

UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Evaluación de fijación simbiótica de nitrógeno para la identificación de genotipos promisorios en fríjol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.)

Norma Constanza Barbosa Torres

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Posgrados
Palmira, Colombia
2016

Evaluación de fijación simbiótica de nitrógeno para la identificación de genotipos promisorios en fríjol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.)

Norma Constanza Barbosa Torres

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Director

Ph.D. Idupulapati M. Rao

Codirector

M.sc. Daniel Gerardo Cayón

Línea de Investigación:

Fisiología de Cultivos.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela de Posgrados
Palmira, Colombia
2016

Lema

"No pretendamos que las cosas cambien si siempre hacemos lo mismo.

La creatividad nace de la angustia como el día nace de la noche.

Es en la crisis que nace la inventiva, los descubrimientos y las grandes estrategias.

Quien supera la crisis se supera a sí mismo sin quedar "superado"

Albert Einstein

Agradecimientos

Idupulapati M. Rao, por su dirección en este trabajo, por compartir su conocimiento y ser el Ejemplo a seguir en la ciencia.

Steve Beebe por acogerme profesionalmente en el programa de frijol, y darme la oportunidad para hacer este sueño realidad.

Gerado Cayón, por su dirección, apoyo, y enseñanzas durante mi formación académica y el desarrollo de mis trabajos de grado.

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) por acogerme durante estos años, disfrutar de sus beneficios y reconocimiento. Al Fondo de Capacitación del CIAT y CRECIAT por brindarme el apoyo financiero y el tiempo para realizar esta maestría.

Al Grupo consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR) y la fundación Bill and Melinda Gates, por el financiamiento del proyecto, enmarcado en el CRP 3.5 *Grain Legumes, strategic objective 2: Identifying and promoting crop and pest management practices for sustainable legume production. Output 3.1 strategies to optimize Biological Nitrogen Fixation by legumes. Product Line 4: Symbiotic Nitrogen Fixation in common bean.*

A mis colegas Neuza Asakawa, Elizabeth Portilla, Héctor Fabio Buendía, José Polania, Cesar Cajiao, Mariela Rivera y por su apoyo y asistencia profesional.

A mi familia, mis padres, Tía Chela y Mi Wilder amado, por su apoyo, compañía, ánimo y paciencia.

Resumen

Las deficiencias de Nitrógeno (N) afectan cerca del 40% de la producción de frijol común en el mundo, causando pérdidas de alrededor de 60% en rendimiento. Es sabido que los frijoles de hábito voluble tienen una mayor habilidad para fijar N atmosférico que los frijoles de tipo arbustivo, a través de Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN). Uno de los principales factores en la eficiencia de FSN es el genotipo de la planta. Los objetivos principales de este estudio fueron: i) cuantificar la variación genotípica de la habilidad en FSN; ii) identificar genotipos promisorios de frijol voluble en FSN que combinen con buen rendimiento y puedan servir como padres en el programa de mejoramiento genético y iii) validar el uso de ^{15}N en grano como metodología para la cuantificación de FSN. Un total de 100 genotipos de frijol voluble fueron evaluados en su habilidad FSN. Los ensayos fueron realizados en dos localidades en Colombia (Darién y Popayán) con inoculación de *Rhizobium tropici* cepa CIAT 899 además de suministro óptimo de agua y nutrientes excepto N. Las determinaciones incluían la evaluación visual de nodulación, determinación de abundancia natural de ^{15}N en biomasa de copa y grano, % N derivado de la atmósfera (%Ndfa), N total fijado por hectárea (Ndfa total), biomasa aérea, N total derivado del suelo (Ndfs), uso eficiente de N (NUE), índice de particionamiento de N (NPI) e índice de cosecha de vaina. Diferencias significativas fueron observadas en la habilidad en FSN entre genotipos. Las líneas promisorias identificadas presentaron hasta 4.6 Mg ha^{-1} de rendimiento soportado por 60% de Ndfa equivalente a $92 \text{ kg de N fijado ha}^{-1}$ sin aplicación de fertilización nitrogenada al suelo. Cinco (5) genotipos fueron identificados como promisorios ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21 and CGA 10, estas líneas servirán como padres en el programa de mejoramiento genético. Por otro lado, se valida el uso de grano para esta determinación con una correlación positiva y altamente significativa entre las dos metodologías. Por lo tanto, se valida el uso de grano para estimar Ndfa en cambio de Ndfa a partir de biomasa aérea, para determinar la capacidad FSN. Esta metodología ayudará a los programas de mejoramiento genético a identificar fácilmente genotipos con habilidades superiores en este atributo.

Palabras clave: Frijol voluble, fijación simbiótica de nitrógeno, rendimiento, uso eficiente del nitrógeno, nitrógeno derivado de la atmósfera y nodulación.

Abstract

Nitrogen (N) deficiency affects about 40% of the common bean producing regions causing yield losses up to 60%. Symbiotic Nitrogen Fixation (SNF) – through association with root-nodulating rhizobia for the uptake of atmospheric N – contributes to improve grain yield. Climbing bean is known to be superior to bush bean in its potential for SNF ability. One of the main factors determining the efficiency of SNF is the plant genotype. The three main objectives of this study were to: (i) quantify genotypic variability in SNF ability of climbing bean; (ii) identify genotypes that combine high SNF ability with high yield potential that could serve as parents in the breeding program and iii) validate the use of ^{15}N natural abundance in grain as a selection method to quantify SNF ability. A total of 100 genotypes of climbing bean including 89 ENF (disease resistant) lines and 11 checks were evaluated for SNF ability. Field trials were conducted at two locations (Darien and Popayán) in Colombia. Both trials received *Rhizobium* inoculum and adequate nutrients except N fertilizer. Measurements included visual evaluation of root nodulation, ^{15}N natural abundance ($\delta^{15}\text{N}$) in shoot tissue and grain, %N derived from the atmosphere (%Ndfa), total Ndfa, canopy biomass, total N uptake, N use efficiency, N partitioning index and pod harvest index. Significant phenotypic differences were observed in SNF ability between genotypes. Good yielding genotypes with grain yield as high as 4.6 Mg ha^{-1} fixed as much as 60% of their total N from the atmosphere (TNdfa) which is estimated to be up to $92 \text{ kg of N ha}^{-1}$ without application of N fertilizer to soil. Based on phenotypic evaluation from both locations, five lines (ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21 and CGA 10) were identified as promising for further testing and use as parents in the breeding program. Phenotypic variation in SNF ability is usually estimated using $\delta^{15}\text{N}$ of shoot tissue rather than $\delta^{15}\text{N}$ of grain tissue. We tested the relationship between $\delta^{15}\text{N}$ of grain vs $\delta^{15}\text{N}$ of shoot at both locations. We found positively significant relationship between the two methods. Thus using grain samples to determine SNF ability helps the breeding programs to select for genotypes with superior SNF ability.

Keywords: Climbing bean, symbiotic nitrogen fixation, grain yield, nitrogen use efficiency, nitrogen derived from atmosphere and nodulation.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XVII
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XIX
Introducción	1
Objetivos.....	4
Hipótesis.....	4
1. Estado actual.....	5
1.1 Frijol Común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	5
1.2 Frijol Voluble tipo IV	8
1.3 Fijación Simbiótica de N.....	9
1.4 Nitrogenasa y mecanismo de acción.....	11
1.5 Infección, Nodulación y el proceso de FSN	12
1.6 Métodos de Cuantificación de Fijación Simbiótica de Nitrógeno.....	13
1.6.1 Medida de la actividad de la Nitrogenasa – Método de reducción de acetileno.....	14
1.6.2 Medida de balance de Nitrógeno	14
1.6.3 Métodos de Abundancia Natural de ¹⁵ N y determinación de % Ndfa.....	15
1.7 Potencial de Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) en frijol voluble	17
1.8 Validación de Metodología grano para cuantificar FSN	18
1.9 Características para evaluar la respuesta de la planta a FSN	19
1.9.1 Uso eficiente de N (NUE).....	19
1.9.2 Particionamiento de N (%NPI)	20
1.9.3 Biomasa y Movilización de fotoasimilados.	20
1.10 Factores abióticos que afectan el proceso de FSN.....	21
1.10.1 Sequía	22
1.10.2 Efecto de concentraciones altas de N edáfico en FSN.....	22
1.10.3 Efecto de deficiencias de fósforo (P) en FSN.....	25
1.10.4 Efecto de deficiencias nutricionales de Fe, Mo, Ca.....	25
2. Metodología.....	27
2.1 Localización y condiciones experimentales.....	27

