; si el fenómeno se prolonga puede causar daños irreversibles a la mitocondria y la viabilidad celular, que generalmente ocurre bajo 15 horas de anaerobiosis¹⁹².

Asimismo, las deficiencias afectan el crecimiento sobre todo en las etapas iniciales del cultivo⁷⁷, y son causa principal para la baja producción. Asimismo, altas temperaturas

asociada a una HR elevada, favorecen la aparición de diversas enfermedades. En el Perú se encuentran grandes áreas de cultivo de frijol en zonas desérticas, donde la disponibilidad de agua es limitada, los riegos se dan esporádicamente y en un número limitado de veces. Así, el estrés hídrico que se da con frecuencia, tiene su mayor efecto cuando el frijol se encuentra en plena floración y se acentúa en las variedades tardías ya que estas demoran mayor tiempo en la movilización de carbohidratos a las vainas¹⁸⁹.

Por lo tanto, se concluye que la humedad del suelo debe ser bien distribuida durante las diferentes fases del periodo vegetativo, principalmente en la floración y fructificación; es decir en el desarrollo final del cultivo del frijol⁴⁰, ya que a mayor frecuencia de riego mayor es el número de vainas por planta, granos por vaina, peso de 100 gramos y el rendimiento⁷⁷. La situación ideal para el crecimiento y la fijación del N es de 70% de la capacidad de campo del suelo¹⁵⁸. En cuanto a las exigencias de riego, los requerimientos del frijol son del orden de los 500 a 700 mm de lámina de agua⁷⁷.

2.1.10.3. Luz

La luz es un factor importante en la fotosíntesis, morfología y fenología de la planta⁷⁷. En el caso de las leguminosas, la mayor parte de la luz es captada por las hojas periféricas; el 40-50% de las hojas superiores interceptan el 90% de la luz. El rendimiento de la planta es consecuencia de su capacidad fotosintética, lo cual tiene una alta correlación el área foliar. Por lo tanto, cualquier factor que modifica el área foliar influirá en el rendimiento⁴³. Las hojas relativamente horizontales destacadas implican una pérdida de eficiencia debido a una excesiva iluminación de hojas superiores y a un sombreado de hojas inferiores²⁸¹.

El frijol es una planta fotoperiódica de días cortos²⁹, aunque la mayoría de cultivares son a menudo sensibles a largos fotoperiodos y altas temperaturas⁷⁷, y necesitan para su normal desarrollo alrededor de 12 h de luz al día para poder completar su ciclo de vida en 100 a 130 días²³³. En condiciones de otoño, en la costa central se encontró que existe un mayor número de hojas y cantidad de materia seca en plantas bajo radiación directa que bajo sombra con diferencias significativas¹⁵⁸.

2.1.10.4. Suelo

El cultivo del frijol prefiere suelos de textura franca, limosa o franco limoso, aireados y con buen drenaje, pero tolera bien suelos franco arcillosos. El frijol no es un cultivo exigente en cuanto a las condiciones físicas del suelo. Sin embargo, produce bien en terrenos sueltos, profundos, aireados y con buen drenaje, no debiéndose cultivar en suelos húmedos, calizos y/o salinos⁷⁷. El pH óptimo para el buen desarrollo del cultivo del frijol está entre 5,5 y 7,0, el frijol es altamente sensible a la salinidad del suelo y del agua. El frijol no tolera condiciones de salinidad ni alcalinidad, se debe evitar sembrar en suelos con un pH mayor a 8 y el exceso de sales provoca una reducción del crecimiento de la planta del área foliar acompañado de una necrosis o quemazón de los márgenes foliares²⁵⁷. Uno de los papeles importantes que tienen las leguminosas como mejorador de los suelos es que ayuda a formar materia orgánica en el suelo. Dependiendo de las condiciones para un buen desarrollo, las leguminosas pueden aportar más de 100 kg de nitrógeno por hectárea en forma de residuos de plantas y raíces⁷⁷. El cultivo de frijol de 100 a 120 días a la cosecha y con un rendimiento de 2,500 kg.ha⁻¹, usualmente extrae del suelo entre 60 a 80 kg.ha⁻¹ de nitrógeno y 40 kg.ha⁻¹ de fósforo²³³.

2.1.10.5. Malezas

La productividad del frijol además de ser limitada por baja disponibilidad de nutrientes y el estrés hídrico es fuertemente restringida por la competencia con malezas anuales y perennes²⁸⁵. El frijol es sensible a la competencia con malezas. El rendimiento del frijol se reduce en un 13 a 77% con solanáceas silvestres (*Solanum sarrachoides*) a 2 y 100 plantas m⁻¹ de hilera, respectivamente¹⁷. La maleza “cerraña” (*Sonchus arvensis* L.) a 98 plantas m⁻² reduce el rendimiento del frijol en un 83%²⁹³. Malezas anuales no controladas reducen el rendimiento del frijol en un 70% con 0,38 kg.ha⁻¹ de pérdida de rendimiento del frijol por cada 1 kg.ha⁻¹ de incremento en biomasa de las malezas.

La competitividad de cultivos con las malezas no siempre mejora con la adición de nutrientes²²⁰, aunque las especies de malezas responden de manera diferente a las variaciones en los niveles de nutrientes. La competitividad del frijol con las malezas es asociada con el índice de área foliar (IAF)²⁸⁴. El IAF del frijol se puede aumentar con mayor aporte de nutrientes, aunque la competitividad relativa de algunas malezas con el

frijol puede aumentar en tales condiciones²⁵³. La nutrición del cultivo de frijol (NPK) puede mejorar su rendimiento y al mismo tiempo que mejora la competitividad relativa de frijol con tres especies de malas hierbas (*Solanum nigrum*, *Bidens pilosa* y *Galinsoga parviflora*). El rendimiento del frijol fue reducido en 48% por *Bidens pilosa*. La absorción de nutrientes y el crecimiento del frijol disminuyeron en comparación a la absorción de nutrientes y el crecimiento de malezas cuando el N y P fueron aplicados, pero el K incrementa la competitividad del frijol respecto a las malezas²⁵³. Por lo tanto, el conocimiento de los efectos del suministro de nutrientes en frijol es necesaria la interacción de malezas para diseñar estrategias de manejo de nutrientes que sean compatibles con el manejo de malezas. Incrementar el N derivado de la atmósfera (**FBN**) mejora la competitividad del frijol con respecto a las malezas, en comparación con la fertilización mineral de N²⁵³.

Los agricultores comúnmente aplican herbicidas que son ambientalmente dañinas, por lo tanto, es mejor incrementar la densidad de siembra, ya que existe sinergismo entre plantas de la misma especie⁵⁰. y además el follaje cubre los espacios entre hileras suprimiendo la luz necesaria para la germinación de malezas. La principal desventaja es que se incrementa el riesgo de enfermedades cuando las plantas están muy juntas y también hay solapamiento de raíces¹⁸.

El frijol tiene un periodo crítico de competencia entre 20 y 60 días después de la siembra, si el cultivo se mantiene infestado de malezas por más de 40 días el rendimiento baja en forma muy significativa y un descenso significativo en el número de plantas. El tratamiento de mayor rendimiento fue el de 60 días de campo limpio después de la siembra, enmalezado después.

Las malezas más frecuentes en el cultivo del frijol son: *Cyperus esculentus* (coquito), *Cyperus rotundus*, *Amaranthus spp.*, *Bidens pilosa* (amor seco), *Sorghum halepense* (grama china), *Sesbania exasperata* (hierba de gallinazo), *Bromas uniolodes* (cebadilla), *Heteranthera reniformes* (oreja de ratón), *Solanum nigrum* (hierba mora)⁴⁵.

2.1.10.6. Plagas

El cultivo del frijol es atacado por muchas especies de insectos y ácaros, los daños puede ocurrir desde la siembra hasta después de la cosecha e inclusive durante el periodo de almacenamiento. La magnitud de los daños depende de las condiciones ambientales, época de siembra, cultivares utilizados y en especial el medio geográfico donde se desarrolla el cultivo del frijol. En el caso de cultivo de frijol se puede deducir que las de plagas son más severas en la costa y menos graves en la sierra⁷⁷.

Las plagas más importantes del cultivo del frijol: Gusanos cortadores (*Feltia experta*, *Agrotis ypsilon*, *Spodoptera frugiperda*), gusano picador o barrenador del tallo (*Elasmopalpus lignosellus*), gusano pegador de hojas (*Omiodes indicata*), barrenador de brotes (*Crociosema aporema*), barrenador de vainas (*Cydia favibora*), siendo los dos últimos plagas clave y los de mayor importancia económica^{120, 257}.

2.1.10.7. Enfermedades

Las enfermedades son causadas principalmente por hongos, virus y bacterias, que son capaces de reducir los rendimientos y la calidad del grano significativamente. El frijol es sensible a un gran número de estas enfermedades que se cuenta más de 200 en todo el mundo¹²⁰. Las enfermedades más importante son: pudriciones radiculares (*Rhizoctonia*, *Fusarium*), nematodos del nudo de la raíz (*Meloidogyne incognita*), botritis (*Botritis sp.*), roya (*Uromyces appendiculatus*); siendo los dos últimos junto con el virus BCMV, los de mayor importancia económica^{120, 257}.

En el Perú: en la Región de la Costa se ha encontrado que los factores que más están afectando la producción del frijol son las pudriciones radiculares, el virus del Mosaico Común (BCMV), la roya y los nemátodos¹²⁰.

2.1.11. Rendimiento

Los componentes del rendimiento son los factores morfológicos y fisiológicos que directa o indirectamente intervienen en el rendimiento⁴⁴.

Los componentes del rendimiento¹³⁸, se agrupan en dos:

- a. Morfológicos: número de vainas, número de ramas por planta, número de semillas por vaina y peso seco de individual de: tallos, ramas, vainas y semilla.
- b. Fisiológicos: tamaño y duración del crecimiento foliar, el área foliar por unidades de peso y eficiencia de traslocación de fotosintatos.

Por su influencia en el rendimiento⁷⁷, los componentes se dividen en:

- a. Directos: Número de vaina, índice de vigor y peso en 100 gramos.
- b. Indirectos: Precocidad (número de nudos al primer racimo, número de días entre siembra y la floración), superficie foliar, aptitud de nodulación y resistencia a la sequía o el frío.

Finalmente la fórmula de rendimiento es la siguiente:

$$\text{Rendimiento} = \text{Peso de una semilla} \times \text{N}^\circ \text{ semillas/vaina} \times \text{N}^\circ \text{ vainas/planta} \times \text{N}^\circ \text{ plantas/m}^2$$

Para obtener el mejor rendimiento se ha propuesto la necesidad de seleccionar cultivares más eficientes en el transporte de la materia seca y nitrógeno a las semillas, con una adecuada combinación, entre los estados de crecimiento en la planta y el llenado de las vainas.

2.2. EL NITRÓGENO

2.2.1. Importancia

Después del carbono, el nitrógeno es el elemento requerido en más grandes cantidades por las plantas (1.5% de la materia seca) y uno de los más importantes en los sistemas biológicos, que desempeña un papel central en el metabolismo de la planta como un constituyente de ácidos nucleicos^{2w}, clorofila, co-enzimas, fitohormonas y metabolitos secundarios^{38, 152}. Las plantas son la última fuente de N y carbono para todos los animales, incluso los humanos¹⁰⁶. En la naturaleza, existe principalmente en forma gaseosa, y constituye aproximadamente el 78% de la atmósfera. A pesar de su abundancia, el nitrógeno (N) es uno de los nutrientes más limitantes del crecimiento en ecosistemas terrestres y acuáticos³⁸, debido a que su forma gaseosa es inerte e inutilizable por la mayoría de los organismos vivos, excepto para los microorganismos fijadores de nitrógeno³⁸. El nitrógeno (N) es uno de los elementos claves en la producción agrícola mundial, cada año entre 150 y 200 millones de toneladas de N son requeridos por las

plantas²⁵⁴. Generalmente, solo 40-50% del fertilizante nitrogenado es utilizado por el cultivo²⁴³. El N el cual es perdido del sistema suelo-planta puede originar problemas ambientales, incluyendo contaminación del aire y del agua¹⁵².

2.2.2. Origen de nitrógeno en el suelo

El ciclo del N en el suelo es una parte integral del ciclo global de N en la naturaleza. En la naturaleza existen dos fuentes principales de reserva de N para las plantas. La mayor es la atmósfera, donde el N₂ es el gas predominante (79,08% en volumen), aunque también existen otras formas gaseosas de N de mucha menor importancia cuantitativa: óxido nitroso (N₂O), óxido nítrico (NO), dióxido de nitrógeno (NO₂) y amoníaco (NH₃). La capa arable de un rico suelo de la pradera puede contener hasta 3 toneladas de nitrógeno combinado por acre; en la atmósfera sobre esta misma área, habrá cerca de 35.000 toneladas de nitrógeno elemental. Sólo un número muy limitado de microorganismos tienen la capacidad para utilizar nitrógeno elemental; todos los demás organismos vivos en la Tierra requieren nitrógeno combinado para llevar a cabo sus actividades de la vida^{178, 270}. Los seres vivos cuentan con una gran proporción de nitrógeno en su composición química. El nitrógeno oxidado que reciben como nitrato (NO₃⁻) es transformado a grupos aminoácidos (asimilación). Para volver a contar con nitrato hace falta que los descomponedores lo extraigan de la biomasa dejándolo en la forma reducida de ion amonio (NH₄⁺), proceso que se llama amonificación; y que luego el amonio sea oxidado a nitrato, proceso llamado nitrificación³⁵.

La otra reserva importante de N es la materia orgánica del suelo (MOS). Del total del N que hay en el suelo, aproximadamente el 98% se encuentra formando compuestos orgánicos. Dependiendo de su contenido de materia orgánica, los primeros 20 centímetros de profundidad de un suelo pueden contener entre 1.000 y 10.000 kg. de N por ha. Estas formas orgánicas incluyen proteínas, aminoácidos y azúcares aminados. Sin embargo, las formas químicas identificadas representan sólo un 30-35% del total del N orgánico del suelo. El resto, entre un 70 a 75% del N orgánico, está en estructuras químicas complejas que aún no se han podido identificar¹⁷⁸.

2.2.3. Fuentes de N en el suelo

El nitrato y amonio son las principales fuentes de N inorgánico absorbido por las raíces de las plantas superiores¹⁵². El nitrato está generalmente presente en concentraciones más altas (1-5 mM) que el amonio (20-200 μ M) en la solución suelo de suelos agrícolas¹⁸¹. El nitrato es también más móvil en el suelo que el amonio y por lo tanto más disponible para las plantas¹⁵⁹. En los suelos agrícolas no fertilizados, el amonio puede estar presente en concentraciones más altas que el nitrato, y los aminoácidos proporcionan una fuente adicional de N. La concentración de aminoácidos en la solución suelo varía entre 0,1 y 100 μ M y dominan la reserva de N unido a las partículas del suelo¹²⁶.

La disponibilidad de las fuentes de N en el suelo varía sustancialmente en el tiempo y en el espacio, en función de las propiedades del suelo tales como la textura, el pH, la humedad y la actividad microbiana¹⁵². Como consecuencia, las plantas han evolucionado mecanismos para modular su eficiencia en la adquisición de N en respuesta a la disponibilidad y la forma de N externo, así como a la demanda de N durante su ciclo de vida²⁶⁹. Esto incluye tener varios sistemas de transporte de N que median la absorción a diferentes concentraciones externas, así como ser capaz de cambiar la arquitectura del sistema radicular para permitir una mejor exploración de un volumen de suelo determinado¹⁵².

La absorción de nitrato y amonio en las raíces de plantas está mediada por proteínas de transporte situadas en la membrana plasmática de las células corticales y epidermales de la raíz. Varios sistemas de transporte fisiológicos median la captación de nitrato o amonio con diferentes afinidades. Los sistemas de transporte de alta afinidad (HATS) operan a bajas concentraciones (<0.5 mM) de nitrato o amonio externo. A mayores concentraciones, >0.5 mM, la absorción se produce principalmente por los sistemas de transporte de baja afinidad (LATS), lo que permite grandes entradas de sustrato¹⁵².

2.2.4. Absorción y Transporte de N inorgánico en la planta

a) Absorción de nitrógeno por las raíces

En las plantas superiores, hay transportadores involucrados en la absorción de nitrato o amonio por la raíz. En el caso de nitrato, hay dos tipos de transportadores, NRT1 y NRT2 que median los transportes de nitrato de baja y de alta afinidad en las raíces,

respectivamente²⁵². En el caso del amonio hay tres tipos de transportadores, AMT/MEP/Rh²⁶⁸. En general se supone que los transportadores independientemente del tipo de transportador de nitrato, el transporte hacia el interior de nitrato a través de la membrana plasmática se produce contra un fuerte gradiente de potencial electroquímico porque el ion nitrato negativamente cargado tiene que superar tanto el potencial negativo de la membrana plasmática, así como una concentración de gradiente alta. Por lo tanto, la absorción de nitrato requiere energía metabólica.

Los transportadores de nitratos NRT1 y NRT2 transportan nitrato a través de la membrana plasmática en simporte con protones⁸⁷, que a su vez requiere gastos de ATP por la H⁺-ATPasa para la extrusión de protones a fin de mantener el gradiente de protones en la membrana plasmática. Los niveles de fosforilación de AtNRT1 (NRT1 en Arabidopsis) en respuesta a cambios en las concentraciones externas de nitrato permitiendo que la proteína AtNRT1.1 funcione como un sensor de nitrato¹¹⁴ y pueda controlar su propio medio de transporte. AtNRT2.1 está involucrada en el transporte de nitrato a bajas concentraciones de nitrato y sistemas de alta afinidad. El aminoácido glutamina representa la señal principal para la comunicación del estado de N a las raíces, permitiendo la regulación de la tasa de absorción de N de acuerdo con la demanda de N durante el crecimiento de la planta ¹⁶⁹. Comúnmente, el consumo de nitrato es reducido sustancialmente a la floración¹⁴⁸. La subfamilia AMT1 que transporta amonio a través de uniporte NH₄⁺ o simporte NH₃/H⁺ ¹⁴⁷. Los transportadores de amonio de la familia AMT1 representan la principal vía de entrada para la absorción radicular de amonio¹⁴⁶. Debido a que el amonio es un ion cargado positivamente tienen una gradiente positiva sin gasto de energía y es la principal forma tomada por las raíces¹⁴⁶. En general, la absorción de N en la planta está regulada por la oferta de fotoasimilados, especialmente en la noche¹⁵².

b) Eflujo de nitrógeno por las raíces

Mientras que la absorción de nitrógeno por las raíces es esencial para el crecimiento de las plantas, el eflujo también puede ocurrir¹⁵². Esto puede ocurrir cuando hay exceso de N. Aunque su importancia fisiológica no es clara, se cree que desempeña un papel en la detección de la disponibilidad de nitrato proporcionando una regulación dinámica y flexible

de la homeostasis de nitrato y su absorción neta¹⁶⁰. El eflujo de amonio sirve para regular la concentración de amonio en la planta, a través de la membrana plasmática.

c) Transporte radial a través de la raíz y carga de nitrato al xilema

Una vez que el nitrato se ha incorporado en el **simplasto** de la raíz, el nitrato puede moverse radialmente a través de los diferentes tipos de células de la raíz y pasar la banda de Caspary endodérmico. Para que el nitrato sea transportado a los brotes, el nitrato es cargado desde el simplasto de las células de la estela en el apoplasto del xilema para transportes a larga distancia a través de la transpiración¹⁵². El amonio absorbido por las raíces es asimilado o almacenada en vacuolas en la raíz o se transporta a las partes aéreas. Generalmente se ha supuesto que el amonio no se utiliza para el transporte de larga distancia de N dentro de la planta; sin embargo, la concentración de amonio de xilema puede estar en el rango milimolar²⁸⁹, lo que sugiere que el amonio se transporta desde las raíces a los brotes. Por lo tanto los transportadores de amonio son importantes en toda la planta con el fin de mover el amonio procedente de los sumideros. Generalmente, las concentraciones de amonio en el citosol varían de 1 a 30 mM¹⁶¹. Excesiva acumulación de amonio en el citosol puede conducir a la necrosis de los tejidos de la planta.

d) Transporte de nitrato dentro de la célula

A diferencia del amonio, que se incorpora predominantemente en compuestos orgánicos en la raíz, el nitrato es distribuido más fácilmente en toda la planta⁵⁹. El nitrato se acumula en las vacuolas en conexión con el citosol y se pueden almacenar en las vacuolas de las raíces, brotes y órganos de almacenamiento, desde donde puede ser recuperada²¹³. El nitrato almacenada en las vacuolas puede ser un depósito de N que se utilizará cuando el suministro externo de N es baja. Sin embargo, esta reserva de N es, en la mayoría de los casos, muy pequeño comparado al N orgánico en la planta, y además la reserva de nitrato en las vacuolas se agota dentro de 12 a 48 h de falta de nitrato²⁰⁹. El nitrato se almacena en vacuolas transitoriamente, por ejemplo durante la noche cuando el nitrato no se metaboliza por la nitrato reductasa. Esto sugiere que el almacenamiento de nitrato en las vacuolas sirve

como un amortiguador de nitrato para procesos de transporte en lugar de almacenamiento de N.

e) Transporte de N dentro del brote

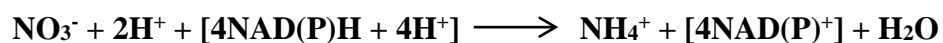
Varios miembros de la familia NRT1 de los transportadores de nitrato se ha encontrado que ejercen un papel específico en el control de distribución de nitrato en el brote. Se cree que el transporte de nitrato a través de la membrana plasmática en el floema proviene de las hojas más viejas⁸⁰. Esto permitiría la remobilización de nitrato de hojas viejas (origen) a tejidos demandantes de N (sumidero). Sin embargo, las concentraciones de nitratos en el floema son generalmente muy bajas (μM), por lo tanto, la importancia fisiológica de este proceso es probablemente limitada. En *Arabidopsis* varios NRT2 genes se expresan en el brote y podrían estar involucrados en la distribución de nitrato entre diferentes órganos y tipos de células en el brote. La absorción primaria de nitrato también puede ocurrir en las hojas, lo cual es importante para las epífitas y la fertilización foliar de las plantas cultivadas¹⁵².

2.2.5. Absorción orgánica del nitrógeno

Además de la absorción inorgánica de N, la absorción de N orgánico también contribuye a la nutrición de las plantas¹⁶⁸. El N orgánico es la principal forma de N en los suelos, en la materia orgánica y en forma de péptidos y proteínas, aminoácidos y urea¹⁵⁹. Los péptidos y proteínas se descomponen en aminoácidos en el suelo por proteasas liberadas por los microorganismos del suelo¹⁵⁹. La concentración de los aminoácidos libres en los suelos agrícolas está en el intervalo de 1 a 100 mM, que constituyen la mayor fracción N disuelto orgánico de bajo peso molecular¹²⁸. La absorción de aminoácidos por las plantas está en fuerte competencia con los microbios. La arginina es una forma importante de almacenamiento de N y es catabolizada durante la remobilización de N del tejido de origen o durante la senescencia. El catabolismo de la arginina tiene lugar en las mitocondrias y produce urea, que es transportado al citosol. Luego, la urea se hidroliza a amonio que es luego reasimilada.

2.2.6. Asimilación del nitrógeno

Para que el N en forma de nitrato (NO_3^-) sea incorporado en las estructuras orgánicas, el nitrato tiene que ser reducido a amonio (NH_4^+). La mayor parte del amonio, ya sean originarios de la reducción de nitrato o de absorción directa de la solución del suelo, se incorpora normalmente en compuestos orgánicos en las raíces, aunque el NH_4^+ también puede ser translocado al brote, incluso en las plantas que recibieron nitrato como la forma de N en el suelo²²⁵. La reducción de nitrato a amonio está mediada por dos enzimas: la *nitrato reductasa*, que cataliza la reducción de dos electrones de nitrato a nitrito (NO_2^-), y *nitrito reductasa*, que transforma el nitrito de amonio en un proceso de transferencia de seis electrones. La reacción neta es:



La mayor parte de las especies vegetales tienen dos genes de nitrato reductasa (*NIA*) que se expresan en brotes y raíces⁴⁹. El nitrito generada por la nitrato reductasa se transporta al cloroplasto para la reducción en amonio mediante nitrito reductasa. Se localiza en los cloroplastos de las hojas y en las proplastidios de raíces y otros tejidos no verdes. En hojas verdes, el donador de e^- s es ferredoxina reducida, generado por el fotosistema I durante el transporte electrónico fotosintético lumínico. Los electrones de la ferredoxina reducida son pasados al nitrito vía un dominio unido a la ferredoxina (un grupo Fe-S), y un co-factor *siroheme* unido a la enzima nitrito reductasa. En los plastidios de la raíz, la ferredoxina reducida se genera a través de NADPH en la vía pentosa fosfato junto con reductasa ferredoxina-NADP⁺. La enzima tiene una vida media de sólo unas pocas horas y está ausente en las plantas que no reciben nitrato y se activa fuertemente con la adición de nitrato²³. Además, la concentración de la nitrato reductasa se incrementa por la luz, sacarosa y citoquinina, mientras que la glutamina, un producto primario de la asimilación N, reprime la nitrato reductasa¹³⁶. Alcanza máximos picos de actividad cuando la tasa de expansión de la hoja es máxima y se convierte en muy baja en las hojas completamente expandidas. El nitrato puede ser reducido en raíces y brotes, dependiendo del nivel de suministro de nitrato, especie y edad de la planta¹⁵². Cuando se expresa en equivalentes de ATP, el requerimiento de energía para la reducción de un mol de nitrato es de 15 moles de ATP con un adicional de 5 moles de ATP para la asimilación de amonio²¹⁹.

El amonio es un intermediario central en el metabolismo del N en la planta. Además de la absorción del suelo por las raíces, el amonio es constantemente generado en altas tasas en los tejidos vegetales por procesos tales como la reducción de nitrato, la fotorrespiración, biosíntesis de lignina, remobilización inducida de N en la senescencia y la fijación de N₂ en leguminosas¹⁵². Independientemente de la fuente de amonio o el órgano en el cual es asimilado (raíces, nódulos de las raíces y hojas), las enzimas clave involucradas son la glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT). Ambas enzimas están presentes en las raíces, en los cloroplastos, y en microorganismos fijadores de N₂. A través de estas dos enzimas, el aminoácido glutamato actúa como aceptor para el amonio, formando la amina glutamina. La reacción neta es:



La glutamina sintetasa (GS) tiene múltiples formas presentes en el citosol y en los plastidios¹⁴. La GS citosólica transforma el amonio en glutamina para su transporte y distribución en toda la planta. La otra enzima implicada en la asimilación de amonio, glutamato sintasa (GOGAT), cataliza la transferencia del grupo amida (-NH₂) de la glutamina a 2-oxoglutarato, que es un producto del ciclo del ácido tricarboxílico. La conversión de glutamina en glutamato tiene lugar en los plastidios que tienen dos isoformas de GOGAT. Una forma acepta electrones de ferredoxina reducida (desde el fotosistema I), el otro de NADPH de la respiración¹⁵².

El N inorgánico asimilado en glutamato y glutamina puede ser fácilmente utilizado para la síntesis de otras amidas, así como aminoácidos, ureidos, aminas, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros compuestos que contienen N. La glutamina y glutamato son los principales puntos de entrada de amoniaco en compuestos orgánicos, y los grupos amino en glutamato y aspartato y el grupo amida de la glutamina son la fuente de N de la mayoría de los compuestos nitrogenados de la planta, incluidos otros aminoácidos¹⁶³.

La asimilación de amonio en las raíces tiene una gran necesidad de esqueletos de carbono para la síntesis de aminoácidos. Estos esqueletos de carbono son proporcionados por el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y los intermedios retirados tienen que ser repuesto por el aumento de la actividad de PEP carboxilasa. En comparación con el suministro de

nitrate, la fijación neta de carbono en las raíces con amonio es varias veces más alta²⁶⁶. Con el fin de minimizar los costos de carbono para el transporte de la raíz a los brotes, la mayor parte de la N asimilado en las raíces es transportado en forma de compuestos ricos en N con relaciones de N/C >0,4. Uno, raramente dos o más, de los siguientes compuestos dominan en el exudado de xilema de las raíces: las amidas glutamina (2N/5C) y asparagina (2N/4C); el aminoácido arginina (4N/6C); y los ureidos alantoína y ácido alantoico (4N/4C). En el transporte del floema de frutos en desarrollo, que son los sumideros no fotosintéticos, aminoácidos con una relación N/C >0,4 son las formas predominantes de transporte de nitrógeno¹⁵². En las leguminosas, como el frijol común, caracterizada por nódulos determinados, la mayoría del N fijado transportado en el xilema de las raíces noduladas se incorpora como ureidos alantoína y ácido alantoico¹⁵². Las concentraciones de estos aminoácidos de transporte varían y son modulados por factores tales como la luz y la disponibilidad de nitrógeno. La glutamina se sintetiza principalmente a la luz, mientras que la asparagina se sintetiza preferentemente en la oscuridad¹⁵².

2.2.7. Abastecimiento del nitrógeno

La elección de la fuente de suministro de N, ya sea amonio o nitrato depende de varios factores. Suelos ácidos o que tienen un bajo potencial redox (e.g. humedales) tienen una preferencia por amonio¹⁴¹. Por el contrario, suelos calcáreos con pH alto utilizan nitrato preferentemente. Sin embargo, las mayores tasas de crecimiento y rendimiento de las plantas se obtienen por suministros combinados de amonio y nitrato. Como el amonio o nitrato comprende aproximadamente 80% de los cationes y aniones totales absorbidos por las plantas, la forma de N tiene un fuerte impacto en la absorción de otros cationes y aniones, en la regulación del pH celular y el pH de la rizósfera. La asimilación de amonio aumenta el pH de la rizósfera mientras que el nitrato reduce el pH de la rizósfera, a través de una absorción neta de protones de la rizósfera¹¹².

2.3. FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO (FBN)

2.3.1. Generalidades

El nitrógeno gas o dinitrógeno (N₂) es relativamente inerte, pero puede reaccionar con otros compuestos y convertirse en productos asimilables para las plantas y por otros

organismos²⁵⁴. La cantidad de N₂ fijado en la naturaleza es de unas 230 x 10⁶ t por año. De esta cantidad, aproximadamente un 13% se fija por oxidación, provocada por las descargas eléctricas de las tormentas (transformación del N₂ a ácido nítrico en presencia de O₂ y vapor de agua), incendios forestales y la actividad volcánica¹⁵. Y el 87% restante es fijado por los microorganismos, unas 140 millones de t por año⁹³. Este último proceso se denomina “**fijación biológica de nitrógeno**”.⁵ Después de la fotosíntesis, la fijación del N es probablemente el proceso biológicamente más importante llevado a cabo en la tierra²⁵⁴.

La FBN terrestre se produce principalmente en el suelo, ya sea por diazótrofos de vida libre o los asociados en diversos grados con las plantas. La producción de fertilizantes, el uso de altas temperaturas y presiones (350-550°C y 150-350 atm) en el proceso industrial de Haber-Bosch (N₂+3H₂ → 2NH₃) se produce aproximadamente el 20% de fijación de nitrógeno anual mundial, cerca de 100 millones de t anuales¹⁵. Este proceso, puesto en operación comercial en 1913, revolucionó la producción de fertilizantes nitrogenados y ha tenido un impacto profundo en la oferta mundial de alimentos. Sin embargo, el proceso es dependiente de combustibles fósiles y consume 3-5% del gas natural en el mundo cada año²¹. La FBN es una importante ruta de suministro de N para la vegetación natural y las plantas cultivadas²⁶¹. Este proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente y presiones subambientales y lo pueden realizar solo unos pocos procariotas: aquellos que poseen la enzima **nitrogenasa**¹⁵². Aunque el proceso de FBN es altamente demandante en energía (16 a 18 moléculas de ATP por molécula de N fijado) y, en consecuencia, consumo de fotosintatos.

2.3.2. Cantidad fijada de N₂ por la FBN

Diversas cantidades de N₂ fijado han sido medidas en sistemas agrícolas que en ambientes naturales^{100, 152, 191, 254}, estos se resumen en el Cuadro 4. Los organismos fijadores de N₂ de vida libre, utilizando residuos vegetales como paja y hojarasca pueden contribuir con pequeñas cantidades de N a la agricultura de secano (menos de 5 kg.ha⁻¹.año⁻¹). La fijación de N₂ llevada a cabo por cianobacterias y bacterias fotosintéticas que habitan en los suelos inundados de cultivos como el arroz puede contribuir con 30 kg N.ha⁻¹ ¹⁵².

Hay pocos datos sobre la cantidad de N₂ fijado por bacterias en asociación con otros cultivos que no son leguminosas, como la caña de azúcar que puede llegar a fijar de 10-65

kg N.ha⁻¹.año⁻¹¹⁹. La simbiosis rizobios-leguminosas son las que más aportan con N₂ fijado a los sistemas agrícolas¹⁰⁰, pero las cantidades que fijan pueden ser grandemente influenciados por factores medioambientales y las prácticas agrícolas empleadas¹⁹⁰.

Cuadro 4. Cantidades de N₂ fijado por diferentes agentes en sistemas agrícolas (modificado de Unkovich²⁵⁴).

Agente fijador de N ₂	Rango de medición (kg N/ha por cultivo o año)	Rango comúnmente observado (kg N/ha por cultivo o año)
Vida libre		
Bacteria heterotrófica	1-39	<5
Cianobacteria	10-80	10-30
Asociativa		
Pasturas tropicales	0-45	10-20
Cultivos	0-240	5-65
Simbiótico		
<i>Azolla</i>	10-150	10-50
Leguminosas para abono	5-235	50-150
Leguminosas forrajeras	1-680	50-250
Leguminosas cultivadas	0-450	30-150
Árboles/arbustos	5-470	100-200

La fijación de N₂ por leguminosas está en el rango de 24 a 250 kg N.ha⁻¹ por temporada²⁷⁷, aunque se reportan valores de hasta a 340 kg N.ha⁻¹ por temporada²⁵. Las diferencias inherentes en la producción de biomasa, la eficacia de las cepas de rizobios y factores medioambientales tales como la fertilidad del suelo son responsables para este amplio espectro de valores. Cuando están en monocultivo, las leguminosas contienen una menor proporción de N fijado que cuando crece en mezclas con no leguminosas (siempre que la mezcla es dominado por una leguminosa)¹⁴⁹. En varios genotipos de *Phaseolus vulgaris*, el N derivado de la fijación de N₂ puede variar entre 5,6 y 21,1% en el monocultivo, y entre 18,2 y 56,6% cuando es intercalado con maíz²⁵¹.

2.3.3. Sistemas biológicos fijadores de nitrógeno

La capacidad de fijar N₂ atmosférico a NH₃ es limitado a un pequeño subconjunto de diversos organismos taxonómicamente dentro de los procariotas^{152,254}. Pueden ser simbióticos, asociativos o de vida libre en relación a las plantas superiores (Cuadro 5).

La rizósfera provee un ambiente ideal para el crecimiento de un gran número de microorganismos¹⁷¹. Dentro de este ambiente en el suelo, muchas bacterias fijadoras de N pueden proliferar debido a la energía, nutrientes y otros compuestos liberados por, o derivados de las raíces de las plantas²⁵⁴. La fijación de nitrógeno en esta situación es referida como **fijación asociativa de nitrógeno**. Este término es usado para describir la fijación de nitrógeno por bacterias que pueden también vivir en asociación con hojas, tallos o en las vainas de las hojas de las plantas²⁵⁴.

La **fijación asimbiótica de nitrógeno** es la fijación de nitrógeno que no involucra directamente el intercambio controlado de N y C entre la bacteria y la planta hospedante²⁵⁴. La **fijación de nitrógeno por los organismos de vida libre** es la fijación de nitrógeno por bacterias de vida libre en el suelo o agua, que no se asocia con ninguna planta o animal. Esta constituye una forma de fijación asimbiótica de nitrógeno²⁵⁴.

La **fijación simbiótica de N₂** es la fijación de nitrógeno por bacterias que establecen una simbiosis con la planta, donde hay una transferencia neta significativa de fotosintatos de la planta (C) a las bacterias fijadoras de N₂, simultáneamente con la transferencia neta de N biológicamente fijado directamente de las bacterias a la planta huésped. Con legumbres, todo esto ocurre en estructuras altamente especializadas llamadas **nódulos**, que contienen la bacteria y se forman en las raíces o tallos de las plantas^{254, 282}.

Los simbioses son los fijadores más significativos de N para las plantas; están representados principalmente por los rizobios (Protobacteria), *Frankia* (actinomicetos) y *Nostoc/Anabaena* (cianobacterias). Estos organismos residen en estructuras especializadas en las que tienen acceso a una fuente de energía abundante en forma de fotosintatos y un entorno que es propicio tanto para la actividad nitrogenasa (e.g., mediante la provisión de un mecanismo de protección de oxígeno) y la translocación de N fijado directamente a la planta hospedante¹⁶⁶.

Las leguminosas noduladas por rizobios, como la alfalfa y la soja, son algunos de los sistemas de fijación de N₂ más destacados en la agricultura. Las leguminosas arbustivas (e.g., *Leucaena leucocephala* y *Robinia pseudoacacia*) también se benefician de la

simbiosis de nódulos fijadores de N₂ con rizobios como lo hace una no-leguminosa, el árbol tropical *Parasponia*.

Cuadro 5. Ejemplos del rango de géneros bacteriales que pueden fijar nitrógeno en sistemas agrícolas²⁵⁴.

Status del organismo	Organismo fijador de N	Planta hospedante
Heterótrofos		
Vida libre		
Anaeróbico	<i>Clostridium, Methanosarcina</i>	
Microaerofílico	<i>Frankia, Azospirillum, Bradyrhizobium</i>	
Aeróbico	<i>Azotobacter, Derrxia</i>	
Asociado a las raíces		
Microaerofílico	<i>Azospirillum, Paenibacillus</i>	
Endofítico	<i>Herbaspirillum, Acetobacter</i>	Caña de azúcar, pastos tropicales
Simbiótico	<i>Frankia</i>	Alnus, Myrica, Casuarina
	<i>Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium, Sinorhizobium</i>	Varias leguminosas, Parasponia, Acacia sp.
	<i>Ochrobactrum</i>	Acacia sp.
	<i>Blastobacter</i>	<i>Aeschynomene</i> sp.
	<i>Methylobacterium</i>	<i>Crotalaria</i> sp.
	<i>Burkholderia, Ralstonia, Cupriavidus?</i>	<i>Mimosa</i> sp.
	<i>Allorhizobium, Devosia</i>	<i>Neptunia</i> sp.
	<i>Herbaspirillum</i>	<i>Phaseolus</i> sp.
	<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
	<i>Phyllobacterium</i>	<i>Trifolium</i> sp.
Autótrofos		
Vida libre		
Microaerofílico	<i>Rhodospirillum, Bradyrhizobium</i>	
Aeróbico	<i>Cyanobacteria</i>	
Simbiótico	<i>Anabaena azollae</i>	<i>Azolla</i> sp.
	<i>Cyanobacteria, Bradyrhizobium</i>	Fungi (líquenes), cícada <i>Gunnera</i> <i>Aeschynomene</i> sp.

Sin embargo, en algunos bosques y los ecosistemas forestales la mayoría del N de FBN viene de simbiosis no rizobiales en nódulos de las raíces de especies no leguminosas, como actinomicetos del género *Frankia* y leñosas como *Alnus*, *Casuarina* y *Caenothus*. Aproximadamente 200 especies de arbustos y árboles leñosos, la mayoría en las regiones

templadas, forman simbiosis actinorrícicas con *Frankia*²⁶⁵. Los miembros del orden gimnospermas Cicadales forman simbiosis de raíces con cianobacterias fijadoras de N₂, principalmente con especies filamentosas de *Nostoc*²⁰⁴. En los ecosistemas acuáticos, por ejemplo campos de arroz, una fuente importante de FBN es la simbiosis entre la cianobacteria *Anabaena azollae*, formadora de heterocistos, y una pteridofita, *Azolla*.

Las raíces de las plantas superiores son colonizadas por otras bacterias, que no residen en órganos especializados, pero pueden, en algunos casos, invadir la corteza de la planta como endófitos²¹². La mayoría de estas asociaciones, sin embargo, implican bacterias de vida libre con relativamente bajas tasas de fijación de N₂ que crecen en el rizoplano o en la rizósfera. Alguna evidencia también señala fijación de N₂ asociativa como un factor en la estimulación del crecimiento de la planta, por ejemplo, *Azospirillum* con el maíz, el arroz y el trigo; *Burkholderia* con arroz y *Herbaspirillum* con arroz, sorgo y la caña de azúcar¹³².

Fijadores de vida libre N₂ están ampliamente distribuidos en los suelos pero en el caso de las bacterias heterótrofas, son generalmente limitados en su capacidad de fijación por la falta de sustratos orgánicos para la generación de energía. Se pueden encontrar ejemplos entre los aerobios (*Azotobacter*), anaerobios (*Clostridium*) y anaerobios facultativos (*Klebsiella*). Algunas cianobacterias formadores de heterocistos (e.g., *Anabaena*, *Nostoc*, *Calothrix*, *Cylindrospermum*) también puede fijar N₂ sin entrar en simbiosis con un huésped eucariota¹⁵². Son limitados por la sensibilidad al oxígeno de la nitrogenasa¹⁹⁹.

2.3.4. Bioquímica de la fijación de nitrógeno

El mecanismo de FBN es de gran interés desde puntos de vista agrícola y químico; no sólo se trata del medio por el cual una porción sustancial de la demanda de N de algunas plantas cultivadas es satisfecho, sino también un sistema catalítico eficiente que logra el equivalente de la reacción de Haber-Bosch a temperatura ambiente y presión inferior a la atmosférica. La reducción biológica de N₂ a NH₃ es un proceso altamente demandante de energía con un requisito mínimo de energía de casi 960 kJ mol⁻¹ N fijado¹⁵². En todos los microorganismos fijadores de N₂, las principales etapas de la reacción son las mismas (Fig. 2). La enzima clave, la **nitrogenasa**, está presente en los microorganismos fijadores de N₂. Tres sistemas genéticamente distintos de nitrogenasa-sensible al oxígeno (O₂) son

reconocidos actualmente: nitrogenasa molibdeno (*Nif*), nitrogenasa vanadio (*Vnf*) y nitrogenasa solo de hierro (*Anf*)²⁹². De los tres, la variante de molibdeno es el mejor estudiado y el más ampliamente distribuido en la naturaleza²⁰⁵. Un cuarto, nitrogenasa insensible al O₂, se ha informado en una bacteria, *Streptomyces thermoautotrophicus*²⁰⁸.

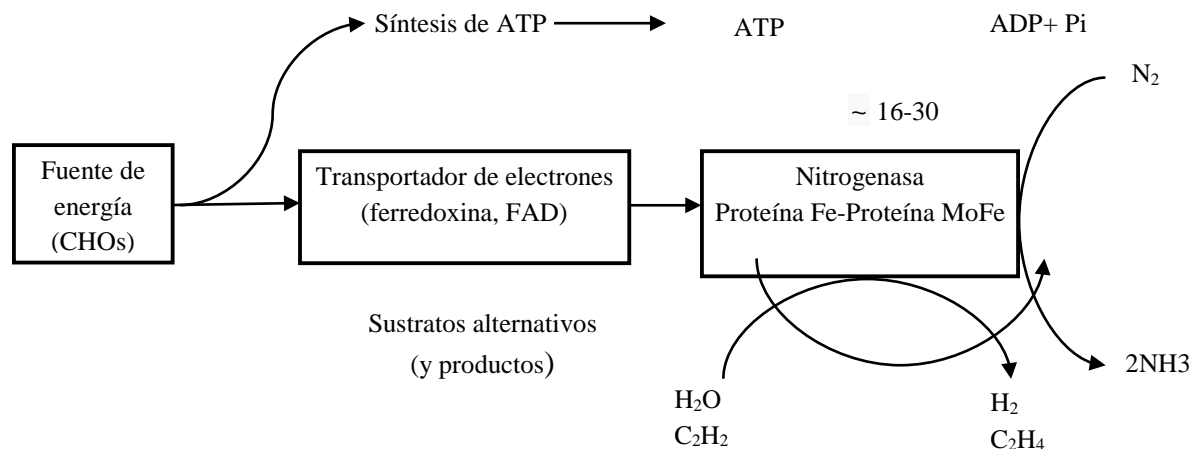
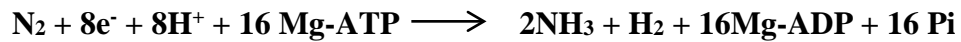


Figura 2. Representación esquemática del suministro de energía y las principales reacciones del sistema nitrogenasa¹⁵².

La nitrogenasa molibdeno consta de dos proteínas férricas no hemo: dinitrogenasa (componente I) y dinitrogenasa reductasa (componente II). El componente I, que contiene el sitio activo para la reducción de N₂, es el mayor de los dos. Se trata de una proteína MoFe que comprende un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ que se asocia con dos copias de cada uno de dos grupos metálicos denomina el cofactor MoFe y el grupo P. El primero contiene el sitio de reducción del sustrato (N₂) y este último se cree que sea el aceptor inicial de electrones del componente II²⁰⁶. El componente II es una proteína férrica en la forma de un homodímero que contiene un grupo metálico por dímero. Tiene una masa molecular ca. 60 kDa y una la hidrólisis de ATP a la transferencia de electrones entre proteínas²⁹¹.

La reacción de la nitrogenasa requiere energía (ATP) y equivalentes reductores (electrones), o flavodoxina. Un mecanismo básico de cuatro etapas de nitrogenasa Mo a nivel de proteínas ha sido propuesto: (i) la formación de un complejo entre la proteína Fe reducida con dos moléculas de ATP y la proteína Mofe; (ii) la transferencia de electrones entre las dos proteínas acopladas con la hidrólisis de ATP; (iii) la disociación de la proteína Fe acompañado por la re-reducción y el intercambio de ATP para ADP; (iv) la repetición de este ciclo hasta que un número suficiente de electrones y protones se han acumulado

para reducir el sustrato disponible²⁰⁵. La estequiometría de la reacción global catalizada por nitrogenasa Mo es:



La nitrogenasa también cataliza la reducción de otros sustratos, tal como acetileno, que se convierte en etileno. El etileno puede ser detectado a bajas concentraciones y en el pasado fue ampliamente utilizado en el ensayo de reducción de acetileno (ARA) para la medición de fijación de N₂¹⁵². Hoy en día, dilución isotópica ¹⁵N y la metodología de abundancia natural son las opciones preferidas, particularmente si la cuantificación, en oposición a la obtención de datos sobre las tasas relativas de fijación⁷.

Como se señaló anteriormente, la nitrogenasa es muy sensible a O₂ y diversos medios se emplean por microorganismos diazotróficos para proteger la enzima de la inactivación irreversible por O₂ in vivo¹⁵². Estos incluyen:

1. Vida y fijación de N₂ exclusivamente en condiciones anaeróbicas (e.g., *Clostridium*).
2. Vivir en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, pero la fijación de N₂ sólo bajo este último (e.g., *Klebsiella*).
3. Proporcionar condiciones microaerófilas al sitio enzimático, de lo contrario en modo aeróbico, por el consumo de la mayoría de O₂ a través de la respiración excesiva, es decir, de protección respiratoria (e.g., *Azotobacter*).
4. Vivir en colonias cubierto por hojas de limo, que restringen la difusión de O₂.
5. La separación espacial de la nitrogenasa y sitios de fotosíntesis/evolución O₂ (e.g., la fijación de N₂ en heterocistos de cianobacterias tales como *Anabaena*).
6. El control de difusión de O₂ a través de las barreras físicas, y mediante la unión a leghemoglobina (por ejemplo, en nódulos de las raíces de legumbres).
7. Síntesis de enzimas que expulsan para especies de oxígeno tóxico y H₂O₂ (e.g., ascorbato peroxidasa en los nódulos de leguminosas).

La gran demanda de ATP, que puede ser proporcionado en grandes cantidades sólo por el catabolismo aeróbico de carbohidratos, junto con la necesidad de proteger la nitrogenasa del O₂, necesita que la FBN esté muy regulada a nivel transcripcional por redes que

responden a los cambios en diversos parámetros ambientales⁶⁸. Esto puede ser logrado en simbiosis con las plantas superiores que por lo tanto tienen un mayor potencial para la fijación de N₂ que otros sistemas.

2.3.5. Sistemas simbióticos (Fijación simbiótica de nitrógeno)

2.3.5.1. Generalidades

Dos categorías amplias de sistema simbiótico pueden ser identificadas, basado principalmente en el tipo y la ubicación de la estructura que alberga el microsimbionte:

- I. Legumbres noduladas y no leguminosas;
- II. Simbiosis con cianobacterias.

En la Categoría I, los microorganismos fijadoras de N₂ son o bien rizobios (en las legumbres) o actinomicetos del género *Frankia* (en no leguminosas). Los nódulos son generalmente ubicados en las raíces de la planta hospedante (algunas excepciones se producen entre legumbres, por ejemplo *Sesbania rostrata* donde rizobios forman nódulos en el tallo). La fotosíntesis de la planta hospedante es la fuente de sustratos utilizados para la generación de ATP por el microsimbionte través de la respiración aeróbica.

En la Categoría II, las cianobacterias fijadoras de N₂ son encontrados en diversas localidades en una diversa (con respecto a los de los rizobios), pero un tanto restringida, gama de huéspedes²⁵⁶. Ellos ocurren extracelularmente en hifas de los hongos en líquenes, en cavidades en hojas de *Azolla* y los talos de briofitas, y en las raíces coraloides de cícadas. En *Gunnera*, por otro lado, se encuentran intracelularmente en glándulas del tallo.

2.3.5.2. Rango de simbiosis leguminosa-*Rhizobium*

Las leguminosas mantienen una posición de significancia especial dentro de las plantas agrícolas: su capacidad de capturar N₂ atmosférico a través de la presencia de rizobios en los nódulos de las raíces hace que su crecimiento sea teóricamente independiente tanto del estado de N en el suelo y la adición de fertilizantes nitrogenados. Entre ellos son importantes cultivos de grano y forrajes que crece en las zonas tropicales o zonas climáticas templadas, incluyendo soja, frijoles, arvejas, alfalfa, tréboles, tréboles y lupino²⁴¹.

La fijación de nitrógeno se produce cuando estas plantas están en estado simbiótico y los agentes de fijación son bacterias del suelo de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium* (los tradicionales rizobios de los α -Proteobacteria), así como algunos géneros descubiertos más recientemente que se encuentran filogenéticamente fuera de este grupo¹⁹⁹. Estos incluyen *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochractrum* y *Phyllobacterium* en α -Proteobacteria y *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Cupriavidus* de la β -Proteobacteria^{144, 241, 282}. En sentido estricto, el término '*Rhizobium*' debe limitarse a el grupo tradicional de α -Proteobacteria enumerados anteriormente. Además, posiblemente, *Agrobacterium*²⁸².

Los rizobios son bacterias Gram negativas de forma bacilar (0.5-0.9 μm * 1.2-3.0 μm). Su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 25 y 30°C, el pH óptimo entre 6 y 7, son bacterias aerobias. Todas producen un abundante polisacárido extracelular soluble en agua cuando crecen en medios con carbohidratos como fuente de carbono¹²⁹. Los rizobios exhiben diversos grados de especificidad hacia sus hospedantes. Con la excepción de la no leguminosa *Parasponia*, la infección se limita a los miembros de Leguminosae. Algunas especies o biotipos de rizobios, son específicos para grupos individuales o pequeños de géneros de leguminosas. Por ejemplo, *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* y *R. leguminosarum* *bv. trifolii* forman nódulos radiculares sólo en especies de *Phaseolus* y *Trifolium*, respectivamente. En contraste, la promiscuidad simbiótica puede encontrarse en algunos otros rizobios y es tal vez más extendido de lo que se pensaba anteriormente, sobre todo entre los aislamientos de los trópicos¹⁹⁵. Una cepa de Nueva Guinea con un muy amplio rango de hospedantes de leguminosas es *Rhizobium* *sp.* NGR234; que nodula al menos 112 géneros²⁰⁰. Desde la perspectiva de la planta hospedante, algunas leguminosas (e.g., *Vigna*, *Phaseolus*) son considerados no selectivos para rizobios, mientras que otros (e.g., *Pisum*, *Trifolium*) son nodulados por una especie o biovar único de rizobios. Ejemplos de rizobios y sus leguminosas hospedantes se dan en el Cuadro 6.

2.3.5.3. Filogenia de *Rhizobium*

Contrario a las tempranas hipótesis morfológicas, estudios moleculares sistemáticos han mostrado que las familias de plantas que forman nódulos radiculares fijadores de nitrógeno con rizobios o actinomicetos están cercanamente relacionadas²³⁶. Sin embargo, hay muchas

familias no fijadoras de N₂ y muchas especies no fijadoras de nitrógeno dentro de este clado.

Cuadro 6. Algunas especies de rizobios y sus leguminosas hospedantes (adaptado de Marschner¹⁵²).

Especies^a	Hospedantes nodulados
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
<i>biovar phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>biovar trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
<i>biovar viciae</i>	<i>Pisum, Lens, Vicia</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega</i>
<i>Rhizobium lupinii</i>	<i>Lupinus, Ornithopus</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus, Leucaena</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine, Vigna, Cajanus</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus, Lupinus, Anthyllis, Leucaena</i>
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine, Macroptilium, Vigna</i>
<i>Bradyrhizobium sp.</i> ^b	<i>Aeschynomene</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i> ^c	<i>Sesbania</i>
<i>Rhizobium spp.</i> ^d	<i>Vigna, Arachis, Desmodium, Lotus</i>
<i>Burkholderia caribensis</i>	<i>Mimosa</i>
<i>Burkholderia tuberumc</i>	<i>Cyclopia spp.</i>
<i>Methylobacterium nodulans</i>	<i>Crotalaria</i>

^a Especies de *Rhizobium* y *Sinorhizobium* crecen relativamente rápidos en medios de cultivo de laboratorio. Especies de *Bradyrhizobium* crecen más lentamente y especies de *Mesorhizobium* muestran una tasa de crecimiento intermedio

^b Fotosintético y falta de genes nod

^c Capacidad inusual de N₂ fijado en estado de vida libre

^d Incluye la cepa NGR234, que puede nodular al menos 112 géneros de leguminosas. A veces se refiere como la cepa *Sinorhizobium sp.* NGR234

Esos descubrimientos sugieren que la fijación simbiótica de nitrógeno surgió una única vez, y fue subsecuentemente perdida varias veces o que miembros de este clado fueron previamente adaptados a la fijación de nitrógeno, permitiendo que la simbiosis evolucionara independientemente muchas veces²³⁶. Debido a estas incertidumbres, la edad de la fijación simbiótica de nitrógeno es desconocida, pero pueden preceder al origen de las leguminosas, hace casi 60 millones de años atrás en el Terciario temprano^{239, 240}.

A pesar de eso, está claro que las simbiosis con leguminosas surgieron independientemente en dos o más linajes de α -Proteobacteria. Este grupo comprende géneros fotótrofos, como

los simbioses *Rhizobium* y patógenos peligrosos como rickettsias²⁸⁷. Dentro de la subdivisión de Proteobacteria, el gen *rrs* (un gen 16S rRNA) resuelve la filogenia de los rizobios en siete géneros: *Devosia*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, siendo los cuatro últimos, los que cuentan con el mayor número de especies descritas. Hasta este momento, han sido descritas 51 especies de rizobios en α - y β -Proteobacteria, 48 y 3 respectivamente. Los grupos más próximos entre sí dentro de los rizobios de α -Proteobacteria son *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*¹⁴⁴. De estos tres géneros, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* son muy cercanos entre sí y menos próximos a *Mesorhizobium*, por lo que se ha sugerido que *Sinorhizobium* pudiera ser considerado como un subclado dentro del género *Rhizobium*. Estos dos clados de rizobios de rápido crecimiento constituyen taxones independientes pero muy cercanos y han sido designados como los dos géneros que forman a la familia *Rhizobiaceae*²⁸⁸. En los análisis filogenéticos del gen 16S rRNA, así como en otros genes del genoma básico, las especies de los géneros de *Rhizobium* se entrelazan con las de *Agrobacterium*^{247, 288}, indicando que ambos géneros no se separan cada uno como linajes monofiléticos y por lo tanto su denominación taxonómica como géneros distintos no corresponde con una clasificación natural¹⁹⁵, criterio que fue establecido hace más de una década en el reporte del comité ad hoc sobre conciliación de criterios en sistemática bacteriana que aún sigue vigente¹⁴⁴.

El género *Mesorhizobium* tiene características intermedias entre los rizobios de rápido crecimiento, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, y el de lento crecimiento, *Bradyrhizobium* y constituye un clado independiente junto con el género no simbiote *Phyllobacterium* como su pariente más cercano. *Bradyrhizobium* es el género de rizobio de lento crecimiento y probablemente el más antiguo, pues como ya se mencionó arriba, es el único rizobio con representantes fotosintetizadores y parientes que no son diazótrofos simbioses pero que sí fotosintetizan como lo es el género *Rhodopseudomonas*¹⁴⁴.

La especie que nodula el frijol es *R. leguminosarum* *bv. phaseoli*, pero también lo hacen *R. tropici* y *R. etli*. La fijación de nitrógeno y los genes de nodulación, incluyendo el rango de huéspedes determinantes, son transportados en plásmidos, por lo que la designación del

biovar es realmente una descripción del plásmido en vez que el fondo cromosómico de la cepa¹⁴⁴.

2.3.5.4. Eventos iniciales de la nodulación

Mucho se sabe ahora, a nivel genético, bioquímico y molecular, sobre las interacciones entre los rizobios y sus plantas hospedantes que conducen a la formación de nódulos en las raíces. El estado simbiótico es alcanzado a través de un ‘diálogo molecular’⁶⁴, involucrando la generación, transmisión, reconocimiento y procesamiento de señales por ambos socios.

Los metabolitos secundarios de las plantas, los **flavonoides**, son responsables de iniciar la interacción simbiótica. Ellos son liberados de las cubiertas de las semillas de leguminosas o de las raíces en cantidades micromolares o incluso nanomolares y son detectados por rizobios de vida libre en la rizósfera de leguminosas y en las superficies de los pelos radiculares. Su función principal es la de actuar, junto con las proteínas **NodD**¹⁶⁶, como co-inductores de los genes de nodulación de rizobios de la siguiente manera. En los rizobios, un complejo flavonoide-proteína es formado a través de la combinación con un producto del gen regulador *nodD* constitutivamente expresado, **NodD**, que ya está unido a secuencias conservadas de ADN (cajas *nod*) en las regiones promotoras de los genes estructurales de la nodulación (*nod*, *noe* y *nol*; conocidos colectivamente como genes **nod**). La presencia de un flavonoide en el sitio de unión NodD en la caja *nod* activa la transcripción de estos genes¹⁵². Los análisis genéticos y moleculares han demostrado que la síntesis de la estructura del factor Nod es catalizada por los productos de los loci *nodA*, *nodB* y *nodC*¹⁶⁶. Las diversas proteínas producidas de los genes *nod* inducen la síntesis y liberación de moléculas recíprocas a la señal detectada en la planta, **los lipoquitooligosacáridos factores Nod**. Estos compuestos provocan una serie de cambios en el metabolismo de la raíz y su morfogénesis y son señales esenciales para la entrada de los rizobios en las raíces de leguminosas²⁰⁷.

El primer gen *nod* inducido por flavonoides a ser descubiertos fueron flavonas, posteriormente, casi más de 30 compuestos han sido identificados en nueve géneros de leguminosas; que son o bien gliconas o agliconas de una variedad de subgrupos de flavonoides tales como chalconas, flavonas, flavanonas, isoflavonas y cumestanos⁴⁷. La

mayoría de las leguminosas analizadas liberan de varios compuestos, y en el caso de *Phaseolus vulgaris*, 13 inductores de genes *nod* se han aislado de plantas crecidas asépticamente.

Se cree que la presencia de un flavonoide adecuado altera el ángulo de la curva en el ADN en los puntos donde una proteína NodD está unida al sitio de la caja *nod* una región promotora del gen *nod*, permitiendo de esta manera que la ARN polimerasa inicie la transcripción de genes³⁹. Diferentes rizobios responden a diferentes conjuntos de inductores de flavonoides y mientras en algunos casos este aspecto de interacción influye en la especificidad del hospedador, no hay correlación consistente entre la gama de hospedantes de una bacteria y el número de flavonoides inductores a la cual es sensible. Los genes *nod* de *Rhizobium sp.* NGR234 son inducidas por muchos flavonoides y esta bacteria tiene un muy amplio rango de hospedantes, pero *R. leguminosarum bv. viciae*, que también responde a muchos inductores, tiene un pequeño rango de hospedantes. Se cree que la producción de una variedad de factores Nod (18) es la base de su amplia gama de hospedantes¹⁵². Algunos compuestos no flavonoides de origen vegetal también pueden inducir la expresión de genes *nod* pero generalmente a concentraciones mayores, milimolar, y ninguno se ha demostrado que sustituye completamente a los flavonoides en esta función¹⁵².

Los factores Nod son lipoquitooligosacáridos compuestos por tres a cinco β -1,4-N-acetil-D-glucosaminas con una cadena de acilo graso en el extremo no reductor. El primer compuesto para ser caracterizado fue aislado por Lerouge de *Rhizobium* (ahora *Sinorhizobium meliloti*)¹⁴². Variaciones sobre la estructura básica surgen de varias fuentes, como el número de residuos en la cadena carbonada, el tipo de ácido graso en el extremo no reductor, y el número y tipos de grupos sustituyentes (acetilo, arabinosilo, fucosiltransferasa, manosilo, sulfato, etc.). Productos génicos adicionales, NodI y NodJ, son necesarios para la secreción de factores Nod por la bacteria. La estructura se modifica adicionalmente por la acción de otras proteínas Nod que sintetizan o añaden diversos sustituyentes. Estas sustituciones, así como el tamaño y grado de saturación de sus cadenas de acilo pueden determinar la especificidad del hospedador²⁰². La longitud de la cadena principal de azúcar desempeña un papel importante en el reconocimiento por la planta¹⁶⁶.

Por ejemplo, en *R. meliloti*, los genes *nodH* y *nodPQ* son los principales determinantes del rango de hospedantes¹⁵². Sin embargo, para muchos factores Nod no parece haber ninguna correlación entre su estructura y la nodulación de un hospedante o grupo particular de hospedantes¹³⁰. Los rizobios pueden sintetizar más variantes del factor Nod (>50 en el caso de *R. tropici*, que no tiene un amplio rango de hospedantes) que se pensaba originalmente¹⁵². Aunque la razón de esto no se ha establecido, es poco probable que un gran número de variantes de factores Nod puede entenderse únicamente en términos de especificidad del hospedante.

Los factores Nod, incluso en ausencia de las bacterias que los producen, puede inducir a algunos de los muchos genes **nodulina** en la planta que se expresan en la pre-infección, infección, desarrollo de nódulos y fases funcionales del nódulo en la simbiosis¹⁰. los factores Nod no son los únicos compuestos rizobiales participantes en el diálogo molecular con leguminosas. Otras moléculas de señal influyen la progresión exitosa para el funcionamiento del nódulo⁹⁹. Particularmente importantes son los polisacáridos de superficie que se encuentran en todos los rizobios: extracelulares (EPS), lipo (LPS), capsular (KPS) y glucanos cíclicos. Están involucrados en varias fases del desarrollo simbiótico, incluyendo la colonización de la raíz, reconocimiento de hospedantes, formación del hilo de infección e invasión de nódulos⁹⁰.

Con respecto a los factores de la planta, inductores de genes *nod*, distintos de los flavonoides y no flavonoides, por más de 30 años, las proteínas lecitinas ligadas a carbohidratos, encontrados en las superficies de los pelos radiculares de las leguminosas, se han propuesto como factores determinantes de la especificidad del hospedante. Sin embargo, a pesar de muchas investigaciones sobre su interacción con polisacáridos de la superficie rizobial (especialmente EPS), el papel preciso de las lecitinas en el proceso de infección aún no se ha dilucidado¹¹³. Otra categoría de proteínas vegetales, las flotilinas, ha sido recientemente demostrado que desempeñan un papel crítico en la infección de las leguminosa por rizobios¹⁰⁸.

2.3.5.5. Interacción con la epidermis de la raíz

Cuando los rizobios colonizan las raíces de leguminosas, inducen la deformación y el rizado de pelos radiculares y la expresión de varios genes de la planta en la epidermis. En varios sistemas, se ha demostrado que los factores Nod purificados inducen la deformación de los pelos radiculares a concentraciones tan bajas como 10^{-12} M^{110, 142}, pero generalmente no el rizado²⁰⁷.

En un ensayo con *Vicia sativa*, un ensayo de deformación rápida semicuantitativa del pelo radicular ha permitido que el proceso de deformación del pelo radicular se caracterice en detalle. En esta planta, la deformación del pelo radicular se induce sólo en una pequeña zona de la raíz, que abarca jóvenes pelos radicales que casi han alcanzado su tamaño maduro¹¹⁰. La deformación comienza con hinchazón en las puntas del pelo de la raíz, 1 hora después de que los factores Nod han sido añadidos. Posteriormente, el nuevo crecimiento de la punta se inicia en las puntas inflamadas, dando como resultado pelos claramente deformados dentro de 3 horas. Incubación con factores Nod por ~ 10 min es necesaria para fijar el proceso de deformación en movimiento¹¹⁰; después de esto, incluso si se eliminan los factores Nod, el proceso de deformación continúa. Estos cambios morfológicos están precedidos por una despolarización de la membrana plasmática⁷³, cambios en el flujo de calcio, eflujo de protones, reordenamientos de los filamentos de actina en los primeros 3 a 5 minutos²⁷⁶, y el aumento de la corriente citoplasmática¹¹⁰. Estos cambios ocurren dentro de 5 a 30 minutos después que se añaden los factores Nod y pueden ser parte de una serie de eventos que conduce finalmente a la deformación del pelo radicular.

2.3.5.6. Infección

El modo de infección por rizobios puede ser inter o intracelular o una combinación de ambos²⁶⁵. En muchos casos, incluyendo plantas de cultivo tales como frijoles, arvejas, soja, alfalfa y el trébol, la invasión intracelular implica que los rizobios entren vía infección de los pelos radicales. Después de la unión de rizobios a las puntas de los pelos radiculares, las puntas se enroscan herméticamente y las bacterias quedan atrapadas en los rizos. Una hidrólisis localizada de la pared celular de la planta se lleva a cabo en la región rizada, y la

membrana plasmática se invagina y la nueva pared celular vegetal se deposita⁹². Esto resulta en la formación de una estructura tubular cilíndrica, el llamado **hilo de la infección**, por el cual la bacteria entra en la planta⁹². La ultraestructura de la pared del hilo de infección es muy similar a la de la pared normal de las células vegetales, pero la incorporación de ciertos nodulinas puede dotarlo de propiedades únicas.

Las nodulinas tempranas ricas en prolina ENOD5 y ENOD12 son candidatos para los componentes de la pared del hilo de infección, ya que las células corticales contienen un hilo infección que expresa los genes correspondientes²²⁴. Las bacterias en el hilo de infección están rodeadas por una matriz que parece consistir en compuestos secretados por la planta y las bacterias.

Asociado con la formación de hilo de infección, las células corticales son mitóticamente reactivadas, formando el **primordio del nódulo**. Los hilos de infección crecen hacia este primordio y, una vez allí, liberan las bacterias en el citoplasma. En aquellas leguminosas que forman nódulos indeterminados, como la alfalfa y el guisante, el primordio de nódulo surge a partir de células corticales internas y las que surgen a partir de células corticales externas producen nódulos determinados. En la formación del nódulo indeterminado, los hilos de infección deben atravesar la corteza externa antes de llegar a estas células. Antes de la penetración del hilo de infección, las células corticales externas sufren cambios morfológicos. Los núcleos se mueven al centro de las células, y los microtúbulos y el citoplasma se reorganizan para formar una estructura cónica orientada radialmente, el **punteo citoplasmático**, que se asemeja a una banda pre-profase¹³⁴. Los hilos de infección atraviesan las células corticales a través de los puentes citoplasmáticos radialmente alineados, que por lo tanto son llamados **hilos de preinfección**²⁵⁹.

Aunque las células corticales externas que forman el hilo de preinfección nunca se dividen, los cambios morfológicos inducidos son un recuerdo de los que se observan en las células que entran en el ciclo celular. Los experimentos de hibridación in situ²⁸⁶ mostraron que hileras estrechas de células corticales exteriores expresan el gen específico histona H4 de la fase S (Figura 3). Sin embargo, un gen de la ciclina mitótica expresado específicamente durante la fase de transición de G2 a M no es activado. Por lo tanto, las células que forman el hilo de preinfección vuelven a entrar en el ciclo celular y lo más probable es que se

detienen en la fase G2, mientras que las células corticales internas progresan todo el camino a través del ciclo celular y forman los primordios. Esto muestra que parte del proceso de infección se deriva de un proceso general, es decir, el ciclo celular. De alguna manera, los rizobios lo han modificado y ahora lo explotan con un propósito completamente diferente, el proceso de infección.

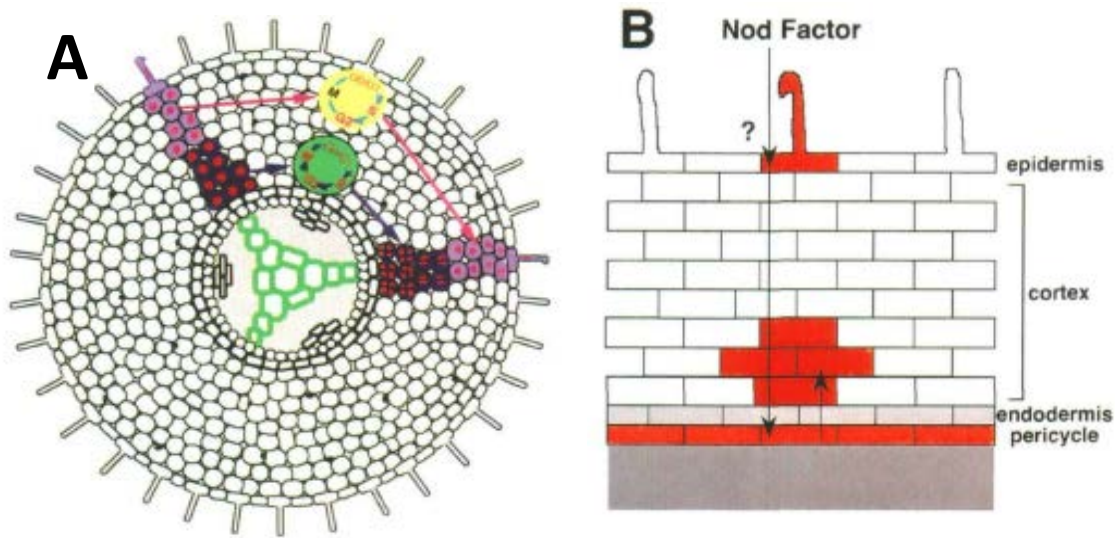


Figura 3. Eventos en la corteza durante la inducción de un nódulo indeterminado¹⁶⁶.

(A) Representación esquemática que muestra la reactivación de células corticales en las raíces de guisantes después de la inoculación con rizobios o aplicación de factores Nod. Las células corticales externas, que se muestran en color lavanda, vuelven a entrar en el ciclo celular, que procede de la fase G1/G0 para la fase S, y finalmente quedó detenido en G2, como se indica en el ciclo celular en el círculo amarillo. En contraste, las células corticales internas, que se muestran en púrpura, progresan todo el camino a través del ciclo celular, como se indica por el ciclo celular en el verde círculo, dividirse y formar los primordios nódulo. Las células activadas están opuestas a los polos del protoxilema de la raíz, que se muestran en verde. (B) Modo de acción de los factores Nod se muestran en una representación esquemática de una sección longitudinal de la raíz de una leguminosa. Aplicación de factores Nod conduce a la deformación del pelo radicular, seguido de una activación del periciclo, ya sea debido a la acción de los factores Nod sí mismos o a la de los segundos mensajeros (indicado por?) generados en las células epidérmicas. Expresión de ENOD40 en las células del periciclo puede causar un cambio en la relación citoquinina / auxina que se traduce en divisiones celulares corticales (panel superior). Las células se muestra en rojo son aquellos que son sensibles a la acción, directa o indirecta, de los factores Nod.

Los factores Nod purificados inducen la formación de hilo de preinfección, pero los hilos de infección no se forman²⁵⁹. Por lo tanto, las bacterias parecen ser necesarias para la formación de los hilos de infección, la interacción con los compuestos de la superficie bacteriana parece jugar un papel importante en la formación del hilo de infección¹⁶⁶. Los

factores Nod producen la división mitótica de las células corticales²⁰⁷. En algunas plantas hospedantes, los **factores Nod purificados incluso inducen la formación de nódulos**²⁵⁰. Curiosamente, sólo ciertas células corticales son susceptibles a los factores Nod. En leguminosas tropicales, como la soja, son las células corticales exteriores las que son activadas mitóticamente. En leguminosas templadas, como arveja, veza y alfalfa, son las células corticales internas, y especialmente aquellas localizadas opuesto a los polos del protoxilema, que divide¹³⁴. El mecanismo que controla la susceptibilidad de las células corticales es desconocido. Se ha postulado durante décadas que **la susceptibilidad de las células corticales es conferido por una detención en la fase G2**²⁶⁴. **La Figura 3 muestra que sólo hileras estrechas de células corticales se activan para expresar el gen Histona H4 por rizobios**, en este momento, las puntas del hilo de infección-el sitio donde los factores Nod se liberan-están todavía en la epidermis, que indica que los factores Nod actúan a distancia.

La planta hospedante decide qué factores nod pueden inducir la reactivación mitótica de las células corticales. Los rizobios que inducen divisiones celulares en las capas corticales internas, como *R. leguminosarum bv viciae* y *R. meliloti*, producen factores **Nod** con grupos acilo grasos muy insaturados, mientras que los rizobios que reactivan mitóticamente las células corticales externas, tales como *Bradyrhizobium japonicum*, generalmente contienen un grupo acilo C18:1. **El grupo acilo graso altamente insaturado parece ser importante para la inducción de divisiones celulares en la corteza interior**. Para explicar el mecanismo por el cual los factores Nod provocan divisiones celulares corticales, las evidencias fuertemente sugieren que los factores Nod causan un cambio en el equilibrio auxina-citoquinina. Ambos, las citoquininas y los compuestos que bloquean el transporte de auxina polar inducen la formación de estructuras en forma de nódulos, en el cual genes nodulina tempranos son expresados¹⁶⁶.

Los factores nod son reconocidos por un receptor o sistemas de receptores en la planta hospedante. Ardourel et al.⁶ postuló que al menos dos receptores del factor Nod diferentes están presentes en la epidermis: un "**receptor de señalización**" que participan en la inducción de la deformación del pelo de la raíz, y un "**receptor de captación**" que se activa sólo por moléculas con una estructura muy específica y que inicia el proceso de

infección⁶. Aún se desconoce las vías de señalización posterior a la percepción del factor Nod. Aunque, ahora se ha vuelto posible para estudiar si, además de los factores Nod, otros compuestos rizobiales son involucrados en la facilitación de las respuestas inducidos por los factores Nod. La candidata es la proteína NodO²⁴², se ha sugerido que NodO puede amplificar las respuestas inducidas por los factores Nod mediante su integración a la membrana plasmática de la planta²⁴².

2.3.5.7. Formación de nódulos y su función en las leguminosas

Las ramas de los hilos de infección penetran en las células del primordio del nódulo y liberan los rizobios en ellos (con algunas células vegetales en el nódulo que permanecen libres de rizobios durante toda la vida del nódulo). Una vez dentro de la célula hospedante, los rizobios se diferencian de bacterias móviles Gram-negativas en **bacteroides** no móviles en una entidad similar a un orgánulo, el **simbiosoma**. Un **simbiosoma** está rodeado por una membrana simbiosomal (derivado de la endocitosis de bacteroides por la membrana plasmática de la planta) y puede contener uno o varios bacteroides cada encerrados en una membrana peribacteroidal (**PBM**; Figura 4), y cada célula del nódulo infectada puede ser llenado con varios miles de simbiosomas²⁷⁷. Este proceso de internalización y propagación en el endosimbionte requiere síntesis masiva de membranas, en el caso de los nódulos de leguminosas, 30 veces la cantidad de síntesis de la membrana plasmática²⁶⁴.forman la interfaz entre los socios simbióticos través de los cuales las señales y metabolitos se intercambian y evitan una respuesta de defensa por la planta contra las bacterias "intracelulares" ^{167, 264}. La membrana que rodea el microsimbionte se deriva de la membrana plasmática del hospedante. El PBM de nódulos de leguminosas tiene fosfolípidos¹⁹⁴ y la composición de proteínas son diferentes de aquellos de la membrana plasmática²⁶⁴ y que presumiblemente los dota con funciones especializadas. El PBM contiene varias nodulinas y también puede contener una proteína rizobial. Dentro del espacio peribacteroidal entre los bacteroides y el PBM, varias proteínas están presentes que también se encuentran en las vacuolas. Así, el PBM puede haber adaptado algunas propiedades del tonoplasto¹⁵⁷.

La región entre la membrana peribacteroidal (s) y la membrana simbiosomal se denomina el espacio peribacteroidal. Dependiendo de la planta hospedante, los nódulos pueden ser iniciados en la corteza interna o externa de la raíz. En las leguminosas cultivadas, tales como *Medicago*, *Lens*, *Trifolium*, *Pisum* y *Vicia*, los nódulos son iniciados en la corteza interior y son del tipo **indeterminado**, manteniendo un meristemo apical activo y distintas zonas de desarrollo, de la diferenciación del bacteroide en la punta de crecimiento a través de bacteroides maduros, donde se encuentra la fijación de N₂, a una zona senescente en la base (figura 4, figura 5)^{263, 265}. Los nódulos que se originan en la corteza externa de la raíz, como en *Glycine*, *Lotus*, *Phaseolus* y *Vigna*, son del tipo **determinado**; no mantienen un meristemo activo y tienen un ciclo de vida más limitada. Otra diferencia entre los dos tipos es que los bacteroides de nódulos determinados pueden regenerar la forma de vida libre de la bacteria, mientras que los de nódulos indeterminados no¹⁵². Las plantas hospedantes apoyan en el control de la diferenciación de bacterioides en los nódulos indeterminados mediante el bloqueo de la división celular bacteriana y fuerzan a los rizobios hacia un estado bacteroidal de diferenciación terminal; por lo tanto, es el hospedante el que domina esta simbiosis⁶³.

El sistema radical de una sola planta, y quizás también los nódulos individuales, pueden ser infectados por más de una cepa de una especie o biovar de *Rhizobium*¹⁰⁵. Dado que no todas las cepas tienen una alta capacidad de fijación de N₂, esta es una característica problemática de la simbiosis en aplicaciones agrícolas, ya que puede causar variabilidad en el rendimiento de las leguminosas cultivadas.

El gran potencial de las leguminosas noduladas para la fijación de N₂ se basa en tres factores principales: (i) el suministro directo de C fijados fotosintéticamente a los bacteroides en los nódulos; (ii) mantenimiento efectivo de muy bajas concentraciones de O₂ en el interior del nódulo para proteger la nitrogenasa; y (iii) exportaciones rápidas del N fijado por el xilema¹⁵².

En todas las simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, el sustrato energético para la fijación de N₂ se deriva de fotosintatos transportados al citosol del nódulo como sacarosa en el floema.



Figura 4. Endosimbiontes fijadores de nitrógeno en la simbiosis¹⁶⁶: Rizobio intracelular en un nódulo formado en trébol por *Rhizobium trifolii*. Esta magnificación de la región del nódulo indeterminado del trébol muestra la transición de la zona de prefijación a la interzona. En la zona derecha de la célula, la bacteria intracelular (ba) no está aún diferenciado en su forma fijadora de nitrógeno. En la zona izquierda de la célula contiene amiloplastos (a) y bacteroides fijadores de nitrógeno diferenciados (b). En ambas células, la bacteria intracelular está rodeada por unas membranas peribacteroidales derivada de las plantas (pbm).