2.2	Diagnóstico de línea base.....	28
2.3	Material Vegetal.....	28
2.4	Inoculación con Rhizobium cepa CIAT 899.....	29
2.5	Diseño experimental.....	29
2.6	Determinación de Fijación Simbiótica de Nitrógeno.....	29
2.7	Determinación de B valor ensayo en invernadero.....	31
2.8	Medidas fisiológicas y variables complementarias.....	32
2.9	Validación de Resultados Nodulación y Ndfa en invernadero de genotipos promisorios y no promisorios en FSN identificados en campo.....	33
2.10	Análisis estadístico.....	33
3.	Resultados.....	35
3.1	Diagnóstico de la línea base del suelo.....	35
3.2	Habilidad de fijación simbiótica de nitrógeno.....	38
3.2.1	Nodulación.....	38
3.2.2	Nitrógeno derivado de la atmosfera (%Ndfa).....	40
3.2.3	Nitrógeno derivado de la atmosfera % Ndfa y el rendimiento de grano.....	42
3.2.4	Nitrógeno total derivado de la atmosfera TNdfa (kg N ha ⁻¹) y el rendimiento de grano. 44	44
3.2.5	Nitrógeno total derivado del suelo TNdfs (kg N ha ⁻¹) y el rendimiento de grano. 45	45
3.2.6	Fijación Simbiótica de Nitrógeno y extracción de N en biomasa aérea y grano. 46	46
3.2.7	Índice de eficiencia de uso e índice de particionamiento de nitrógeno.....	48
3.2.8	Fijación Simbiótica de nitrógeno y producción de biomasa aérea.....	49
3.3	Análisis Multivariado Componentes Principales (PCA) y biplots.....	51
3.3.1	Análisis multivariado componentes principales CP.....	51
3.4	Análisis de Biplots.....	53
3.4.1	Análisis de clúster localidad Darién.....	53
3.4.1.1	Clúster #3:.....	53
3.4.1.2	Clúster #2:.....	54
3.4.1.3	Cluster #1:.....	55
3.4.2	Análisis de clúster localidad de Popayán.....	57
3.5	Validación de resultados FSN en Invernadero.....	60
3.6	Validación del uso de ¹⁵ N abundancia natural a partir de grano.....	63
4.	Discusión.....	67
4.1	Diferencias en la habilidad FSN entre localidades y genotipos.....	67
4.2	Validación de estimación de Ndfa a partir de grano y diferencias en abundancia natural ¹⁵ N en biomasa aérea y grano.....	71
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	73
5.1	Conclusiones.....	73
5.2	Recomendaciones.....	74
A.	Anexo: Phenotyping Common Beans for Symbiotic Nitrogen Fixation (SNF): Protocol for field evaluation.....	75
Bibliografía.....		91

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1. Representación esquemática Ilustración de los hábitos de crecimiento y etapas de desarrollo fenológico en frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	8
Figura 1-2. Catalizada por Nitrogenasa. Ferredoxina reduce Fe proteína. Unión e hidrolisis de ATP. La proteína Fe reduce la Mofe proteína, y la proteína Mofe reduce la N ₂	11
Figura 1-3. El proceso de infección durante la organogénesis nódulo. B. Modelo esquemático de la estructura de un nódulo indeterminado y del desarrollo de los simbiomas, epidermis, córtex interno, tejido vascular. 1-2 Formación del bacteroide, 3 procesos de diferenciación del simbioma y 4 simbiomas maduros.....	13
Figura 1-4. Ilustración de Abundancia Natural de $\delta^{15}\text{N}$ para la estimación de Fijación Simbiótica de Nitrógeno A. Valor igual a cero (0 %) para planta fijadora dependiente 100% de N atmosférico B. Planta con fijación intermedia C. Planta totalmente dependiente del N del suelo con $\delta^{15}\text{N}$ en tejido cercano o igual al valor del suelo.	15
Figura 1-5. Modelo esquemático de la Autorregulación de la Nodulación (AON). La percepción del factor Nod rizobial (1) inicia la infección y la Nodulación, sino que también genera un inhibidor de larga distancia desde la raíz (2). LjCLE-RS1 y -RS2 son péptidos que reciben la señal. Esta señal se transporta a la sesión y provoca la producción de la señal derivada a la parte aérea (3). Las quinasas de tipo receptor LLR (LjHAR1 / GmNARK / MtSUNN / PsSYM29) y KLAVIER median este proceso. La señal derivada a la parte aérea se transloca a la raíz donde se reprime la Nodulación TML / RDH1 (4). PsNOD3 y MtRDN en la raíz truncan la Nodulación (Cuchi et al., 2010).	24

Figura 3-1. Mapeo para definición de línea base antes del establecimiento del ensayo. A. Población de rhizobium en suelo por punto de muestreo UFC/ g suelo 37

Figura 3-2. Mapeo para definición de línea base antes del establecimiento del ensayo. B. Concentración de P disponible en mg kg⁻¹ 37

Figura 3-3. Mapeo para definición de línea base antes del establecimiento del ensayo. C. Concentración de Nitratos mg/ kg. 38

Figura 3-4. Habilidad en nodulación según escala 1-9 para para los 100 genotipos de frijol voluble en las dos localidades A. Nodulación en la localidad de Darién B. Nodulación en la localidad de Popayán..... 39

Figura 3-5. Apariencia de nodulación y vigor de biomasa aérea entre genotipos contrastantes para nodulación A. Genotipo ENF 28 alta nodulación, promisorio para ambas localidades B. Genotipo ENF 81, baja nodulación..... 40

Figura 3-6. La identificación de genotipos que combinan una mayor % Ndfa con el rendimiento de grano (kg / ha) cultivadas en un Inceptisol en Darién en 2014 y Popayán en 2015. Los datos de $\delta^{15}\text{N}$ de grano fueron utilizados para estimar %Ndfa. Los genotipos con valores más altos de rendimiento de grano y %Ndfa fueron identificados en el cuadrante superior derecho. Genotipos marcados en rojo mostraron capacidad FSN superiores en ambos lugares. Genotipos marcados en azul eran pobres en su capacidad FSN en ambos lugares..... 44

Figura 3-7. La identificación de genotipos que combinan un mayor Ndfa Total expresado en kg N fijado ha⁻¹ con el rendimiento de grano (kg ha⁻¹) cultivadas en un Inceptisol en Darién en 2014 y Popayán en 2015. Los datos de $\delta^{15}\text{N}$ de grano fueron utilizados para estimar %Ndfa y con ello Ndfa total. Los genotipos con valores más altos de rendimiento de grano y Ndfa total fueron identificados en el cuadrante superior derecho. Genotipos marcados en rojo mostraron capacidad FSN superiores en ambos lugares. Genotipos marcados en azul eran pobres en su capacidad FSN en ambos lugares 45

Figura 3-8. . La identificación de genotipos que combinan un mayor Ndfs Total expresado en kg N fijado desde el suelo por ha⁻¹ con el rendimiento de grano (kg ha⁻¹) cultivadas en un Inceptisol en Darién en 2014 y Popayán en 2015. Los datos de δ¹⁵N de grano fueron utilizados para estimar Ndfs total. Los genotipos con valores más altos de rendimiento de grano y Ndfa total fueron identificados en el cuadrante superior derecho. Genotipos marcados en rojo mostraron capacidad FSN superiores en ambos lugares. Genotipos marcados en azul eran pobres en su capacidad FSN en ambos lugares 46

Figura 3-9. La identificación de genotipos que combinan una mayor N total derivado de la atmósfera (TNdfa) en kg de N por hectárea con NUE cultivadas en un Inceptisol en Darién 2014 y en Popayán en 2015. Los genotipos con valores más altos de y TNdfa fueron identificados en el cuadrante superior derecho. Genotipos marcados en rojo mostraron capacidad FSN superiores en ambos lugares. Genotipos marcados en azul eran pobres en su capacidad FSN en ambos lugares 49

Figura 3-10. La identificación de genotipos que combinan una mayor Biomasa de parte aérea (SB) en kg de N por hectárea cultivados en un Inceptisol en Darién 2014 y en Popayán en 2015. Los genotipos con valores más altos de SB y TNdfa fueron identificados en el cuadrante superior derecho. Genotipos marcados en rojo mostraron capacidad FSN superiores en ambos lugares. Genotipos marcados en azul eran pobres en su capacidad FSN en ambos lugares..... 50

Figura 3-11. Variables de FSN , biomasa y rendimiento representadas en Biplots de 100 genotipos de frijol voluble establecidos en la localidad de Darién (2014). Los clúster o agrupamientos se identifican por colores y la magnitud de los vectores indica el CP de cada variable. 56

Figura 3-12. Variables de FSN biomasa y rendimiento representadas en Biplots de 100 genotipos de frijol voluble establecidos en la localidad de Popayán (2015). Los clúster o agrupamientos se identifican por colores y la magnitud de los vectores indica el CP de cada variable. 60

Figura 3-13. Validación de habilidad en FSN en sustrato arena cuarzo estéril de genotipos identificados como promisorios y no promisorios en campo en campo. A. Contrastes de vigor de planta entre genotipos promisorios en FSN CGA 10 y No promisorios ENF 81. B. Contraste en apariencia de Nodulación genotipos promisorios ENF 235 y no promisorio ENF 81.....62

Figura 3-14. Contenidos de Clorofila en genotipos promisorios y no promisorios en FSN durante todo el ciclo de cultivo 63

Figura 3-15. Relación entre $\delta^{15}\text{N}$ de biomasa aérea y $\delta^{15}\text{N}$ a partir de grano de 100 genotipos en ambas localidades. Genotipos promisorios en habilidad FSN fueron marcados con color rojo. Genotipos no promisorios fueron marcados con color azul..... 65

Lista de tablas

Pág.