Después de entrar en las células no infectadas del nódulo, la sacarosa sintasa lo convierte en monosacáridos; algunos de éstos se someten a la glicolisis para producir fosfoenolpiruvato (PEP), que es carboxilado a oxalacetato por la PEP carboxilasa seguido de la reducción al ácido dicarboxílico malato (C4) por la malato deshidrogenasa. Los monosacáridos que no entran en la vía glucolítica son canalizados en la síntesis de celulosa o almidón. Malato, junto con otros ácidos dicarboxílicos tales como succinato y fumarato, es transportado de células no infectadas del nódulo hacia el citosol de las células infectadas y luego a través del simbiosoma y las membranas peribacteroidales hacia los bacteroides por un sistema de transporte de ácido dicarboxílico (**DCT**). Los ácidos dicarboxílicos son la fuente de carbono suministrado por la planta a las bacterias intracelulares²⁷⁷. En los bacteroides, la oxidación en el ciclo TCA (ácidos tricarboxílicos) genera la reducción de equivalentes y ATP necesario para la función de la nitrogenasa. A través del metabolismo fuera del bacteroide, el malato también proporciona esqueletos de carbono necesarios para la asimilación de N fijado en el citosol de los nódulos. El suministro de carbono a los nódulos y su metabolismo en bacteroides ha sido revisado por White²⁸⁰.

Los nódulos tienen que ser equipados para lidiar con dos requisitos fisiológicos aparentemente incompatibles para la fijación de N₂ en bacteroides, garantizar un suministro abundante de O₂ para la fosforilación oxidativa con el fin de proporcionar energía para la actividad de la nitrogenasa, mientras que al mismo tiempo, y en más o menos el mismo lugar, la protección de la nitrogenasa del efecto perjudicial de O₂. Las bajas concentraciones de O₂ se consiguen de dos maneras: (i) una barrera de difusión al O₂ en las células densamente empaquetadas en la corteza interior de nódulos, y (ii) altas tasas de respiración de los bacteroides¹⁶⁶ (Figura 5). El preciso modo de acción de la barrera de difusión no es conocida, pero su permeabilidad al O₂ rápidamente se ajusta a los cambios en la concentración externa de O₂ o la demanda interna de O₂²⁶⁵. En esta barrera de uno a cinco capas de células de espesor, los espacios intercelulares pueden ser llenados con aire o agua; ya que el coeficiente de difusión de O₂ en el aire es de aproximadamente 10⁴ veces mayor que en el agua, una barrera de agua es un eficaz medio para limitar la difusión de O₂ al interior de los nódulos¹⁵². El parénquima nodular contiene muy pocos y pequeños espacios intercelulares, y esta característica morfológica se piensa que es responsable del bloqueo en la difusión de oxígeno. En el parénquima nodular, genes nodulina tales como ENOD2 son expresados en productos proteicos que pueden contribuir a la construcción de la barrera de oxígeno. En células infectadas de la parte central del nódulo, altos niveles de proteína leghemoglobina transportadora de oxígeno facilita la difusión de oxígeno. De esta manera, el microsimbionte está provisto de suficiente oxígeno para generar energía dentro de una baja concentración de oxígeno (Figura 5).

En este ambiente limitado de O₂, la **leghemoglobina** juega un papel importante para asegurar el suficiente suministro de O₂ a los bacteroides. Leghemoglobina es codificado por lo menos cuatro genes *lb* y constituye (en los nódulos maduros de soja) aproximadamente el 5% del total de proteínas en el nódulos¹⁵². Esta proteína, con un átomo central de Fe en un anillo de porfirina (idénticos a los citocromos), actúa mediante la unión de O₂ de los espacios intercelulares en la zona infectada del nódulo y entregándola por difusión junto con una gradiente de concentración de oxileghemoglobina a una alta afinidad de tipo citocromo oxidasa *cbb3* en los bacteroides⁶⁵. El alto consumo de O₂ de los nódulos, necesaria para la provisión de energía, también puede conducir a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Para la protección en contra de su toxicidad, los rizobios

emplean una variedad de mecanismos de defensa anti-oxidante, incluyendo basureros y reductores de ROS, que parecen ser esenciales para el normal desarrollo del nódulo²⁴⁶.

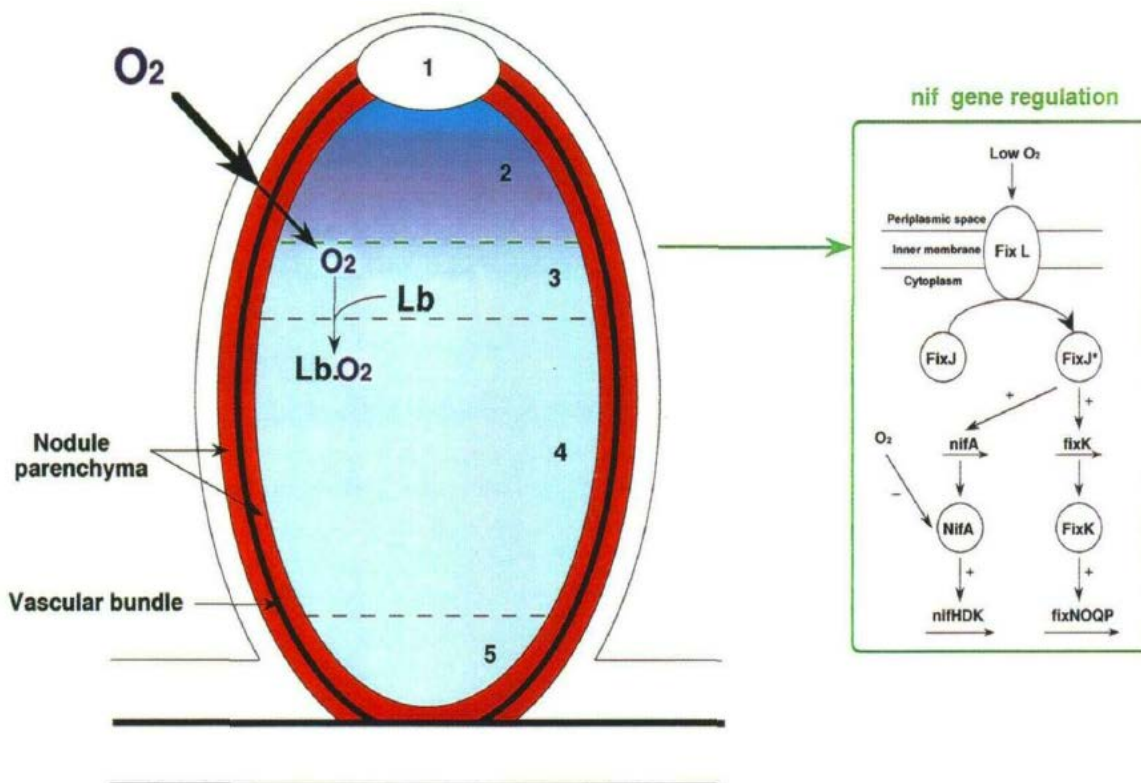


Figura 5. Regulación del oxígeno en leguminosas de nódulos indeterminados (Adaptado de Mylona¹⁶⁶.)

Los nódulos de leguminosas indeterminados consisten de cinco regiones distintas: 1, meristema del nódulo; 2, zona de prefijación; 3, interzona; 4, zona de fijación de nitrógeno; y 5, la zona senescente. Una barrera para el oxígeno está presente en el parénquima nodular que rodea el haz vascular del nódulo (mostrado en rojo) que reduce el acceso de oxígeno al tejido central del nódulo. Sin embargo, debido a que esta barrera de oxígeno se interrumpe en el meristema, se forma un gradiente de oxígeno que se extiende desde el extremo distal hasta el extremo proximal del nódulo (mostrada por el sombreado azul). En la primera capa de células de la interzona (mostrado por la línea verde discontinua), la baja concentración de oxígeno conduce a los eventos descritos en el cuadro verde.

El nitrógeno fijado en bacteroides se difunde en forma de NH_3 en el espacio simbiosomal ácido. Aquí es protonado a amonio y evita que se vuelvan a utilizar en los bacteroides por la supresión de un sistema de transporte de amonio (Amt) que de otro modo funciona en rizobios de vida libre¹⁵². Un canal de cationes monovalentes transporta amonio a través de la membrana simbiosomal en el citosol del hospedante en el que se asimila en glutamina a través de la vía glutamina sintetasa (GS)/glutamato sintasa (GOGAT) ²⁶².

Otro aminoácido, alanina, se puede sintetizar en los bacteroides y luego transportado al citosol de hospedante, esto está en disputa²⁸⁰, pero la evidencia existe para el intercambio

de algunos amino ácidos entre bacteroide y la planta¹⁵². El N fijado se entrega a través del xilema al brote principalmente como **amidas** en las leguminosas con nódulos indeterminados (generalmente leguminosas templadas), o como **ureídos** en nódulos determinados (generalmente leguminosas tropicales). Los ureídos se sintetizan en las células no infectadas, a partir de asparagina y glutamina recibida desde el citosol de las células infectadas adyacentes, antes de ser exportados en el xilema¹⁶⁶.

Muchos intentos se han hecho para calcular los costos del carbono para las plantas de la fijación de N₂ frente a la absorción de N mineral de la rizósfera. Aunque los costos de la energía de fijación podrán sobrepasar a los de absorción por >10% d⁻¹, estas comparaciones pueden ser engañosas porque no tienen en cuenta el coste económico de la producción de los fertilizantes nitrogenados, su baja eficiencia en el uso en la agricultura (con frecuencia menos de 50% de la cantidad aplicada al suelo es absorbido por la cosecha) y los costos ambientales debido a la lixiviación del nitrógeno¹⁵²..

Una vez que han nodulado su leguminosa hospedante, no todos los rizobios fijan altas cantidades de N₂. Las capacidades de fijación de N₂ varían sustancialmente entre cepas dentro de una especie o biovar de *Rhizobium* que van desde cero (inefectivo) a alta (efectiva). Para una especie, *Rhizobium giardinii*, que nodula *Phaseolus vulgaris*, todas las cepas hasta ahora descritas fueron inefectivas⁶⁷. Para una cepa de rizobio dado, su eficacia puede variar en función del género, especie o la variedad del hospedante que se nodula. Por lo tanto, una alta fijación de N₂ y rendimiento no se da frecuentemente aun cuando otras condiciones para el crecimiento de la planta (e.g., el pH del suelo, la disponibilidad de agua y nutrientes distintos del N) son favorables. La inoculación de semillas con cepas de *Rhizobium* seleccionadas es a veces empleada en un intento de garantizar la nodulación efectiva de las plantas en suelos cuyas cepas indígenas son pobres fijadores de N₂. Desafortunadamente, la falta de conocimiento de los mecanismos que gobiernan la competencia entre cepas para la infección de la raíz y la nodulación y cepas inoculantes elegidos por sus altas propiedades de fijación de N₂ no necesariamente superan en competencia a los rizobios nativos.

Los beneficios para una leguminosa de una simbiosis efectiva con rizobios son evidentes: un suministro de N independientemente del estado de N del suelo. Los beneficios para una

cepa de *Rhizobium* eficaz, sin embargo, no son inmediatamente evidentes. Ella puede existir y multiplicarse como heterótrofo de vida libre en el suelo durante décadas, incluso en la ausencia de una leguminosa hospedante adecuado, y no tiene que fijar N para sobrevivir. En simbiosis sacrifica un porcentaje significativo de su propio potencial respiratorio para abastecer a su hospedante con N, mientras que una cepa ineficaz puede nodular una planta huésped sin tener tal demanda colocada en su propio metabolismo. Además, los bacteroides de nódulos indeterminados pierden la capacidad de replicarse y ser liberados de nódulos senescentes como bacterias de vida libre. De hecho, se han planteado preguntas como – ‘¿por qué los rizobios fijan nitrógeno?’²⁷⁸ y ‘¿por qué la mayoría de los rizobios son beneficiosos para sus plantas hospedantes, en lugar de ser parásitos?’⁶⁶. Una posible respuesta es que la planta hospedante impone sanciones metabólicas en los nódulos que contienen cepas de rizobios débilmente eficaces o ineficaces. Una estrategia (particularmente en nódulos determinados que contienen bacteroides replicables) podría implicar la restricción del suministro de O₂ a los nódulos no fijadores, limitando así la multiplicación de rizobios dentro de ellos y reduciendo el número de células viables que eventualmente pueden ser liberados de nódulos senescentes¹³³. Se ha argumentado que tales restricciones podría contrarrestar la evolución de parasitismo y estabilizar una simbiosis fijadora de N₂ favoreciendo las cepas efectivas de *Rhizobium*¹⁷⁹. Este tema está en debate y algunas de las complejidades de la nodulación aún no se han tenido en cuenta. Entre éstos están: (i) una cepa *Rhizobium* puede ser inefectivo en un hospedante pero efectivo en otro; (ii) los nódulos de las raíces individuales que albergan cepas efectivas e inefectivas, si es que existen su frecuencia de ocurrencia es desconocida; (iii) las cepas ineficaces a veces producen mucho más nódulos en un sistema radicular que los efectivos, por tanto, potencialmente compensaría las sanciones de hospedante; y (iv) una leguminosa hospedante puede influir en la selección de cepas de *Rhizobium* sin emplear restricciones¹⁵².

2.3.6. Efectos de los nutrientes que no sean nitrógeno

Las deficiencias de nutrientes pueden afectar negativamente la simbiosis en una fase muy temprana de desarrollo, incluyendo la multiplicación del microsimbionte en la rizósfera de la planta hospedante, su capacidad para detectar señales de nodulación y su capacidad para

producir y excretar factores Nod¹⁵². Los nutrientes esenciales requeridos por los rizobios son los que tienen una participación directa en la estructura y funcionamiento metabólico de la célula microbiana¹⁷⁴. Posteriormente, estos elementos influyen en la fijación de N₂ en diversas etapas de la interacción simbiótica: la infección y el desarrollo del nódulo, funcionamiento de nódulos y el crecimiento de la planta hospedante. Además, el requerimiento relativo de un nutriente dado para el crecimiento de las plantas, por una parte y el establecimiento y funcionamiento del aparato simbiótico en el otro, pueden diferir¹⁷⁴. La señalización química entre los rizobios y la leguminosa es de fundamental importancia para el proceso de nodulación. El fósforo (P) juega un papel clave en los sistemas de señalización a través de receptores quinasa y no-quinasa, y en otros procesos metabólicos que requieren pasos de fosforilación como la regulación de enzimas intracelulares y la unión de proteínas a ADN para la regulación de genes¹⁷⁴. Bajo estrés por P, los rizobios responden de la misma manera que la planta hospedante: inducción de la expresión de genes que están implicados en la adquisición de P²¹⁷.

- **Fósforo (P)**

El fósforo tiene una función esencial en el metabolismo energético de las plantas y por lo tanto juega un importante papel en la fijación de N₂ debido a la alta demanda de ATP de la reacción de la nitrogenasa. La deficiencia de P, tiene un impacto negativo en el estado energético de los nódulos de leguminosas¹⁷⁷. La síntesis de ácidos nucleicos y fosfolípidos es también dependiente de P¹⁷⁴. Comparado con las plantas que recibieron la fertilización mineral de N, las plantas fijadoras de N₂ necesitan más P debido al desarrollo de nódulos y vías asociados de transducción de señales, y para fosfolípidos en bacteroides¹⁰³. Este requisito puede ser mayor que para el crecimiento de la raíz o brotes de la planta hospedante. La concentración mínima de P para la nodulación es aproximadamente 0,5 µg P l⁻¹ en la solución externa. Un incremento de 200 a 500 µg P l⁻¹ resulta en un mayor aumento de peso seco del nódulo con respecto al peso seco de brotes y raíces¹⁵².

Los nódulos son un fuerte sumidero de P; la concentración de P suele ser considerablemente más alta (hasta tres veces) en los nódulos que en las raíces y brotes, particularmente cuando la oferta externa de P es baja¹⁵². La capacidad de desarrollar nódulos para competir con otros sumideros vegetativos de P (meristemos de la raíz y

brotos) cuando la oferta externa es limitada difiere entre especies de leguminosas. Esto puede ser en parte responsable de los desacuerdos con respecto a las cantidades de P necesario para la nodulación¹⁵². Simbiosis tripartita entre las leguminosas, los rizobios y las micorrizas son comunes. La micorrización incrementa la adquisición de P por las plantas cultivadas en suelos con bajo P. La nodulación puede ser mejorada mediante la aplicación de fertilizantes fosfatados¹.

La concentración de N y P en el brote de las leguminosas están positivamente correlacionados¹³⁷. Por tanto, cuando las leguminosas que dependen de la fijación de N₂ reciben un inadecuado suministro de P, también puede sufrir de deficiencia de N. A baja disponibilidad de P, la adición de P aumenta el número de nódulos de la raíz¹, la masa de nódulos, el tamaño del nódulo¹³⁷ y el rendimiento¹⁵². Sin embargo, la aplicación de P afecta principalmente a la absorción de N total en lugar del porcentaje derivado de la atmósfera (%Ndfa)²³⁷.

- **Calcio**

El calcio es especialmente importante para los eventos iniciales de la infección¹⁵². Una concentración baja de Ca en el nódulo reduce la fijación de N₂ debido a que el Ca es inadecuado para la estructura del nódulo⁹. Alto suministro de Ca incrementa el número de nódulos¹⁵² y la cantidad de compuestos inductores de genes *nod* en exudados de la raíz¹⁵². En la vía metabólica de señalización de nodulación, el Ca juega un papel esencial como mensajero secundario, a través de una única quinasa activada de Ca¹⁷⁶. Algunos de los efectos negativos de la acidez del suelo en la nodulación de leguminosas están vinculados a una restricción de la disponibilidad de Ca.

- **Azufre**

La deficiencia de azufre disminuye la fijación de N₂ porque afecta el desarrollo y la función de los nódulos, reduce la concentración de leghemoglobina en los nódulos¹⁸³ y disminuye las concentraciones de ATP en los bacteroides, así como en las mitocondrias de los nódulos radiculares¹⁵². El último puede ser causado por el suministro bajo de carbohidratos a los nódulos por deficiencias de S en la leguminosa¹⁸³. El azufre es importante para la actividad de la nitrogenasa debido a que el menor de las dos proteínas de Fe no hemo sensible al

oxígeno contiene una unidad simple Fe_4S_4 ¹⁵². Además de la nitrogenasa, las actividades de otras enzimas importantes implicadas en la fijación de N_2 , tales como PEP-carboxilasa, malato deshidrogenasa o glutamato sintasa, también se reducen cuando la oferta de S es insuficiente¹⁵². La aplicación de S en suelos deficientes de S puede no sólo aumentar la calidad de leguminosas de grano, sino también el número de nódulos en las raíces y el peso de nódulos¹⁸³ y la actividad de la nitrogenasa¹⁵².

- **Molibdeno**

Como el Mo es un componente metálico de la nitrogenasa, la simbiosis tiene un alto requerimiento de Mo. Aunque Mo no se necesita específicamente para la nodulación, la deficiencia de Mo afecta el desarrollo de nódulos mediante la reducción de la multiplicación de bacteroides¹⁷⁴, aunque, a bajo suministro, este elemento es preferentemente transportado dentro de los nódulos¹⁵². La deficiencia de Mo y N en leguminosas que fijan N_2 está muy extendida, sobre todo en los suelos minerales ácidos de las zonas tropicales húmedas y subhúmedas. En condiciones ácidas, el tratamiento de suelos con Mo puede aumentar de tasas de fijación de N_2 en las leguminosas.

En suelos ácidos, la aplicación de cal y Mo puede mejorar la formación de nódulos de las raíces y el rendimiento de semilla en 370%⁵⁵.

En la madurez, los frijoles que recibieron N mineral tenían una mayor cantidad de brotes pero menor peso seco de vainas en comparación con plantas fijadoras de N_2 fertilizadas con Mo. Este índice de cosecha menor en las plantas fertilizadas con N mineral fue muy probablemente el resultado de un mayor consumo de agua y el resultado de una sequía más severa durante las etapas iniciales del llenado de vaina¹⁵².

- **Hierro**

El hierro es un nutriente esencial tanto para las leguminosas y sus nódulos en las raíces. En la fijación de N_2 es un componente de varias enzimas tales como la nitrogenasa, el portador de electrones ferredoxina, leghemoglobina y varias hidrogenasas². El componente hemo de leghemoglobina tiene una exigencia particularmente alta de Fe. Por lo tanto, es necesaria Fe

en mayores cantidades para la formación de nódulos que para el crecimiento de la planta hospedante^{2, 152}.

La deficiencia de hierro no afecta la infección per se, sino la posterior división de las células corticales, es decir, las primeras etapas de desarrollo de nódulos y la proliferación de rizobios que invaden la raíz¹⁵².

- **Boro**

Las legumbres requieren B en concentraciones relativamente altas para el desarrollo de nódulos. La concentración de B en los nódulos es alrededor de cuatro a cinco veces más alta que en las raíces³³ y una ausencia de B en el medio de enraizamiento ocasiona una disminución de la nodulación y altera el desarrollo de nódulos¹⁵². El boro se requiere para el desarrollo de los hilos de infección y la invasión de células en el nódulo. En ausencia de B, la unión de las superficies celulares rizobiales a la pared del hilo de la infección se inhibe, las bacterias no pueden progresar a través del hilo de la infección y son incapaces de llegar al entorno endofítico. La deficiencia de boro también causa aborto de hilos de infección, así como la degeneración de las paredes celulares y las membranas que rodean los bacteroides intracelulares³³. Estos impedimentos para el desarrollo de nódulos resultan en la disminución de la fijación de N₂ y necrosis.

- **Cobalto**

Deficiencia de Co severa reduce la infección y retarda la formación de nódulos mientras que la tasa de crecimiento de nódulos no es afectada por el suministro de Co¹⁷⁴. Por otra parte, se requiere Co para la síntesis de leghemoglobina. El indicador más sensible de la deficiencia de Co es el contenido de nódulos en el bacteroide. Mientras la síntesis de leghemoglobina se ve reforzada por el suministro de Co, el aumento en la actividad de la nitrogenasa por unidad de leghemoglobina sólo es relativamente pequeño.

- **Níquel**

Aunque el Ni es un constituyente de un número de hidrogenasas de absorción y una menor actividad hidrogenasa se ha encontrado en bacteroides aisladas de plantas de soja

deficientes en Ni, se carece de evidencia que en condiciones de campo la fijación de N_2 se vea obstaculizada por la deficiencia de Ni¹⁵².

2.3.7. Efecto del Nitrógeno Mineral

El efecto del N mineral del suelo (desde el suelo o fertilizantes) en la FBN está bien documentada¹⁵². En las leguminosas (y otros sistemas de fijación simbiótica de N_2), el N mineral puede aumentar o bajar la fijación de N_2 , en función de una serie de factores y la tasa de suministro de N en particular.

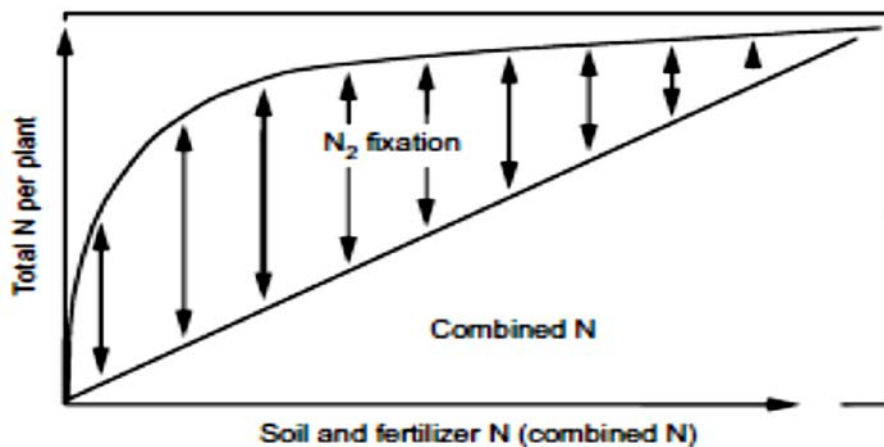


Figura 6. Esquema simplificado de la relación entre la fijación de N_2 y absorción de N del suelo y fertilizantes en leguminosas noduladas (Adaptado de Marschner, 2012).

Como se muestra esquemáticamente en la Figura 6 incrementando la oferta de N combinado (suelo+fertilizantes N) resulta en un aumento asintótica en N total por planta. El efecto de mejora de bajos niveles de N combinado en la FBN en leguminosas se relaciona con la fase de latencia entre la infección de las raíces y la aparición de la fijación de N_2 . La deficiencia de nitrógeno durante esta fase es perjudicial para la formación de un área foliar que sea lo suficientemente grande para suministrar los fotosintatos necesarios para el crecimiento y la actividad de nódulos. En nulos o muy bajos niveles de N combinado, el efecto del fertilizante N mejora (Figura 6) dependiendo de la reservas de N en las semillas. Como regla general, la nodulación y actividad del nódulo (fijación de N_2) más alta es obtenida cuando las reservas de N en la semilla y el N mineral, ya sea desde el suelo o fertilizantes, están disponibles en cantidades que son suficientes para el crecimiento vigoroso de las plantas durante las primeras semanas de establecimiento de la leguminosa.

Las bajas tasas de fertilizantes minerales, suministrados como primera fuente de N, aumentaron la nodulación de la soja y la cantidad total de N derivado de la fijación de N₂, pero altas tasas disminuyeron drásticamente la nodulación e inhibieron la fijación de N₂. Sin embargo, las tasas bajas de N en un inicio, como 20 a 40 kg de N.ha⁻¹ pueden disminuir tanto la nodulación y la fijación de N₂, sin beneficios en el rendimiento^{118, 152}.

Cuando las concentraciones de N combinado aumentan, la actividad de la nitrogenasa y el número de nódulos disminuyen¹⁵². El crecimiento de brotes, por otro lado, continúa aumentando, lo que indica un cambio de nutrición N simbiótica a inorgánica. El mayor contenido de N en los brotes coincide con la más alta actividad de la nitrogenasa pero no con el mayor peso seco de las plantas. Esto sugiere que a la máxima fijación de N₂, la producción de materia seca fue limitada (por falta de fotosintatos) y la desviación de algunos fotosintatos para la fijación de N₂ tal vez puede restringir el crecimiento de las plantas. La medida a la cual la nodulación y la actividad del nódulo se reducen a niveles altos de N combinado depende del genotipo de la planta y la forma de N suministrado. En general se considera que la infección y el desarrollo de nódulos son más sensibles al nitrato que el amonio.

En arveja, suministro continuo de los niveles moderadamente altos de N-amonio (1 mM) no sólo puede aumentar la nodulación y la fijación de N₂, sino también estimular la proliferación de pequeños nódulos. Aunque un suministro de alto nitrato generalmente deprime la nodulación, diferencias genotípicas en la sensibilidad al nitrato existen. En frijol común, existen diferencias incluso entre cultivares con respecto a la inhibición de la nodulación por alto suministro de nitrato¹⁵².

La regulación del metabolismo de la raíz para asegurar que las plantas son suministradas con cantidades adecuadas de N, se sabe que involucra sistemas de retroalimentación, de forma que el estado de N de toda la planta influye en el crecimiento de la raíz, la actividad de transporte y, en el caso de las leguminosas, el crecimiento y actividad de los nódulos¹⁸⁷. Aunque las señales precisas que transmite el estado de N en la planta a los nódulos de la raíz son aún desconocidos, los aminoácidos ricos en N que son transportados desde el brote juegan un papel en la formación, función y regulación del nódulo¹⁵². Sin embargo, el conocimiento de los mecanismos exactos de detección de la planta y la señalización en

relación con el estado N sigue siendo bastante pobre. Se cree que la captación de la señal puede ocurrir en las células en los brotes y las señales podrían comunicarse a las raíces y nódulos a través del floema¹⁸⁷. Estas señales parecen operar de una manera cuantitativa, lo que permite la absorción de N y la fijación de N₂, que se ajusta con precisión a la demanda.

2.3.8. Efectos Ambientales

La rizósfera afecta fuertemente la interacción simbiótica entre los rizobios y sus leguminosas hospedantes. Las condiciones favorables de crecimiento de las plantas y el establecimiento de las poblaciones bacterianas mejoran el éxito del inóculo y promueven el desarrollo de los sitios de infección en los pelos radicales⁷⁴. Por lo tanto, los factores de suelo influyen en el crecimiento de rizobios y la planta, como la acidez, alcalinidad, salinidad, temperatura, humedad, fertilidad (incluyendo las deficiencias de nutrientes) y estructura física²³⁴ también afectarán a la infección y la nodulación.

- ***Salinidad***

La mayoría de las leguminosas son clasificadas como cultivos sensibles a la salinidad⁷⁴ y los efectos del estrés salino en la fijación de N₂ en estas plantas han sido ampliamente reportados. La salinidad puede afectar la simbiosis directamente reduciendo el crecimiento de la planta hospedante o indirectamente por alterar las interacciones entre *Rhizobium* y el hospedante conduciendo a la inhibición de la formación de nódulos. Bajo condiciones de salinidad, la adhesión bacteriana a las raíces se reduce y los pelos radiculares no muestran la característica respuesta a factores Nod, es decir, la deformación del pelo radicular y el posterior rizado⁷⁴. El estrés salino también inhibe la invasión y proliferación bacteriana dentro de las células del hospedante, que puede ser aliviado por complementar las leguminosas inoculadas con B y Ca²⁰. Sin embargo, estos efectos varían según las especies de leguminosas, el frijol común, por ejemplo, es más sensible a la sal que la soja y la alfalfa.

- ***Humedad del suelo***

En las regiones áridas, una pobre nodulación de leguminosas es más probable debido a la muerte de rizobios durante la estación seca. La humedad del suelo también influye en el

crecimiento de los rizobios alterando el crecimiento de las plantas, la arquitectura de la raíz y la exudación de las raíces²¹⁷. La sincronización del estrés por sequía con respecto a la etapa de crecimiento de la planta tiene un efecto importante en la nodulación y la fijación de N₂ y un período prolongado de estrés durante la etapa vegetativa retarda ambos procesos. Una vez establecidos los nódulos, la sequía reduce la fijación de N₂¹⁸⁹. El efecto de la sequía sobre la actividad del nódulo se debe principalmente a un aumento de la resistencia a la difusión de O₂ en los bacteroides¹⁵².

Para equilibrar las concentraciones osmóticas internas y externas, rizobios tolerantes a la salinidad acumulan solutos compatible orgánicos o inorgánicos. *S. meliloti* supera la inhibición del crecimiento inducido por el estrés hídrico mediante la acumulación de solutos tales como glutamato o prolina. En *Glycine max* L., la disminución de la fijación de N₂ a baja disponibilidad de agua está asociado con un aumento de las concentraciones de ureídos y aminoácidos libres en el tejido de la planta, lo que indica una inhibición potencial de retroalimentación por estos compuestos en respuesta a la sequía¹⁵².

- **Temperatura**

Las altas temperaturas perjudican la sobrevivencia y persistencia de cepas de rizobios en el suelo y también la infección de la raíz²¹⁷. Además, temperaturas elevadas puede afectar la producción o liberación de inductores de genes *nod*, alteran el funcionamiento de nódulos a través de cambios en la síntesis de leghemoglobina y actividad de la nitrogenasa, y aceleran la senescencia del nódulo¹¹⁷. Sin embargo, hay rizobios tolerante a altas temperaturas (40 ° C). En *Trifolium repens*, la fijación de N₂ disminuyó con la disminución de la temperatura de la raíz (c), siendo cuatro veces y dos veces mayor a 12 °C que a 6 y 9 ° C, respectivamente. Sadowsky²¹⁷ sugirió que cada combinación de *Rhizobium*/leguminosa tiene una temperatura óptima específica, que está entre 25 y 30 °C en el frijol común, alrededor de 30 °C para las arvejas y el trébol y entre el 35 y 40 °C para el caupí, maní y soja.

- **La acidez**

La acidez afecta rizobios de vida libre y fijadores de N₂²³⁴. En suelos ácidos, la densidad de rizobios puede ser baja. El aumento de pH del suelo por el encalado es por lo tanto muy

eficaz para aumentar el número de nódulos, por ejemplo en frijol común, alfalfa y maní¹⁵². En suelos ácidos, diversos factores, tales como altas concentraciones de H^+ , Al monomérica y, a veces micronutrientes³⁰ que se vuelven más solubles a pH bajo, puede contribuir a una pobre nodulación y la inhibición del crecimiento de las plantas. Por otra parte, la disponibilidad de Ca y P están perjudicados por bajo pH del suelo y también puede influir el crecimiento y la supervivencia de rizobios²¹⁷.

La formación de nódulos tiene un mayor requisito de Ca que el crecimiento de raíces y brotes de la planta hospedante. Sin embargo después de la iniciación de nódulos, el posterior crecimiento del nódulo no se vio afectada por una disminución en la concentración de Ca, lo que sugiere que sólo el primer paso de la infección es altamente sensible al suministro de Ca¹⁵². A bajas concentraciones de Ca, particularmente en combinación con concentraciones altas de protones, la fijación de rizobios a la superficie de la raíz del hospedante se ve afectada. En contraste con especies sensibles a la acidez, los exudados de las raíces liberadas por la especie tolerante *Medicago* a pH bajo y bajas concentraciones de Ca son eficaces en la inducción de la expresión del gen nod¹¹⁵.

La pobre nodulación en suelos ácidos puede ser causada por la baja sobrevivencia de cepas de rizobios¹¹⁵, así como efectos sobre la morfología de la raíz. La inhibición de la formación del pelo radicular por bajas concentraciones de Ca y altas concentraciones de Al y H^+ puede explicar la nodulación dañada en especies donde los pelos radicales son los sitios de infección dominantes. En suelos ácidos, la liberación neta de H^+ , es decir, la acidificación de la rizósfera, acoplado inherentemente con la fijación de N_2 de leguminosas y no leguminosas noduladas, puede exacerbar el impacto negativo de la acidez.

2.3.9. La Inoculación de la leguminosa

La inoculación de las leguminosas significa la introducción o adhesión de las bacterias a la semilla de leguminosas o al suelo para permitir a las plantas fijar o transformar a una forma utilizable el nitrógeno de la atmosfera. La forma más común de introducción de inoculo al suelo es al momento de sembrar. Generalmente, las semillas de leguminosas deben ser cubiertas con el inoculante apropiado justo antes de la siembra. La proporción inoculo-semilla viene determinada por las condiciones del cultivo. En el caso de

inoculantes solidos se recomienda utilizar alguna solución pegajosa, como la goma arábica para obligar al inoculante a adherirse a la semilla. Algunos autores recomiendan el uso de azúcar como solución pegajosa; sin embargo, se ha observado que el azúcar atrae insectos como hormigas, por lo que tiende a ser un problema en lugar de una solución. Si el inoculante es liquido se recomienda aplicar 1 ml de la suspensión bacteriana al suelo^{77, 111}. Los inoculantes son cultivos puros de *Rhizobium* específicos y seleccionados que se mezclan con un soporte, generalmente a base de turba. La duración del inoculante depende del número de bacterias que contenga y también de la manera como se conserva este.

Las características que debe reunir un buen inoculante son:

- a) Debe contener cepas de alta eficiencia en su capacidad para fijar nitrógeno procedente del laboratorio donde se realice una selección rigurosa
- b) Una cepa de *Rhizobium* debe tener una alta especificidad con una leguminosa, buena infectividad, adecuado grado de competitividad con otras cepas, alta efectividad de infección con las leguminosas, estabilidad genética
- c) Las cepas deben estar adaptadas a las condiciones de la región, hay cepas que pueden funcionar bien en diferentes regiones pero en otras con diferentes condiciones (clima, suelo, etc.) presentan un comportamiento inferior o no funcionan adecuadamente. De funcionar un inoculante, se deberá ver entre los 45 a 60 días después de la siembra, nódulos con características de efectividad¹⁵².

2.3.10. Antecedentes

Noa¹⁷² evaluó diferentes variedades de frijol de grano amarillo en invierno donde obtuvo altos rendimientos para las variedades de crecimiento indeterminado con valores entre 2493 y 1900 kg.ha⁻¹ debido a las condiciones favorables que encontró el cultivo en su desarrollo y superaron a la variedad testigo Canario Divex 8130-1 con habito de crecimiento tipo I. Encontró que los componentes que más influenciaron en el rendimiento de grano fueron: el número de vainas por planta, número de granos por vaina y número de días a la floración. Tsai²⁵¹ obtuvieron altas tasas de fijación de N₂ en judías, incluso a elevadas dosis de fertilización nitrogenada (120 kg N-úrea/ha) cuando se equilibraron otros elementos nutritivos.

Quiñones²⁰¹ probó la adaptación de 36 líneas de frijol Canario, obteniendo altos rendimientos en dos líneas CIFAC con 3327 y 2745 kg.ha⁻¹, también obtuvo buenos rendimientos para Canario 2000, Canario Centinela y Canario Corriente con 2688, 2052 y 1661 kg.ha⁻¹, respectivamente.

Canchari³¹ evaluó el efecto de aplicación de cepas de *Rhizobium*, bioestimulantes y fertilización en el rendimiento de frijol canario en condiciones de costa central, en la variedad CIFAC 92008 obteniendo rendimientos entre 1331.6 y 1061.1 kg.ha⁻¹ correspondiendo el primero al tratamiento 3 (*Rhizobium*+ bioestimulantes) y el último al tratamiento 1 (testigo sin aplicación), además los tratamientos en los cuales la aplicación de bioestimulantes en prefloración tanto individualmente como en la combinación con la inoculación de *Rhizobium* a la semilla se presenta mayores incrementos en el rendimiento de grano seco.

Paima¹⁸⁴ evaluó una cepa de *Rhizobium sp.* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su interacción con la materia orgánica y microelementos encontrando diferencias altamente significativas en el rendimiento del frijol común, en los tratamientos fertilizados y en los tratamientos donde se estableció la simbiosis, respecto al testigo, obteniendo rendimientos de 2129.7 kg.ha⁻¹ para los tratamientos inoculados. Además, señaló que la fertilización nitrogenada y la fijación biológica de nitrógeno tuvieron efecto favorable significativo en el rendimiento.

Villanueva²⁶⁷ evaluó el efecto de dos cepas de *Rhizobium sp.*, y abono orgánico en el rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Canario molinero PLVI/1-3 en condiciones de La Molina. Los rendimientos se asocian con la fijación de nitrógeno activo por los nódulos efectivos de la leguminosa. Así la cepa LMT 15 supera en rendimiento a la cepa LMT 10 teniendo en cuenta el mayor número de nódulos y efectividad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN DEL CAMPO EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación se realizó entre Julio y Noviembre del 2013 en el campo Guayabo I, perteneciente al Programa de Investigación y Proyección Social en Leguminosas y Oleaginosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina, cuyas coordenadas geográficas son:

Latitud : 12°05'13.04'' S

Longitud : 76°56'45.55'' O

Altitud : 245 msnm

3.2.HISTORIAL DE CAMPO

El campo Guayabo I se dedica exclusivamente al monocultivo del frijol todos los años.

3.3.MATERIALES

3.3.1. Análisis Fisicoquímico del Suelo

El suelo donde se realizó el presente trabajo experimental, es como todos los suelos de La Molina, profundos, de buen drenaje, permeabilidad moderada, textura media, estructura granular media y moderada, de consistencia friable en húmedo (**Anexo 3**).

El análisis de suelos se realizó en base a una muestra de suelo del área experimental. Los resultados presentados en el **Anexo 3**, indica un contenido de sales bajo (0.35 dS/m), sin efectos adversos sobre el crecimiento del cultivo. El análisis mecánico de las fracciones minerales indica una textura franca.

Se puede deducir que el pH (7.92) indica que es un suelo medianamente alcalino. El contenido de CaCO₃ (1.8%) está en concentraciones muy bajas. El contenido de materia orgánica (1.07% de la M.O.) y por lo tanto de nitrógeno total (5% de la M.O.), es bajo. Por otro lado el contenido de fósforo disponible es medio (10.7 ppm). Asimismo, el contenido de potasio disponible (176 ppm) es medio. Estos niveles indicarían una mediana a baja probabilidad de respuesta a la fertilización fosforada-potásica y una alta probabilidad de

respuesta a la fertilización nitrogenada. La CIC (11.20 cmol) está en el límite de los rangos bajos y medio lo que nos indicaría una disminuida fertilidad potencial edáfica.

En las relaciones entre los cationes involucrados se observa una predominancia del Ca y el Mg (94.19% PSB) sobre el K (5% PSB), con una relación Ca/Mg de 6.53 y una relación K/Mg de 0.4. El porcentaje de saturación de bases es de 100%, siendo un suelo óptimo.

3.3.2. Condiciones meteorológicas

Según el sistema modificado de Koepen, basado en promedios anuales de precipitación y promedios anuales de temperatura, le corresponde a La Molina, la clasificación de Desierto subtropical Árido caluroso.

El Cuadro 7 presenta los datos climatológicos correspondientes a la zona experimental durante el periodo vegetativo del cultivo (julio a noviembre de 2013) fueron obtenidos de los registros del Observatorio Meteorológico “Alexander Von Humboldt” de la Universidad Agraria La Molina (UNALM).