Tabla 3-1. Caracterización de suelos en cuanto a cantidad de Nitrógeno, %Materia Orgánica, fosforo disponible NPM de <i>Rhizobium</i> en Darién y Popayán 2014.....	36
Tabla 3-2. Promedios y rangos asociados a Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) en 100 genotipos de frijol voluble desarrollado en Darién 2014 y Popayán 2015	41
Tabla 3-3. Coeficientes de correlación (r) entre % Nitrógeno derivado de la atmosfera estimado usando tejido de parte aérea (%Ndfa-SH), % Nitrógeno derivado de la atmosfera usando tejido de grano (%Ndfa-G).Nitrógeno Total derivado de la atmosfera en kg N ha ⁻¹ usando grano (TNdfa-G), Nitrógeno total derivado del suelo en kg N ha ⁻¹ usando grano (TNdfs-G), Nitrógeno total en grano kg N ha ⁻¹ (N total G), Uso Eficiente del Nitrógeno en kg de grano producido por N asimilado en parte aérea kg.kg-1 (NUE), Biomasa de copa kg ha ⁻¹ (SB) and Rendimiento en kg ha ⁻¹ (GY) de 100 líneas de frijol voluble establecidas en Darién y Popayán Colombia en 2014 and 2015.....	47
Tabla 3-4. Nod: Evaluación visual de Nodulación , CB: biomasa aérea, NG: N total en grano (kg ha ⁻¹), Nsh: N total en biomasa aérea (kg ha ⁻¹), %Ndfa-G: % N derivado de la atmosfera usando grano, TNdfa-Sh: N total fijado derivado del aire a partir de biomasa aérea (kg N ha ⁻¹), TNdfs-Sh: N total derivado del suelo a partir de biomasa aérea (kg N ha ⁻¹), TNdfa-G: N total fijado derivado del aire a partir de grano (kg N ha ⁻¹), TNdfs-G: N total derivado del suelo a partir de grano (kg N ha ⁻¹), GY: rendimiento (kg ha ⁻¹), NUE: Uso eficiente del Nitrógeno (kg g kg N ⁻¹), NPI: Índice de particionamiento del nitrógeno and PHI: Índice de cosecha de vaina.	52
Tabla 3-5. Evaluación de Nodulación y determinación de %Ndfa-G en genotipos identificados como promisorios y no promisorios bajo condiciones de invernadero.....	61

Tabla 3-6. Diferencias fenotípicas en % de nitrógeno derivado de la atmósfera estimadas usando tejido foliar (% Ndfa-SH), % de nitrógeno derivado de la atmósfera estimado usando tejido de grano (% Ndfa-G), Abundancia natural de ^{15}N de tejido foliar (‰) y Abundancia natural de ^{15}N de grano (‰) de 100 genotipos de común frijol sembrados en Darién y Popayán, 2014 y 2015 Colombia 66

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término	Unidad SI
DAP	Días despues de siembra	DAP
MSNM	Metros sobre el nivel del mar	msnm
N	Nitrógeno	N
Ndfa	N derivado del aire (N fijado)	% kg N ha ⁻¹ l
Ndfs	N derivado del suelo	% kg N ha ⁻¹
δ ¹⁵ N	Abundancia Natural Isotopo de δ ¹⁵	‰
NA	Habilidad en nodulación	1 -9
NUE	Uso eficiente del Nitrógeno	Kg g kg N
NPI	Indice de particionamiento de N	%
PHI	Índice de cosecha de vaina	%
SB	Biomasa aerea	Kg ha ⁻¹
FSN	Fijación Simbiotica de Nitrógeno	FSN
SCMR	Contenido de clorofila	SPAD
GY	Rendimiento (kg ha ⁻¹)	GY

Introducción

Parte de la población mundial padece de desnutrición. En el mundo cerca de 795 millones de personas equivalentes al 10,5% de la población mundial está bajo esta condición y se calcula que el 26% de los niños del mundo padecen retraso del crecimiento (FAO, 2015). La mayor parte de población se registra en Asia con 280 millones, sin embargo, avanzó en el África subsahariana (Etiopía, Ghana, Kenia, Nigeria, Ruanda y Uganda) con 220 millones (FAO, 2015). Es evidente que existe un problema significativo de demanda de alimentos y garantías en seguridad alimentaria, especialmente para países en condición de vulnerabilidad.

En este sentido, las leguminosas y especialmente el frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*), tienen un papel importante en los sistemas de producción agrícola en todo el mundo. Este cultivo es el más importante en América Latina y África Oriental y meridional, cultivado principalmente por pequeños agricultores, donde es a menudo sembrado en ambientes marginales con baja fertilidad especialmente con deficiencias de Fósforo y Nitrógeno además de un mínimo uso de insumos (Beebe et al., 2012), debido a esto, los rendimientos son hasta 60% reducidos, alrededor de menos de tres veces del potencial reportado para este cultivo con tendencia a disminuir en el largo plazo (Rao, 2014; FAO, 2006). Así, Cultivos sembrados bajo estas circunstancias generan en las poblaciones vulnerables hambre, desnutrición y desplazamiento.

Por otro lado, y paralelo a la problemática de seguridad alimentaria, el consumo de fertilizantes nitrogenados ha aumentado en las últimas décadas, principalmente por el incremento en la demanda de alimento y el rendimiento en los cultivos. El nitrógeno (N) es uno de los principales impulsores de la producción agrícola mundial con requerimientos entre 150 y 200 millones de toneladas de mineral N cada año en los sistemas agrícolas para la producción de alimentos (Unkovich et al., 2008). Actualmente, este incremento se ha dado tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo y se predice que los

2 Evaluación de fijación simbiótica de nitrógeno para la identificación de genotipos promisorios en frijol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.)

requisitos de fertilizantes nitrogenados aumentarán en el futuro, sin embargo, a pesar de la síntesis de 100 toneladas de N al año para suplir esta demanda, existen problemas con el uso de fertilizantes nitrogenados especialmente con la baja eficiencia de uso y aprovechamiento referido a la volatilización de NH_3 , la lixiviación de NO_3 contaminado fuentes de agua y la desnitrificación de nitratos a N_2O como gas de efecto invernadero contribuyendo al aumento progresivo del calentamiento global. Algunos de los impactos más fuertes de esta problemática se sentirán en los “pequeños agricultores” o de “agricultura de subsistencia” de países en desarrollo (Morton 2007), debido a la reducción de los rendimientos en cultivos desarrollados en suelos con baja fertilidad, una alta demanda de nitrógeno, la demanda de alimentos cada vez mayor y, sumado a esto, el incremento en los costos de fertilizantes de síntesis que hacen insostenible la producción de alimentos y la seguridad alimentaria.

Así, con las problemáticas de reducción de rendimientos por deficiencias nutricionales y los efectos negativos generados por la fertilización nitrogenada; se ve como alternativa de solución, el desarrollo de genotipos de frijol promisorios en la asimilación de nutrientes especialmente nitrógeno además de la disminución de la demanda en fertilización. Estas soluciones son esenciales para contribuir a la seguridad alimentaria de una población creciente que requiere más alimentos con menos recursos.

Para ello, la capacidad que poseen las leguminosas y en especial el frijol denominada fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) se convierte en la alternativa de solución para la búsqueda de genotipos eficientes con el uso del nitrógeno y capaces de suplir la demanda a través de la interacción con la bacteria nitrificante *Rhizobium*, que convierte el nitrógeno inútil del aire (N_2) en nitratos y amonio NO_3 y NH_4 que la planta puede utilizar para el crecimiento y la producción de proteínas (Kumarasinghe et al., 1992). Se ha reportado que en condiciones óptimas, hasta el 73% del nitrógeno total de la planta es aportado por FSN y cantidades de hasta 125 kg N ha^{-1} se han registrado sosteniendo rendimientos de hasta 4 Ton ha^{-1} sin aplicaciones de fertilizantes (Giller, 2001).

Sin embargo, hay diferencias de potencial FSN entre frijol arbustivo y voluble, está reportado que este último tiene hasta 50% más capacidad de fijar nitrógeno atmosféricamente asociado a altos rendimientos (Graham and Rosas, 1977; Graham and

Temple, 1984; Kipe-Nolt and Giller, 1993; Bliss, 1993). Es evidente que el potencial de mejoramiento de FSN en frijol común está presente, por esto, buscar este atributo en los diferentes genotipos de frijol voluble, se considera necesario con el fin de incrementar la oferta de nitrógeno para la planta bajo condiciones de baja fertilidad como estrategia para una agricultura sustentable y de esta manera mejorar la cantidad y la calidad de alimento. De igual forma, el estudio de FSN se considera una estrategia amigable con el medioambiente y de bajo costo reduciendo la aplicación de fuentes nitrogenadas.

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) desde los años 70's ha venido desarrollando un trabajo arduo de mejoramiento genético a través de la evaluación fenotípica y genética de materiales tanto del acervo andino como del mesoamericano enfocado al estudio de genotipos tolerantes a sequía y enfermedades (Beebe et al., 2000). El programa de frijol actualmente cuenta con líneas mejoradas provenientes de cruces simples, retrocruzas y cruces interespecíficos, que han sido usadas como padres y caracterizadas para atributos de interés, sin embargo, el atributo genético de fijación de nitrógeno no había tenido prioridad hasta ahora, teniendo en cuenta que actualmente las variedades comerciales de frijol son pobres en la fijación de nitrógeno (Martínez y Romero, 2003).

Actualmente la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) en frijol retomó importancia al estar incluido dentro del programa de mejoramiento como una más de las características de evaluación fenotípica para la obtención del ideotipo de frijol común, con interés en mejoramiento de frijol de hábito voluble. Por ende, genotipos de frijol voluble podrían ser promisorios para el mejoramiento de la capacidad de fijación de nitrógeno en el cultivo de frijol aumentando el rendimiento. Por esta razón, se plantea esta investigación con el objetivo general de evaluar el potencial de fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) de diferentes genotipos de frijol para identificar variabilidad fenotípica y materiales promisorios, que eventualmente puedan ser utilizados como padres en programas de mejoramiento genético.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar la fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) potencial de genotipos de frijol común de hábito voluble e identificar materiales promisorios, a ser utilizados como progenitores en programas de mejoramiento genético.