Se observa un incremento marcado de la temperatura en octubre y noviembre debido a la estación primaveral, la precipitación asimismo disminuye al mismo ritmo del cambio de estación de invierno a primavera, con una disminución de la humedad relativa en los dos últimos meses de estudio.

Cuadro 7. Parámetros climatológicos de la zona de La Molina en el periodo experimental Julio-Noviembre 2013.

MES	TEMPERATURA PROMEDIO media mensual (°C)	TEMPERATURA MÁXIMA media mensual (°C)	TEMPERATURA MÍNIMA media mensual (°C)	HUMEDAD RELATIVA media mensual (%)	PRECIPITACIÓN MENSUAL (mm)	PRESIÓN media mensual (mb)
JULIO	15.08	17.97	13.50	85.09	3.90	986.42
AGOSTO	15.03	18.51	12.85	84.15	6.80	983.70
SETIEMBRE	16.00	20.04	13.46	82.74	3.60	985.99
OCTUBRE	17.47	21.25	14.49	73.87	0.00	975.93
NOVIEMBRE	18.97	22.31	15.53	76.89	0.60	973.50

Fuente: Datos obtenidos de los registros del observatorio Meteorológico “Alexander Von Humboldt” La Molina. Facultad de Ciencias UNALM

3.3.3. Material biológico de estudio

Para este experimento, el material biológico de estudio estuvo conformado por cuatro variedades comerciales de frijol para el experimento, incluyéndose un testigo dentro de cada variedad. Las variedades fueron proporcionadas por el Programa de Investigación y Proyección Social en Leguminosas y Oleaginosas de la UNALM. Las variedades son: Canario Centenario, Canario CIFAC, Blanco Molinero, Rojo Molinero y se describen a continuación:

- **Canario Centenario**

Origen genético: Procede de una selección efectuada por el Programa de Investigación y Proyección Social en Leguminosas y Oleaginosas-UNALM entre un conjunto de líneas mejorada en generación F9 proporcionadas en 1996 por la Estación Experimental Los Pobres de Ica, procedentes del Programa de Investigación en Leguminosas de Grano del INIA. La línea seleccionada de código CANVER 92008, procedente de la cruce [‘Mayocoba’ x (‘CC7816-3-6-CM’ x ‘Canario Divex’)] x [(‘CC07332-4-2-1-3-CM (10C)’ x ‘Canario corriente’)], realizada en 1986 por Ángel Valladolid y colaboradores en la Estación Experimental Agropecuaria de Chincha. La línea seleccionada fue evaluada durante cuatro años, primero en ensayos preliminares de adaptación y rendimiento y luego en ensayos avanzados en diferentes localidades y épocas destacando por su potencial de rendimiento y calidad de grano²⁹.

Características Agronómicas: Planta de hábito de crecimiento arbustivo determinado (Tipo I), con 110 días a la madurez de cosecha, con 15 a 30 vainas por planta y 5 semillas por vaina. El grano es de color amarillo intenso, brillante y de buena calidad comercial, el tamaño es mediano con un peso de 100 semillas de 55.5 gr y la forma es ovoide truncado. El rendimiento promedio en grano seco es de 2500 a 3000 kg/ha en costa y 2000 kg/ha en sierra baja. La forma de consumo es como grano seco. Se adapta bien a la costa en siembras de invierno y primavera y valles interandinos hasta los 2400 msnm. Variedad resistente al BCMV y tolerante a la roya (*Uromyces appendiculatus*) y oidiosis (*Erysiphe polygoni*).

- **Canario CIFAC**

Variedad precoz de hábito de crecimiento indeterminado, presenta resistencia a virus. Planta determinada, semitardía con 150 días a la madurez de cosecha, se siembra en otoño e invierno. El tamaño de granos grande de buena calidad culinaria²⁹.

- **Blanco molinero**

Variedad de alta calidad de grano principalmente para uso en verde, precoz y de alto rendimiento, evaluada y seleccionada en el Programa de Investigación y Proyección Social en Leguminosas y Oleaginosas de la UNALM.

Características: planta de hábito de crecimiento arbustivo determinado (Tipo I), presenta la floración a los 38 días después de la siembra y la madurez de cosecha a los 110 días después de la siembra. El tamaño del grano es grande con un peso de 100 semillas de 50 gramos, su forma es ligeramente arriñonado y el color es blanco semibrillante.

El rendimiento promedio de grano seco es de 2000 kg.ha⁻¹, se consume como grano verde y seco, se recomienda principalmente para consumo en verde por el tamaño grande de la vaina. Se adapta a los valles de la costa central en siembras de primavera. Variedad resistente a virus BCMV, y a oidiosis, susceptible a nematodos, pudriciones de la raíz y a otras plagas importantes en la costa²⁹.

- **Rojo Molinero**

Variedad de alta calidad de grano principalmente para mercado interno y externo, precoz y de alto rendimiento. Variedad evaluada y seleccionada por el Programa de Investigación y Proyección Social en Leguminosas y Oleaginosas de la UNALM. Planta de hábito de crecimiento arbustivo determinado (Tipo I), con una altura promedio de 60 cm., la floración se presenta a los 40 días después de la siembra y la madurez de cosecha a los 115 días después de la siembra. El tamaño del grano es grande con un peso de 100 semillas de 46 gramos, su forma es ligeramente arriñonada y de color rojo brillante. El rendimiento promedio de grano seco es de 2000 kg.ha⁻¹ y de 4000 a 6000 kg.ha⁻¹ de grano verde. Se adapta a los valles de la costa central en siembras de primavera. Variedad resistente a virus BCMV, a roya y a oidiosis, susceptible a nematodos, pudriciones de la raíz y a otras plagas importantes en la costa²⁹.

3.3.4. Inoculantes de Rhizobium

La cepa LMT 10 y LMT 15 de *Rhizobium sp.* utilizadas en el presente ensayo provienen del Laboratorio de Ecología, Microbiología y Biotecnología “Marino Tabusso” de la UNALM y fueron aislados de los nódulos presentes en las plantas de frijol canario variedad

Centenario procedentes del campo experimental del Programa de Investigación y Proyección Social en Leguminosas y Oleaginosas de la UNALM.

Las características de estas cepas son: bacterias Gram negativas, crecen bien en LMA (Levadura Manitol Agar) y en 48 horas están formando colonias. El color característico de estas colonias es que son cremosas, elásticas con bastante producción de mucosidad luego de las 27 horas de incubación.

En los campos cultivados con leguminosas de grano se aprecian poblaciones o cepas nativas de *Rhizobium sp.*, que pueden ser importantes ya que González¹⁰² identificó que hay diversidad de cepas *Rhizobium* y encontró que las cepas 13, 14, 15 y 21 tuvieron buenos resultados en la nodulación.

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Tratamientos en estudio

Factor Variedades (V): con 4 niveles v_1 (Canario centenario), v_2 (Canario CIFAC), v_3 (Blanco Molinero), v_4 (Rojo Molinero)

Factor Fuente de Nitrógeno (N): con 4 niveles n_1 (*Rhizobium sp* (LMT 10)), n_2 (*Rhizobium sp* (LMT 15)), n_3 (Cepa nativa en el suelo (testigo)) y n_4 (100 kg/ha de Nitrógeno (Nitrato de amonio.))

En el Cuadro 8 se aprecian los tratamientos a evaluarse en el presente estudio

Cuadro 8: Clave y descripción de los tratamientos en estudio.

CLAVE	DESCRIPCIÓN
T1 = v_1n_1	Canario Centenario con cepa LMT 10
T2 = v_1n_2	Canario Centenario con cepa LMT 15
T3 = v_1n_3	Canario Centenario testigo (cepa nativa en el suelo)
T4 = v_1n_4	Canario Centenario con nitrógeno (100 kg/ha)
T5 = v_2n_1	Canario CIFAC con cepa LMT 10
T6 = v_2n_2	Canario CIFAC con cepa LMT 15

T7 = v ₂ n ₃	Canario CIFAC testigo (cepa nativa en el suelo)
T8 = v ₂ n ₄	Canario CIFAC con nitrógeno (100 kg/ha)
T9 = v ₃ n ₁	Blanco Molinero con cepa LMT 10
T10 = v ₃ n ₂	Blanco Molinero con cepa LMT 15
T11 = v ₃ n ₃	Blanco Molinero testigo (cepa nativa en el suelo)
T12 = v ₃ n ₄	Blanco Molinero con nitrógeno (100 kg/ha)
T13 = v ₄ n ₁	Rojo Molinero con cepa LMT 10
T14 = v ₄ n ₂	Rojo Molinero con cepa LMT 15
T15 = v ₄ n ₃	Rojo Molinero testigo (cepa nativa en el suelo)
T16 = v ₄ n ₄	Rojo Molinero con nitrógeno (100 kg/ha)

3.4.2. Características del campo experimental

Nº de parcelas	: 48
Nº de bloques	: 3
Nº de parcelas por bloque	: 16
Distanciamiento entre surcos	: 0.8 m
Distanciamiento entre golpes	: 0.3 m
Longitud de cada surco	: 4m
Número de surcos	: 144
Nº de golpes por surco	: 22
Nº de repeticiones	: 3
Nº golpes por parcela	: 66
Nº de semillas por golpe	: 3
Distancia entre calles	: 0.3 m
Área de la parcela	: 9.6 m ²
Ancho total del experimento	: 19.2 m
Largo total del experimento	: 25.5 m
Área total del experimento	: 489.6 m ²
Nº plantas por parcela	: 198

RANDOMIZACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EN EL CAMPO EXPERIMENTAL

Tratamientos	I	II	III
1. Canario centenario con Cepa LMT 10	101	208	312
2. Canario centenario con Cepa LMT 15	102	206	304
3. Canario centenario T (cepa nativa del suelo)	103	212	308
4. Canario centenario con nitrógeno (100 kg/ha)	104	215	311
5. Canario CIFAC 920018 con Cepa LMT 10	105	210	305
6. Canario CIFAC 920018 con Cepa LMT 15	106	204	313
7. Canario CIFAC 920018 T (cepa nativa del suelo)	107	209	302
8. Canario CIFAC 920018 con nitrógeno (100 kg/ha)	108	211	315
9. Blanco Molinero con Cepa LMT 10	109	203	307
10. Blanco Molinero con Cepa LMT 15	110	214	306
11. Blanco Molinero T (cepa nativa del suelo)	111	201	309
12. Blanco Molinero con nitrógeno (100 kg/ha)	112	202	314
13. Rojo Molinero con Cepa LMT 10	113	205	310
14. Rojo Molinero con Cepa LMT 15	114	216	316
15. Rojo Molinero T (cepa nativa del suelo)	115	213	301
16. Rojo Molinero con nitrógeno (100 kg/ha)	116	207	303

3.4.3. Diseño experimental

El diseño estadístico experimental empleado fue el de Diseño de Bloques Completos al Azar con Arreglo Factorial 4², con 2 factores variedades y fuente de nitrógeno cada uno con 4 niveles, 16 tratamientos y tres bloques haciendo un total de 48 unidades experimentales. Para probar las diferencias entre los promedios de los tratamientos se utilizó la prueba de Duncan de comparación de medias. El software estadístico utilizado fue SAS 9.1²²². El modelo aditivo lineal es el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \delta_k + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Valor observado al finalizar el experimento de la unidad experimental que recibió el i-ésimo factor A con el j-ésimo factor B en el k-ésimo bloque.

μ = Efecto de la Media general

δ_k = Efecto del k-ésimo bloque

α_i = Efecto incremental sobre la media causado por el nivel i del factor V.

β_j = Efecto incremental sobre la media causado por el nivel j del factor N.

$(\alpha\beta)_{ij}$ =Efecto incremental sobre la media causado por la interacción del nivel i del factor V y el nivel j del factor N.

ε_{ijk} = Efecto aleatorio del error

La tabla de análisis de la varianza (ANVA) es:

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F Calculado
Bloques	r-1	SC Bloques	$\frac{SC_{\text{Bloques}}}{r-1}$	$\frac{CM_{\text{Bloques}}}{CM_{\text{Error}}}$
Variedad (V)	v-1	SC V	$\frac{SC_V}{(v-1)}$	$\frac{CM_V}{CM_{\text{Error}}}$
Fuente de Nitrógeno (N)	n-1	SC N.	$\frac{SC_N}{(n-1)}$	$\frac{CM_N}{CM_{\text{Error}}}$
VN	(v-1)(n-1)	SC VN	$\frac{SC_{VN}}{(v-1)(n-1)}$	$\frac{CM_{VN}}{CM_{\text{Error}}}$
Error	(vn-1)(r-1)	SC Error	$\frac{SC_{\text{Error}}}{(vn-1)(r-1)}$	-----
Total	vnr-1	SC Total	-----	-----

3.4.4. Conducción del Experimento

- **Preparación del terreno**

Se procedió al riego de machaco oportunamente antes de la siembra, luego se realizará una aradura a tracción mecánica a una profundidad de 35 cm., se efectuará el pase de rastras y luego el despajo con jornales, seguido del gradeo y surcado a 0.8 m de distancia entre surcos. Finalmente se procederá al marcado de los bloques, calles y parcelas utilizando para ello una wincha, cordel, estacas y cal.

- **Preparación de insumos**

Se realizó la selección de la semilla por su pureza y sanidad, luego el conteo del número de semillas para cada tratamiento y se ubicó ésta en un sobre de papel que es rotulado con la información del ensayo (número de parcela e identificación del tratamiento según la randomización, lugar y fecha). El compost fue sometido a un lavado con la finalidad de eliminar las sales que contienen. Se utilizaron 8 sacos de compost para todo el experimento.

- **Inoculación de semillas**

Antes de la siembra en el terreno experimental se dispusieron las cepas de *Rhizobium sp.*, provenientes del Laboratorio de Ecología, Microbiología y Biotecnología Marino Tabusso de la UNALM, luego se realizó el cálculo de la semilla, a utilizar por cada tratamiento donde se iba a emplear las cepas de *Rhizobium sp.*, el procedimiento que se utilizó fue preparar un recipiente con sustrato de tierra mullida (0.5 kg) sacando las impurezas

existentes, y luego se aplicó el inoculante procediendo a echar un poco de agua hasta formar una pasta seguidamente se agregó la semilla revolviendo todo para que la pasta se adhiera en forma uniforme a todas las semillas después se deja orear por 15 minutos a la sombra quedando lista para siembra.

- **Siembra**

Se distribuyeron las bolsas conteniendo las semillas según la randomización indicada. La siembra fue hecha con ayuda de una lampa, depositando en una sola costilla de surco (hilera doble) 3 semillas por golpe en un área de 0.24 m² haciendo una población de 83334 golpes por hectárea y un total de 250000 plantas/ha. La siembra se realizó el día 22 de Junio del 2013 a capacidad de campo.

- **Resiembra**

Se realizó a los 15 días después de la siembra para corregir las fallas de la siembra y así uniformizar el campo de cultivo. La resiembra se realizó el día 17 de Julio de 2013

- **Desahije**

Esta labor se realizó a los 15-25 días después de la siembra.

- **Riego**

Se manejó con riego por gravedad y las cantidades variaron de acuerdo a la necesidad de cultivo, las condiciones meteorológicas y el suelo. Se dieron 2 riegos por mes y en total fueron 7 riegos en todo el cultivo más el riego inicial de machaco.

- **Control de malezas**

Al inicio, antes de la siembra se aplicó el herbicida selectivo en preemergencia y de postemergencia temprana, Linurón. Se aplicó al suelo previo a la emergencia de las malezas a la dosis de 2 l/ha, para controlar plántulas de especies susceptibles durante un período de tiempo prolongado. Las malezas fueron controladas de forma manual y con la ayuda de una lampa de acuerdo al desarrollo de las malezas (4 veces), controlándolo sobre todo en el período crítico.

- **Fertilización**

De acuerdo al análisis fisicoquímico del cultivo se hizo la dosis de fertilización NPK [100 kg/ha, cada nutriente en forma elemental N, P y K, con las fuentes nitrato de amonio (33-3-0), superfosfato triple de calcio (0-46-0) y cloruro de potasio (0-0-60) respectivamente] en los tratamientos con fertilización nitrogenada y solo PK (100 kg/ha cada uno, solo

superfosfato triple de calcio y cloruro de potasio), en los tratamientos en donde se encuentra el *Rhizobium* para evitar la inhibición de la fijación biológica del nitrógeno. Asimismo micronutrientes como el Oligomix Co a la dosis de 0.5 kg/ha. Se aplicaron protohormonas como Agrostemin GL a la dosis de 0.3 l/ha para disminuir los ligeros efectos del estrés hídricos en la planta.

- **Control fitosanitario**

El control se realizó en función de la presencia de las plagas y enfermedades que se presenten durante el desarrollo del cultivo. Se utilizaron cebos para los gusanos cortadores (10 kg afrecho+ 1 l melaza, 6-7 l de agua y 1 kg del insecticida Tifón).

- **Cosecha**

La cosecha se efectuó de acuerdo a la madurez de cosecha, a los 140 días después de la siembra, se realizó en forma manual extrayendo al azar 10 plantas de los surcos centrales para su posterior evaluación y de igual manera se procedió con el resto de las plantas.

El material cosechado e identificado se trasladó al Programa de Leguminosas para su secado al aire libre y cubierto con malla para protegerlo de las aves, luego se realizó la trilla en forma manual y registrando los datos requeridos

3.5. CRONOGRAMA DEL EXPERIMENTO

ACTIVIDADES	PLAZO	SEMANAS																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Selección del terreno	1 semana	X																
Preparación del terreno																		
Limpieza del terreno	1 semana	X																
Incorporación de materia orgánica	1 semana	X																
Arado, rastra y nivelación	1 semana	X																
Riego de machaco	1 semana	X																
Siembra																		
Selección de semilla	1 semana	X																
Prueba de viabilidad	1 semana	X																
Inoculación de semillas	1 semana	X																
Siembra en campo	1 semana	X																
Labores culturales																		
Desahije	1 semana				X													
Riegos	12 semana	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Deshierbo	2 semanas				X				X									
Control de plagas y enfermedades	12 semana	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
Evaluación de nodulación																		
Extracción de muestras	1 semana													X				
Peso fresco de follaje y raíz	1 semana													X				
Conteo y ubicación de nódulos	1 semana													X				
Evaluación de fijación de nitrógeno	1 semana													X				
Peso seco de follaje y raíz	1 semana														X			
Evaluación estadística																		
Resultados	1 semana																	X
Procesamiento de datos	1 semana																	X

Figura 7. Diagrama de Gantt del experimento

3.6.VARIABLES EVALUADAS EN EL EXPERIMENTO

3 . 6 . 1 . Variables morfofisiológicas

3.6.1.1. Días a la floración

Esta característica se evaluó basándose en los días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas tuvieron su primera flor. La evaluación se realizó en forma visual en los dos surcos centrales.

3.6.1.2. Altura de planta

Se evaluó justo al momento de la madurez fisiológica. Se tomó la altura promedio de 8 plantas seleccionadas al azar de los dos surcos centrales. Se mide desde la superficie del suelo hasta el ápice del tallo principal.

3.6.1.3. Peso fresco de follaje y raíces

Se tomó el peso fresco total, peso fresco de follaje y peso fresco de raíces en 8 plantas por parcela.

3.6.1.4. Peso seco de follaje y raíces

Se tomó el peso seco total, de follaje y de raíces en ocho plantas seleccionadas, las muestras de la evaluación anterior se llevan a la estufa a un promedio de 60°C por 2 días.

3 . 6 . 2 . Variables de nodulación

Para la evaluación de la nodulación se tomaron cuatro plantas al azar de cada parcela, en plena floración para cada variedad, la evaluación es de acuerdo al manual del CIAT⁴⁵:

❖ Número total de nódulos

Se contabilizó el número total de nódulos en las raíces de cuatro plantas extraídas al azar de cada tratamiento y repetición entre los estadios fenológicos V5 y R1. Se registrará el promedio de las 3 repeticiones.

❖ Posición de los nódulos

Después de haber realizado el conteo de nódulos por planta a la vez se determinaba la posición de los nódulos ya sea en la raíz principal o lateral.

Se determinó el número de nódulos ubicados tanto en la raíz principal como en las raíces secundarias para la cual se tomaron cuatro plantas al azar de cada parcela de tratamiento y de cada repetición.

❖ Tamaño de los nódulos:

Según Matos¹⁵⁴ y las recomendaciones del Programa de Investigación y Proyección Social de Leguminosas de Grano y Oleaginosas de la UNALM, el tamaño de los nódulos está determinado por la siguiente escala:

Nódulos Pequeños	Menores de 2mm
Nódulos Medianos	2 a 4 mm
Nódulos Grandes	Mayores de 4 mm

❖ Forma de nódulos

Se utilizará dos categorías: redonda y alargada, los que correspondieron a nódulos determinados e indeterminados, respectivamente.

❖ Color interno del nódulo

Se tomó al azar dos nódulos con tamaño predominante y se cortó por la mitad, el color interno registrado fue según las cuatro categorías utilizadas (1: rosado-rojo; 2: verde; 3: verde-marrón, 4: marrón). Se utilizó las 4 plantas recolectadas.

❖ Peso fresco y seco del nódulo

De las 8 plantas extraídas para peso fresco de follaje y raíces, se obtiene también el peso seco de nódulos y el promedio se anota en cada bloque. Luego de llevada a la estufa, después de 2 días se toma el peso seco del nódulo.

3.6.3. Variables de rendimiento

- Número de vainas por planta

Se contó el número de vainas de 10 plantas de cada parcela tomadas al azar. Se registró el promedio de las 3 repeticiones.

- Número de granos por vaina

Se contó el número de granos por vaina, para lo cual se tomó una muestra representativa de 20 vainas para cada tratamiento y cada bloque.

- Peso de 100 semillas (g)

Se obtuvo el peso de las semillas en granos de un promedio de 100 semillas tomadas de vainas maduras escogidas al azar y se registró el promedio de las 3 repeticiones.

- Índice de cosecha (%)

Es un indicador de la eficiencia de una variedad desde el punto de vista de rendimiento, es decir, si el interés es la semilla, las plantas que acumulen mayor cantidad de materia seca en la semilla, en relación al total de las estructuras de la planta (biomasa), serán más eficientes. Se determinó con los datos del peso total de las plantas, y el peso seco de grano de 10 plantas competitivas.

$$\% \text{ IC} = \frac{\text{Peso seco del grano} \times 100}{\text{Peso seco total}}$$

- Rendimiento de grano seco (kg/ha)

Se obtuvo el peso de todas las semillas secas tomadas de las vainas maduras cosechadas de las plantas por tratamiento. Se registraron los promedios de las tres repeticiones y luego se expresó en kg/ha.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Variables morfofisiológicas

4.1.1. Días a la floración

La variedad Canario Centenario fue muy precoz y la variedad Blanco Molinero fue la de floración más tardía (Figura 8). El análisis de varianza (Cuadro 10) indica que hay diferencias muy significativas ($p < 0.01$) solo para el factor principal variedad, no se hallaron diferencias significativas para fuente de N (Cuadro 12), bloques ni la interacción ($p < 0.05$). La prueba de Duncan (Cuadro 11) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades Blanco Molinero (53 días) y Canario Centenario (47 días) y Rojo Molinero (49 días), ésta última presentaba poco crecimiento debido a las condiciones ambientales adversas en el invierno. Rosales et al.²¹¹ reporta que no existe una variación notable en el número de días cuando las condiciones de estrés no son tan severas en las etapa de prefloración y floración; sin embargo a medida que se incrementan las condiciones ambientales adversas existe un adelanto proporcional en la floración de las líneas sometidas a esta condición, lo que puede estar relacionado con la capacidad de algunos genotipos para modificar el inicio de la floración en respuesta a la disponibilidad de humedad y a la temperatura.

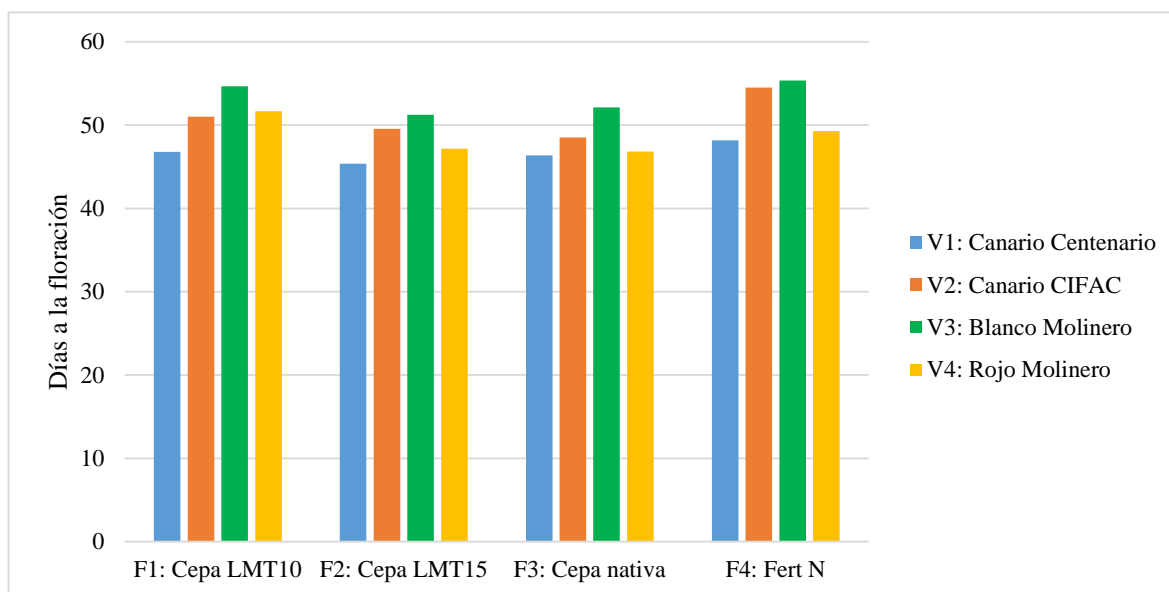


Figura 8. Valores medios de la variable días de floración (días) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

Cuadro 9. Resultados promedios de las variables morfofisiológicas evaluadas de los tratamientos

VARIEDAD	FUENTE DE N	TRAT	RENDIMIENTO (kg/ha)	INICIO DE FLORACIÓN (días)	ALTURA DE PLANTA (cm)	PESO FRESCO DE FOLLAJE (g)	PESO FRESCO DE RAÍCES (g)	PESO SECO DE FOLLAJE (g)	PESO SECO DE RAÍCES (g)
Canario Centenario	Fert. N	T4	3062	48.17	41.29	38.62	2.50	9.57	1.96
Blanco Molinero	Cepa nativa	T11	2836	52.12	37.68	27.23	1.64	6.09	0.37
Blanco Molinero	Cepa LMT10	T9	2815	54.67	34.61	50.95	1.57	9.83	0.45
Canario CIFAC	Fert. N	T8	2681	54.52	47.46	52.26	2.59	11.72	1.87
Canario Centenario	Cepa LMT15	T2	2593	45.35	35.21	34.39	2.94	9.24	2.41
Blanco Molinero	Cepa LMT15	T10	2573	51.26	28.75	41.07	1.43	8.88	0.38
Canario CIFAC	Cepa nativa	T7	2396	48.50	38.17	28.57	2.48	8.50	1.37
Canario Centenario	Cepa LMT10	T1	2353	46.80	41.79	46.22	2.69	10.82	2.13
Blanco Molinero	Fert. N	T12	2320	55.35	35.30	42.10	1.47	9.22	0.43
Canario CIFAC	Cepa LMT10	T5	2191	51.01	48.83	48.61	2.60	11.70	1.81
Canario CIFAC	Cepa LMT15	T6	2173	49.55	43.42	33.80	2.64	9.87	1.53
Canario Centenario	Cepa nativa	T3	2084	46.37	36.29	27.79	2.30	6.68	1.94
Rojo Molinero	Cepa LMT10	T13	649	52.00	24.86	13.25	1.14	2.58	0.43
Rojo Molinero	Cepa LMT15	T14	487	47.19	25.45	11.25	0.88	2.11	0.37
Rojo Molinero	Cepa nativa	T15	452	46.82	22.06	11.69	1.41	2.31	0.59
Rojo Molinero	Fert. N	T16	430	49.29	19.57	8.62	0.91	1.62	0.28
PROMEDIO			2006	49.94	35.05	32.28	1.95	7.55	1.15

TRAT= Tratamiento

Tratamientos testigos: todas las variedades con cepa nativa (T3, T7, T11, T15)

Cuadro 10. Análisis de Varianza de las variables morfofisiológicas evaluadas del experimento

FUENTE DE VARIABILIDAD	G.L.	DÍAS A LA FLORACIÓN	ALTURA DE PLANTA (cm)	PESO FRESCO DE FOLLAJE (g)	PESO FRESCO DE RAÍCES (g)	PESO SECO DE FOLLAJE (g)	PESO SECO DE RAÍCES (g)
Bloque	2	3*	79.28	241.93	0.48	24.44	0.91
Variedad (V)	3	46.34***	992.5***	2407.71***	3**	163.02***	17.47***
Fuente de nitrógeno (N)	3	2.91	49.98	567.49	0.03	17.45	0.03
VxN	9	33.58	39.44	100.54	0.21	2.54	0.04
Error	30	0.87	59.44	253.5	0.48	10.43	0.41
Total	47						
C.V. (%) ^t		1.84	10.92 ^t	23.82 ^t	21.12 ^t	21.85 ^t	22.77 ^t
PROMEDIO		50	35.05	32.28	1.95	7.55	1.15

Significación estadística: * (0.01<p<0.05), ** (p<0.01)

^t Variables con coeficiente de variación con la transformación raíz cuadrada

Cuadro 11. Resumen de la prueba de comparación de medias ($p=0.05$) según Duncan en las variables morfofisiológicas para el factor variedad en promedio del factor fuente de nitrógeno.

VARIEDAD	Floración (días)	Altura de planta (cm)	Peso fresco de follaje (g)	Peso fresco de raíces (g)	Peso seco de follaje (g)	Peso seco de raíces (g)
Canario Centenario	47 b	38.65 ab	36.75 a	2.61 a	9.08 a	2.43 a
Canario CIFAC	51 a	44.47 ab	40.81 a	2.58 a	10.45 a	2.11 a
Blanco Molinero	53 a	34.08 b	40.34 a	1.53 b	8.51 a	0.41 b
Rojo Molinero	49 b	22.99 c	11.20 b	1.08 b	2.15 b	0.42 b

Cuadro 12. Resumen de la prueba de comparación de medias ($p=0.05$) en las variables morfofisiológicas para el factor fuente de nitrógeno en promedio de variedades.

FUENTE DE N	Floración (días)	Altura de planta (cm)	Peso fresco de follaje (g)	Peso fresco de raíces (g)	Peso seco de follaje (g)	Peso seco de raíces (g)
Cepa LMT10	51 a	37.52 a	39.76 a	1.71 a	8.73 a	1.49 a
Cepa LMT15	48 a	33.21 a	30.13 ab	1.64 a	7.52 a	1.50 a
Cepa nativa	48 a	33.55 a	23.82 b	1.60 a	5.90 a	1.43 a
Fert. N	52 a	35.91 a	35.40 ab	1.60 a	8.03 a	1.40 a

4.1.2. Altura de planta (cm)

En el cuadro 9, se aprecia que la altura de planta fluctúa entre 19.57 cm y 48.83 cm correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T5 (Canario CIFAC con la cepa LMT10) respectivamente. Se observa que los tratamientos superan al testigo (cepa nativa) solo en la variedad CIFAC (Figura 9), siendo la altura de planta promedio para el experimento en general de 35.04 cm y con un coeficiente de variabilidad de 10.92%, lo cual da una confiabilidad en los resultados obtenidos en experimentos agrícolas según Calzada²⁸.

El análisis de varianza (Cuadro 10) indica que hay diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) solo para el factor principal variedad, no se hallaron diferencias significativas para fuente de N (Cuadro 12), bloques ni la interacción ($p < 0.05$). La prueba de Duncan (Cuadro 11) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades Canario CIFAC (44.46 cm), Blanco Molinero (34.08 cm) y Rojo Molinero (22.98 cm), esta última de menor altura de planta con una disminución del 48.31% con respecto a la variedad CIFAC, debido probablemente a su cultivo en condiciones ambientales no favorables a la variedad.

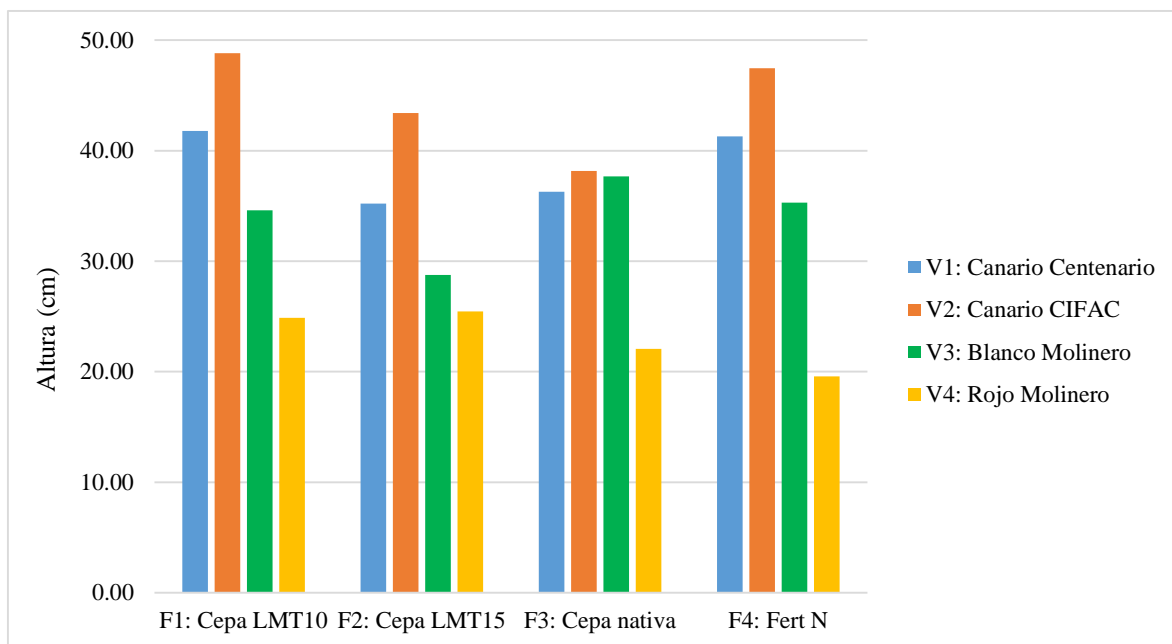
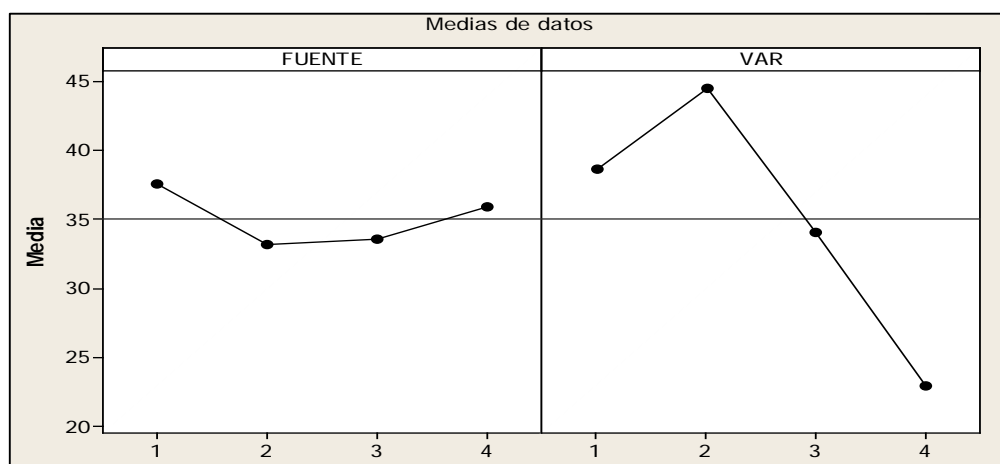


Figura 9. Valores medios de la variable altura de planta (cm) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

La altura de planta de la variedad Canario Centenario (38.64 cm) es menor a lo reportado por Núñez¹⁷³, que alcanzo el valor máximo de 44.48 cm. Este alto valor puede deberse a

una alta densidad de plantas por hectárea según Crepy y Casal⁵⁰, quien afirma que aumentar las plantas por unidad de superficie incrementa la altura de planta.

Dentro de las fuentes de N, la cepa LMT 10 (37.52 cm) tuvo el más alto promedio, seguido de la fertilización mineral de nitrógeno (35.90 cm), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 10). La cepa nativa (33.54 cm) obtuvo un promedio ligeramente mayor a la cepa LMT 15, que obtuvo el más bajo promedio (33.21 cm), aunque no diferentes estadísticamente. Esto se puede deber básicamente a que la fertilización nitrogenada mineral estimula el crecimiento de la longitud del tallo y de toda la planta.



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 10. Efectos principales para la variable altura

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que la altura tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables peso fresco de follaje, peso seco de follaje, peso seco de raíces, número de vainas por planta, número de granos por vaina y rendimiento grano seco, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa.

Por los resultados obtenidos, se puede comprobar que solo las variedades influyeron en la altura de planta, más no las fuentes de N probadas (cepas de *Rhizobium* más fertilización mineral), lo que concuerda con Ruíz²¹⁵ quien señala que la altura de planta es un carácter influenciado por el medio ambiente, y para expresarse en este caso, variaron los genotipos dentro de cada variedad de frijol.

4.1.3. Peso fresco de follaje (g)

En el Cuadro 9, se aprecia que el peso fresco de follaje fluctúa entre 8.62 g y 52.26 g correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T8 (Canario CIFAC con Fert. N), con un incremento del 506.22% sobre el de menor valor. Se observa que los tratamientos superan al testigo (cepas nativas) en todas las variedades excepto en la variedad Rojo Molinero (Figura 11), siendo el peso fresco de follaje promedio para el experimento en general de 32.27 g, y con un coeficiente de variabilidad de 23.81%, lo cual da una confiabilidad en los resultados obtenidos en experimentos agrícolas según Calzada²⁸.

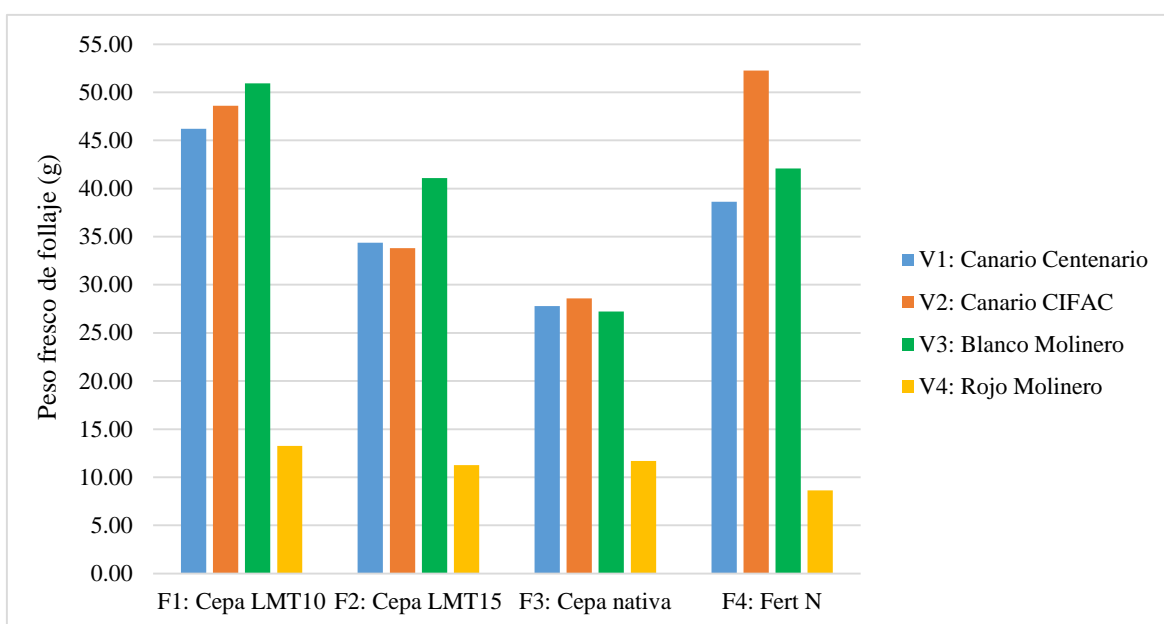


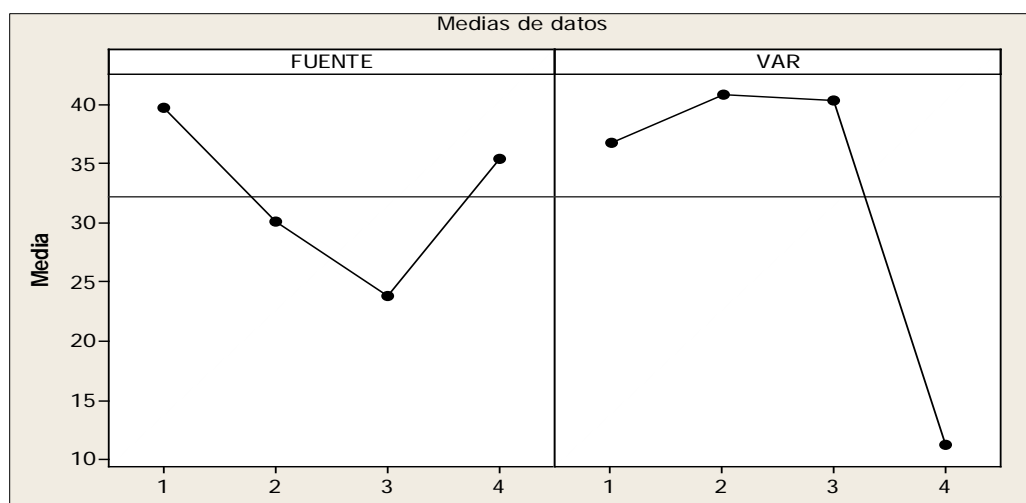
Figura 11. Valores medios de la variable peso fresco de follaje (g) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

El análisis de varianza (Cuadro 10) indica que hay diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) solo para el factor principal variedad, no se hallaron diferencias significativas para fuente de N, bloques ni la interacción ($p < 0.05$).

La prueba de Duncan (Cuadro 11) encuentra diferencias significativas entre las variedades Canario CIFAC (40.81 g) y Rojo Molinero (11.204 g), cuyo promedio presenta una disminución del 48.31% con respecto a la variedad CIFAC, debido probablemente a su cultivo en condiciones ambientales no favorables a la variedad, ya que se siembra en

verano. El valor obtenido en la variedad Canario Centenario (40.33 g) con promedios similares a la variedad Blanco Molinero (36.75 g) es menor a lo obtenido por Flores⁸⁴.

Dentro de las fuentes de N, la cepa LMT 10 (39.76 g) tuvo el más alto promedio, seguido de la fertilización mineral de nitrógeno (35.40 g), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 12). La cepa LMT15 (30.12 g) obtuvo un promedio ligeramente mayor a la cepa nativa, que obtuvo el más bajo promedio (23.82 g), aunque no diferentes estadísticamente. Esto se puede deber básicamente a que la fertilización nitrogenada mineral estimula el crecimiento vegetativo de la planta, con un exuberante follaje y altura a medida que se incrementan las tasas de fertilización nitrogenada, al igual que la cepa LMT 10).



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 12. Efectos principales para la variable peso fresco de follaje (g)

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el peso fresco de follaje tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables altura, peso fresco de raíces, peso seco de follaje, peso seco de raíces, número de vainas por planta, número de granos por vaina y rendimiento grano seco, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa.

4.1.4. Peso seco de follaje (g)

En el Cuadro 9, se aprecia que el peso seco de follaje fluctúa entre 1.621 g y 11.177 g, correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T8 (Canario CIFAC con Fert. N), respectivamente. Se observa que los tratamientos superan al testigo en todas las variedades excepto en la variedad Rojo Molinero (Figura 13), siendo el peso seco de follaje promedio para el experimento en general de 7.546 g y con un coeficiente de

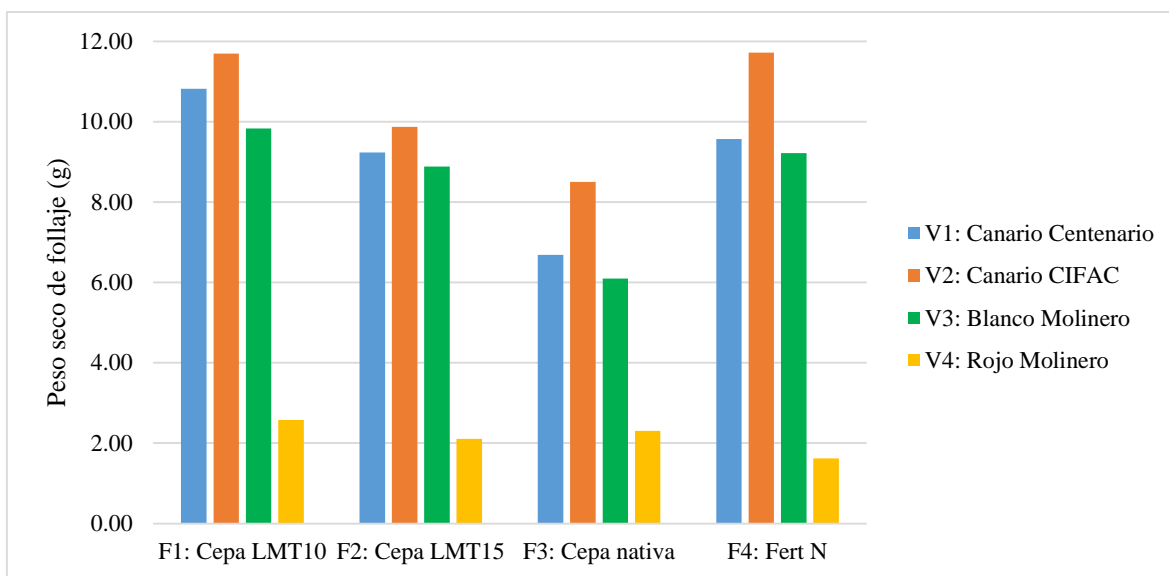


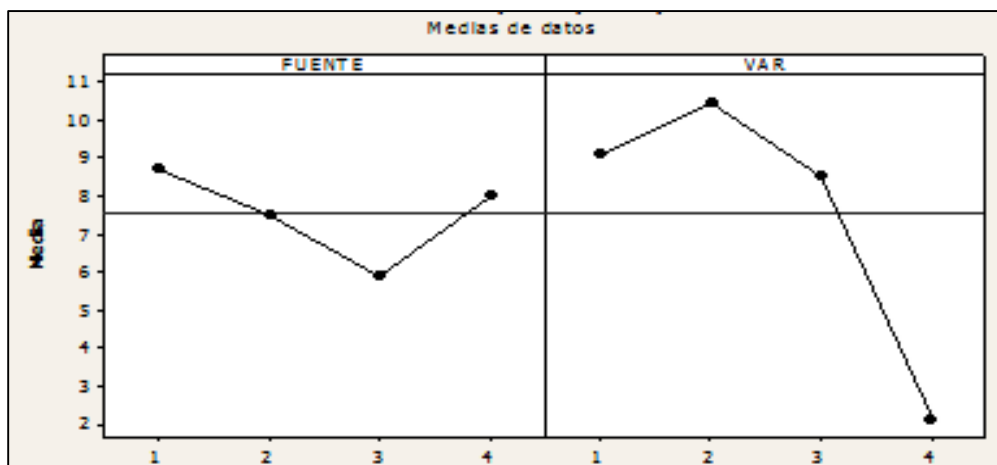
Figura 13. Valores medios de la variable peso seco de follaje (g) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

El análisis de varianza (Cuadro 10) indica que hay diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) solo para el factor principal variedad, no se hallaron diferencias significativas para fuente de N, bloques ni la interacción ($p < 0.05$).

La prueba de Duncan (Cuadro 11) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades Canario CIFAC (10.44 g) de mejor promedio y Rojo Molinero (2.15 g) de menor peso seco de follaje con 2.15 g, debido probablemente a su cultivo en condiciones ambientales no favorables a la variedad, debido a que es una variedad de climas cálidos. El valor obtenido en la variedad Canario Centenario (9.07 g) que tiene promedio similar a Blanco Molinero (8.51 g) es menor a lo obtenido por Flores⁸⁴.

Dentro de las fuentes de N, la cepa LMT 10 (8.73 g) tuvo el más alto promedio, seguido de la fertilización mineral de nitrógeno (8.03 g), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 14). La cepa LMT 15 (7.52 g) obtuvo un promedio ligeramente mayor a la

cepa nativa (5.89 g), que obtuvo el más bajo promedio, además son estadísticamente diferentes (Cuadro 12). Esto se puede deber básicamente a que la fertilización nitrogenada mineral estimula el crecimiento vegetativo de la planta, con un exuberante follaje y altura a medida que se incrementan las tasas de fertilización nitrogenada.



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 14. Efectos principales para la variable peso seco de follaje (g)

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el peso seco de follaje tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables altura, peso fresco de follaje, peso fresco de raíces, peso seco de raíces, número de vainas por planta, número de granos por vaina y rendimiento grano seco, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa.

4.1.5. Peso fresco de raíces

En el Cuadro 9, se aprecia que el peso fresco de raíces fluctúa entre 0.880 g y 2.721 g correspondiendo a los tratamientos T14 (Rojo Molinero con cepa LMT15) y T2 (Canario Centenario con cepa LMT15), con un incremento del 209.2% respecto a T14. Se observa que sólo Canario Centenario y Canario CIFAC superan a su testigo, más no las variedades Blanco Molinero y Rojo Molinero (Figura 15), siendo el peso fresco de raíces promedio para el experimento en general de 1.638 g. y con un coeficiente de variabilidad de 21.11%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas según Calzada²⁸.

El análisis de varianza indica que hay diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) solo para el factor principal variedad, no se hallaron diferencias significativas para fuente de N, bloques ni la interacción ($p < 0.05$).

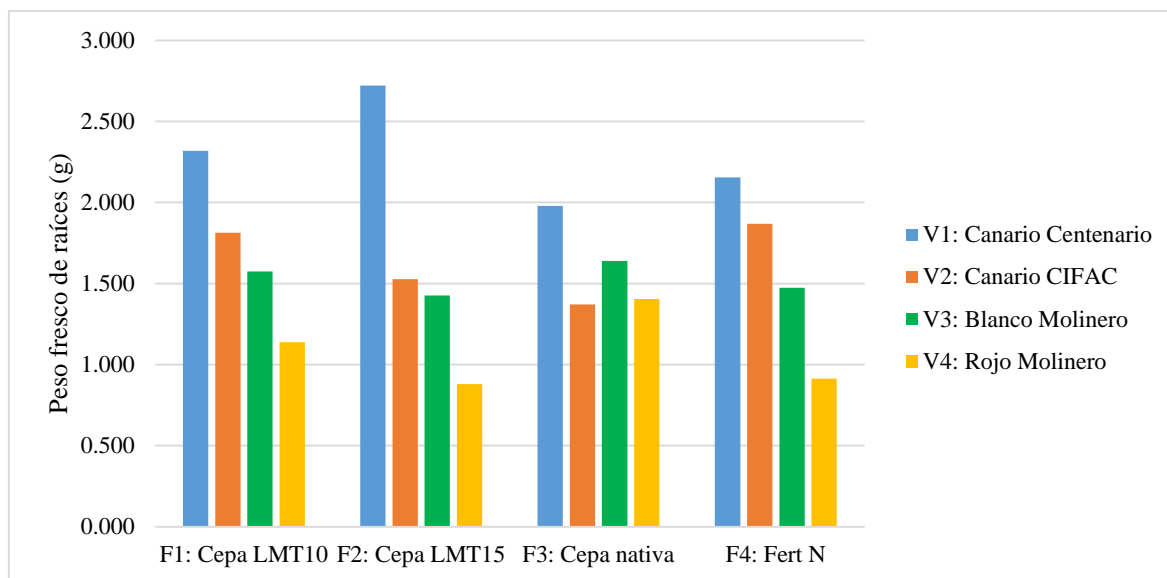
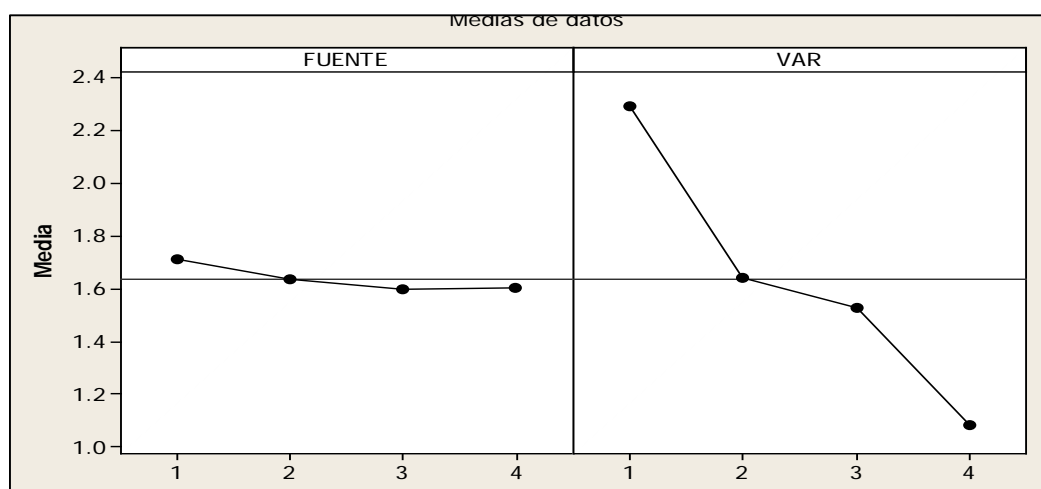


Figura 15. Valores medios de la variable peso fresco de raíces (g) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

La prueba de Duncan (Cuadro 11) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades Canario Centenario (2.29 g) con respecto a Canario CIFAC (1.64 g), Blanco Molinero (1.52 g) y Rojo Molinero (1.08 g) y que estos últimos no presentan diferencias entre ellos.



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 16. Efectos principales para la variable peso fresco de raíces (g)

El valor obtenido en la variedad Canario Centenario es menor a lo obtenido por Flores⁸⁴. La variedad Rojo Molinero de menor peso fresco de raíces presenta una disminución del 111.6% con respecto a la variedad CIFAC, debido probablemente a su cultivo en condiciones ambientales no favorables a la variedad (bajas temperaturas y estrés hídrico que limitó el crecimiento de raíces).

Dentro de las fuentes de N, la cepa LMT 10 (1.71 g) tuvo el más alto promedio, seguido de la cepa LMT15 (1.64 g), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 16). La fertilización mineral de N (1.60 g) obtuvo un promedio ligeramente mayor a la cepa nativa (1.59 g) que obtuvo el más bajo promedio, aunque no diferentes estadísticamente.

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el peso fresco de raíces tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables peso fresco de follaje, peso seco de follaje, peso seco de raíces, peso fresco de nódulos ($p < 0.05$), número de vainas por planta, número de granos por vaina ($p < 0.05$) y rendimiento grano seco, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa. Se puede concluir que el peso fresco de las raíces tiene relación con el peso fresco de nódulos, esto se debe a que a mayor masa radicular, mayor probabilidad de tener más nódulos en distintas zonas de crecimiento activo al momento de la infección.

4.1.6. Peso seco de raíces

En el Cuadro 9, se aprecia que el peso seco de raíces fluctúa entre 0.283 g y 2.638 g correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T6 (Canario CIFAC con cepa LMT15), con un incremento del 802.35% respecto a T16. Se observa que los tratamientos superan al testigo en todas las variedades excepto en la variedad Rojo Molinero, siendo el peso seco de raíces promedio para el experimento en general de 1.457 g. y con un coeficiente de variabilidad de 22.76%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas según Calzada²⁸.

El análisis de varianza (Cuadro 10) indica que hay diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) solo para el factor principal variedad, no se hallaron diferencias significativas para fuente de N, bloques ni la interacción ($p < 0.05$).

La prueba de Duncan (Cuadro 11) indica que entre las variedades Canario Centenario (2.42 g) y Canario CIFAC (2.57 g) no hay diferencias significativas ($p < 0.05$), pero estos dos si presentan diferencias con respecto a las variedades Rojo Molinero (0.42 g) y Blanco

Molinero (0.41 g). El valor obtenido en la variedad Canarias Centenario es menor a lo obtenido por Flores⁸⁴ quien obtuvo 4.46 g; debido a periodos pequeños de estrés hídrico durante el cultivo.

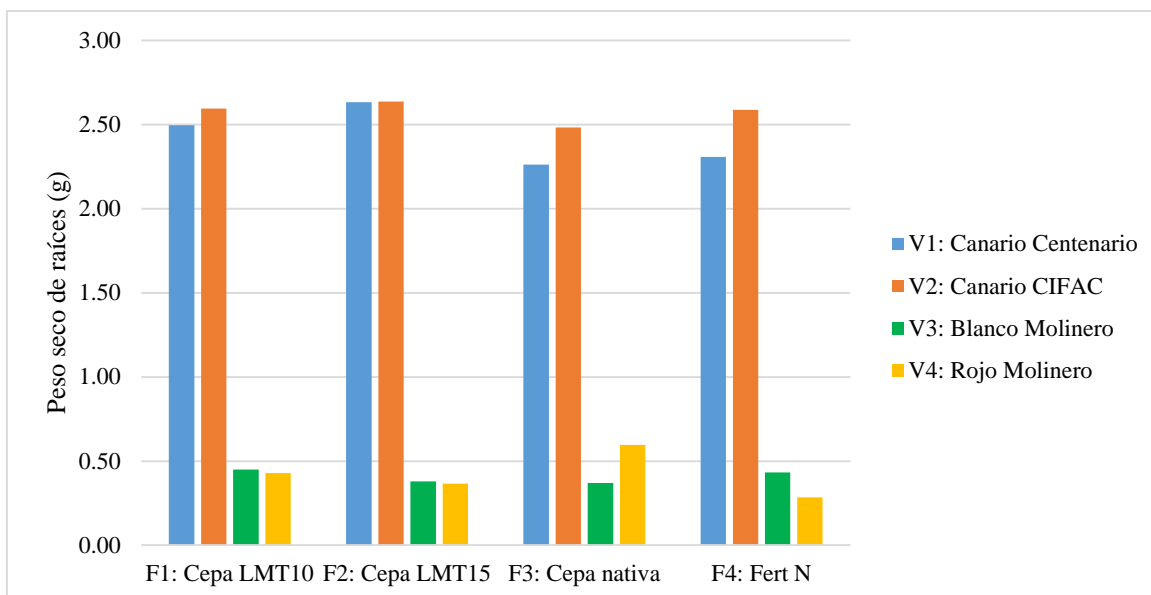
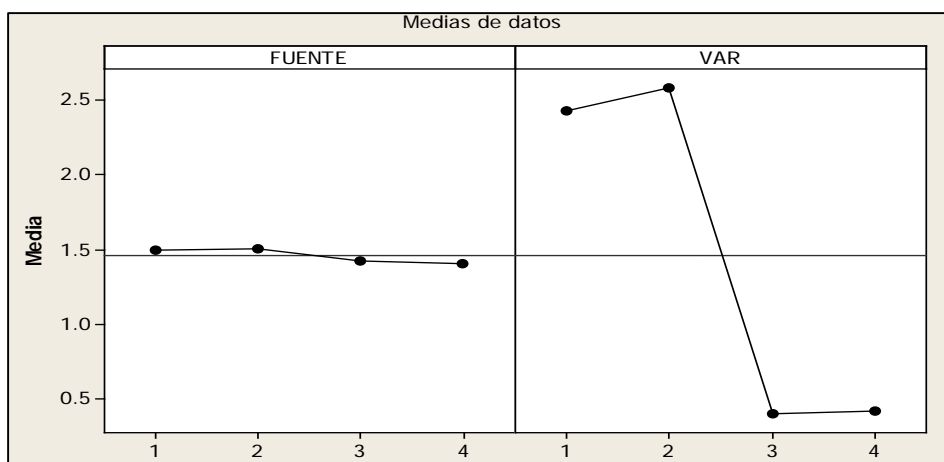


Figura 17. Valores medios de la variable peso seco de raíces (g) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

Dentro de las fuentes de N, la cepa LMT 15 (1.50 g) tuvo el más alto promedio, seguido de la cepa LMT10 (1.49 g), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 18). La cepa nativa (1.43 g) obtuvo un promedio ligeramente mayor a la fertilización mineral de N (1.40 g) que obtuvo el más bajo promedio, aunque no diferentes estadísticamente..



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 18. Efectos principales para la variable peso seco de raíces (g)

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el peso seco de raíces tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables altura, peso fresco de follaje, peso seco de follaje, peso fresco de raíces, tamaño de nódulos, número de vainas por planta y rendimiento grano seco, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa.

4.2. Variables de nodulación

4.2.1. Número de nódulos

En el Cuadro 13, se aprecia que el número de nódulos fluctúa entre 1.833 y 17.033 correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T10 (Blanco Molinero con cepa LMT15) respectivamente. Se observa que todos los tratamientos con cepas de *Rhizobium* (inoculada o nativa) superan a la fertilización mineral (Figura 19), debido a que este inhibe el proceso de nodulación, siendo el número de nódulos promedio para el experimento en general de 10.61 nódulos y con un coeficiente de variabilidad de 51.01%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas en hortalizas, árboles frutales y maderables según Ruíz-Ramírez²¹⁶. Esta media general es superior a lo encontrado por Canchari³¹ quien obtuvo 7.6 nódulos por planta, pero este resultado es menor a lo reportado por Núñez¹⁷³ en frijol que presenta una mediana nodulación y Castro³⁴ que registro 30.71 nódulos por planta.

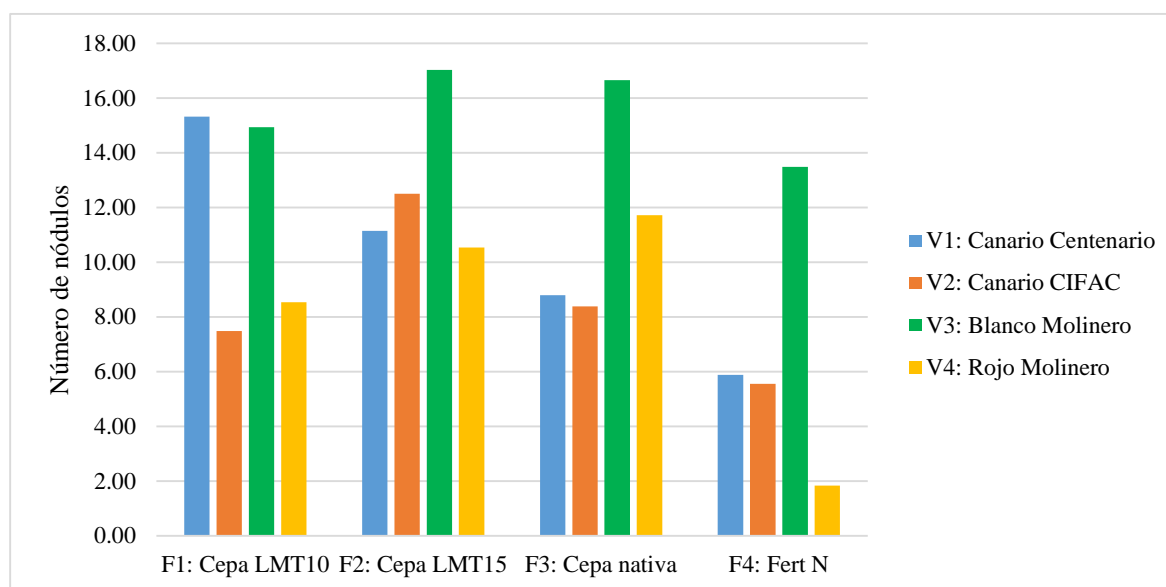


Figura 19. Valores medios de la variable número de nódulos en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

Cuadro 13. Resultados promedios de las variables de nodulación evaluadas de los tratamientos

VARIEDAD	FUENTE DE N	TRAT	RENDIMIENTO (kg/ha)	NÚMERO DE NÓDULOS	TAMAÑO DE NÓDULOS (mm)	PESO FRESCO DE NÓDULOS (g)	PESO SECO DE NÓDULOS (g)	POSICIÓN DE LOS NÓDULOS	FORMA DE LOS NÓDULOS	COLOR INTERNO DEL NÓDULO	% DE NÓDULOS EFECTIVOS
Canario Centenario	Fert. N	T4	3062.20	5.89	2.25	0.13	0.02	Medio	Redondo	Rojo	20
Blanco Molinero	Cepa nativa	T11	2835.57	16.65	2.11	0.44	0.07	Medio-Inferior	Redondo-Elíptico	Rojizo/Marrón	50
Blanco Molinero	Cepa LMT10	T9	2815.12	14.93	1.83	0.49	0.11	Medio-Inferior	Redondo	Rojo	80
Canario CIFAC	Fert. N	T8	2680.54	5.56	6.14	0.10	0.02	Todas	Redondo	Rojo/Incoloro	30
Canario Centenario	Cepa LMT15	T2	2592.80	11.14	4.06	0.45	0.06	Medio-Inferior	Redondo	Rojo	80
Blanco Molinero	Cepa LMT15	T10	2572.73	17.03	2.23	0.47	0.10	Medio	Redondo	Rojizo/Marrón	70
Canario CIFAC	Cepa nativa	T7	2396.26	8.39	6.37	0.11	0.02	Medio-Inferior	Redondo	Rojo/Incoloro	70
Canario Centenario	Cepa LMT10	T1	2353.00	15.33	3.56	0.43	0.06	Medio	Redondo	Rojizo/Marrón	70
Blanco Molinero	Fert. N	T12	2320.05	13.48	2.13	0.43	0.06	Medio-Inferior	Redondo	Rojo/Incoloro	30
Canario CIFAC	Cepa LMT10	T5	2191.42	7.49	6.88	0.12	0.02	Medio	Redondo-Elíptico	Rojo/Incoloro	80
Canario CIFAC	Cepa LMT15	T6	2173.05	12.50	8.75	0.20	0.03	Medio	Redondo	Rojo	60
Canario Centenario	Cepa nativa	T3	2084.40	8.79	5.59	0.24	0.03	Superior-Medio	Redondo-Elíptico	Rojo/Incoloro	60
Rojo Molinero	Cepa LMT10	T13	649.43	8.54	4.13	0.36	0.06	Todas	Redondo-Elíptico	Rojizo/Marrón	90
Rojo Molinero	Cepa LMT15	T14	486.99	10.54	3.92	0.20	0.03	Superior-Medio	Redondo-Elíptico	Rojizo/Marrón	85
Rojo Molinero	Cepa nativa	T15	451.88	11.72	6.12	0.41	0.07	Superior-Medio	Redondo	Rojo	60
Rojo Molinero	Fert. N	T16	430.37	1.83	1.58	0.05	0.01	Todas	Redondo	Rojo/Incoloro	30
PROMEDIO			2006.0	10.61	4.23	0.29	0.05				60

TRAT= Tratamiento

Tratamientos testigos: todas las variedades con cepa nativa (T3, T7, T11, T15)

Cuadro 14. Análisis de Varianza de las variables de nodulación evaluadas del experimento

FUENTE DE VARIABILIDAD	G.L.	NÚMERO DE NÓDULOS	TAMAÑO DE NÓDULOS (mm)	PESO FRESCO DE NÓDULOS (g)	PESO SECO DE NÓDULOS (g)
Bloque	2	118.65	47.07	0.05	0.0003
Variedad (V)	3	139.19 N.S.	50.87*	0.22*	0.0088**
Fuente de nitrógeno (N)	3	86.85	9.55	0.07	0.0032
VxN	9	17.72	3.6	0.03	0.0008
Error	30	60.60	15.31	0.05	0.0013
Total	47				
C.V. (%) ^t		51.02 ^t	60.48 ^t	51.48 ^t	47.75 ^t
PROMEDIO		10.61	4.23	0.29	0.05

Significación estadística: * (0.01<p<0.05), ** (p<0.01)

^t Variables con coeficiente de variación con la transformación raíz cuadrada

Cuadro 15. Resumen de la prueba de comparación de medias ($p=0.05$) en las variables de nodulación para el factor variedad.

VARIEDAD	Número de nódulos	Tamaño de nódulos (mm)	Peso fresco de nódulos (g)	Peso seco de nódulos (g)
Canario Centenario	10.29 ab	3.86 ab	0.31 ab	0.04 b
Canario CIFAC	8.48 b	7.03 a	0.13 b	0.02 b
Blanco Molinero	15.53 a	2.08 c	0.46 a	0.09 a
Rojo Molinero	8.16 b	3.94 ab	0.25 b	0.04 b

Cuadro 16. Resumen de la prueba de comparación de medias ($p=0.05$) en las variables de nodulación para el factor fuente de nitrógeno.

FUENTE DE N	Número de nódulos	Tamaño de nódulos (mm)	Peso fresco de nódulos (g)	Peso seco de nódulos (g)
Cepa LMT10	11.57 a	4.10 a	0.35 a	0.06 a
Cepa LMT15	12.80 a	4.74 a	0.33 a	0.06 a
Cepa nativa	11.39 a	5.05 a	0.30 a	0.05 ab
Fert. N	6.69 a	3.03 a	0.18 a	0.03 b

El análisis de varianza (Cuadro 14) no encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) para el factor principal variedad, fuente de N (Cuadro 16), bloques ni la interacción ($p < 0.05$). La prueba de Duncan (Cuadro 15) encuentra diferencias significativas entre las variedades Blanco Molinero con 15.52 nódulos (valor superior a lo obtenido por Meneses¹⁵⁸ y Núñez¹⁷³), y la variedad Rojo Molinero de menor cantidad con 8.16 nódulos. La variedad Canario Centenario tuvo un promedio de 10.28 nódulos y la variedad Canario CIFAC con 8.48 nódulos tiene un promedio ligeramente mayor a la variedad Rojo Molinero.

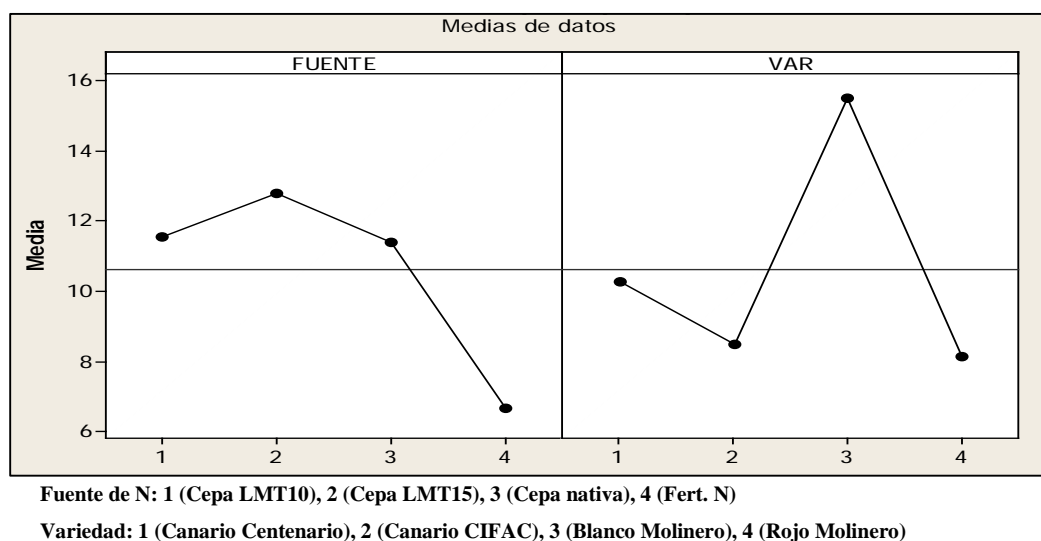


Figura 20. Efectos principales para la variable número de nódulos

Dentro de las fuentes de N, la cepa LMT 15 (12.80 nódulos) tuvo el más alto promedio, seguido de la cepa LMT10 (11.57 nódulos), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 20). La cepa nativa (11.38 nódulos) obtuvo un promedio contrastante con la fertilización mineral de N (6.69 nódulos) que obtuvo el más bajo promedio, aunque no diferentes estadísticamente. Estos resultados obtenidos con la cepa LMT 15 concuerdan con lo obtenido por Núñez¹⁷³, quien reporta que esta cepa favorece una mejor simbiosis en el frijol Canario Centenario. Cubero y Moreno⁵² afirman que los nódulos nativos son competitivos y muchas veces superior a cualquier cepa inoculada aunque en este experimento no resultaron tan significativos como los inoculados, sin embargo Zavaleta²⁹⁰, expresa que la presencia de nematodos puede afectar negativamente a la bacteria *Rhizobium*, principalmente por la reducción de los sitios de infección y exudados radiculares como lo señala Echegoyen⁷². La fertilización con nitrógeno a la siembra produjo los menores valores debido a que causó la inhibición de la actividad fijadora de

nitrógeno y provoca una senescencia prematura del nódulo¹⁵². Sin embargo, estos resultados no tuvieron efecto sobre el rendimiento final del cultivo²⁴⁹.

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el número de nódulos tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables peso fresco de nódulos, peso seco de nódulos, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa. Por lo cual se concluye que el número de nódulos no está relacionado con la masa radicular en este experimento.

4.2.2. Posición de los nódulos

En Cuadro 13 y las fotos 1, 4, 5 y 7 se puede observar que la mayoría de los tratamientos presentaron nódulos en las raíces laterales, solo algunas en las raíces principales, esto concuerda con Tapia y Camacho²⁴⁵, quienes refieren que los nódulos están distribuidos en las raíces laterales, en la parte superior media del sistema radical, debido a que son estas raíces las que se encuentran en constante crecimiento activo y los nódulos se forman en ellas^{16, 165}. En el Cuadro 13 se observa que las raíces se presentan mayormente en la parte media de las raíces laterales, algunas en la parte inferior y otras en la superior.

4.2.3. Tamaño de nódulos (mm)

En el Cuadro 13, se aprecia que el tamaño de nódulos fluctúa entre 1.583 y 8.750 mm correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T6 (Canario CIFAC con cepa LMT15), respectivamente. Se observa que todos los tratamientos con cepas de *Rhizobium* (inoculada o nativa) superan a la fertilización mineral, excepto Blanco Molinero (Figura 21), debido a que este inhibe el proceso de nodulación, siendo el tamaño de nódulos promedio para el experimento en general de 4.226 mm. y con un coeficiente de variabilidad de 60.48%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas en hortalizas, árboles frutales y maderables según Martínez¹⁵³ y Ruiz-Ramírez²¹⁶.

El análisis de varianza (Cuadro 14) indica que existe alta significación estadística a un nivel de significación 0.05 para el factor principal variedad, no se halló diferencias significativas para fuente de N (Cuadro 16), bloques ni la interacción. La prueba de Duncan (Cuadro 15) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades CIFAC (7.033 mm) y Blanco Molinero (2.076 mm), e indica que no existen diferencias entre las variedades Rojo Molinero (3.936 mm) y Canario Centenario (3.862 mm) cuyos promedios son casi similares.

Dentro de las fuentes de N, la cepa nativa (5.046 mm) tuvo el más alto promedio, seguido de la cepa LMT 15 (4.737 mm), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 22). La cepa LMT10 (4.097 mm) obtuvo un promedio contrastante con la fertilización mineral de N (3.029 mm) que obtuvo el más bajo promedio, aunque no diferentes estadísticamente. Esto se puede deber a que la cepa nativa permite obtener mejores simbiosis con la raíz y el nódulo puede desarrollarse muy bien debido a la alta especificidad y reconocimiento molecular entre ambos socios simbióticos.

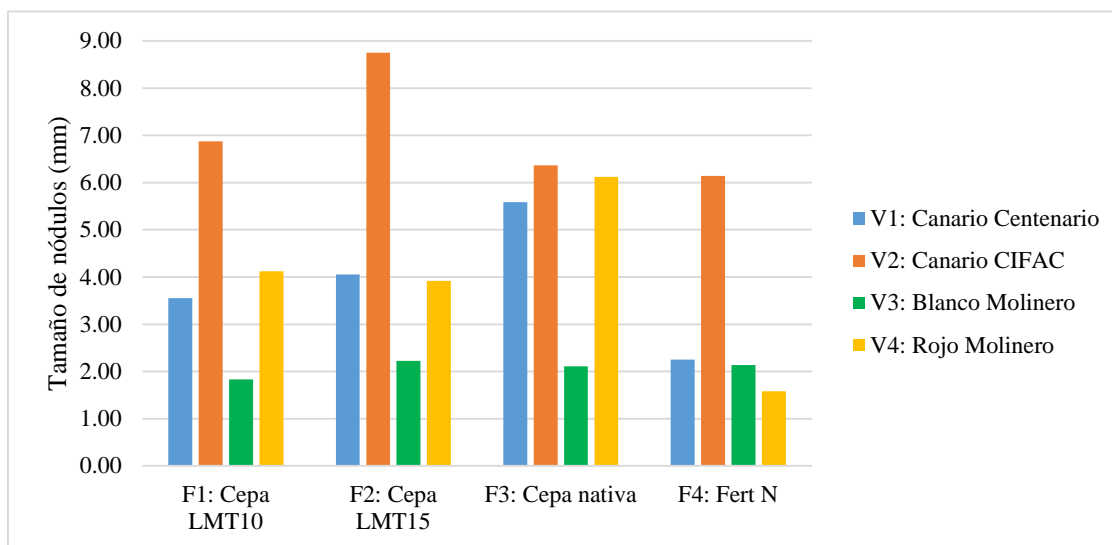
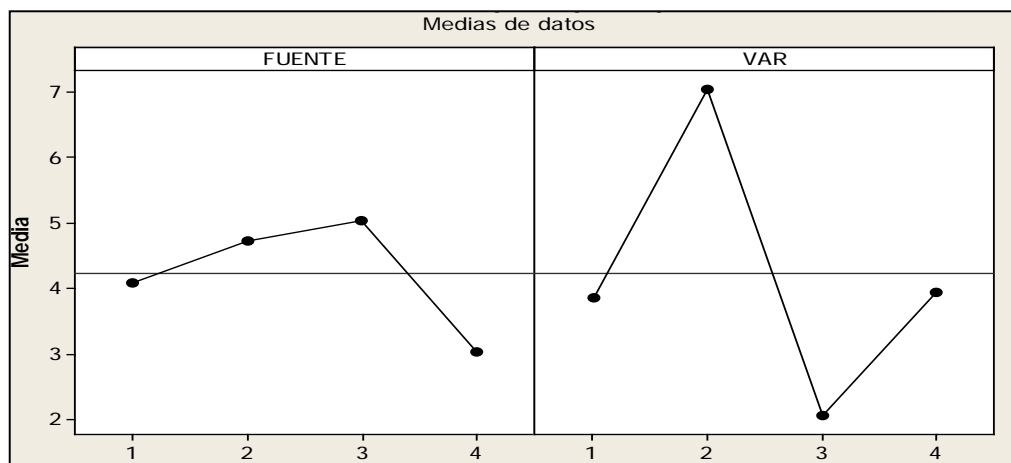


Figura 21. Valores medios de la variable tamaño de nódulos (mm) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 22. Efectos principales para la variable tamaño de nódulos

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el tamaño de nódulos tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables peso seco de raíces y peso de cien semillas, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa. Por lo cual se concluye que el tamaño de nódulos está relacionado con el peso seco de raíces, debido a que a mayor volumen de raíces, mayor probabilidad de infección de *Rhizobium* y el aporte de N orgánico puede contribuir a un mayor peso de las semillas.

4.2.4. Forma de nódulos

Los nódulos observados en el sistema radicular de las diversas variedades fueron redondos (Cuadro 13) con algunas variaciones a redondos-elípticos; correspondieron al tipo determinado. Según Newcomb, citado por Nap y Bisseling¹⁶⁷, este tipo de nódulos es inducido en las plantas como las del género *Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna* y *Lotus*, entre otras. A diferencia que en los indeterminados, en esta clase de nódulos no hay meristemo permanente. Así, su crecimiento se basa en la expansión en vez de la división celular, razón por la que presentan una morfología esférica y no cilíndrica.

4.2.5. Color interno del nódulo

El color interno de los nódulos vivos puede ser rojo, rosado, verde, blanco, negro o marrón, aunque un solo nódulo puede presentar dos colores. El color interno de un nódulo efectivo generalmente es rojo o rosado, por la presencia de leghemoglobina. Sin embargo, algunas cepas inefectivas también pueden formar nódulos rojos. Los nódulos verdes y blancos generalmente son inefectivos. También existen algunas cepas que forman nódulos negros⁴⁵. En el Cuadro 13 se observa en todos los tratamientos, la coloración interna del nódulo corresponde al rosado-rojo, rojizo-marrón, rojo-incoloro⁴⁵. Según coincide con la coloración interna de los nódulos rosada o rojo, según Matos y Zúñiga¹⁵⁴ quienes lo relacionaron con la presencia de leghemoglobina y una activa fijación de nitrógeno y la presencia de nódulos blancos, verdosos u oscuros son indicativos de nódulos ineficaces y pueden correlacionarse con bajas tasas de fijación de N²⁵⁴.