Objetivos específicos

1. Cuantificar la variación genotípica de la habilidad en FSN.
2. Identificar genotipos promisorios de frijol voluble en FSN que combinen con buen rendimiento y puedan servir como padres en el programa de mejoramiento genético.
3. Validar el método para estimar la capacidad FSN usando abundancia natural de isótopo ^{15}N en grano como alternativa a la determinación a partir de abundancia natural de ^{15}N en el tejido de biomasa aérea.

Hipótesis

Ho: Existe variación genotípica en FSN entre los genotipos de frijol voluble y se valida el método de cuantificación de ^{15}N a partir de grano.

Ha: Es posible identificar algunos genotipos de frijol voluble con alta habilidad en FSN en combinación con potencial de rendimiento y tolerancia a enfermedades. La relación ^{15}N biomasa aérea y ^{15}N de grano es inversa y no significativa.

1.Estado actual

El frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es una de las leguminosas más importantes para el consumo humano en el mundo. El Frijol común se caracteriza por su alta diversidad genética la cual incluye variedades de frijol arbustivo y hábito trepador o voluble el cual tiene alta capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno y de potencial de rendimiento en comparación con frijol arbustivo (Graham and Rosas, 1977; Graham and Temple, 1984; Kipe-Nolt and Giller, 1993; Bliss, 1993). Así, la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) contribuye a una nutrición nitrogenada mejorada y es una estrategia ecológica y de bajo costo para mejorar la productividad en el cultivo de frijol común (Beebe, 2008).

Por ello, es necesario mejorar la eficiencia y la estabilidad de FSN en el cultivo de frijol. En este sentido, en primer lugar, se enuncian los principios fisiológicos, la importancia de frijol además de las metodologías de cuantificación de la FSN, los métodos de medición y se revisa si el frijol de hábito voluble es o puede ser proveedor de potencial genético para mejorar la capacidad de FSN en el mejoramiento de frijol común.

1.1 Frijol Común (*Phaseolus vulgaris L.*)

Frijol común (*Phaseolus vulgaris L.*) es la leguminosa alimenticia más importante cultivada en las zonas tropicales de América Latina y África Oriental y meridional. Para más de 300 millones de personas en el mundo, especialmente en países en desarrollo, es la pieza central de la dieta diaria (FAO, 2003). Nutricionistas caracterizan este cultivo como una de las más importantes fuentes de proteína, además de las cantidades generosas de fibra, carbohidratos y complejos de primera necesidad en la dieta, como el ácido fólico, hierro y zinc. (Broughton et al., 2003).

La cosecha de frijol mundial es de 18 millones de toneladas al año y tiene un valor estimado de US \$ 11 mil millones (CIAT 2006). La mayor parte (11,5 millones de toneladas) se

produce en América Latina y África. La mayoría de la producción de frijol en América Latina se lleva a cabo en pequeñas explotaciones que van de 1 a 10 hectáreas de tamaño, a menudo en tierras con pendientes pronunciadas y de baja fertilidad (Beebe et al., 2008). El cultivo de frijol es cultivado por pequeños agricultores que a menudo se expone a condiciones desfavorables con un uso mínimo de insumos (Beebe et al., 2008).

Alrededor del 50% de las áreas de producción de frijol en África Oriental y central y el 60% en África meridional tiene deficiencia de N debido a la pérdida de las N en el suelo y la limitada aplicación de fertilizantes (Beebe et al., 2014). Por esta razón, los rendimientos promedios se ven afectados desde un 60% a un 100% por factores bióticos y abióticos entre los cuales se encuentran: enfermedades, plagas y estrés abiótico como sequías y baja fertilidad del suelo. En consecuencia, los rendimientos se encuentran entre 600 a 900 kg ha⁻¹, aunque su potencial de rendimiento en condiciones óptimas es capaz de llegar a 2.500 a 5.000 kg ha⁻¹ (CIAT, 2000).

Las tierras altas de África Oriental y central representan más del 80% de la producción de frijol y se caracterizan por una alta densidad de población, estas tierras presentan disminución de la fertilidad del suelo y la siembra se realiza con una aplicación limitada de insumos especialmente de N (Jensen and Hauggaard-Nielsen, 2003). Sin embargo, la fijación de nitrógeno (proceso paralelo de asimilación de N a través de la atmosfera) contribuye en un 60% en el al rendimiento del frijol, en términos de oferta de nitrógeno al sistema de cultivo y el contenido de nutrientes del grano (Jensen and Hauggaard-Nielsen, 2003). Sin embargo, las líneas de frijol comerciales actuales son a menudo pobres en fijar N bajo las restricciones ambientales actuales.

El frijol común es un cultivo extremadamente diverso en términos de métodos de cultivo, los usos, la variedad de ambientes a los que se han adaptado y variabilidad morfológica. Se encuentran desde el nivel del mar hasta los 3000 msnm y se cultivan en sistema de rotación o en asociación, a menudo con maíz (Broughton et al., 2003). Las semillas son de forma y existe una rica variedad de colores y granos. El tamaño de la semilla varía de 50 mg / semilla de las accesiones silvestres de México, a más de 2000 mg / semilla en algunas variedades de semillas grandes de Colombia (Graham y Ranalli, 1997).

Existen importantes centros secundarios de diversidad en África, Brasil, Europa, Oriente Medio y América del Norte. Una colección mundial que comprende algo más de 40.000 accesiones se encuentra en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Cali Colombia) e incluye especies silvestres y muestras de malezas, las variedades locales no mejoradas y líneas puras de *Phaseolus vulgaris*, así como numerosas especies relacionadas (Singh et al., 1991).

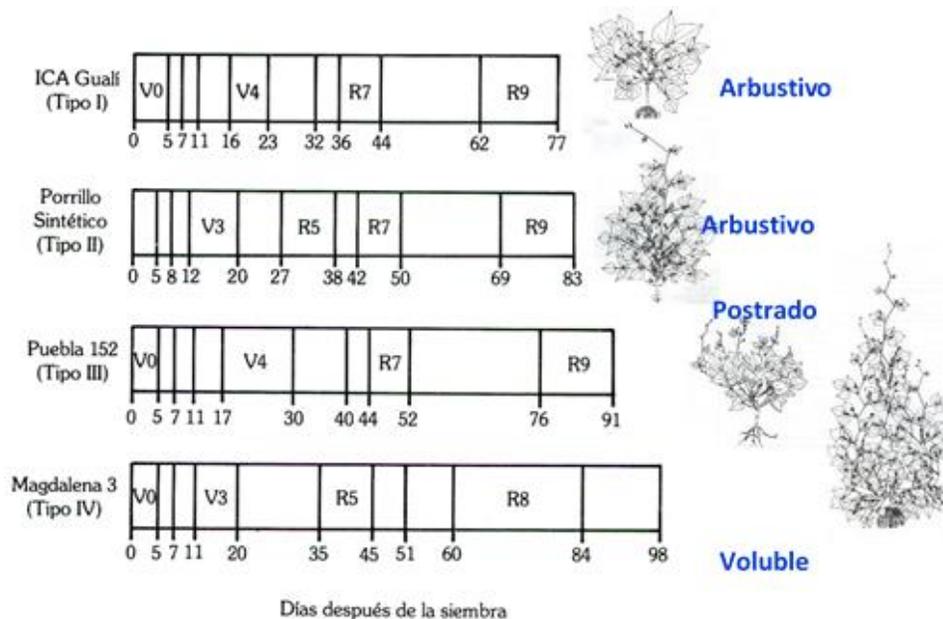
Esta diversidad particularmente rica se da por la historia de domesticación de frijol que condujo a dos grandes bancos de genes correspondiente al acervo mesoamericano y el acervo Andino, que se puede distinguir por el potencial de rendimiento y morfología (Singh et al., 1991).

Así el frijol común se clasifica en cuatro hábitos de crecimiento: el hábito de crecimiento tipo I se caracteriza por plantas que presentan brotes e inflorescencias terminales reproductivas (determinadas), erecto rama, y sin capacidad de escalada; tipo II hábito de crecimiento erecto pero con un crecimiento vegetativo terminal de creciente brotes que son indeterminados; tipo III hábito de crecimiento que también es indeterminado, pero más postrados, con los brotes de crecimiento de terminales; mientras que el hábito de crecimiento de tipo IV incluye, plantas indeterminadas de altura con un crecimiento alto, entrenudos largos, yemas vegetativas terminales, y una fuerte capacidad trepadora (Singh, 1982; Checa et al, 2006).

Las condiciones ambientales tales como la calidad de la luz y la duración del día en gran medida influyen en el crecimiento, la expresión de hábito y las diferencias entre los hábitos de crecimiento II y III o entre III y IV (Figura. 1-1) (Singh, 1982; CIAT 1984).