Estos resultados señalaron que los nódulos muestreados estaban activos y fijando nitrógeno, con distintas variaciones según los tratamientos en el Cuadro 13.

4.2.6. Peso fresco de nódulos (g)

En el Cuadro 13, se aprecia que el peso fresco de nódulos fluctúa entre 0.050 g y 0.490 g correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T9 (Canario CIFAC

con cepa LMT10), respectivamente. Se observa que los tratamientos superan al testigo en todas las variedades (Figura 23), siendo el peso fresco de nódulos promedio para el experimento en general de 0.290 g. y con un coeficiente de variabilidad de 51.48%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas en hortalizas, árboles frutales y maderables según Martínez¹⁵³ y Ruiz-Ramírez²¹⁶.

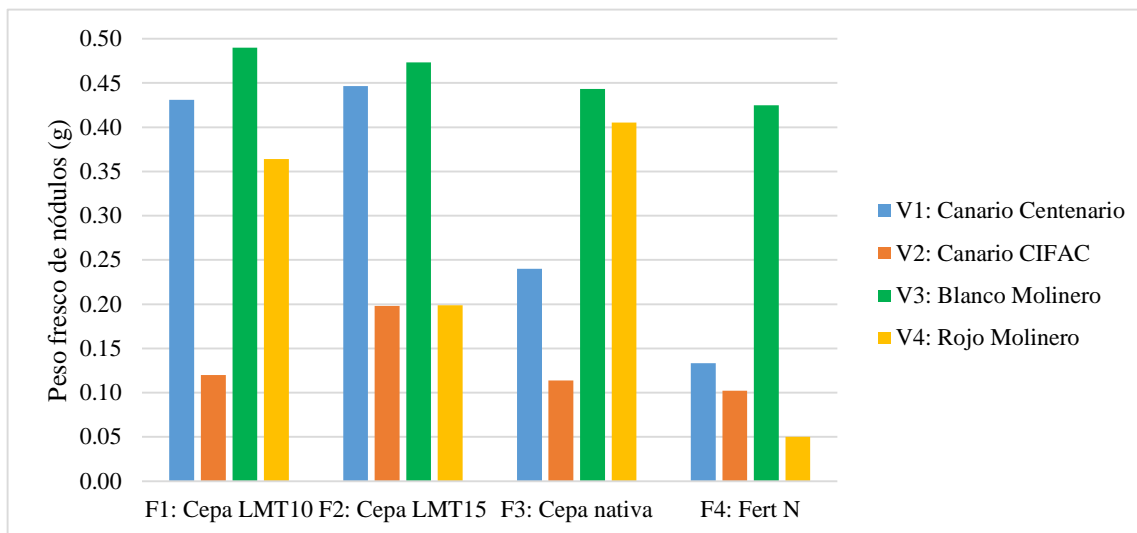
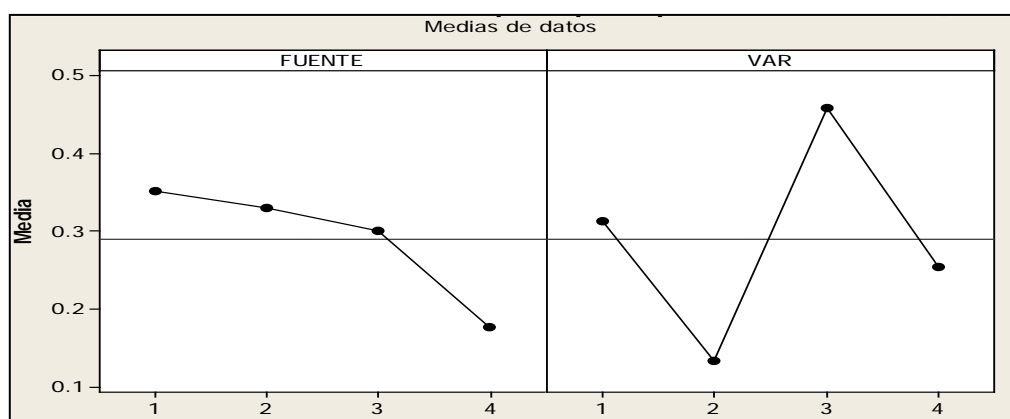


Figura 23. Valores medios de la variable peso fresco de nódulos (g) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

El análisis de varianza indica que existe alta significación estadística a un nivel de significación 0.05 para el factor principal variedad, no se halló diferencias significativas para fuente de N (Cuadro 16), bloques ni la interacción ($p < 0.05$).



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 24. Efectos principales para la variable peso fresco de nódulos (g)

La prueba de Duncan (Cuadro 15) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades Blanco Molinero (0.46 g) de mayor peso fresco de nódulos con promedios similares a las variedades Canario Centenario (0.31 g) y Rojo Molinero (0.25 g); y CIFAC, la de menor peso fresco de nódulos con 0.13 g.

Dentro de las fuentes de N, la cepa LMT10 (0.351 g) tuvo el más alto promedio, seguido de la cepa LMT 15 (0.329 g), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 24). La cepa nativa (0.301 g) obtuvo un promedio contrastante con la fertilización mineral de N (0.178 g) que obtuvo el más bajo promedio, aunque no diferentes estadísticamente..

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el peso fresco de nódulos tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables número de nódulos, peso seco de nódulos y peso fresco de raíces, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa.

4.2.7. Peso seco de nódulos (g)

En el Cuadro 13, se aprecia que el peso seco de nódulos fluctúa entre 0.008 g y 0.109g correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T9 (Canario CIFAC con cepa LMT10), respectivamente. Se observa que los tratamientos superan a la fertilización nitrogenada en todas las variedades (Figura 25), siendo el peso fresco de follaje promedio para el experimento en general de 0.048 g. y con un coeficiente de variabilidad de 47.75%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas en hortalizas, árboles frutales y maderables según Martínez¹⁵³ y Ruiz-Ramírez²¹⁶.

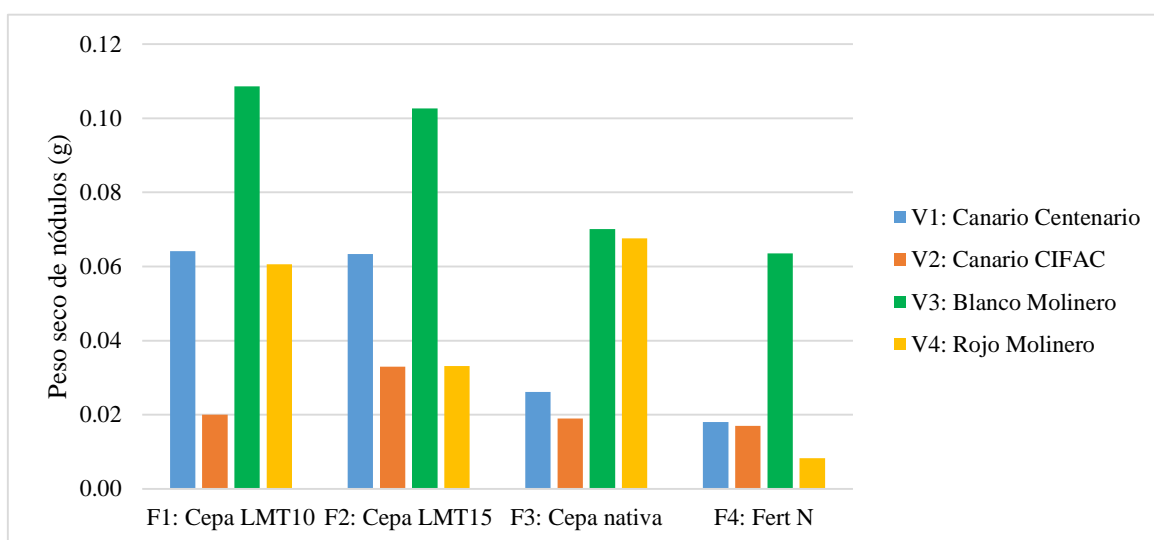
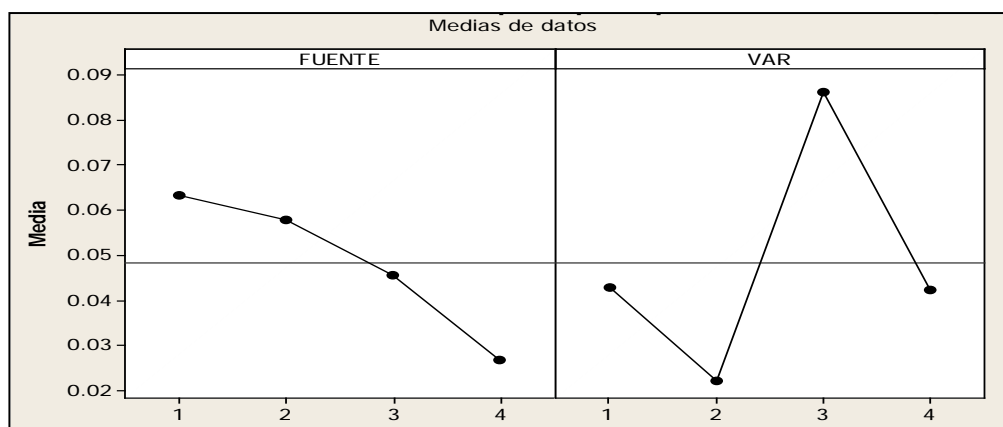


Figura 25. Valores medios de la variable peso seco de nódulos (g) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

El análisis de varianza (Cuadro 14) indica que existe alta significación estadística a un nivel de significación 0.01 para el factor principal variedad, no se halló diferencias significativas para fuente de N, bloques ni la interacción. La prueba de Duncan (Cuadro 15) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades Blanco Molinero (0.087 g) con respecto a Canario Centenario (0.043 g), Rojo Molinero (0.043 g) y Canario CIFAC (0.022 g).

Dentro de las fuentes de N, la cepa LMT10 (0.064 g) tuvo el más alto promedio, seguido de la cepa LMT 15 (0.058 g), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 26). La cepa nativa (0.046 g) obtuvo un promedio contrastante con la fertilización mineral de N (0.027 g) que obtuvo el más bajo promedio, aunque no diferentes estadísticamente..



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 26. Efectos principales para la variable peso seco de nódulos (g)

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el peso seco de nódulos tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables número de nódulos y peso fresco de nódulos, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa.

4.3. Variables de rendimiento

4.3.1. Número de vainas por planta

En el Cuadro 17 se aprecia que el número de vainas por planta fluctúa entre 4.86 y 21.44 correspondiendo a los tratamientos T15 (Rojo Molinero con cepa nativa) y T4 (Canario Centenario con Fert. N), con un incremento del 340.51%. El número de vainas por planta

promedio para el experimento en general es de 15.29 vainas por planta y con un coeficiente de variabilidad de 15.33%, lo cual lo ubica en un rango aceptable para experimentos agrícolas según Calzada²⁸.

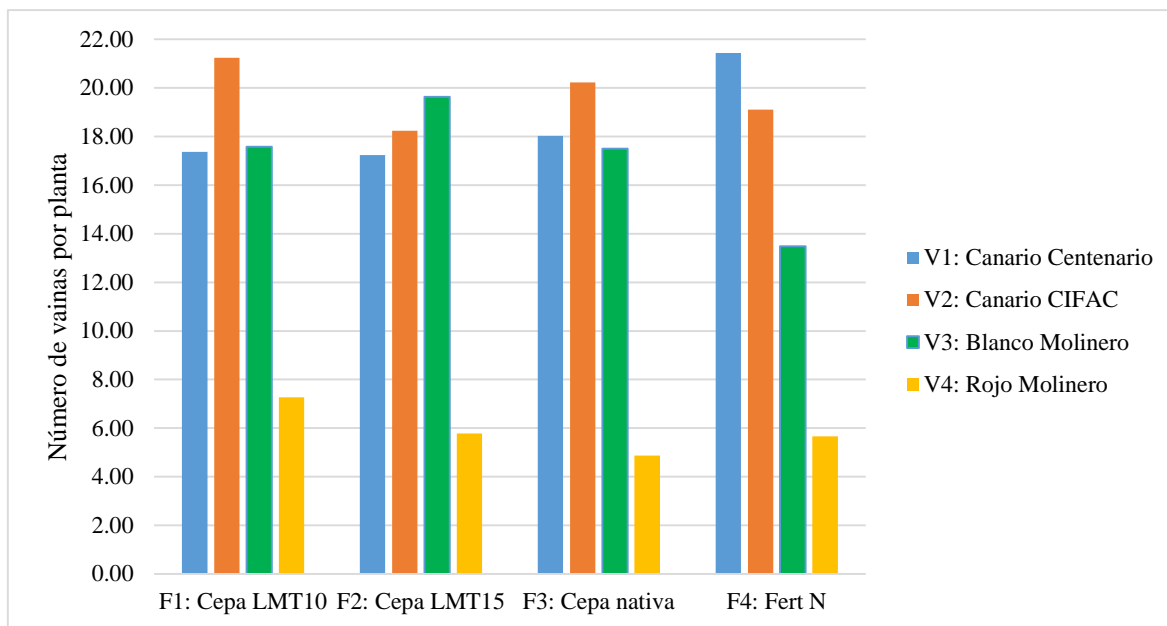


Figura 27. Valores medios de la variable número de vainas por planta en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

El análisis de varianza (Cuadro 18) indica que hay diferencias muy significativas ($p < 0.01$) para el factor principal variedad y a un nivel 0.05 para la interacción, no se halló diferencias significativas para fuente de N (Cuadro 20) ni bloques. La prueba de Duncan (Cuadro 19) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades CIFAC (19.70 vainas por planta), con promedios similares a Canario Centenario (18.52) y Blanco Molinero (17.05); y Rojo Molinero con 5.89 vainas por planta y una disminución del 234.46% con respecto a la variedad CIFAC, debido probablemente a su cultivo en condiciones ambientales no favorables a la variedad. En el caso de Canario Centenario, los valores son ligeramente inferiores a lo obtenido por Núñez¹⁷³ y Flores⁸⁴ quien obtuvo 24 vainas/planta; y mayor a lo obtenido por Espinoza⁷⁷. El número de vainas por planta es una variable muy importante y tiene asociación directa con el rendimiento.

Cuadro 17. Resultados promedios de las variables de rendimiento evaluadas de los tratamientos

VARIEDAD	FUENTE DE N	TRAT	RENDIMIENTO (Kg/ha)	NÚMERO DE VAINAS POR PLANTA	NÚMERO DE GRANOS POR VAINA	PESO DE CIEN GRANOS (g)	INDICE DE COSECHA (%)
Canario Centenario	Fert. N	T4	3062.2	21.44	3.53	60.10	64.98
Blanco Molinero	Cepa nativa	T11	2835.6	17.50	3.86	61.33	54.45
Blanco Molinero	Cepa LMT10	T9	2815.1	17.58	4.01	58.63	61.10
Canario CIFAC	Fert. N	T8	2680.5	19.11	3.60	57.85	51.97
Canario Centenario	Cepa LMT15	T2	2592.8	17.24	3.91	56.73	57.29
Blanco Molinero	Cepa LMT15	T10	2572.7	19.63	3.25	58.07	44.27
Canario CIFAC	Cepa nativa	T7	2396.3	20.22	3.38	54.20	56.48
Canario Centenario	Cepa LMT10	T1	2353.0	17.37	3.62	53.73	59.08
Blanco Molinero	Fert. N	T12	2320.0	13.48	4.30	57.70	61.34
Canario CIFAC	Cepa LMT10	T5	2191.4	21.25	3.34	49.13	56.25
Canario CIFAC	Cepa LMT15	T6	2173.0	18.24	3.33	54.43	60.56
Canario Centenario	Cepa nativa	T3	2084.4	18.03	3.36	50.73	59.53
Rojo Molinero	Cepa LMT10	T13	649.4	7.27	2.37	54.88	62.36
Rojo Molinero	Cepa LMT15	T14	487.0	5.78	2.36	52.30	63.03
Rojo Molinero	Cepa nativa	T15	451.9	4.87	2.72	51.67	55.17
Rojo Molinero	Fert. N	T16	430.4	5.67	2.01	57.67	48.14
PROMEDIO			2006.0	15.29	3.31	55.57	57.25

TRAT= Tratamiento

Cuadro 18. Análisis de Varianza de las variables de rendimiento evaluadas del experimento

FUENTE DE VARIABILIDAD	G.L.	NÚMERO DE VAINAS POR PLANTA	NÚMERO DE GRANOS POR VAINA	PESO DE CIEN GRANOS (g)	ÍNDICE DE COSECHA (%)	RENDIMIENTO (Kg/ha)
Bloque	2	4.13	0.03	151.96*	2.66	205824.61
Variedad (V)	3	485.23***	5.16***	64.9 N.S.	54.11 N.S.	12174648.74***
Fuente de nitrógeno (N)	3	1.95	0.05	43.87	32.21	81295.27
VxN	9	12.6*	0.33	24.58	125.69***	269442.76
Error	30	5.50	0.22	31.56	19.77	196366
Total	47					
C.V. (%)		15.33	14.21	10.11	7.77	22.09
PROMEDIO		15.29	3.31	55.57	57.25	2006.00

Significación estadística: * (0.01<p<0.05), ** (p<0.01)

Cuadro 19. Resumen de la prueba de comparación de medias ($p=0.05$) según Duncan en las variables de rendimiento para el factor variedad.

VARIEDAD	Número de vainas por planta	Número de granos por vaina	Peso de cien semillas (g)	Índice de cosecha (%)	Rendimiento grano seco (kg/ha)
Canario Centenario	18.52 ab	3.61 ab	55.33 a	60.22 a	2523.1 a
Canario CIFAC	19.71 a	3.41 b	53.90 a	56.32 b	2360.3 a
Blanco Molinero	17.05 b	3.85 a	58.93 a	55.29 b	2635.9 a
Rojo Molinero	5.89 c	2.36 c	54.13 a	57.18 ab	504.7 b

Cuadro 20. Resumen de la prueba de comparación de medias ($p=0.05$) según Duncan en las variables de rendimiento para el factor fuente de nitrógeno.

FUENTE DE N	Número de vainas por planta	Número de granos por vaina	Peso de cien semillas (g)	Índice de cosecha (%)	Rendimiento grano seco (kg/ha)
Cepa LMT10	15.87 a	3.34 a	54.10 a	59.70 a	2002.2 a
Cepa LMT15	15.22 a	3.21 a	55.38 a	56.29 a	1956.4 a
Cepa nativa	15.16 a	3.33 a	54.48 a	56.41 a	1942.0 a
Fert. N	14.92 a	3.36 a	58.33 a	56.61 a	2123.3 a

Cuadro 21. Análisis de efectos simples de la variable Número de vainas por planta

a) Análisis de Varianza para el estudio de los efectos simples de los factores (p=0.05*; p=0.01**)

Fuente de Variabilidad	SC	GL	CM	F	Sign.
Efectos simples del factor variedad					
Variedades en cepa LMT10	345.27	3	115.09	20.93	**
Variedades en cepa LMT15	365.60	3	121.87	22.16	**
Variedades en cepa nativa	435.93	3	145.31	26.42	**
Variedades en fert. N	443.27	3	147.76	26.87	**
Efectos simples del factor fuente de N					
Fuente de N en Canario Centenario	35.16	3	11.72	2.13	ns
Fuente de N en Canario CIFAC	15.41	3	5.14	0.93	ns
Fuente de N en Blanco Molinero	69.78	3	23.26	4.23	*
Fuente de N en Rojo Molinero	9.01	3	3.00	0.55	ns

b) Comparación de medias Duncan (p=0.05) de la interacción Fuentes de N en la variedad Blanco Molinero y variedades con las cepas

TRATAMIENTO	PROMEDIOS	DUNCAN	% Δ
Blanco Molinero-Cepa LMT15	19.633	a	145.6
Blanco Molinero-Cepa LMT10	17.583	a	130.4
Blanco Molinero-Cepa nativa	17.500	a	129.8
Blanco Molinero-Fert.N	13.483	b	100.0

TRATAMIENTO	PROMEDIOS	DUNCAN	% Δ
Cepa LMT10-Canario CIFAC	21.246	a	292.4
Cepa LMT10-Blanco Molinero	17.583	a	242.0
Cepa LMT10-Canario Centenario	17.367	a	239.0
Cepa LMT10-Rojo Molinero	7.267	b	100.0

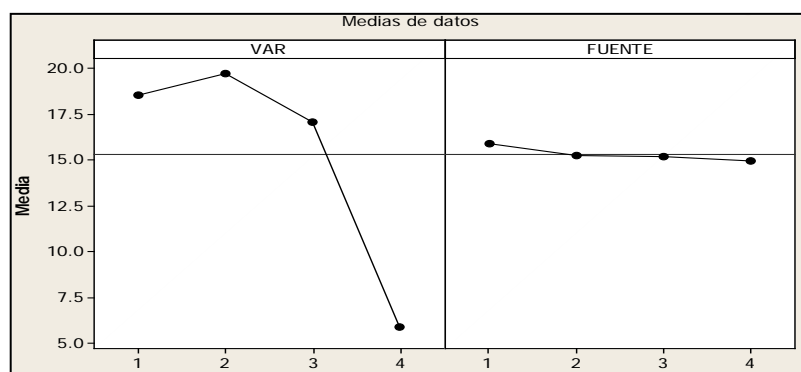
TRATAMIENTO	PROMEDIOS	DUNCAN	% Δ
Cepa LMT15-Blanco Molinero	19.633	a	339.8
Cepa LMT15-Canario CIFAC	18.243	a	315.7
Cepa LMT15-Canario Centenario	17.244	a	298.4
Cepa LMT15-Rojo Molinero	5.778	b	100.0

TRATAMIENTO	PROMEDIOS	DUNCAN	% Δ
Cepa nativa-Canario CIFAC	20.222	a	415.5
Cepa nativa-Canario Centenario	18.033	a	370.5
Cepa nativa-Blanco Molinero	17.500	a	359.6
Cepa nativa-Rojo Molinero	4.867	b	100.0

TRATAMIENTO	PROMEDIOS	DUNCAN	% Δ
Fert. N-Canario Centenario	21.440	a	378.4
Fert. N-Canario CIFAC	20.222	a	356.9
Fert. N-Blanco Molinero	13.483	a	237.9
Fert. N-Rojo Molinero	5.667	b	100.0

Al haber interacción entre ambos factores en estudio se procedió a realizar el análisis de efectos simples (Cuadro 21). Respecto a las variedades comparados con cada uno de las fuentes de N se observan diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) para la variedad Blanco Molinero. Las fuentes de nitrógeno comparados con cada una de las variedades se observan diferencias altamente significativas para todas las variedades.

Se observa que dentro de las fuentes de N, no hay diferencias significativas, aunque solo la cepa LMT10 está por encima de la media y muy similares en número de vainas por planta, asimismo las variedades Canario Centenario, Canario CIFAC y Blanco Molinero están encima del promedio, siendo la mejor combinación para número de vainas por planta, la variedad Canario Centenario con fertilización nitrogenada, seguido por la variedad Canario CIFAC con cepa LMT 10). En general es importante señalar que en esta variable se observa una tendencia a mayor número de vainas con fertilización nitrogenada y cepa LMT 10 de *Rhizobium* que con las cepas nativas del suelo.



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 28. Efectos principales para la variable número de vainas por planta

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el número de vainas por planta tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables altura, peso fresco de follaje, peso fresco de raíces, peso seco de follaje, peso seco de raíces, número de granos por vaina y rendimiento grano seco, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa. El número de vainas por planta es influenciado básicamente por días de floración y la altura de planta como lo señala Manrique¹⁵⁰ y el coeficiente de correlación comprueba lo mencionado por López¹⁴⁵ y Voysest²⁷¹, quien indica que a mayor número de vainas por planta el rendimiento se incrementa.

4.3.2. Número de granos por vaina

En el Cuadro 17 se aprecia que el número de granos por vaina fluctúa entre 2.01 y 4.30 granos por vaina correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T12 (Blanco Molinero con Fert. N), respectivamente; con un incremento del 113.93% sobre T16. Se observa que solo en Canario Centenario los tratamientos superan al testigo (cepa nativa), pero en las otras variedades no (Figura 29), siendo el número de granos por vaina promedio para el experimento en general de 3.309 granos por vaina y con un coeficiente de variabilidad de 14.12%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas según Calzada²⁸.

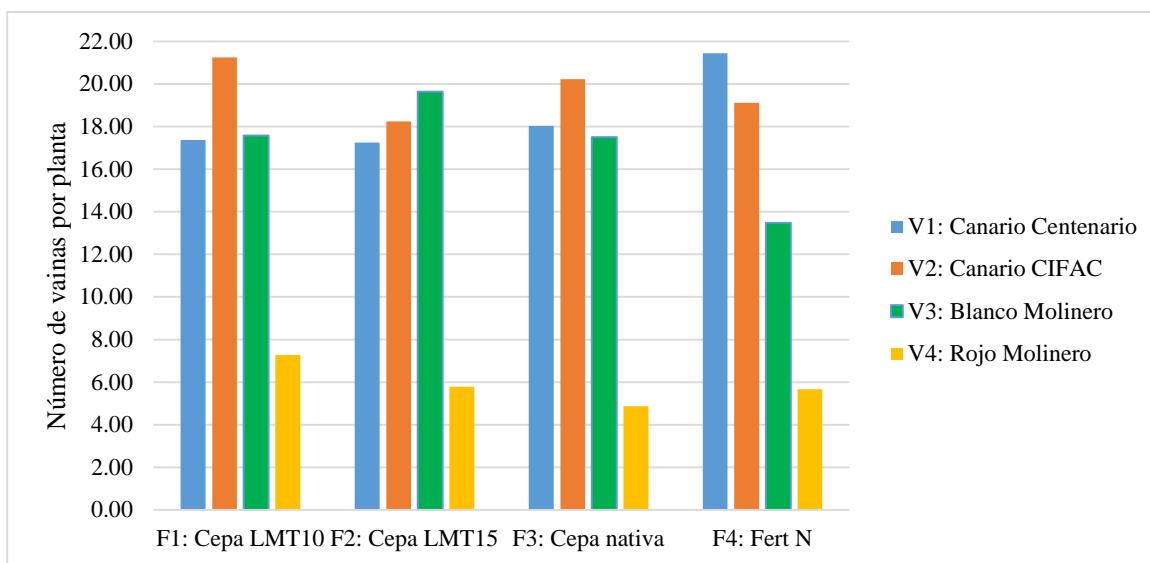
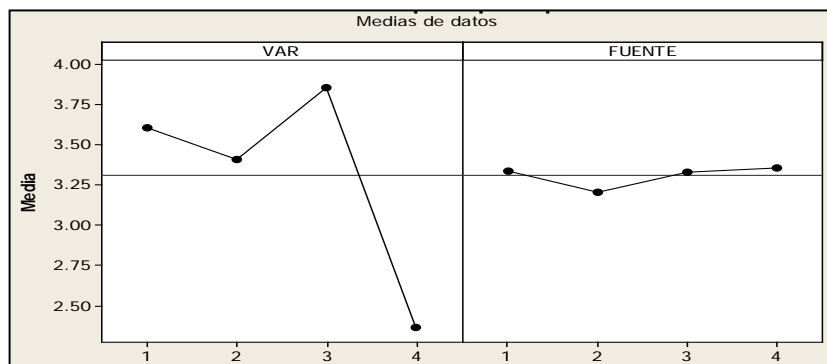


Figura 29. Valores medios de la variable número de granos por vaina en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

El análisis de varianza (Cuadro 18) indica que hay diferencias muy significativas ($p < 0.01$) para el factor principal variedad, no se halló diferencias significativas para fuente de N (Cuadro 20), bloques ni la interacción ($p < 0.05$). La prueba de Duncan (Cuadro 19) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades Blanco Molinero (3.85 granos por vaina) y Rojo Molinero (2.36 granos por vaina) que tiene una disminución del 63.13% con respecto a la variedad Blanco Molinero; la variedad Blanco Molinero presenta promedios similares con la variedad Canario Centenario (3.60 granos por vaina) y la variedad Canario CIFAC (3.41 granos por vaina).

El valor promedio obtenido en Canario Centenario son similares a Flores⁸³, Canchari³¹, Núñez¹⁷³ e inferiores a Ramírez²⁰³, cuyo valor es similar a lo obtenido con el tratamiento 12 (4.3 granos por vaina) y Flores⁸⁴ quien obtuvo 6.75 granos/vaina.

Dentro de las fuentes de N, la fertilización mineral de N (3.36 granos por vaina) tuvo el más alto promedio de vainas por planta, seguido de la cepa LMT10 (3.34 granos por vaina), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 30). La cepa nativa (3.33 granos por vaina) obtuvo un promedio ligeramente mayor a la cepa LMT 15 (3.21 granos por vaina) que obtuvo el más bajo promedio, aunque no diferentes estadísticamente..



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 30. Efectos principales para la variable número de vainas por planta

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el número de granos por vaina tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables altura, peso fresco de follaje, peso fresco de raíces, peso seco de follaje, número de vainas por planta y rendimiento grano seco, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa.

El número de granos por vaina es el componente que conserva estabilidad y es poco influenciado por los factores externos, por lo que no se nota una tendencia definida en el experimento lo cual concuerda con Falcón⁷⁹ y López¹⁴⁵. Por los resultados obtenidos, se puede comprobar que las variedades, así como la alta densidad de siembra según Espinoza⁷⁷, propicio una mayor formación de granos, ya que es un carácter influenciado por el medio ambiente.

4.3.3. Peso de cien semillas (g)

En el Cuadro 17 se aprecia que el peso de cien granos fluctúa entre 49.133 g y 61.333 g correspondiendo a los tratamientos T5 (Canario CIFAC con cepa LMT10) y T11 (Blanco Molinero con cepa nativa) respectivamente con un incremento del 24.83%, siendo el peso de cien granos promedio para el experimento en general de 55.573 g. y con un coeficiente

de variabilidad de 10.10%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas según Calzada²⁸. El valor promedio es superior a lo obtenido por Núñez¹⁷³: 42.31g., Espinoza⁷⁷: 39.28 g., Camarena²⁹: 35.8 g., y Farfán⁸¹: 24.5 g; y menor a lo obtenido por Flores⁸⁴:159.34 g. Sin embargo, Olivera mencionado por Dulanto⁷¹ opina que el peso de 100 semillas no era aparentemente importante como factor de la producción siempre que los valores para otro componente de rendimiento como número de vaina por planta y número de granos por vaina fueran altos.

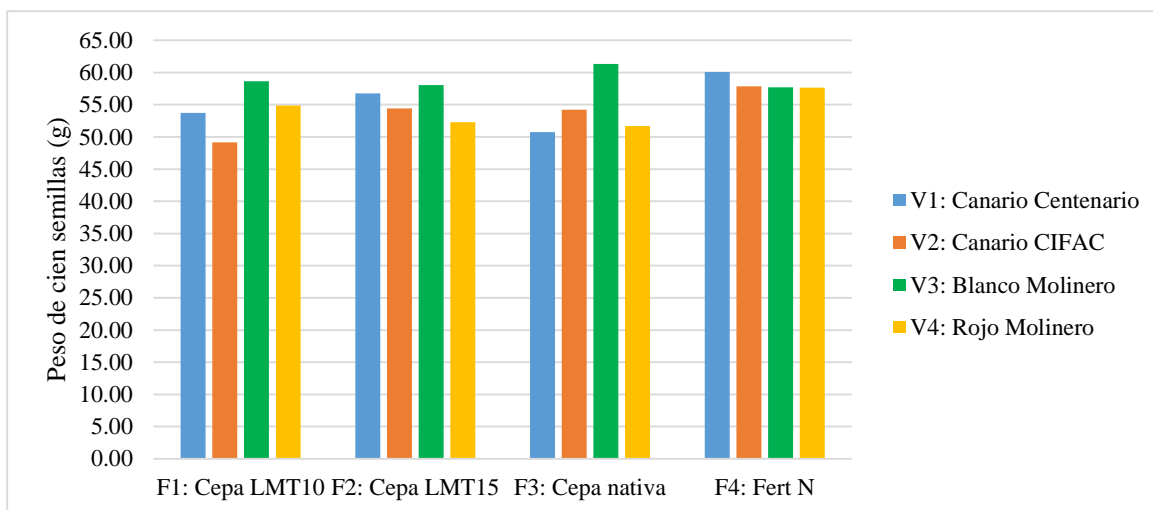
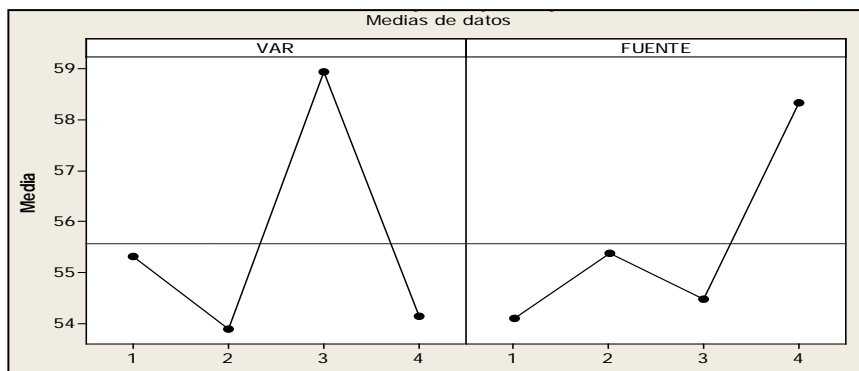


Figura 31. Interacción de las fuentes de N en el peso de cien semillas (g) en cuatro variedades de frijol común.

El análisis de varianza (Cuadro 18) indica que existe alta significación estadística a un nivel de significación 0.05 para los bloques, no se halló diferencias significativas para variedad, fuente de N (Cuadro 20), ni la interacción. los resultados obtenidos indican que las variedades no tuvieron mayor efecto sobre el peso de grano, de acuerdo a lo señalado por Fernández⁸², quien concluye que al evaluar los efectos de densidades de siembra el número de granos por vaina y el peso de 100 semillas se mantuvieron constantes. La diferencia entre bloques sugiere que hubo diferencias en las condiciones del experimento, lo cual se puede deber a condiciones ambientales como el suelo, agua, nutrición edáfica u algún otro factor como la incidencia de plagas y enfermedades.

La prueba de Duncan (Cuadro 19) no encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades ni entre las fuentes de N, siendo la variedad Blanco Molinero, la de mayor peso de cien granos con 58.933 g y la variedad CIFAC, la de menor peso de cien granos con 53.9 g, una disminución del 9.33% con respecto a la variedad Blanco Molinero.



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 32. Efectos principales para la variable peso de cien semillas (g)

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el peso de cien granos tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables tamaño de nódulos y rendimiento grano seco, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa.

4.3.4. Índice de cosecha

En el Cuadro 17, se aprecia que el índice de cosecha fluctúa entre 44.267% y 64.976% correspondiendo a los tratamientos T10 (Blanco Molinero con cepa LMT15) y T4 (Canario Centenario con Fert. N) respectivamente con un incremento del 46.78%, siendo el índice de cosecha promedio para el experimento en general de 57.249% y con un coeficiente de variabilidad de 7.76%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas según Calzada²⁸.

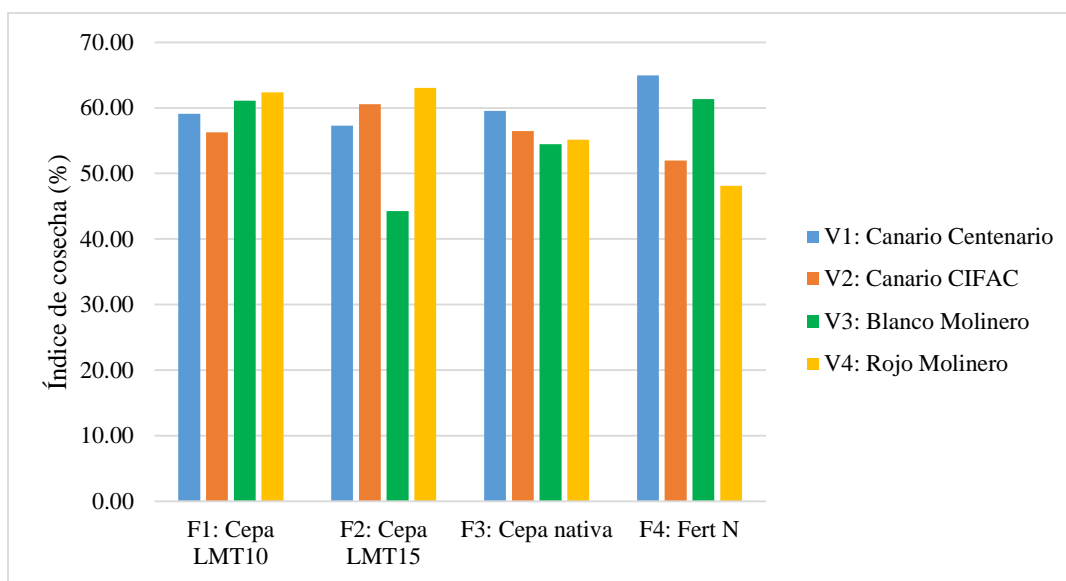


Figura 33. Valores medios de la variable índice de cosecha (%) en cuatro variedades de frijol común evaluados con cuatro fuentes de nitrógeno.

Los valores son similares a los obtenidos por Canchari³¹ y mayores a los obtenidos por Ramírez²⁰³, Gutiérrez¹⁰⁴, probablemente por haber obtenido menor número de vainas por planta.

El análisis de varianza (Cuadro 18) indica que existe indica que hay diferencias muy significativas ($p < 0.01$) para la **interacción** variedad x fuente de N, no se halló diferencias significativas para fuente de N (Cuadro 20), variedad ni bloques ($p < 0.05$). La prueba de Duncan (Cuadro 19) encuentra diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las variedades Canario Centenario (60.21%) y, Rojo Molinero (57.17 %), Canario CIFAC (56.32%) y Blanco Molinero (55.28%), ésta última presenta una disminución del 8.91% con respecto a la variedad Canario Centenario.

Al haber interaccion entre ambos factores en estudio se procedió a realizar el análisis de efectos simples (Cuadro 22). Respecto a las variedades comparados con cada uno de las fuentes de N se observan diferencias altamente significativas para las variedades Blanco Molinero y Rojo Molinero. Las fuentes de nitrógeno comparados con cada una de las variedades se observan diferencias altamente significativas para la cepa LMT15 y la fertilización nitrogenada.

Se puede observar que dentro de las fuentes de N, no hay diferencias significativas ($p < 0.05$), aunque solo la cepa LMT10 está por encima de la media, asimismo solo la variedad Canario Centenario está encima del promedio, siendo la mejor combinación para índice de cosecha, la variedad Canario Centenario con fertilización nitrogenada, seguido por la variedad Rojo Molinero con la cepa LMT15. Para esta característica se puede mencionar que el tratamiento 4 (NPK) destaco con 64.98% del total de su biomasa en la formación de granos. Esto podría deberse al mayor número de vainas por planta, al peso de cien semillas que es el valor más alto en esta variable y también relacionarse con los factores genéticos y al ambiente donde se desarrolla el experimento, que influye en la planta es decir la variedad de frijol, para la formación de las partes vegetativas, reproductivas y finalmente el grano cosechado. Además la cepa LMT15 presenta un IC de 63.03% en la variedad Rojo Molinero, aunque su rendimiento sea bajo debido al descenso de los valores anteriormente mencionados.