Dentro del acervo andino se encuentra el frijol de hábito IV o voluble que se caracteriza por poseer un tamaño de grano grande, diversidad de tipos y rendimientos superiores hasta 4 Ton ha⁻¹

Figura 1-1. Representación esquemática Ilustración de los hábitos de crecimiento y etapas de desarrollo fenológico en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Adaptado de Morfología de la planta de frijol CIAT 1984



1.2 Frijol Voluble tipo IV

El rasgo más evidente del frijol voluble es la capacidad de trepar y la necesidad de un tutorado en sistemas productivos. El frijol Voluble se considera un componente importante de la agricultura tradicional en varios lugares de América Latina, especialmente en México, Guatemala, Colombia, Ecuador y Perú (Voyses, 2000) y se han extendido a la región de los Grandes Lagos de África (Sperling y Munyaneza, 1995). Genotipos de frijol común voluble tienen el potencial de rendimiento más alto entre todas las accesiones de especies que se encuentran. Un estudio realizado por Kornegay et al. 1992, encontró que el mejoramiento de la capacidad de rendimiento se encuentra asociada positivamente con un aumento de la expresión de los rasgos de hábito voluble. Esto le permite que el sistema de cultivo de frijol voluble se clasifique como monocultivo y también como cultivo intercalado (Woolley y Davis, 1991). El cultivo intercalado implica crecimiento en asociación con el maíz, ya sea en plantaciones transicionales o simultáneas, y en este sistema agrícola, el maíz proporciona el apoyo necesario para este hábito de crecimiento. En monocultivo, frijol voluble se siembran con el apoyo de estacas en madera, de bambú o sistemas de enrejado. En este sistema, puede proporcionar un uso para los árboles en

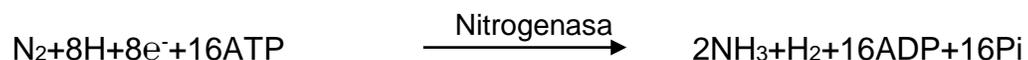
proyectos agroforestales. El sistema de tutorado requerido en frijol voluble, es un sistema muy extendido en la región andina y una alternativa que reduce la necesidad de estacas, pero requiere una inversión en cables y cuerdas para atar los tallos (Sañudo et al., 1999). Este sistema de tutorado para frijol trepador se justifica económicamente porque el rendimiento puede superar a 4500 kg ha^{-1} en condiciones óptimas. Sin embargo, es más laborioso debido a la necesidad de mano de obra, a pesar de esto, se considera una importante fuente de empleo en la agricultura para la producción y mano de obra estacional. Por lo tanto, el frijol voluble es particularmente útil para las pequeñas propiedades en donde la superficie disponible es limitada, pero no la mano de obra, y donde la demanda de granos es alta (Sañudo et al., 1999).

Las variedades de frijol voluble más cultivadas tienen adaptación agroecológica en regiones de altitudes altas entre 2000 a 2800 metros sobre el nivel del mar (msnm) (Voysset, 2000), pero a diferencia del frijol arbustivo, el frijol voluble está más cerca del fenotipo silvestre en términos de hábito de crecimiento y sensibilidad al fotoperiodo (Debouck, 1991; Singh, 2001). En la década de 1990, los mejoradores de frijol en el CIAT liberaron los llamados frijoles volubles adaptados a altitud media (MAC) capaces de crecer y rendir hasta 4500 kg ha^{-1} en condiciones de altitud media entre los 500 a 1500 msnm. Estas líneas MAC se caracterizaron también por presentar maduración temprana comparadas con granos de volubles tradicionales además de presentar altos contenidos de Zn y Fe en el grano además de resistencia a virus del mosaico común (BCMV), aunque no tenían un grano comercial deseable para países del Este Africano (Beebe, 2014; Blair et al., 2007). Esta ha sido una de las historias de impacto más drásticas del CIAT, en el que los rendimientos de frijol en algunos países como Uganda, se triplicaron en comparación con los rendimientos de frijol arbustivo disponibles en ese momento.

1.3 Fijación Simbiótica de N

Aunque Nitrógeno gaseoso (N_2) representa casi el 78% del Nitrógeno en la tierra, este no está directamente disponible para las plantas. La fijación simbiótica de N_2 (FSN) es el proceso mediante el cual bacterias del género *Rhizobium* en asociación con las leguminosas convierten el N_2 atmosférico en amoníaco (NH_3), una forma de nitrógeno (N) asimilable. Los productos de FSN se pueden incorporar como componentes orgánicos, proteínas y ácidos nucleicos (Unkovich et al., 2008; Kipe-Nolt et al, 1993; Peoples et al, 1995). Giller

(2001) lo define como el proceso de reducción de N_2 a una forma de N fácilmente disponible para la planta como NH_4 . En condiciones óptimas, hasta el 73% del nitrógeno total de la planta es aportado por FSN y cantidades de hasta $125 \text{ kg N fix ha}^{-1}$ (Giller, 2001), es evidente que el potencial de mejoramiento de FSN está presente, sin embargo para que se dé la FSN debe haber relación y coordinación de factores, entre los cuales están: la selectividad de la planta leguminosa, la especificidad de la bacteria *Rhizobium* y las condiciones ambientales que incluye la condición de elementos como el Nitrógeno, fosforo, molibdeno y Fe en el suelo (Taiz y Zeiger, 2002). El proceso de fijación de nitrógeno requiere de cada uno de estos elementos y en algunos casos el exceso puede generar inhibición del proceso. Adicional a esto, debido a la estabilidad molecular del nitrógeno atmosférico, este proceso es energéticamente costoso, y requiere de 16 moléculas de ATP por cada N_2 reducido (Taiz y Zeiger, 2002):



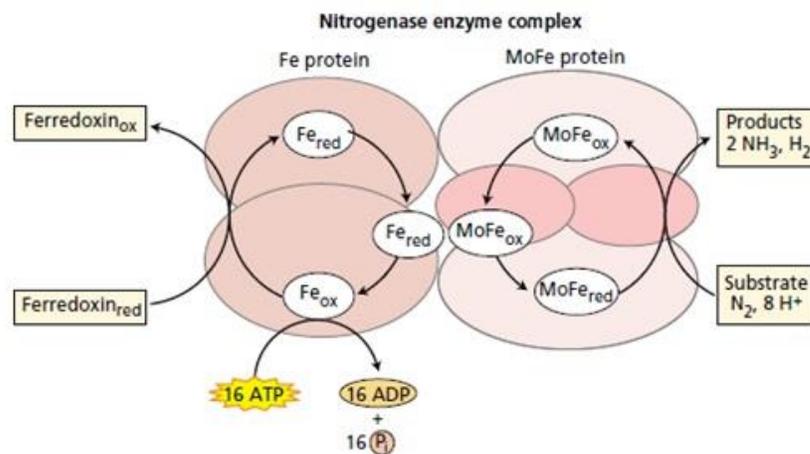
La reacción es catalizada por la enzima nitrogenasa sintetizada por la bacteria *Rhizobium*. Los géneros contemplados en la FSN en frijol son *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* y *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero, 1991; Taiz y Zeiger, 2002). A diferencia de las cianobacterias *Rhizobium* no puede generar un ambiente anaerobio en donde poder realizar la fijación de nitrógeno por sí mismas. Para llevar a cabo el proceso, estas bacterias en las inmediaciones de las raíces de las leguminosas y tras una serie de reacciones, dan origen a la formación de un órgano mixto nuevo denominado nódulo simbiótico, en el cual se proporciona un entorno controlado anaerobio, con el fin de evitar la inhibición de la enzima nitrogenasa. A través del nódulo se da la simbiosis planta – *Rhizobium* donde la planta suministra carbohidratos a la bacteria y la bacteria obtiene energía para sintetizar la enzima necesaria para efectuar el proceso de fijación en el proceso FSN (Giller, 2001; Unkovich et al., 2008).

1.4 Nitrogenasa y mecanismo de acción

Todos los microorganismos que convierten el N_2 en amonio NH_4 , lo hacen gracias a la actividad del complejo enzimático Mo-Fe nitrogenasa; la enzima requiere de la colaboración de otras dos proteínas llamadas ferredoxina y flavodoxina; éstas actúan como donadores de electrones y reductores naturales (Giller, 2001).

El complejo enzimático, que cataliza la reducción del N_2 en amoniaco, está constituido por dos metaloproteínas, y contiene tres tipos de grupos prostéticos. La nomenclatura para designar estas proteínas es variable. Así, la proteína I es llamada Fierromolibdeno-proteína Fe-Mo. El otro componente, la proteína II, es igualmente nombrada dinitrogenasa reductasa o "Fierro-proteína". Para su funcionamiento, el complejo requiere un donador de electrones de bajo potencial, de la hidrólisis de ATP y de un ambiente estrictamente anaerobio. Esta proteína contiene el cofactor con hierro y molibdeno (FeMo-Co). La proteína II es un dímero de alrededor de 68,000 Da, formado por dos subunidades idénticas unidas por un grupo prostético único de 4Fe-4S. El gene responsable de la síntesis de esta proteína es *nifH*. Esta proteína tiene la función de transportar los electrones del donador fisiológico de electrones (ferredoxina o flavodoxina), hacia la proteína I para llevar a cabo la reducción de la molécula de N_2 , (Figura 1-2). Como se mencionó anteriormente, la Nitrogenasa es sumamente susceptible a la inactivación por el O_2 (Giller, 2001).

Figura 1-2. Catalización de N_2 por Nitrogenasa. La Ferredoxina reduce Fe proteína. Unión e hidrólisis de ATP. La proteína Fe reduce la MoFe proteína, y la proteína MoFe reduce la N_2 . Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002.



1.5 Infección, Nodulación y el proceso de FSN

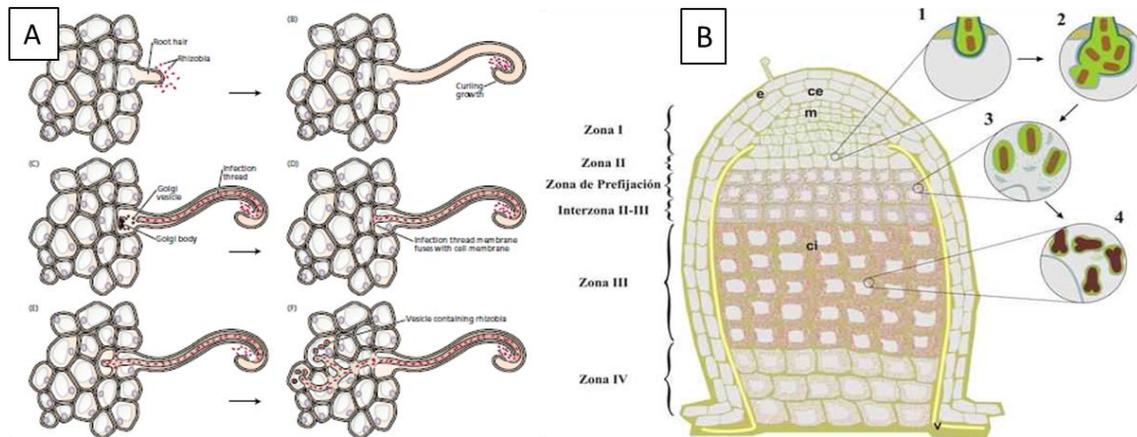
Infección de las raíces por rizobios es un proceso de múltiples etapas iniciado por la secreción de exudados de la raíz como flavonoides y nutrientes tales como ácidos orgánicos y aminoácidos. Los Rhizobios responden a estos exudados y se unen a sitios particulares en las raíces de leguminosas (Van Rhijn y Vanderleyden., 1995; Madigan et al, 2003; Garg y Geetanjali, 2007). En la superficie los pelos radicales, los rizobios causan hinchazón, la deformación y si introducción a través de la secreción de oligosacáridos llamados factores Nod (Giller, 2001).

Los Rizobios son entonces atrapados en el pelo de raíz deformado y entran por la lisis de la pared celular y la posterior invaginación de la membrana plasmática. El nuevo material de la pared celular de la planta huésped forma alrededor de la lesión un tubo hacia el interior, conocido como el hilo de infección, que se propaga por la raíz. Simultáneamente, las células corticales se dividen para formar un primordio de nódulos y el hilo de la infección crece hacia estos primordios (van Rhijn y Vanderleyden, 1995, Madigan et al., 2003; Garg y Geetanjali, 2007). Además, un número limitado de células en el periciclo también se dividen (Kinkema et al., 2006).

Una vez que el hilo de infección alcanza el primordio en desarrollo, las bacterias se liberan en las células vegetales a través de endocitosis y encerrados en estructuras en forma de vacuolas rodeadas por una membrana peribacteroide derivada de la membrana plasmática (simbioma) (Figura 1-3). En estas estructuras, los rizobios se diferencian en bacteroides y comienza la conversión de N_2 a NH_4 (Giller, 2001; Stacey et al, 2006; Garg y Geetanjali, 2007). Un nódulo es un órgano verdadero con especialización celular. Al lado de las células de plantas infectadas, las células vegetales infectadas se ocupan de la asimilación y sistemas de transporte vía simplásto que permite el intercambio de nutrientes entre el nódulo y el tejido vascular periférico (Stacey et al, 2006; Kouchi et al, 2010).

Figura 1-3. El proceso de infección durante la organogénesis nódulo. B. Modelo esquemático de la estructura de un nódulo indeterminado y del desarrollo de los simbiomas, epidermis, córtex interno, tejido vascular. 1-2.

Formación del bacteroide, 3. procesos de diferenciación del simbioma y 4. simbiomas maduros. Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002.



1.6 Métodos de Cuantificación de Fijación Simbiótica de Nitrógeno

Un método exacto de medición de fijación N_2 es esencial para cualquier evaluación de la capacidad FSN, sin embargo, tal método ha sido difícil de estandarizar (Giller, 2001). A pesar de la investigación activa en este tema, muchas mediciones de la cantidad de N_2 fijado en el campo siguen teniendo incertidumbre en el dato obtenido. Esto es en gran parte, debido a que la diferenciación de N adquirido de la atmósfera y el N absorbido desde el suelo y las variables que intervienen en el proceso. A continuación, se describen las principales metodologías y las limitaciones de los tres métodos más importantes para medir la FSN, en los que encontramos i) la cuantificación de la actividad de la Nitrogenasa ii) el método de balance de N y iii) Abundancia Natural de ^{15}N (Giller, 2001 y Unkovich et al., 2008).

1.6.1 Medida de la actividad de la Nitrogenasa – Método de reducción de acetileno

El ensayo de reducción de acetileno (ARA), es un método indirecto que mide las tasas de actividad de la enzima nitrogenasa bacteriana producida por *Rhizobium* en el metabolismo de FSN, responsable de la conversión de N_2 atmosférico en amonio (NH_4) Unkovich et al., 2008). Este método se basa en el hecho de que la enzima Nitrogenasa participa tanto en la transformación de N_2 a NH_3 como en la reducción de acetileno (C_2H_2) a etileno (C_2H_4). Este método se lleva a cabo incubando el material de ensayo (raíces y nódulos por planta a analizar), en una atmósfera que contiene 10% de acetileno en un recipiente cerrado. De esta manera se mide la concentración de etileno producido por acción de la nitrogenasa después de un período de incubación y se mide a través de cromatografía de gases. La cantidad de etileno sería directamente proporcional a la actividad de la nitrogenasa de los nódulos evaluados. Este método es útil como un método rápido para la detección de actividad de la enzima en uno o varios puntos de tiempo específicos y para las mediciones de las tasas de la enzima en los sistemas simples de laboratorio. Su uso, sin embargo es limitado principalmente a condiciones de laboratorio y es una metodología problemática si se utiliza para cuantificar cantidades de N_2 fijado en campo o en invernadero (Giller, 2001; Unkovich et al., 2008).

1.6.2 Medida de balance de nitrógeno

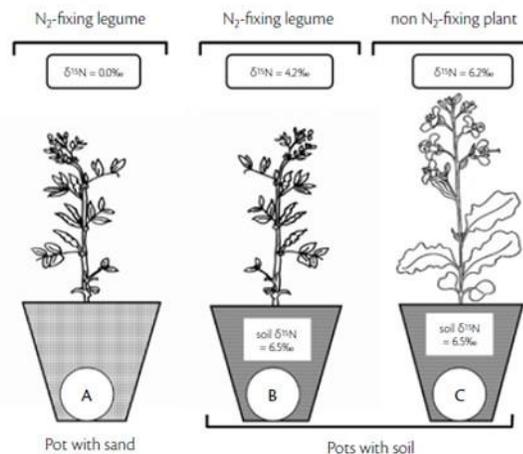
El método de diferencia y balance de Nitrógeno es un método simple y directo para cuantificar la cantidad de N_2 fijado durante un período considerable de tiempo y consiste en medir la concentración de N en el tejido multiplicándolo por el peso del material de planta producida (Unkovich et al., 2008). Esto es, por supuesto, válido para N_2 fijado en ausencia de otras fuentes de N. Los rastros de N en la semilla o inóculo bacteriano se pueden despreciar si la cantidad de N_2 fijado es grande. Sin embargo, los problemas se producen en condiciones de nitrógeno libre, pero que en realidad son contaminados con N. Sin embargo, esto sólo será problemático si la cantidad de contaminación es considerable en comparación con la cantidad de N_2 fijado (Giller, 2001; Thies et al., 2001; Unkovich et al, 2008). Sin embargo, la absorción de N determinado por este método sólo será una aproximación de N absorbido por la fijación de las plantas en asocio. En el mejor

de los casos este método pueden proporcionar indicaciones aproximadas de las cantidades de N_2 fijado y en el peor de los casos, los resultados pueden ser engañosos.

1.6.3 Métodos de abundancia natural de ^{15}N y determinación de % Ndfa.

Los isótopos estables son elementos que tienen variaciones en el número de neutrones en sus átomos, pero estos átomos no se deterioran. Por ejemplo, el nitrógeno tiene un peso atómico de 14, con siete protones y siete neutrones este isótopo de N es conocido como $\delta^{14}N$, a su vez, el N puede presentar isótopos de 6 (^{13}N) u ocho neutrones ($\delta^{15}N$) (Unkovich et al., 2008). La diferencia entre isótopos depende de su estabilidad y $\delta^{15}N$ es el más estable y pesado por esta razón se puede cuantificar en órganos y tejidos. El Nitrógeno se encuentra en mayor medida como $\delta^{15}N$ en el suelo (abundancia natural de $\delta^{15}N$) y $\delta^{14}N$ en el aire. De esta manera, plantas cuya fuente principal de N es el suelo (plantas no fijadoras) se espera que $\delta^{15}N$ sea más abundante, en cambio, plantas cuya fuente de Nitrógeno esta compartida entre la atmosfera y el suelo la cantidad de $\delta^{15}N$ en tejido será menor. La estimación del enriquecimiento de $\delta^{15}N$ del N del suelo se hace generalmente a través de la utilización de una planta que no fija N como referencia (Unkovich et al., 2008) (Figura 1-4).