Cuadro 22. Análisis de efectos simples de la variable Índice de cosecha (%)

a) Significación estadística (p=0.05*; p=0.01**)

Fuente de Variabilidad	SC	GL	CM	F	Sign.
Efectos simples del factor variedad					
Variedades en cepa LMT10	63.98	3	21.33	3.88	ns
Variedades en cepa LMT15	627.62	3	209.21	38.04	**
Variedades en cepa nativa	45.26	3	15.09	2.74	ns
Variedades en fert. N	556.71	3	185.57	33.75	**
Efectos simples del factor fuente de N					
Fuente de N en Canario Centenario	99.02	3	33.01	6.00	ns
Fuente de N en Canario CIFAC	110.64	3	36.88	6.71	ns
Fuente de N en Blanco Molinero	577.53	3	192.51	35.01	**
Fuente de N en Rojo Molinero	440.68	3	146.89	26.71	**

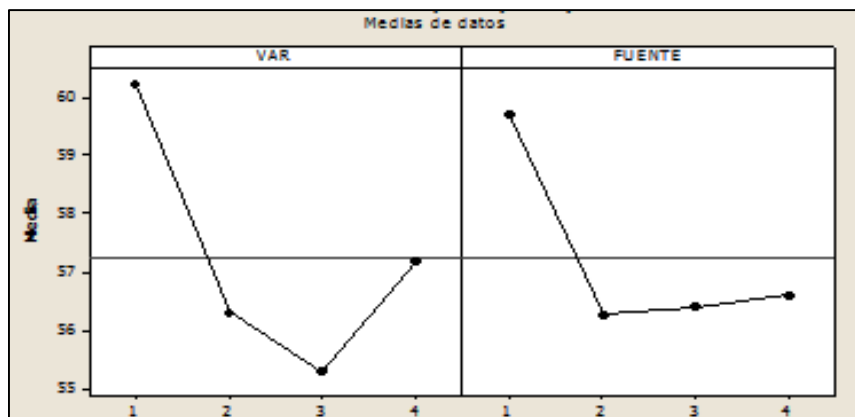
b) Comparación de medias Duncan (p=0.05) en las fuentes de variabilidad significativas

TRATAMIENTO	PROMEDIOS	DUNCAN	% Δ
Blanco Molinero-Fert.N	61.336	a	138.6
Blanco Molinero-Cepa LMT10	61.101	a	138.0
Blanco Molinero-Cepa nativa	54.452	a	123.0
Blanco Molinero-Cepa LMT15	44.268	b	100.0

TRATAMIENTO	PROMEDIOS	DUNCAN	% Δ
Rojo Molinero-Cepa LMT15	63.033	a	130.9
Rojo Molinero-Cepa LMT10	62.363	a	129.5
Rojo Molinero-Cepa nativa	55.169	ab	114.6
Rojo Molinero-Fert.N	48.140	b	100.0

TRATAMIENTO	PROMEDIOS	DUNCAN	% Δ
Cepa LMT15-Rojo Molinero	63.033	a	142.4
Cepa LMT15-Canario CIFAC	60.556	a	136.8
Cepa LMT15-Canario Centenario	57.286	a	129.4
Cepa LMT15-Blanco Molinero	44.268	b	100.0

TRATAMIENTO	PROMEDIOS	DUNCAN	% Δ
Fert.N-Canario Centenario	64.976	a	135.0
Fert.N-Blanco Molinero	61.336	a	127.4
Fert.N-Canario CIFAC	51.973	ab	108.0
Fert.N-Rojo Molinero	48.140	b	100.0



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 34. Efectos principales para la variable índice de cosecha (%)

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el índice de cosecha no está relacionado estadísticamente con ningún parámetro.

El índice de cosecha es un indicativo de la eficiencia fisiológica de la planta, en convertir la biomasa en producto de interés económico grano para el caso del frijol; siendo más eficientes aquellos genotipos que obtienen un valor por encima del 50%. Lapeyre¹³⁹ en un estudio de correlación de componentes de rendimiento, reporta que los días a la madurez e índice de cosecha están asociados con el rendimiento de grano seco.

Por los resultados obtenidos, se puede comprobar que solo las variedades influyeron en la altura, mas no las fuentes de N probadas (cepas de *Rhizobium* más fertilización mineral).

4.3.5. Rendimiento grano seco (kg.ha⁻¹)

El rendimiento en grano seco es el carácter agronómico que ayuda a determinar la rentabilidad del cultivo y hace de la variedad una buena alternativa para el agricultor, que actualmente busca altos rendimientos con el creciente énfasis en la calidad²⁰³.

En el Cuadro 17, se aprecia que el rendimiento grano seco en kg.ha⁻¹ fluctúa entre 430.36 kg.ha⁻¹ y 3062.19 kg.ha⁻¹ correspondiendo a los tratamientos T16 (Rojo Molinero con Fert. N) y T4 (Canario Centenario con Fert. N), respectivamente con un incremento del 506.22%, siendo el rendimiento grano seco en kg/ha promedio para el experimento en general de 2005.98 kg.ha⁻¹ y con un coeficiente de variabilidad de 22.09%, lo cual es aceptable para experimentos agrícolas según Calzada²⁸.

El rendimiento de la variedad Blanco molinero con 2635.9 kg.ha⁻¹, es superior a lo obtenido por López¹⁴⁵ que fue de 1617 kg.ha⁻¹ y al de Huamán¹¹⁶ con 1566 kg.ha⁻¹, habiendo ambos evaluado frijoles blancos medianos y menor a lo obtenido por Flores⁸⁴: 4480 kg.ha⁻¹. Aunque todos estos rendimientos se encuentran por encima del promedio anual, según datos del MINAG en el año 2013 (**Anexo 1**).

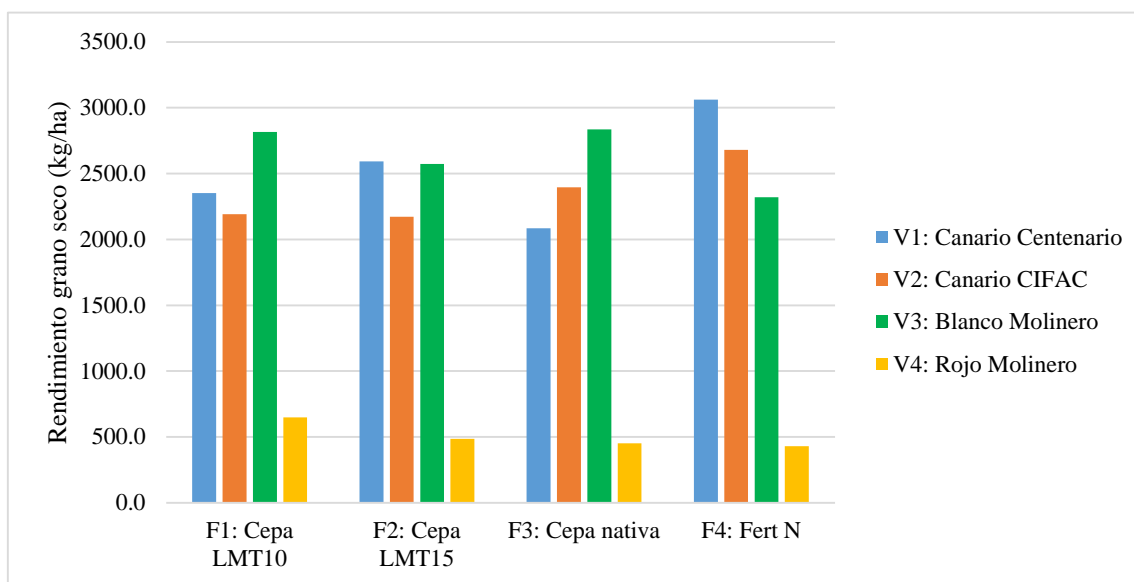


Figura 35. Interacción de las variedades de frijol común en el rendimiento grano seco (kg/ha) con cuatro fuentes de nitrógeno.

El análisis de varianza (Cuadro 18) indica que hay diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) para el factor principal variedad, no se halló diferencias significativas para fuente de N (Cuadro 20) ni la interacción ($p < 0.05$). Asimismo no se encontró diferencias significativas entre los bloques. La significación encontrada entre las variedades nos permite afirmar que las variedades tuvieron rendimientos muy diferentes entre sí debido al genotipo propio de cada una de ellas y al comportamiento que mostraron frente a los factores climáticos de la estación, lo que implica una buena o mala adaptación a las condiciones meteorológicas donde se desarrolló el experimento.

La prueba de Duncan (Cuadro 19) no encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) en los promedios de las tres primeras variedades (Blanco Molinero, Canario Centenario y Canario CIFAC, en orden decreciente), y si hay diferencias con respecto a la variedad Rojo Molinero de menor rendimiento con 504.7 kg.ha⁻¹. En la variedad Blanco Molinero, la cepa LMT10 permite obtener un rendimiento de 2815.12 kg.ha⁻¹ y la cepa LMT15 con la

variedad Canario Centenario obtuvo un rendimiento de 2592.8 kg.ha⁻¹, de similar respuesta comparado con frijol Molinero PLVI/1-3 de Villanueva²⁶⁷ quien aplico las cepas donde se observa para la cepa E-10 y E-14 promedios de 2906 y 2857 kg.ha⁻¹ respectivamente pero; siendo esta variedad indeterminada podría afirmarse que se obtuvo mejor resultado en el Canario Centenario por ser determinada. Esto reafirma la importancia de la simbiosis con *Rhizobium sp.*, que manifiestan Meneses¹⁵⁸ para mejorar el rendimiento del cultivo de frijol. La variedad Canario Centenario tiene un rendimiento promedio de 2523.1 kg.ha⁻¹, superior a lo reportado por Núñez¹⁷³ cuyos rendimientos son de 2461 kg.ha⁻¹, asimismo la variedad CIFAC tiene un rendimiento promedio general en este experimento de 2360.3 kg.ha⁻¹, casi el doble de lo reportado por Canchari³¹ quien obtuvo un valor de 1236.5 kg.ha⁻¹. Estas diferencias de rendimientos encontrados para las investigaciones de frijol canario podrían deberse a las cepas de *Rhizobium* empleadas, abonos orgánicos (estiércol de caballo), compost y protohormonas orgánicas empleadas en las parcelas experimentales; lo cual permitió obtener mejores resultados. Los factores abióticos como la sequía puede ser responsable de la pérdida de la producción son de más de 30% según su severidad, siendo la floración y fructificación las etapas de desarrollo más vulnerable para el frijol lo cual coincide con lo mencionado por Chiappe⁴⁰, en nuestro caso Agrostemin GL pudo ayudar a superar la sequía, ya que después de sus aplicaciones las plantas aumentaron su follaje y su vigor de crecimiento, traduciéndose en un incremento de los componentes del rendimiento, además los altos rendimientos registrados también se pueden deber a las condiciones favorables de temperatura durante el desarrollo del cultivo, que en promedio está cercano a los 20° C durante la fructificación y crecimiento de vainas lo cual coincide con Flores⁸³ y Gutiérrez¹⁰⁸. Asimismo, la temperatura promedio fue 16.51 °C durante el ensayo y la humedad relativa cercano al valor óptimo según señala Chiappe⁴⁰.

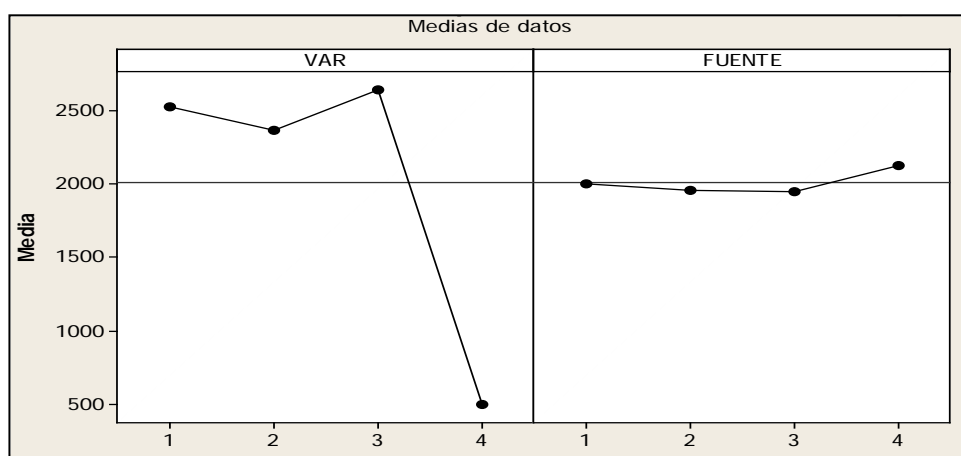
Dentro de las fuentes de N, la fertilización mineral de N (2123.3 kg.ha⁻¹) tuvo el más alto promedio, seguido de la cepa LMT10 (2002.2 kg.ha⁻¹), cuyos valores se encuentran por encima de la media (Figura 36). La cepa LMT 15 (1956.4 kg.ha⁻¹) obtuvo un promedio ligeramente mayor a la cepa nativa (1942 kg.ha⁻¹), que obtuvo el más bajo promedio.

La fertilización mineral N muestra el mayor rendimiento, esto puede deberse a su índice de cosecha de 64.98%, peso de 100 semillas con 60.10 g., altura de planta de 41.29 cm y 21.44 vainas por planta con un promedio de 3.53 granos por vaina; es decir, estos caracteres

influyen en la buena respuesta del cultivar Canarias Centenario para expresar un mayor rendimiento de grano

El otro tratamiento que destaca en este experimento es el tratamiento 11 con 2835.57 kg.ha⁻¹, que es la variedad Blanco Molinero sin inoculación, con la cepa nativa de *Rhizobium* en la parcela, debido al monocultivo de frijol en el terreno sembrado.

Las cepas nativas en este tratamiento superan a los demás tratamientos, incrementando el rendimiento, debiéndose en gran parte a que tiene el mayor peso de cien semillas entre todos los tratamientos y superando los resultados de Villanueva²⁶⁷, Canchari³¹ y Meneses¹⁵⁸.



Fuente de N: 1 (Cepa LMT10), 2 (Cepa LMT15), 3 (Cepa nativa), 4 (Fert. N)

Variedad: 1 (Canario Centenario), 2 (Canario CIFAC), 3 (Blanco Molinero), 4 (Rojo Molinero)

Figura 36. Efectos principales para la variable rendimiento grano seco (kg/ha)

El coeficiente de correlación de Pearson (Anexo 2) muestra que el rendimiento grano seco en kg.ha⁻¹ tuvo una significación ($p < 0.01$) relacionado con las variables altura, peso fresco de follaje, peso fresco de raíces, peso seco de follaje, peso seco de raíces, número de vainas por planta, número de granos por vaina y peso de cien semillas, indicándonos que hay una asociación entre estas variables y en forma directa. El peso de granos seco está asociado significativamente y en forma positiva con días a la floración, altura de planta y población de plantas a la cosecha como lo señala Robles²¹⁰.

V. CONCLUSIONES

En base a los resultados y discusiones se concluye:

1. Las variedades que mejor se comportaron en todas las variables evaluadas y que sobresalieron en rendimiento fueron Blanco Molinero con 2636 kg.ha⁻¹, Canario Centenario con 2523 kg.ha⁻¹ y Canario CIFAC con 2360 kg.ha⁻¹.
2. La variedad Canario Centenario destacó en las variables peso fresco de raíces e índice de cosecha. La variedad Canario CIFAC destacó en altura, peso fresco de follaje, peso seco de follaje, peso seco de raíces, tamaño de nódulos y número de vainas por planta. La variedad Blanco Molinero destacó en número de nódulos, peso fresco de nódulos, peso seco de nódulos, número de granos por vaina, peso de 100 semillas y rendimiento en grano seco.
3. La cepa LMT 10 destacó en las variables altura de planta, peso fresco de follaje, peso fresco de raíces, peso seco de follaje, peso fresco de nódulos, peso seco de nódulos, número de vainas por planta e índice de cosecha. La cepa LMT 15 en peso seco de raíces y número de nódulos. La cepa nativa del suelo en tamaño de nódulos. La fertilización mineral N destacó en número de granos por vaina, peso de 100 semillas y rendimiento en grano seco.
4. Se encontró interacción altamente significativa para vainas por planta y el índice de cosecha, destacando la interacción Canario Centenario x fertilización nitrogenada como el mejor tratamiento con 21.44 y 64.97% respectivamente.
5. Para las variables morfofisiológicas, destacaron la variedad Canario CIFAC y la cepa LMT 10 dentro de las fuentes de N.
6. Para las variables de nodulación, destacaron la variedad Blanco Molinero y la cepa LMT 15 dentro de las fuentes de N.
7. Para las variables de rendimiento, destacaron la variedad Canario Centenario y la cepa LMT 15 dentro de las fuentes de N

VI. RECOMENDACIONES

1. Para una mejor estimación de los resultados en cuanto al efecto de las cepas en el rendimiento debería de realizarse estudios similares con diferentes niveles de inoculación y realizar experimentos en otras condiciones de suelo y clima.
2. Sería conveniente seguir realizando otros experimentos con bioestimulantes debido a que permiten mejorar el performance de los cultivos y superar ciertos estreses ambientales que se presentan, además de aumentar los rendimientos y los beneficios generados para los agricultores; en otras condiciones de suelo y en diferentes épocas del año, así como diferentes dosis, frecuencias de aplicación, para poder visualizar cuales son los factores esenciales y críticos hacen que tengan un deficiente o excelente efecto sobre las características evaluadas en frijol y otras leguminosas de grano.
3. Evaluar las cepas LMT 10 y LMT 15 de *Rhizobium sp.*, frente a las nativas a nivel de laboratorio y campo y su eficiencia en la fijación de nitrógeno atmosférico.
4. Evaluar la eficiencia simbiótica, con otras técnicas de medición de la fijación de N₂, como métodos de dilución isotópica de ¹⁵N, reducción del acetileno o el método de ureídos y el análisis de la savia xilemática.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbasi, M. K., Manzoor, M. and Tahir, M. M. (2010). Efficiency of rhizobium inoculation and P fertilization in enhancing nodulation, seed yield, and phosphorus use efficiency by field grown soybean under hilly region of Ramalakot Azad Jammu and Kashmir, Pakistan. *J. Plant Nutr.* 33, 1080–1102.
2. Abdelmajid, K., Karim, B. H. and Chedley, A. (2008). Symbiotic response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to iron deficiency. *Acta Physiol. Plant* 30, 27–34.
3. Acosta-Gallegos, J.A.; Kelly, J.D.; Gepts, P. (2007). Prebreeding in common bean and use of genetic diversity from wild germplasm. *Crop Sci.*, 47, S44–S49.
4. Allen, R.D. (1995). Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology* 107: 1049-1054.
5. Aparicio-Tejo, et al. (2008). Fijación biológica de nitrógeno. En: Fundamentos de Fisiología Vegetal. Azcon-Bieto, J. y Talón, M. 2º Edición. Mc Graw Hill Interamericana de España. Madrid-España. 193-213.
6. Ardourel, M., Demont, N., Debelle, F., Maillet, F., de Billy, F., Promé, J.-C., Dénarié, J., and Truchet, G. (1994). *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: Different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* 6, 1357-1374.
7. Asis, C. A., Kubota, M., Ohta, H., Arima, Y., Ohwaki, Y., Yoneyama, T., Tsuchiya, K., Nakanishi, Y. and Akao, S. (2002). Estimation of the nitrogen fixation by sugarcane cultivar NiF-8 using ¹⁵N dilution and natural ¹⁵N abundance techniques. *Soil Sci. Plant Nutr.* 48, 283–285.
8. Austin, G.B. and Maclean MSN. (1972). Some effects of temperature of the rates of photosynthesis and respiration of *Phaseolus vulgaris* L. *Photosynthetica* 6:41-50.
9. Banath, C. L., Greenwood, E. A. N. and Loneragan, J. F. (1996). Effects of calcium deficiency on symbiotic nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 41, 760–763.
10. Barnett, M. J. and Fisher, R. F. (2006). Global gene expression in the rhizobial-legume symbiosis. *Symbiosis* 42, 1–24.
11. Beebe S, Skroch PW, Tohme J, Duque MC, Pedraza F and Nienhuis J. (2000). Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of RAPD. *Crop. Sci.* 40, 264–273.
12. Beebe, S.; Ramirez, J.; Jarvis, A.; Rao, I.M.; Mosquera, G.; Bueno, J.M.; Blair, M.W. (2012). Genetic Improvement of Common beans and the Challenges of Climate Change. In Crop Adaptation to Climate Change; Yadav, S.S., Redden, R.J., Hatfield, J.L., Lotze-Campen, H., Hall, A.E., Eds.; Wiley-Blackwell: Chichester, UK. 356–369 pp.
13. Bennett M D and Leitch IJ. (1995). Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Annals. Botany* 76, 113–176.
14. Bernard, S. M., Møller, A. L., Dionisio, G., Kichey, T., Jahn, T. P., Dubois, F., Baudo, M., Lopes, M. S., Tercé-Laforgue, T., Foyer, C. H., Parry, M. A., Forde, B. G., Araus, J. L., Hirel, B., Schjoerring, J. K. and Habash, D. Z. (2008). Gene expression, cellular localization and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol. Biol.* 67, 89–105.
15. Bezdiček, D.F. & Kennedy A.C. (1998) In Lynch JM, Hobbie JE (eds), Microorganisms in Action. Blackwell, Oxford, UK
16. Binder, U. (1997). Manual de leguminosas de Nicaragua. PASOLAC, E.A.G.E. Esteli, Nicaragua.
17. Blackshaw, R. E. (1991). Hairy nightshade (*Solanum sarrachoides*) interference in dry beans (*Phaseolus vulgaris*). *Weed Sci.* 39:48–53.
18. Blackshaw, R. E., H. H. Muendel, and G. Saindon. (1999). Canopy architecture, row spacing and plant density effects on yield of dry bean (*Phaseolus vulgaris*) in the absence and presence of hairy nightshade (*Solanum sarrachoides*). *Can. J. Plant Sci.* 79:663–669.
19. Boddey R.M., de Oliveira O., Urquiaga S., Reis V., Olivares F., Baldani V. and Dobereiner J. (1995). Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil* 174, 195–209.
20. Bolanos, L., Martin, M., El-Hamdaoui, A., Rivilla, R. and Bonilla, I. (2006). Nitrogenase inhibition in nodules from pea plants grown under salt stress occurs at the physiological level and can be alleviated by B and Ca. *Plant Soil* 280, 135–142.

21. Bottomley, P.J., and D.D. Myrold. (2007). Biological nitrogen fixation: The return of N to the soil. p. 365-387. In *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*, 3rd Edition (E.A. Paul, ed.). Academic Press, Burlington, MA.
22. Boutin S, Young N, Olson T, Yu Z, Shoemaker R and Vallejos C (1995). Genome conservation among three legume genera detected with DNA markers. *Genetics* 38, 928–937.
23. Bowsher, C. G., Lacey, A. E., Hanke, G. T., Clarkson, D. T., Saker, L. R., Stulen, I. and Emes, M. J. (2007). The effect of G1c6P uptake and its subsequent oxidation within pea root plastids on nitrite reduction and glutamate synthesis. *J. Exp. Bot.* 58, 1109–1118.
24. Brack, A. (2003). Perú: Diez mil años de domesticación. Editorial Bruño. Lima. 160 pp
25. Braun, M., Schmid, H., Grundler, T. and Hülsbergen, K.-J. (2010). Root and shoot growth and yield of different grass-clover mixtures. *Plant Biosystems* 144, 414–419.
26. Broughton, W. J., G. Hernández, M. Blair, S. Beebe, P. Gepts, and J. Vanderleyden. (2003). Beans (*Phaseolus spp.*) - model food legumes. *Plant Soil* 252: 55–128.
27. Burga, C.A. (1978). Canopy architecture, light distribution, and photosynthesis of different dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plant types. Ph.D. Thesis. Michigan State University, East Lansing.
28. Calzada, J. (1982). Métodos estadísticos para la investigación. Editorial Jurídica. Lima. 644 p.
29. Camarena, M. F.; Huaringa, J. A., Mostacero, N. E. (2009). Innovación Tecnológica para el incremento de la producción de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Primera Edición. Universidad Nacional Agraria La Molina – Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica. 232 p.
30. Campillo, R., Urquiaga, S., Undurraga, P., Pino, I., and Boddey, R. M. (2005). Strategies to optimise biological nitrogen fixation in legume/grass pastures in the southern region of Chile. *Plant Soil* 273, 57–67.
31. Canchari, G. (2005). Efecto de aplicación de cepas de *Rhizobium*, bioestimulantes y fertilización en el rendimiento de frijol canario (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de costa central. Tesis para optar el Título de Ing. Agrónomo. UNALM, Lima 2005. 101 p
32. Carmi, A. and Koller D. (1978). Effects of the roots on the rate of photosynthesis in primary leaves of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Photosynthetica* 12:178-184.
33. Carpena, R., Esteban, E., Sarro, M., Penalosa, J., Gárate, A., Lucena, J. and Zornoza, P. (2000). Boron and calcium distribution in nitrogen-fixing pea plants. *Plant Sci.* 151, 163–170.
34. Castro, J. (2008). Efecto del compost y humus con y sin inoculación de *Rhizobium* en el rendimiento de arveja (*Pisum sativum* L.) cv. "Alderman" en Pachacamac. Tesis Ing. Agrónomo. UNALM. Lima – Perú.
35. Catuto SA. 2013. Efecto de inoculación de *Rhizobium* en el crecimiento y nutrición de plántulas de soya, en la zona de Manglaralto, Cantón Santa Elena. Tesis de Grado previa a la obtención del Título de Ingeniero Agropecuario. Universidad Estatal Península de Santa Elena. La Libertad – Ecuador. 78 pp
36. Caudle K.L. y Maricle B.R. (2012). Effects of flooding on photosynthesis, chlorophyll fluorescence, and oxygen stress in plants of varying flooding tolerance. *Transactions of the Kansas Academy of the Science*, 115 (1/2): 5-18.
37. Chacón MI, B Pickersgill, DG Debouck & JS Arias. (2007). Phylogeographic analysis of the chloroplast DNA variation in wild common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Americas. *Pl. Syst. Evol.* 265-266
38. Chanway C. P., Anand R. and Yang H. (2014). Nitrogen Fixation Outside and Inside Plant Tissues, *Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation*, Prof. Takuji Ohyama (Ed.), ISBN: 978-953-51-1216-7, InTech, DOI: 10.5772/57532. Available from: <http://www.intechopen.com/books/advances-in-biology-and-ecology-of-nitrogen-fixation/nitrogen-fixation-outside-and-inside-plant-tissues>
39. Chen, X.-C., Feng, J., Hou, B.-H., Li, F.-Q., Li, Q. and Hong, G.-F. (2005). Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acids Res.* 33, 2540–2548.
40. Chiappe, V. (1981). Requerimientos Ambientales del Frijol. Copias mimeografiadas de la UNALM. Lima- Perú 45pp.
41. CIAT. (1976). Lista descriptiva del Germoplasma de *Phaseolus* spp. Sistema de Producción de Frijol. Informe Anual. Cali – Colombia.
42. CIAT. (1982). Etapas de desarrollo de la planta de frijol común. Cali. 26p.

43. CIAT. (1984). Morfología de la planta de frijol común. Guía de Estudio 2da. Edic. Cali-Colombia, Serie 04SB-09. 47 pp.
44. CIAT. (1988a). Conceptos básicos de la fisiología del frijol. Cali, Colombia. 56p.
45. CIAT. (1988b). Simbiosis Leguminosa-rhizobio. Manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Cali – Colombia. 178p.
46. CIAT. (1989). Dry bean: Physiology of Yield Potential and Stress Tolerance. 89 pp
47. Cooper, J. E. (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Adv. Bot. Res.* 41, 1–62.
48. Crawford M.H. (1998). The origins of native Americans – evidence from anthropological genetics. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom, 308p.
49. Crawford, N. M. and Arst, H. N., Jr (1993). The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. *Annu. Rev. Genetics* 27, 115–146.
50. Crepy M.A. and Casal J.J. (2014). Photoreceptor-mediated kin recognition in plants. *New Phytologist* 205: 329-338
51. Crookston, R.K. and O'Toole J., and Ozhun J.L. (1974). Characterization of the bean pod as a photosynthetic organ. *Crop Sci.* 14:708-712.
52. Cubero, J. I.; Moreno, M.T. (1983). Leguminosas de grano. Ed. Mundi Prensa, Madrid. 359 pp
53. Dalton, D.A. & Kramer, S. (2006). Nitrogen-fixing bacteria in non-legumes. In Springer Netherlands, Dordrecht pp. 105-130
54. Davis S.D. and McCree J.K. (1978). Photosynthetic rate and diffusion conductance as a function of age in leaves of bean plants. *Crop Sci.* 18:280-282.
55. De Oliveira, W. S., Meinhardt, L. W., Sessitsch, A. and Tsai, S. M. (1998). Analysis of *Phaseolus*–*Rhizobium* interactions in a subsistence farming system. *Plant Soil* 204, 107–115.
56. Debouck, D.G. (1994). Bean (*Phaseolus* sp.) Neglected Crop: 1942 from a different perspective. Plant Production and Protection Series N° 26 FAO. Roma-Italia. Pag. 47-62.
57. Debouck D.G. (1999). Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In Common Bean Improvement in the 21st Century. Ed. S R Singh. pp. 25–52. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
58. Debouck D.G. (2000). Biodiversity, ecology and genetic resources of *Phaseolus* beans – Seven answered and unanswered questions. In The Seventh MAFF International Workshop on Genetic Resources. Part. 1. Wild Legumes. pp. 95–123. Tsukuba, Ibaraki, Japan-National Institute of Agrobiological Resources.
59. Dechorgnat, J., Nguyen, C. T., Armengaud, P., Jossier, M., Diatloff, E., Filleur, S. and Daniel-Vedele, F. (2011). From the soil to the seeds, the long journey of nitrate in plants. *J. Exp. Bot.* 62, 1349–1359.
60. Delgado, S. (1985). Systematic of the Genus *Phaseolus* (Leguminosae) in North and Central America. Ph.D. Tesis. The University of Texas at Austin. 363pp.
61. Delgado Salinas A, Bruneau A and Doyle J.J. (1993). Chloroplast phylogenetic studies in New World Phaseolinae (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). *Syst. Bot.* 18, 6–17.
62. Delgado-Salinas, A., Turley, A. Richman, y M. LAVIN. (1999). Phylogenetic analysis of the cultivated and species of *Phaseolus* (Fabaceae). *Systematic Botany* 23: 438–460.
63. Den Herder, G. and Parniske, M. (2009). The unbearable naivety of legumes in symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 491–499.
64. Dénarié, J., Debelle, F., Truchet, G. and Promé, J.-C. (1993). Rhizobium and legume nodulation: a molecular dialogue. In New Horizons in Nitrogen Fixation (R. Palacios, J. Mora and W. E. Newton, eds.), pp. 19–30. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
65. Denison, R. F. and Okano, Y. (2003). Leghaemoglobin oxygenation gradients in alfalfa and yellow sweetclover nodules. *J. Exp. Bot.* 54, 1085–1091.
66. Denison, R. F. and Kiers, E. T. (2004). Why are most rhizobia beneficial to their host plants, rather than parasitic? *Microbes Infect.* 6, 1235–1239.
67. Depret, G. and Laguerre, G. (2008). Plant phenology and genetic variability in root and nodule development strongly influence genetic structuring of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations nodulating pea. *New Phytol.* 179, 224–235.
68. Dixon. R. and Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 621–631.

69. Doyle, J. J., and M. A. Luckow. 2003. The rest of the iceberg: legume diversity and evolution in a phylogenetic context. *Plant Physiology* 131:900–910.
70. Drew, M.C. (1997). Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 223-250
71. Dulanto B, P.A. (1997). Efecto del abonamiento foliar orgánico y mineral del rendimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Japonés y pallar (*Phaseolus lunatus* L.) cv. I-1548 en La Molina. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. UNALM. Lima, Perú. 116 pp
72. Echegoyen, J. (1993). "Humus de lombriz" su efecto sobre *Meloidogyne incognita* y formación de nódulos bacterianos en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Tesis Ing. Agrónomo. UNALM Lima – Perú, 98 pp.
73. Ehrhardt, D.W., Atkinson, EM., and Long, S.R. (1992). Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* 256, 998-1000.
74. El-Hamdaoui, A., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Bonilla, I. and Bolanos, L. (2003). Effects of boron and calcium nutrition on the establishment of the *Rhizobium leguminosarum*-pea (*Pisum sativum*) symbiosis and nodule development under salt stress. *Plant Cell Environ.* 26, 1003–1011.
75. Engelhard, M. (2004). Trehalose and the nitrogen fixing nodule symbiosis of legumes: studies on rhizobia deficient in the trehalose-6-phosphate synthase gene otsA. Tesis para optar el título de Doctor Philosophiae (PhD). Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad de Basel, Boon-Alemania
76. Espinoza, E. (1990). Manejo del Cultivo de Frijol. Lima – Perú 50 pp.
77. Espinoza, AM. (2009). Evaluación de 16 genotipos seleccionados en dos densidades de siembra de frijol Canario cv. Centenario (*Phaseolus vulgaris* L.) por su calidad y rendimiento en condiciones de Costa central. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en la Especialidad de Producción Agrícola. 179 pp
78. Estrada C. E., A. Delgado-Salinas, J. A. Villarreal, L. Scott M., C. Cantú A., and J. García P. (2010). Diversity and Distributional Patterns of Legumes in Northeastern Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 55(3):426-433.
79. Falcón, J. (2001). Efecto de la densidad de siembra y de la fertirrigación NPK en el cultivo de frijol canario molinero bajo sistema de riego por goteo. Tesis. Ing. Agrónomo. UNALM. Lima – Perú.
80. Fan, S.-C., Lin, C.-S., Hsu, P.-K., Lin, S.-H. , and Tsay, Y.-F. (2009) The Arabidopsis nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *Plant Cell* 21, 2750–2761.
81. Farfán A.R.E. (1996). Evaluación de variedades de frijol Castilla (*Vigna unguiculata* L. Walp) en condiciones de costa central. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. UNALM. Lima, Perú. 82 pp
82. Fernández, F. (1990). Efecto de Nodalidad y densidad de siembra en Frijol Castilla (*Vigna unguiculata* L) en condiciones de verano en Costa Central. Tesis Ing. Agrónomo UNALM. Lima – Perú. 78pp.
83. Flores, L. (2002). Evaluación de Catorce Variedades de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L) Tipo Canario Bajo el Sistema de Siembra en Relevo con Algodón en la Costa Central, Tesis Ing. Agrónomo. UNALM. Lima-Perú. 81pp.
84. Flores P, W.E. (2008). Evaluación de cepas de *Rhizobium* en la contribución del rendimiento en el cultivo de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol canario) en el Valle Pativilca, provincia de Barranca. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. UNALM. Lima, Perú. 79 pp
85. Fofana B, du Jar din P and Baudoin J P (2001). Genetic diversity in the Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) as revealed by chloroplast DNA (cpDNA) variations. *Genet. Resour. Crop Evol.* 48, 437–445.
86. Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2012). FAOSTAT. Rome, Italy: FAO.
87. Forde, B. G. (2000). Nitrate transporters in plants, structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1465, 219–235.
88. Franco, A. & de Carvalho, F. (2000). The role of biological nitrogen fixation in land reclamation, agroecology and sustainability of tropical agriculture. En: Transition to Global Sustainability: The Contributions of Brazilian Science. Ed: Rocha-Miranda, C. Academia Brasileira de Ciencias. Rio de Janeiro. Brasil
89. Fraser, DE., and Bidwell RGS. (1974). Photosynthesis and photorespiration during the ontogeny of the bean plant. *Canadian J. Bot.* 52:2561-2570.

90. Fraysse, N., Couderc, F. and Poinso, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270, 1365–1380.
91. Freytag, G. F. and D. G. Debouck. (2002). Review of taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionoideae) in North America, Mexico, and Central America. *Sida, Botanical Miscellany* 23: 1–300.
92. Gage, D.J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 280–300.
93. Galloway, J. N., Townsend, A. R., Erismán, J. W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J. R., Martinelli, L. A., Seitzinger, S. P. and Sutton, M. A. (2008). Transformations of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889–892.
94. Gepts P, Aragão F, de Barros E, Blair MW, Brondani R, Broughton W, Galasso I, Hernández G, Kami J, Lariguet P, McClean P, Melotto M, Miklas P, Pauls P., Pedrosa-Harand A, Porch T, Sánchez F, Sparvoli F, Yu K. (2008). Genomics of *Phaseolus* beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. In: Moore P, Ming R (eds), *Genomics of Tropical Crop Plants*, Springer: pp. 113-143 Pdf version
95. Gepts P, Debouck DG. (1991). Origin, domestication, and evolution of the common bean, *Phaseolus vulgaris*. In: van Schoonhoven A, Voysest O, editors. *Common beans: research for crop improvement*. Oxon (UK): CAB International. p. 7–53.
96. Gepts P. (2002). *Phaseolus vulgaris* (Beans). *Encyclopedia of Genetics*, pp. 1444-1445. Pdf version (© 2001 Academic Press).
97. Gepts P., R. Papa, S. Coulibaly, A. Gonzalez Mejía & R. Pasquet. (2000). Wild legume diversity-insights from molecular methods. In: “Wild legumes”, K. Oono (ed.), Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries (MAFF). National Institute of Agrobiological Resources Tsukuba, Ibaraki, Japan, pp. 19-31.
98. Gepts, P. (1998). Origin and evolution of common bean: past events and recent trends. *HortScience* 33: 1124–1130.
99. Gibson, K. E., Kobayashi, H. and Walker, G. C. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* 42, 413–441.
100. Giller K.E. (2001). *Nitrogen fixation in tropical cropping systems*. CAB Publishing: Wallingford, UK.
101. Gioia T., Logozzo G., Kami J., Spagnoletti ZP. and Gepts P. (2013). Identification and Characterization of a Homologue to the Arabidopsis INDEHISCENT Gene in Common Bean. *Journal of Heredity* 2013:104(2):273–286
102. González M.E. (2012). Estudio de la Diversidad de cepas *Rhizobium* aislados de tres variedades de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis para optar el título de Bióloga, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria La Molina, 102 p.
103. Graham, P. H. and Vance, C. P. (2000). Nitrogen fixation in perspective, an overview of research and extension needs. *Field Crops Res.* 65, 93–106.
104. Gutiérrez, M. (2008). Comportamiento de 6 líneas promisorias de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo canario en siembra de invierno en costa central. Tesis Ing. Agrónomo. UNALM. Lima – Perú.
105. Hagen, M. J. and Hamrick, J. L. (1996). Population level processes in *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*: the role of founder effects. *Mol. Ecol.* 5, 707–714
106. Halford N.G., Curtis T.Y., Muttucumaru N., Postles J., Mottram D.S. (2011). Sugars in crop plants. *Annals of Applied Biology*, 158, 1–25
107. Hambrecht, R., L. Hilbrich, S. Erbs. (2000). Correction of endothelial dysfunction in chronic heart failure: additional effects of exercise training and oral L-arginine supplementation. *Journal of the American College of Cardiology* 35:706–713.
108. Haney, C. H. and Long, S. R. (2010). Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 478–483.
109. Heckathorn, S.A., DeLucia, E.H. and Zielinski, R.E. (1997). The contribution of drought-related decreases in foliar nitrogen concentration to decreases in photosynthetic capacity during and after drought in prairie grasses. *Physiologia Plantarum* 101:173-182.
110. Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaik, H.P., van Kammen, A., and Bisseling, T. (1994). Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* 105,787-797.