Figura 1-4. Ilustración de Abundancia Natural de $\delta^{15}N$ para la estimación de Fijación Simbiótica de Nitrógeno A. Valor igual a cero (0 ‰) para planta fijadora dependiente 100% de N atmosférico B. Planta con fijación intermedia C. Planta totalmente dependiente del N del suelo con $\delta^{15}N$ en tejido cercano o igual al valor del suelo. Adaptado de Unkovich et al, 2008.



Desafortunadamente, el enriquecimiento del suelo $\delta^{15}\text{N}$ puede variar con la profundidad, por lo que cualquier diferencia en el patrón de enraizamiento de las plantas de ensayo y de referencia puede conducir a la absorción de N del suelo. En conclusión, las plantas de referencia tienen que ser elegidas cuidadosamente, asegurando un patrón de enraizamiento y profundidad que sea similar a la planta de ensayo y del mismo modo una absorción de N-similar a lo largo de la temporada de crecimiento. La mejor opción de cultivo de referencia podrían ser plantas, que tengan capacidad de nodular con una cepa de rhizobio en particular y conocida o plantas mutantes no nodulantes. También las malezas no fijadoras genotipos no nodulantes se pueden utilizar como un cultivo de referencia (Unkovich et al., 2008).

El valor de abundancia natural de $\delta^{15}\text{N}$ de la planta fijadora de nitrógeno dependiente exclusivamente del N_2 como fuente en un medio libre de N se denomina B-valor. Se ha informado de que B-valores puede diferir con la variedad de la planta, la temperatura, las condiciones de luz, la edad de las plantas, etc. (Shearer y Kohl, 1986, Unkovich et al., 1994, Unkovich et al., 2008). Por lo tanto, es esencial para llevar a cabo experimentos de invernadero diseñados para estimar los valores de B en condiciones muy similares en comparación con el experimento en el que se utiliza el método de $\delta^{15}\text{N}$, este dato es requerido en la fórmula para poner en evidencia el dato de $\delta^{15}\text{N}$, en tejido a partir de su transformación en un valor menos ambiguo: el porcentaje de N derivado de aire (% Ndfa) el cual puede calcularse a partir del valor $\delta^{15}\text{N}$ usando la siguiente ecuación:

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}\text{N de la planta de referencia (no nodulante, maleza) - } \delta^{15}\text{N de la planta fijadora de N}_2}{\delta^{15}\text{N de la planta de referencia - B valor}} \times 100$$

$$\text{Total Ndfa (kg N ha)} = \frac{\%Ndfa \times \text{N total (kg N ha)}}{100}$$

Los valores reportados de β value para frijol son menores a cero, se encuentran reportes de -2.0, -2-50 y -1.97‰ para un promedio de -2.16‰. (Peoples, 2000; Yoneyama, 1986; Mariotti, 1980 citados por Unkovich et al 2008). Reportes más recientes y realizados para ambientes específicos muestran β valores para frijol arbustivo de -3.74‰ con corrección de N en semilla inicial (Douxchamps et al, 2010). En contraste, los valores para plantas de referencia están cercanos al valor de $\delta^{15}\text{N}$ del suelo, para algunos pastos el valor es

positivo por encima de cero de 4.0 a 6.0 ‰, para genotipos de leguminosas mutantes que no tienen la facultad de nodular los valores son superiores a 7‰. (Unkovich, 2008).

La evaluación de la nodulación puede proporcionar un complemento útil para mediciones, pero puede haber problemas en la recuperación de todos los nódulos en el suelo y muchas veces no hay una relación simple entre la masa de nódulos y la fijación de N₂. A pesar de algunas limitaciones, los métodos basados en isótopos proporcionan el enfoque más preciso para las mediciones de la cantidad de FSN en las plantas (Unkovich, 2008).

1.7 Potencial de fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) en frijol voluble

Existen muy pocos estudios que utilizan variedades de frijol voluble. La mayoría de los estudios tratan sobre volubles en cuanto a su rendimiento de grano de campo en sistema de cultivo intercalado con maíz (Vieira y Vieira, 1996; Geren et al, 2008;.. Dawo et al, 2009). También se han realizado trabajos enfatizados en la resistencia a enfermedades, y el cultivo intercalado con plátano (Wortmann y Sengooba, 1993) (Garzón et al., 2008 Musoni et al., 2010). Sólo CIAT publicó algunos estudios genéticos sobre frijoles volubles o cruces entre volubles y frijol arbustivo, en los últimos 10 a 20 años, sin embargo, los esfuerzos se han dirigido a: i) el mejoramiento a enfermedades, con énfasis en mosaico común de virus (BCMV) y, ii) el mejoramiento para la mejora de los valores nutricionales de hierro y zinc. Actualmente, se hace hincapié en la tolerancia al estrés abiótico especialmente bajo la tolerancia de la fertilidad y el calor y resistencia a las enfermedades (Blair, 2006).

Sin embargo, existen menos informes sobre la evaluación de FSN en frijol voluble que en frijol arbustivo. Graham y Halliday (1976) fueron los primeros en establecer una buena correlación entre el hábito de crecimiento y su capacidad de fijación de nitrógeno con mayor FSN en frijol voluble. Estos primeros resultados fueron pronto confirmadas por Graham y Rosas (1977) que encontraron que genotipos de frijol voluble son superiores a frijol arbustivo en la reducción de acetileno y de la actividad específica de nódulos (cantidad de acetileno producida / g de peso seco de nódulos). Sin embargo, en este estudio no se encontraron diferencias en el desarrollo de nódulos (peso seco de nódulos). Kumarasinghe et al., (1992) describió el cv voluble. Cipro en términos de su fijación de N₂ e informó que la FSN fue alta en todas las etapas de crecimiento, pero la máxima fijación se produjo entre

las etapas de llenado de vaina, que es el período de mayor demanda de N por la planta acumulando hasta 119 kg N ha⁻¹ equivalente a 84% de Ndfa. Un estudio más reciente de Kimani et al (2004) evaluó 60 arbustivos y 60 variedades de frijol voluble encontrando que frijol voluble tiene mayor capacidad de nodulación en comparación con frijol arbustivo. Por desgracia, en este estudio, no se tomaron otras variables de medición para FSN distintos al número de nódulos.

Wortmann (2001) explica que el frijol voluble tiene mayor capacidad para fijar N atmosférico correspondiente a 49 kg N ha⁻¹ mientras que para frijol arbustivo el valor fue de 34 kg N ha⁻¹ estos resultados se determinaron a partir de abundancia Natural de $\delta^{15}\text{N}$. Hardarson et al (2003) mostró que accesiones de frijol voluble fueron capaces de fijar hasta 100 kg N ha mientras que en frijol arbustivo la reducción fue de un 50%. Por otro lado, Ramaekers et al (2013) evaluó FSN en líneas RILs a partir de los parentales voluble G2333 x el arbustivo G19839 en campo, donde el porcentaje de fijación (%Ndfa) calculada en los estados fenológicos R6, R7/8 fue cercano a 50% Ndfa en volubles mientras que en arbustivos fue inferior con un 30%. De esta manera, es evidente que el potencial de FSN está presente.

1.8 Validación de Metodología grano para cuantificar FSN

El método $\delta^{15}\text{N}$ abundancia natural presenta algunas ventajas sobre otras metodologías. Se puede aplicar tanto en condiciones de invernadero y campo. Por otra parte, el método permite la estimación de la fijación de N en casi cualquier situación en la que tanto las legumbres fijadoras y no fijadores de N coexisten. Esta metodología se puede aplicar a los campos de los agricultores, o para cualquier experimento de campo (Unkovich et al., 2008; Douxchamps et al., 2010). Por lo general se usa la parte aérea o el tejido de la planta cosechada en diferentes etapas de crecimiento, tales como la floración o llenado de vainas. (Boddey et al., 2000; Unkovich et al., 2008). Sin embargo, el hecho de tomar muestra de biomasa aérea, desde una perspectiva de mejoramiento genético, es compleja debido a que la muestra que se requiere es de gran tamaño y conlleva a mayores costos en tiempo y dinero para las determinaciones de FSN. Por esta razón, los programas de mejoramiento de frijol no seleccionan de forma rutinaria para el mejoramiento en la capacidad para fijar N atmosférico.

Por esto, el desarrollo de metodologías que puedan estimar la capacidad FSN utilizando tejido de grano podría ser más fácil de integrar de manera rutinaria en la mayoría de los programas de mejoramiento desde el grano de cosecha para estimar no solo el rendimiento y la calidad nutricional si no también la capacidad en FSN. Por lo tanto, basado en el principio que entre un 80 y un 90% del N se movilizan a partir de estructuras vegetativas al grano en frijol (Ramaekers et al., 2013), y que reportes anteriores que ya validan su uso mostraron una relación altamente positiva y significativa entre el $\delta^{15}\text{N}$ de grano y $\delta^{15}\text{N}$ de parte aérea para cuantificar FSN (Polania, et al 2016), es necesario reiterar esta relación para frijol voluble.

1.9 Características para evaluar la respuesta de la planta a FSN

La habilidad en la fijación de Nitrógeno representa para las leguminosas y el frijol mayor probabilidad para la obtención de N y garantía para la demanda de N en todas las rutas metabólicas que al final se traducen en Vigor y rendimiento. De esta manera, la fijación de Nitrógeno está relacionada directamente con variables que se benefician de esta capacidad. En frijol al presentarse una asimilación de N compartida entre el aire y el suelo, indicadores como el Uso eficiente del Nitrógeno (NUE), el particionamiento del N a grano (%NPI), la movilización de asimilados (PHI) y el vigor en términos de Biomasa, evidencian los efectos de la capacidad %Ndfa y con ello el efecto en el comportamiento fisiológico de la planta (Lynch and Rodríguez, 1993).