- 111.Herridge, D. (ed.) (2002). Inoculants and Nitrogen Fixation of Legumes in Vietnam. ACIAR Proceeding 109e. *Proceedings of a workshop held in Hanoi*, Vietnam 17–18 February 2001
- 112.Hinsinger, P., Plassard, C., Jaillard, B. and Tang, C. X. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. *Plant Soil* 248, 43–59.
- 113.Hirsch, A. M. (1999). Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 320–326.
- 114.Ho, C. H., Lin, S. H., Hu, H. C. and Tsay, Y. F. (2009). *CHLI* functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138, 1184–1194.
- 115.Howieson, J. G., Robson, A. D. and Abbott, L. K. (1992). Acid-tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH, which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. *Aust. J. Plant Physiol.* 19, 287–296.
- 116.Huamán SJR. (1992). Evaluación preliminar del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en condiciones de secano en el valle de Abancay. Tesis Ing. Agrónomo. UNALM. Lima-Perú. 153 p.
- 117.Hungria, M. and Vargas, M. A. T. (2000). Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. *Field Crops Res.* 65, 151–164.
- 118.Hungria, M., Franchini, J. C., Campo, R. J. and Graham, P. H. (2005). The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment* (D. Werner and W. E. Newton, eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 25–42.
- 119.Hunter WJ., Fahring, CJ., Olsen SR. and Porter LK. (1982). Location of nitrate reductase in different soybean cultivars. *Crop Sci.* 22: 944-948.
- 120.IICA. (2008). Guía de identificación y manejo integrado de enfermedades del frijol en América Central. Proyecto Red Sicta. COSUDE. Managua. 37 pp
- 121.Iniestra G.J.J, F.J Ibarra P, J.A Gallegos I, N.E Rocha G y R F González L (2005). «Factores antinutricios y actividad antioxidante en variedades mejoradas de fríjol común (*Phaseolus vulgaris*)», *Rev. Agrociencia*, 39 (6): 603–610.
- 122.Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Climate Change (2007). The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change; Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M., Miller, H.L., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK.
- 123.International Fertilizer Industry Association (IFA). 2010. Fertilizer supply statistics (En línea) (Consulta: 02 de Abril de 2013) Disponible en: <http://www.fertilizer.org/ifa/Home-Page/STATISTICS/Fertilizersupplystatistics>.
- 124.Izquierdo, J. (1982). The effect of accumulation and remobilization of carbon assimilate and nitrogen on abscission, seed development, and yield of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) with differing architectural forms. Ph.D. Thesis, Michigan State University, East Lansing.
- 125.Izquierdo, J. and Hosfield GL. (1981). Ethylene production from bean of flowers and pods. *Ann. Rept. Bean Improv. Crop.* 23: 96-99
- 126.Jämtgård, S., Näsholm, T. and Huss-Danell, K. (2010). Nitrogen compounds in soil solutions of agricultural land. *Soil Biol. Biochem.* 42, 2325–2330.
- 127.Jenkins DJA, Kendall CWC, Marchie A, Jenkins AL, Augustin LSA, Ludwig DS, Barnard ND, Anderson JW (2003) Type 2 diabetes and the vegetarian diet. *Am J Clin Nutr* 78: 610S–616S
- 128.Jones, D. L., Healey, J. R., Willet, V. B., Farrar, J. F. and Hodge, A. (2005). Dissolved organic nitrogen uptake by plants – an important N uptake pathway? *Soil Biol. Biochem.* 37, 413–423.
- 129.Jordan, D. C. (1984). Family III. Rhizobiaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. I, pp. 234–242. Edited by N. R. Krieg & J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins Co.
- 130.Kannenber, E. and Carlson, R. W. (2005). An abundance of Nod factors. *Chem. Biol.* 12, 956–958.
- 131.Kehinde M.O., Olasunkanmi A.G., Damilola A.O. 2015. Chemometric dissimilarity in nutritive value of popularly consumed Nigerian brown and white common beans. *Food Chemistry* 166: 576–584
- 132.Kennedy, I. R., Choudhury, A. T. M. A. and Kecskés, M. L. (2004). Non-symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1229–1244.
- 133.Kiers, E. T., Rousseau, R. A., West, S. A. and Denison, R. F. (2003). Host sanctions and the legume-rhizobium symbiosis. *Nature* 425, 78–81.

134. Kijne, J.W. (1992). The *Rhizobium* infection process. In Biological Nitrogen Fixation, G. Stacey, R.H. Burris, and H.J. Evans, Eds (New York: Chapman and Hall), pp. 349-398.
135. Kohashi S.J. (1996). Aspectos de la morfología y fisiología *Phaseolus vulgaris* L y su relación con el rendimiento. Instituto de Recursos Naturales. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, 42 p.
136. Krapp, A., Fraiser, V., Scheible, W. R., Quesada, A., Gojon, A., Stitt, M., Caboche, M. and Daniel-Vedele, F. (1998). Expression studies of Nrt2:1Np, a putative high-affinity nitrate transporter: evidence for its role in nitrate uptake. *Plant J.* 14, 723–731.
137. Kuang, R. B., Liao, H., Yan, X. L. and Dong, Y. S. (2005). Phosphorus and nitrogen interactions in field-grown soybean as related to genetic attributes of root morphological and nodular traits. *J. Int. Plant Biol.* 47, 549–559.
138. Laing, BRL., Jones PG., and Davis JHC. 1984. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). p. 305-351. In: P.R. Goldsworthy and N.M. Fisher (Eds.). The physiology of tropical field crops. John Wiley & Sons. New York.
139. Lapeyre B., R.A. (1999). Evaluación técnico económico de la siembra de ocho variedades de frijoles amarillos (*Phaseolus vulgaris* L.) en costa central. Tesis Ing. Agrónomo. UNALM. Lima- Perú. 27 p
140. Lavin M., P.S. Herendeen & M.F. Wojciechowski. 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Syst. Biol.* 54 (4): 575-594.
141. Lee, J. A. (1999). The calcicole-calcifuge problem revisited. *Adv. Bot. Res.* 29, 1–30.
142. Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., and Dénarlé, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784.
143. Lewis, G.P. and Schrire, B.D., (2003). Leguminosae or Fabaceae? In: B.B. Klitgaard and A. Bruneau (editors). Advances in Legume Systematics, part 10, Higher Level Systematics, pp 1–3. Royal Botanic Gardens, Kew.
144. Lloret L. y Martínez-Romero E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev Latinoam Microbiol*; 47 (1-2): 43-60
145. López, M. (1986). Comportamiento de 8 variedades de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en los ambientes de la Costa Central del Perú. Tesis Ing. Agrónomo UNALM. Lima – Perú. 95pp.
146. Loqué, D. and von Wirén. N. (2004). Regulatory levels for the transport of ammonium in plant roots. *J. Exp. Bot.* 55, 1293–1305.
147. Ludewig, U. (2006). Ion transport versus gas conduction. Function of AMT/Rh-type proteins. *Transfus. Clin. Biol.* 13, 111–116.
148. Malagoli, P., Lainé, P., Le Deunff, E., Rossato, L., Ney, B. and Ourry, A. (2004). Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv. Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiol.* 134, 388–400.
149. Mallarino, A. P., Wedin, W. F., Goyenola, R. S., Perdomo, C. H. and West, C. P. (1990). Legume species and proportion effects on symbiotic dinitrogen fixation in legume-grass mixtures. *Agron. J.* 82, 785–789.
150. Manrique, S. (1980). Evaluación de 20 generaciones avanzadas de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L) de Grano Negro en siembra de Primavera y Verano en la Costa Central. Tesis Ing. Agrónomo. UNALM Lima – Perú 67pp.
151. Marechal, R., Masherpa, JM & Stainier, F. (1988). Etude du Complexe *Phaseolus-Vigna* (Papilionaceae). *Boissiera* 28, 273 pp
152. Marschner, H. (2012). Mineral nutrition of higher plants. 3 ed. London Academic Press. 651p.
153. Martínez GA. (1994). Experimentación agrícola. Métodos Estadísticos. Universidad Autónoma Chapingo. México
154. Matos C.G. y Zuñiga D.D. (1998). Comportamiento de cepas nativas de rhizobios aisladas de la costa del Perú en dos cultivares de pallar (*Phaseolus lunatus* L.) *Ecología aplicada*, (1): 19-24.
155. Matsubara B.J. (2010). Diversidad fenotípica y molecular de bacterias simbióticas del cultivo del pallar (*Phaseolus lunatus* L) en el valle de Supe- Barranca. Tesis para optar el título de Biólogo. UNALM. Lima, Perú.
156. Mehta, P. Jajoo, A., Mathur, S., and Barthi, S. (2010). Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on Photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 16-20

157. Mellor, R. B., and Werner, D. (1987). Peribacteroid membrane biogenesis in mature legume root nodules. *Symbiosis* 3, 89-114.
158. Meneses, R.; Waaijenberj, H. y Pierola L. (1996). Las leguminosas en la agricultura boliviana, revisión bibliográfica. Editores Cochabamba – Bolivia.
159. Miller, A. J. and Cramer, M. D. (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. *Plant Soil* 274, 1–36.
160. Miller, A. J. and Smith, S. J. (2008). Cytosolic nitrate ion homeostasis, could it have a role in sensing nitrogen status? *Ann. Bot.* 101, 485–489.
161. Miller, A. J., Cookson, S. J., Smith, S. J. and Wells, D. M. (2001). The use of microelectrodes to investigate compartmentation and the transport of metabolized inorganic ions in plants. *J. Exp. Bot.* 52, 541–549.
162. MINAG. Series Históricas de Producción Agrícola- Compendio Estadístico. http://frenteweb.minag.gob.pe/sisca/?mod=consulta_cult Accessed June 2014.
163. Morot-Gaudry, J. F., Job, D. and Lea, P. J. (2001). Amino acid metabolism. In *Plant Nitrogen* (P. J. Lea and J. F. Morot-Gaudry, eds.), pp. 167–211. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
164. Morris, Brad. (2003). Bio-Functional Legumes with Nutraceutical, Pharmaceutical, and Industrial Uses. *Economic Botany* 57(2):254–261.
165. Muslera PE. y Ratera GC. (1984). Praderas y Forrajes. Producción y aprovechamiento. Primera Edición. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. 308-339 pp
166. Mylona, P., Pawlowski, K. and Bisseling, T. (1995). Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, Vol. 7, 869-885.
167. Nap, J.-P., and Bisseling, T. (1990). Developmental biology of a plant prokaryote symbiosis: The legume root nodule. *Science* 250, 948-954.
168. Näsholm, T., Kielland, K. and Ganeteg, U. (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol.* 182, 31–48.
169. Nazoa, P., Vidmar, J. J., Tranbarger, T. J., Mouline, K., Damiani, I., Tillard, P., Zhuo, D. G., Glass, A. D. M. and Tourraine, B. (2003). Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*: responses to nitrate, amino acids and developmental stage. *Plant Mol. Biol.* 52, 689–703
170. Newcomb, E.H., Tandon, S.R., and Kowal, R.R. (1985). Ultrastructural specialization for ureide production in uninfected cells of soybean root nodules. *Protoplasma* 125, 1-12.
171. Nguyen, C. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* Vol.23, pp.375 –396
172. Noa H., C.A. (1992). Evaluación comparativa del rendimiento y sus componentes de 14 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de grano amarillo en siembra de invierno para la costa central. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. UNALM. Lima, Perú. 149 pp
173. Núñez, E.C. (2011). Efecto de dos cepas de *Rhizobium* sp. y microorganismos efectivos en el rendimiento de grano seco de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar canario Centenario en Costa Central. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. UNALM. Lima, Perú. 91 pp
174. O'Hara, G. W. (2001). Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 41, 417–433.
175. Okii D, Tukamuhabwa P, Kami J, Namayanja A, Paparu P, Ugen M, Gepts P. (2014). The genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) germplasm in Uganda. *African Journal of Biotechnology* 29 (35): 2935-2949
176. Oldroyd, G. E. D. and Downie, J. A. (2006). Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 351–357.
177. Olivera, M., Tejera, N., Iridarne, C., Ocana, A. and Lluch, C. (2004). Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiol. Plant.* 121, 498–505.
178. Oik, DC. (2008). Organic forms of soil nitrogen. p. 57-100. In J.S. Schepers and W. R. Raun (co-ed.). Nitrogen in Agricultural Systems. Agronomy Monographs N° 49. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA.
179. Oono, R., Denison, R. F. and Kiers, E. T. (2009). Controlling the reproductive fate of rhizobia: how universal are legume sanctions? *New Phytol.* 183, 967–979.
180. Ortega, M.L. (1991) Bioquímica; en E. Mark Engleman (Editor), Contribuciones al conocimiento de frijol (*Phaseolus*) en México (pp. 101–112). Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.

181. Owen, A. G. and Jones, D. L. (2001). Competition for amino acids between wheat roots and rhizosphere microorganisms and the role of amino acids in plant N acquisition. *Soil Biol. Biochem.* 33, 651–657.
182. Pachico, D. 1989. Trends in world common bean production. In *Bean production problems in the Tropics*. Edited by H.F. Schwartz and M.A. Pastor-Corrales. CIAT, Cali, Colombia. pp. 1-8.
183. Pacyna, S., Schulz, M. and Scherer, H. W. (2006). Influence of sulphur supply on glucose and ATP concentrations of inoculated broad beans (*V. faba minor* L.). *Biol. Fert. Soils* 42, 324–329.
184. Paima, B.R. 2005. Evaluación de una cepa nativa de *Rhizobium sp.* de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) y su interacción con la materia orgánica y los microelementos. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. UNALM. Lima, Perú. 101 pp
185. Palomino, V.R. 2012. Bayesian Analysis of a Linear Mixed Model to Measure the Impact of Climate Change on Yield of Common Bean for the Year 2030 Worldwide. Master's Thesis, University of Puerto Rico, Mayaguez, Puerto Rico.
186. Paredes OM, Gepts P. 1995. Extensive introgression of Middle America germplasm into Chilean common bean cultivars. *Genet Resour Crop Evol.* 42:29–41.
187. Parsons, R. and Sunley, R. J. (2001). Nitrogen nutrition and the role of root-shoot nitrogen signalling particularly in symbiotic systems. *J. Exp. Bot.* 52, 435–443.
188. Pedrosa MM., Cuadrado C., Burbano C., Muzquiz M., Cabellos B., Olmedilla-Alonso B., Asensio-Vegas C. (2015). Effects of industrial canning on the proximate composition, bioactive compounds contents and nutritional profile of two Spanish common dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Food Chemistry* 166, 68–75.
189. Peña-Cabriales. J.J. (2002). La fijación biológica de nitrógeno en A.L. Ed. IMPROSA, SA.de C.V. Inaguato. México. 120 p.
190. Peoples M.B., Ladha J.K. and Herridge D.F. (1995a). Enhancing legume N₂ fixation through plant and soil management. *Plant and Soil* 174, 83–101.
191. Peoples M.B., Herridge D.F. and Ladha J.K. (1995b). Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production? *Plant and Soil* 174, 3–28.
192. Perata, P. and Alpi, A. (1993). Plant responses to anaerobiosis. *Plant Science* 93: 1-17
193. Pérez H.P., Esquivel E.G., Rosales S.R. y Acosta G.J.A. (2002), «Caracterización física, culinaria y nutricional de frijol del altiplano sub-húmedo de México», *Rev. Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 52 (2): 172–180.
194. Perotto, S., Donovan, N., Drobach, B.K., and Brewin, N.J. (1995). Differential expression of a glycosyl inositol phospholipid antigen on the peribacteroid membrane during pea nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8, 560-568
195. Perret, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:180–201.
196. Pimentel, D., Wilson, C., McCullum, C.; Huang, R., Dwen, P., Flack, J., Tran, Q., Saltman, T. & Cliff, B. (1997). Economic and environmental benefits of biodiversity. *Bioscience* 47: 747-757
197. Plauth, M., et al. (1993). Long-term treatment of latent portosystemic encephalopathy with branched-chain amino acids. A double-blind, placebo-controlled crossover study. *Journal of Hepatology* 17:308–314.
198. Porch, Beaver, S. J., Debouck, G. D., Jackson, A. S., Kelly, D. J., & Dempewolf, H. (2013). Use of Wild Relatives and Closely Related Species to Adapt Common Bean to climate Change. *Agronomy*, 3, 433-462.
199. Postgate, J. (1998). Nitrogen fixation. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
200. Pueppke, S. G. and Broughton, W. J. (1999). *Rhizobium sp.* Strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12, 293–318.
201. Quiñones A., M. F. (1995). Adaptación de 36 líneas de frijol Canario (*Phaseolus vulgaris* L.) en costa central. Tesis para optar el título de Ing. Agrónomo. UNALM. Lima, Perú. 140 pp
202. Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E. M. H., Albrektsen, A. S., James, E. K., Thirup, S. and Stougaard, J. (2007). LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *EMBO J.* 26, 3923–3935.
203. Ramírez RJL. (2008). Ensayo preliminar de rendimiento en líneas promisorias de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) tipo Canario en condiciones de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Tesis Ing. Agrónomo. UNALM. Lima-Perú. 82 pp

204. Rasmussen, U. and Nilsson, M. (2002). Cyanobacterial diversity and specificity in plant symbioses. In *Cyanobacteria in Symbiosis* (A. N. Rai, B. Bergman and U. Rasmussen, eds.), pp. 312–328. Kluwer, Dordrecht.
205. Rees, D. C. and Howard, J. B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4, 559–566
206. Rees, D. C., Tezcan, F. A., Haynes, C. A., Walton, M. Y., Andreade, S., Einsle, O. and Howard, J. B. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Phil. Trans. R. Soc. A* 363, 971–984.
207. Relic, B., Taimont, F., Kopcinska, J., Golinowski, W., Promé, J.C., and Broughton, W.J. (1993). Biological activity of *Rhizobium sp.* NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6, 764–774.
208. Ribbe, M., Gadkari, D. and Meyer, O. (1997). N₂ fixation by *Streptomyces thermoautotrophicus* involves a molybdenum-dinitrogenase and a manganese-superoxide oxidoreductase that couple N₂ reduction to the oxidation of superoxide produced from O₂ by a molybdenum-CO dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 272, 26627–26633.
209. Richard-Molard, C., Krapp, A., Brun, F., Ney, B., Daniel-Vedele, F. and Chaillou, S. (2008). Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *J. Exp. Bot.* 59, 779–791.
210. Robles, D. (1982). Evaluación de 25 cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de grano de color en siembra de verano y otoño en Costa Central. Tesis Ing. Agrónomo UNALM. Lima – Perú. 70 pp
211. Rosales, R., Ramírez P., Acosta J. A., Castillo F. & Nelly D. (2000). *Agrociencia* 34: 153-165.
212. Rosenbleuth, M. and Martínez-Romero, E. (2006). Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 827–837.
213. Rossato, L., Laine, P. and Ourry, A. (2001). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus* L. during the growth cycle, nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *J. Exp. Bot.* 52, 1655–1663.
214. Rowlands, D.; Frame, D.J.; Ackerley, D.; Aina, T.; Booth, B.B.B.; Christensen, C.; Collins, M.; Faull, N.; Forest, C.E.; Grandey, B.S.; et al. (2012). Broad range of 2050 warming from an observationally constrained large climate model ensemble. *Nat. Geosci.*, 5, 256–260.
215. Ruíz Varillas, AO. (1982). Evaluación por rendimiento y otras características agronómicas en 25 cultivos de frijol grano rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) para la costa central del Perú. Tesis para optar el título de Ingeniero Agrónomo. UNALM. Lima, Perú. 83 pp
216. Ruiz-Ramírez, Juan. (2010). Eficiencia Relativa y Calidad de los Experimentos de Fertilización en el Cultivo de Caña de Azúcar. *Terra Latinoamericana*, Abril-Junio, 149-154.
217. Sadowsky, M. J. (2005). Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation. In *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment* (D. Werner and W. E. Newton, eds.), pp. 89–112. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
218. Salinas, M.Y., L. Rojas, H.L., E. Sosa, M. y P. Pérez, H. (2005). «Composición de antocianinas en variedades de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas en México», *Rev. Agrociencia*, 39 (4): 385–394.
219. Salsac, L., Chaillou, S., Morotgaudry, J. F. and Lesaint, C. (1987). Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25, 805–812.
220. Santos, B. M., J. A. Dusky, W. M. Stall, D. G. Shilling, and T. A. Bewik. (1998). Phosphorus effect on competitive interactions of smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*) and common purslane (*Portulaca oleracea*) with lettuce (*Lactuca sativa*). *Weed Sci.* 46:307–312.
221. Sarkar, R.P. and Panda, D. (2009). Distinction and characterization of submergence tolerant and sensitive rice cultivars, probed by the fluorescence OJIP rise kinetics. *Functional Plant Biology* 36: 222-233
222. SAS INSTITUTE, INC. (2009). SAS user's guide: basics, version 9.1. SAS Institute, Inc., Cary, North Carolina.
223. Sato H. y Gotoh K. (1983). The phototropic movement and its varietal difference in the leaf of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). M.S. Thesis, Michigan State University.
224. Scheres, B., van Engelen, F., van der Knaap, E., van de Wiel, C., van Kammen, A., and Bisseling, T. (1990). Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. *Plant Cell* 2, 687-700.
225. Schjoerring, J. K., Husted, S., Mäck, G. and Mattsson, M. (2002). The regulation of ammonium translocation in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 883–890.

226. Schmit V, Muñoz J E, du Jardin P, Baudoin J P and Debouck DG. (1995). Phylogenetic studies of some *Phaseolus* taxa on the basis of chloroplast DNA polymorphisms. In *Phaseolus Beans Advanced Biotechnology Research Network. Proceedings of the Second International Scientific Meeting*, 7–10 Sept. 1993, CIAT (Cali, Colombia). Ed. W M Roca, J E Mayer, M A Pastor-Corrales and J Tohme. pp. 69–75.
227. Schmutz J, McClean P, Mamidi S, Wu G, Cannon S, Grimwood J, Jenkins J, Shu S, Song Q, Chavarro C, Torres-Torres M, Geffroy V, Moghaddam SM, Gao D, Abernathy B, Barry K, Blair M, Brick MA, Chovatia M, Gepts P, Goodstein DM, Gonzales M, Hellsten U, Hyten DL, Jia G, Kelly JD, Kudrna D, Lee R, Richard MMS, Miklas PN, Osorno JM, Rodrigues J, Thareau V, Urrea CA, Wan M, Yu Y, Zhang M, Wing RA, Cregan PB, Rokhsar DS, Jackson SA. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics* 46:707-713.
228. Serrano J. y Goñi I. (2004). Papel del frijól negro (*Phaseolus vulgaris*) en el estado nutricional de la población guatemalteca. *Rev. Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 54 (1): 36–46.
229. Shibles, R., Anderson IC. y Gibson AH. (1975). Soybean. p. 151-189. In: L.I. Evans (ed). *Crop physiology some case histories*. Cambridge University Press; Cambridge
230. Shisanya, C.A. (2002). Improvement of drought adapted tepary bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray var. latifolius) yield through biological nitrogen fixation in semi-arid SE-Kenya. *Eur. J. Agron*, 16, 13–24.
231. Sinclair, TR. y de Wit CT. (1976). Analysis of the carbon and nitrogen limitations to soybean yield. *Agron. J.* 68: 319-324
232. Singh S P, Gepts P and Debouck D G (1991). Races of common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae). *Econ. Bot.* 45, 379–396.
233. Singh SP. (ed). (1999). *Common bean improvement in the twenty-first century*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 405 pp
234. Slattery, J. F., Coventry, D. R. and Slattery, W. J. (2001). Rhizobial ecology as affected by the soil environment. *Aust. J. Exp. Agric.* 41, 289–298.
235. Soares-Cordeiro, A.S., Carmo-Silva A.E., da Silva, A., da Silva, J., Keys, A.J., and Arrabaca, M.C. (2009). Effects of rapidly imposed water deficit on photosynthetic parameters of three C4 gases. *Photosynthetica* 47: 304-308
236. Soltis, D. E., P. A. Soltis, D. R. Morgan, S. M. Swenson, B. C. Mullin, J. M. Dowd, and P. G. Martin. (1995). Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic nitrogen fixation in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2647–2651.
237. Somado, E. A., Sahrawat, K. L. and Kuehne, R. F. (2006). Rock phosphate-P enhances biomass and nitrogen accumulation by legumes in upland crop production systems in humid West Africa. *Biol. Fert. Soils* 43, 124–130.
238. Spergel JM & Fiedler JM (2001) Natural history of peanut allergy. *Curr Opin Pediatr* 13: 517–522
239. Sprent, J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.* 174:11–25.
240. Sprent J. I. (2008). 60Ma of legume nodulation. What's new? What's changing? *J. Exp. Bot.* 2008 59: 1081-1084.
241. Sprent, J. I. (2009). *Legume Nodulation: A Global Perspective*. Wiley-Blackwell, Chichester, UK.
242. Sutton J. M., Lea E. J. A., Downie J. A. (1994). The nodulation signaling protein NodO from *Rhizobium leguminosarum biovar viciae* forms ion channels in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 9990–9994
243. Sylvester-Bradley, R. and Kindred, D. R. (2009). Analysing nitrogen responses of cereals to prioritize routes to the improvement of nitrogen use efficiency. *J. Exp. Bot.* 60, 1939–1951.
244. Tanaka A. y Fujita K. (1979). Growth photosynthesis and yield components in relation to grain yield of the field bean. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 59 (2): 145-238
245. Tapia BH., y Camacho HA. (1988). *Manejo integrado en la producción de frijól basado en Labranza Cero*. Primera Edición. GTZ. Managua, Nicaragua. 181 pp.
246. Tavares, F., Santos, C. L. and Sellstedt, A. (2007). Reactive oxygen species in legume and actinorhizal nitrogen-fixing symbioses: the microsymbiont's responses to an unfriendly reception. *Physiol. Plant.* 130, 344–356.
247. Terefework, Z., G. Nick, S. Soumalainen, L. Paulin & K. Lindström. (1998). Phylogeny of *Rhizobium galegae* respect to other rhizobia and agrobacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48:349-356.

248. Toro-Chica, O.; Ocampo, C.H.; Debouck, D.G. (2007). Phaseolin: Variability and reference materials in wild and cultivated common bean. *Annu. Rep. Bean Improv. Coop. (USA)*, 50, 69–70.
249. Trigoso, R. (1970). Algunos factores que afectan la fijación simbiótica del nitrógeno atmosférico. Tesis Magister Scientiae. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. OEA. Turrialba. Costa Rica. 102 pp.
250. Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.C., and Dénarlé, J. (1991). Sulphated lipooligosaccharide signals from *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351, 670–673.
251. Tsai, S. M., R. Bonetti, S. M. Agbala, and R. Rossetto. 1993. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. *Plant Soil* 152:131–138.
252. Tsay, Y. F., Chiu, C. C., Tsai, C. B., Ho, C. H. and Hsu, P. K. (2007). Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett.* 581, 2290–2300.
253. Ugen M.A., H. C. Wien, C. S. Wortmann. 2002. Dry bean competitiveness with annual weeds as affected by soil nutrient availability. *Weed Science*, 50(4):530-535.
254. Unkovich M., Herridge D., Peoples M., Cadisch G., Boddey R., Giller K., Alves B. and Chalk P. 2008. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. ACIAR Monograph No. 136, 258 pp.
255. USDA. National Agricultural Statistics Service (NASS). Crops and Plants [Online]; USDA-NASS: Washington, DC, USA, 2012. Available online: <http://www.nass.usda.gov/> (accessed on 6 Dec 2014).
256. Usher, K. M., Bergman, B. and Raven, J. A. (2007). Exploring cyanobacterial mutualisms. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 38, 255–273.
257. Valladolid, A. 1993. El cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en la costa del Perú. INIA-Proyecto TTA (Transferencia de Tecnología Agropecuaria). Colección INIA. Lima-Perú
258. Valladolid, A., Pantaleon, J., Castillo O. y Aquino J. (1999). Producción de leguminosas de grano para exportación. Programa Promenestras. Comisión para la Promoción de Exportaciones-PROMPEX. Chiclayo. 57 pp
259. Van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J., and Kijne, J.W. (1992). Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257, 70-71.
260. Van Spronsen, F. J., M. van Rijn, and J. Bekhof. (2001). Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine-restricted diets. *American Journal of Clinical Nutrition* 73:153–157.
261. Vance, C. P. (2002). Root–bacteria interactions: symbiotic N₂ fixation. In *Plant Roots: The Hidden Half* (Y. Waisel, A. Eshel and U. Kafkafi, eds.), pp. 839–867. Dekker, New York.
262. Vance, C. P. and Gantt, J. S. (1992). Control of nitrogen and carbon metabolism in root nodules. *Physiol. Plant.* 85, 266–274.
263. Vasse, J., de Billy, F., Camut, S., and Truchet, G. (1990). Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172, 4295–4306.
264. Verma, D.P.S. (1992). Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell* 4, 373–382.
265. Vessey, J. K., Pawlowski, K. and Bergman, B. (2005). Root-based N₂-fixing symbioses: legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant Soil* 274, 51–78.
266. Viktor, A. and Cramer, M. D. (2005). The influence of root assimilated inorganic carbon on nitrogen acquisition/assimilation and carbon partitioning. *New Phytol.* 165, 157–169.
267. Villanueva, A. (2009). Efecto de dos cepas de *Rhizobium* y abono orgánico en el rendimiento de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad canario molinero PLVI/1-3 en condiciones de la molina. Tesis Ing. Agrónomo. UNALM. Lima-Perú. 78 pp.
268. Von Wirén, N. and Merrick, M. (2004). Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. *Topics Curr. Genetics* 9, 95–120.
269. Von Wirén, N., Lauter, F. R., Ninnemann, O., Gillissen, B., Walch-Liu, P., Engels, C., Jost, W. and Frommer, W. B. (2000). Differential regulation of three functional ammonium transporter genes by nitrogen in root hairs and by light in leaves of tomato. *Plant J.* 21, 167–175
270. Voroney P. and Derry D. (2008). Origin and Distribution of Nitrogen in Soil. p. 1-30. In J.S. Schepers and W. R. Raun (co-ed.). Nitrogen in Agricultural Systems. Agronomy Monographs N° 49. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA.

271. Voyses, O. (2000). Mejoramiento Genético del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Legado de Variedades de América Latina 1930- (1999)/ Osvaldo Voyses. Cali, Valle, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
272. Voyses, O., M.C. Valencia, and M.C. Amezcuita. (1994). Genetic diversity among Latin American Andean and Mesoamerican common bean cultivars. *Crop Sci.* 34:1100–1110.
273. Voyses, O. (1979). Resultados de 1er. Vivero Internacional de Rendimiento y Adaptación de Frijol (*Phaseolus vulgaris* L). CIAT. Cali. Colombia.
274. Wallace, D. (1985). Physiological Genetics of plant maturity adaptation and yield. *Plant Breeding Reviews* 3: 21-167
275. Weeden N F, Muehlbauer F J and Ladizinsky G. (1992). Extensive conservation of linkage relationships between pea and lentil genetic maps. *J. Hered.* 83, 123–129.
276. Weerasinghe, R.R., Bird, D. McK., and Allen, N.S. (2005). Root-knot nematodes and bacterial Nod factors elicit common signal transduction events in *Lotus japonicus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 3147-3152.
277. Werner, D. (2005). Production and biological nitrogen fixation of tropical legumes. In *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment* (D. Werner and W. E. Newton, eds.), pp. 1–13, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
278. West, S. A., Kiers, E. T., Simms, E. L. and Denison, R. F. (2002). Sanctions and mutualism stability: why do rhizobia fix nitrogen? *Proc. R. Soc. Lond. B* 269, 685–694.
279. Westermann, L., Porter K. y D'Deen WA. (1985). Nitrogen partitioning and mobilization patterns in bean plants. *Crop Sci.* 25: 225-229
280. White, J. W., Prell, J., James, E. K. and Poole, P. (2007). Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* 144, 604–614.
281. White, JM. (1981). A quantitative analysis of the growth and development of bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.). PhD Thesis. University of California, Berkeley
282. Willems, A. (2006). The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil* 287, 3–14.
283. Wit, CT-de et al. (1979). Stimulation of assimilation, respiration and transpiration of crops. Pudoc; Wageningen. 140 pp.
284. Wortmann, C. S. (1993). Contribution of bean morphological characteristics to weed suppression. *Agron. J.* 85:840–843.
285. Wortmann, C. S., R. A. Kirkby, and C. A. Eledu. (1998). Atlas of Common Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) Production in Africa. CIAT Publication No. 297. Cali, Colombia.
286. Yang, W.-C., de Blank, C., Meskiene, I., Hirt, H., Bakker, J., van Kammen, A., Franssen, H., and Bisselng, T. (1994). *Rhizobium* Nod factors reactivate the cell cycle during infection and nodule primordium formation, but the cycle is only completed in primordium formation. *Plant Cell* 6, 1415-1426.
287. Young JPW. (1996). Phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Plant and Soil* 186: 45-52
288. Young, J.M., L.D. Kuykendall, E. Martinez-Romero, A. Kerr & H. Sawada. (2001). A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:89-103.
289. Yuan, L., Loqué, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., Takahashi, H. and von Wirén, N. (2007). The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *Plant Cell* 19, 2636–2652.
290. Zavaleta, J. (1992). Evaluación de efectos de fertilización nitrogenada sobre la actividad de nitrogenasa y la nitrato reductasa en (*Phaseolus vulgaris* L.) Canario corriente. Tesis Ing. Agrónomo UNALM Lima – Perú. 72-78 p.
291. Zehr, J. P., Jenkins, B. D., Short, S. M. and Steward, G. E. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5, 539–554.
292. Zhao, Y., Bian, S. M., Zhou, H. N. and Huang, J. F. (2006). Diversity of nitrogenase systems in diazotrophs. *J. Integr. Plant Biol.* 48, 745–755.
293. Zollinger, R. K. and J. J. Kells. 1992. Perennial sowthistle (*Sonchus arvensis*) interference in soybean (*Glycine max*) and dry edible bean (*Phaseolus vulgaris*). *Weed Technol.* 7:52–57.

FOTOS

Foto 1. Nódulos de la variedad Blanco Molinero



Foto 2. Vainas de la variedad Blanco Molinero



Foto 3. Vaina que contiene 6 semillas de la variedad Blanco Molinero



Foto 4. Nódulos distribuidos en toda la masa radicular en la variedad Canario Centenario



Foto 5. Nódulos en todas partes de la raíz de la variedad Canario Centenario

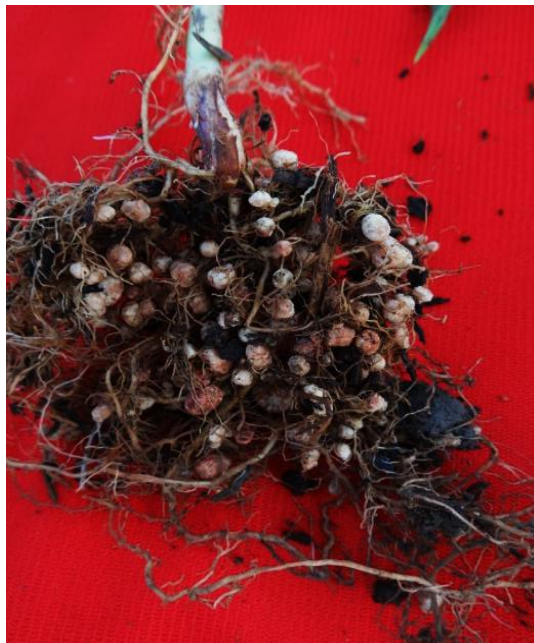


Foto 6. Vista lateral del campo experimental de la variedad Canario Centenario



Foto 7. Nódulos distribuidos en las raíces laterales de la variedad Canario CIFAC



Foto 8. Peso de los nódulos de la variedad Canario CIFAC



Foto 9. Vista frontal del campo experimental de la variedad Canario CIFAC



Foto 10. Vista a nivel del suelo de la variedad Rojo Molinero



Foto 11. Etapa de llenado de vainas de la variedad Rojo Molinero



Foto 12. Vainas de la variedad Rojo Molinero



ANEXOS

ANEXO 1

ESTADÍSTICAS DEL CULTIVO DE FRIJOL EN EL AÑO 2013

DEPARTAMENTOS	Producción (Tn)	%	Superficie cosechada (ha)	%	Rendimiento (t.ha ⁻¹)	Precio en chacra (S/.x kg)
AMAZONAS	6154	6.62	9039	11.13	681	4.01
ANCASH	1605	1.73	1331	1.64	1206	4.74
APURÍMAC	7404	7.97	4197	5.17	1764	3.47
AREQUIPA	9641	10.37	5343	6.58	1804	5.25
AYACUCHO	2356	2.53	2144	2.64	1099	3.38
CAJAMARCA	15070	16.21	18494	22.77	815	2.69
CUZCO	2853	3.07	1895	2.33	1505	2.8
HUANCAVELICA	7567	8.14	5013	6.17	1509	3.79
HUÁNUCO	9451	10.17	6514	8.02	1451	3.79
ICA	784	0.84	405	0.50	1936	5.45
JUNÍN	5304	5.71	4207	5.18	1261	2.79
LA LIBERTAD	4038	4.34	2969	3.66	1360	3.5
LAMBAYEQUE	1159	1.25	1470	1.81	788	3.19
LIMA	1936	2.08	1011	1.24	1915	5.4
LIMA METROPOLITANA	706	0.76	232	0.29	3044	4.6
LORETO	4749	5.11	4434	5.46	1071	1.77
M. DE DIOS	287	0.31	356	0.44	805	3.48
MOQUEGUA	230	0.25	94	0.12	2451	5.11
PASCO	1266	1.36	826	1.02	1533	2.34
PIURA	3434	3.69	5136	6.32	669	3.25
PUNO	398	0.43	362	0.45	1098	1.79
SAN MARTIN	4924	5.30	4723	5.81	1043	4.22
TUMBES	5	0.01	4	0.00	1191	2.67
UCAYALI	1631	1.75	1031	1.27	1582	2.4
TOTAL NACIONAL	92952	100	81230	100	1144	3.52

ANEXO 2

Valores de los coeficientes de correlación entre las variables morfofisiológicas, de nodulación y rendimiento en los tratamientos del experimento en frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*)

CARÁCTER	ALT	PFF	PFR	PSF	PSR	NN	TAM	PFN	PSN	NVP	NGV	PCIEN	IC	RKGHA
ALT	-	0.623**	0.223 ns	0.627**	0.522**	-0.042ns	0.225ns	-0.057ns	-0.108ns	0.614**	0.441**	0.077ns	0.017ns	0.563**
PFF	0.623**	-	0.515**	0.923**	0.409**	-0.036ns	0.036ns	0.067ns	0.047ns	0.605**	0.498**	0.039ns	-0.017ns	0.600**
PFR	0.223 ns	0.515**	-	0.613**	0.648**	0.056ns	0.142ns	0.320*	0.117ns	0.415**	0.362*	-0.055ns	0.107ns	0.406**
PSF	0.627**	0.923**	0.613**	-	0.653**	0.030ns	0.123ns	0.101ns	0.059ns	0.694**	0.514**	0.006ns	0.049ns	0.643**
PSR	0.522**	0.409**	0.648**	0.653**	-	-0.064ns	0.372**	-0.122ns	-0.235ns	0.551**	0.227ns	-0.148ns	0.139ns	0.377**
NN	-0.042ns	-0.036ns	0.056ns	0.030ns	-0.064ns	-	0.228ns	0.575**	0.753**	0.083ns	0.098ns	-0.004ns	0.103ns	0.084ns
TAM	0.225ns	0.036ns	0.142ns	0.123ns	0.372**	0.228ns	-	0.157ns	0.083ns	0.100ns	-0.059ns	-0.437**	-0.046ns	-0.097ns
PFN	-0.057ns	0.067ns	0.320*	0.101ns	-0.122ns	0.575**	0.157ns	-	0.847**	-0.013ns	0.184ns	-0.007ns	0.032ns	0.075ns
PSN	-0.108ns	0.047ns	0.117ns	0.059ns	-0.235ns	0.753**	0.083ns	0.847**	-	0.013ns	0.115ns	-0.041ns	0.013ns	0.055ns
NVP	0.614**	0.605**	0.415**	0.694**	0.551**	0.083ns	0.100ns	-0.013ns	0.013ns	-	0.608**	0.054ns	-0.011ns	0.896**
NGV	0.441**	0.498**	0.362*	0.514**	0.227ns	0.098ns	-0.059ns	0.184ns	0.115ns	0.608**	-	0.054ns	0.165ns	0.813**
PCIEN	0.077ns	0.039ns	-0.055ns	0.006ns	-0.148ns	-0.004ns	-0.437**	-0.007ns	-0.041ns	0.054ns	0.054ns	-	-0.220ns	0.318*
IC	0.017ns	-0.017ns	0.107ns	0.049ns	0.139ns	0.103ns	-0.046ns	0.032ns	0.013ns	-0.011ns	0.165ns	-0.220ns	-	0.015ns
RKGHA	0.563**	0.600**	0.406**	0.643**	0.377**	0.084ns	-0.097ns	0.075ns	0.055ns	0.896**	0.813**	0.318*	0.015ns	-

ANEXO 3

Análisis fisicoquímico del suelo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
 LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



ANALISIS DE SUELOS : CARACTERIZACION

Solicitante : HECTOR CANTARO

Departamento : LIMA
 Distrito : LA MOLINA
 Referencia : H.R. 40611-052C-13

Provincia : LIMA
 Predio : CAMPO GUAYABO I
 Fecha : 18/06/13

Número de Muestra		pH (1:1)	C.E. (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cationes Cambiables					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
Lab	Claves							Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca ⁺²	Mg ⁺²	K ⁺	Na ⁺	Al ⁺³ + H ⁺			
8435		7.92	0.35	1.80	1.07	10.7	176	51	32	17	Fr.	11.20	9.15	1.40	0.57	0.08	0.00	11.20	11.20	100

A = Arena ; A.Fr. = Arena Franca ; Fr.A. = Franco Arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = Franco Limoso ; L = Limoso ; Fr.Ar.A. = Franco Arcillo Arenoso ; Fr.Ar. = Franco Arcilloso ; Fr.Ar.L. = Franco Arcillo Limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = Arcillo Limoso ; Ar. = Arcilloso



Ing. Brailio La Torre Martínez
 Jefe del Laboratorio