1.9.1 Uso eficiente de N (NUE)

El uso eficiente del nitrógeno por sus siglas en inglés (NUE) es un indicador que muestra la eficiencia de recuperación de este elemento o en otras palabras, la capacidad de reducción de las pérdidas de N desde que es asimilado hasta la cosecha. De esta manera, es posible a través de NUE cuantificar si los genotipos evaluados dentro de un experimento aprovechan al máximo el recurso N (ya sea de origen del suelo o del aire) para producir la mayor cantidad de grano. Para el caso de ensayos de Fijación de N donde gran parte del Nitrógeno asimilado es a través de la simbiosis, es pertinente evaluar el uso eficiente del N para definir la influencia de FSN en el rendimiento. Anteriores reportes confirman que la eficiencia en el uso de Nitrógeno es un indicador asociado positivamente con el

rendimiento y el vigor de planta (Zhiqin et al, 2016; Beatty and Wong, 2016; Lynch and Rodríguez, 1993)

1.9.2 Particionamiento de N (%NPI)

El Nitrógeno asimilado a partir del suelo o del aire se transloca a través de la planta para participar en fotosíntesis y con ello en producción de grano. En estudios fenotípicos donde se requiere determinar la eficiencia de uso también es pertinente cuantificar a través de porcentajes la cantidad del N total asimilado en la fase vegetativa que fue removida o particionada a la formación de grano. Este índice muestra qué porcentaje de N fue removido a grano y con ello se dimensiona la eficiencia de uso. Múltiples estudios reportan %NPI como uno de los índices más importantes para determinar el efecto de estreses abióticos, fertilización y comportamiento entre genotipos en diferentes especies. Barraclough et al, (2014) usó %NPI para determinar cuánto del N asimilado en cuatro genotipos de cereales con diferentes dosis de fertilización se removía al grano y determinó que dos de cuatro genotipos removilizaban desde partes vegetativas hasta un 85% del N en todos los tratamientos. En estudios de Fijación de Nitrógeno donde la planta depende en gran medida de su capacidad para transformar N atmosférico en amonio, el %NPI sirve como indicador de la eficiencia del uso de N a partir del aire en la formación de grano. Otros estudios en frijol muestran que esta especie es capaz de traslocar cerca de 80 a 93% del N al grano (Ramaekers et al., 2013). Por otro lado, para estudios de FSN es importante determinar %NPI debido a que se ha demostrado que se trasloca y acumula preferiblemente el N fijado del aire en el grano (Westermann et al, 1985. Dubois y Burris, 1986; Wolyn et al., 1991).

1.9.3 Biomasa y movilización de fotoasimilados.

La biomasa aérea o biomasa dosel pueden entenderse en un sentido fisiológico, como el resultado de la fotosíntesis neta acumulada del cultivo, y está directamente relacionada con la producción de fotoasimilados, por esta razón la producción de biomasa es un indicador de vigor y rendimiento. (Araus et al., 2002).

El objetivo del mejoramiento genético de plantas es seleccionar genotipos que produzcan mayor cantidad de materia seca (fuente de foto-asimilados) acompañada de una mayor

capacidad de asignación de foto-asimilados al grano. Existen reportes que indican que esta relación es directa y es usada para inferir acerca de la capacidad de los genotipos y se ha encontrado una relación positiva entre la biomasa de dosel en la mitad del llenado de la vaina y el rendimiento de grano, tanto en condiciones de riego y sequía, (Rosales-Serna et al., 2004; Muñoz-Perea et al., 2007; Klaedtke et al., 2012; Assefa et al., 2013; Beebe et al., 2013; Rao et al., 2013). Polania et al (2016) cita que genotipos de frijol con una mayor FSN bajo estrés por sequía, reducen su biomasa comparada con plantas desarrolladas bajo riego, sin embargo, genotipos promisorios a pesar de esta reducción, presentan mayor biomasa que genotipos no promisorios y son eficientes con el uso del carbono para producir los fotoasimilados necesarios en proceso de fijación de N₂. Adicionalmente, en este mismo estudio, la movilización de asimilados a través de biomasa a grano cuantificados como Índice de particionamiento de vaina e Índice de cosecha (PHI y HI) referidos como el porcentaje de fotoasimilados exportados de biomasa aérea a vainas y de vainas a grano, mostraron estar directamente asociados con el rendimiento bajo estrés por sequía. De esta manera, el mejoramiento de la removilización de N a grano contribuye a incrementar los rendimientos (Wolyn et al., 1991). Investigaciones anteriores sugieren que la resistencia a la sequía en frijol común se asocia con una removilización fotosintatos más eficiente para la formación y producción de granos (Rao, 2001; Hall, 2004; Rosales-Serna et al., 2004; Klaedtke et al., 2012; Rosales et al., 2012; Assefa et al., 2013; Beebe et al., 2013, 2014; Rao et al., 2013)

1.10 Factores abióticos que afectan el proceso de FSN

El proceso de FSN requiere de la coordinación de factores internos y externos. Dentro de los internos se encuentra la especificidad de la planta con la cepa de *Rhizobium* con la que se asociará en simbiosis para generar el ensamble y el inicio de la infección. Dentro de los factores externos que influyen la FSN, se encuentra la temperatura del suelo que afecta el desempeño de la cepa, la condición de sequía o riego y por último, el factor externo asociado con la condiciones de suelo que incluye, condición de radiación, concentraciones de oxígeno, inundación y los contenidos de nutrientes en exceso o en deficiencias necesarios en los mecanismos de la Fijación Simbiótica de N. El proceso de asimilación de nitrógeno atmosférico es complejo y requiere de la coordinación de estos factores.

1.10.1 Sequia

La población de *Rhizobium* en el suelo se reduce drásticamente en condición de sequía (Giller, 2001). Se ha reportado que *Rhizobium* sobrevive en poblaciones pequeñas (1.0×10^4 UFC/ gr suelo) bajo sequía que contengan reducidas cantidades de arcilla y materia orgánica (Chao y Alexander, 1982). Paralelamente, el efecto de sequía tiene efectos drásticos en el proceso FSN, este proceso se inhibe fácilmente siendo más sensible que la fotosíntesis, la transpiración, el desarrollo de biomasa y la asimilación de nitratos desde el suelo (Sinclair et al, 1987; Serraj et al, 1999). En el mismo sentido, se ve afectada la translocación de los productos de la fijación de la parte aérea al grano (Giller, 2001). Sin embargo, la tolerancia a la sequía en beneficio de la FSN está relacionado directamente con la habilidad de las plantas para capturar agua a través de su distribución de raíces, discriminación de C y adaptaciones estomáticas (Giller, 2001; Devi et al., 2013, Beebe et al, 2014; Polania et al, 2016). Genotipos promisorios en FSN bajo sequia están asociados positivamente con vigor de planta, uso eficiente del agua, biomasa de raíces y removilización de asimilados a grano. Hardarson et al.1993 identificó genotipos con alta capacidad de fijar N atmosférico bajo condiciones de riego, manteniendo su capacidad con evidencia de cambios fisiológicos para el mantenimiento de FSN. Polania et al., 2016 identifico genotipos de frijol mesoamericanos RCB 593, SEA 15, NCB 226 y BFS 29 con buena FSN bajo condiciones de estrés por sequía en asocio positivo con rendimiento de grano, biomasa aérea, NUE y PHI. La Sequía afecta este proceso, sin embargo los hallazgos de genotipos promisorios en FSN bajo estrés, generan la posibilidad de mejorar este atributo.

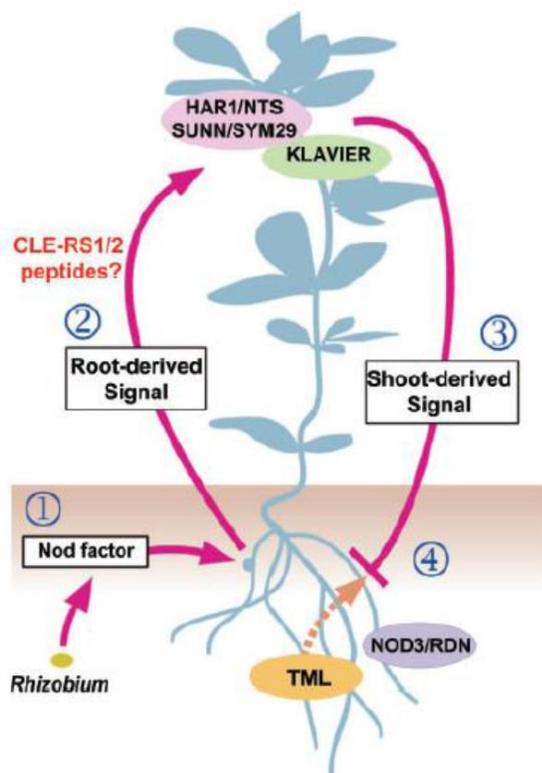
1.10.2 Efecto de concentraciones altas de N edáfico en FSN

En el caso de leguminosas en asocio con bacterias para fijar N atmosférico, es sabido que la regulación de este proceso está dado por la planta hospedera y la cepa de la bacteria simbiote (Giller, 2001). Sin embargo, este proceso también esta mediado por la concentración de NO_3 en el suelo que en concentraciones altas inhibe el proceso FSN (Leidi and Navarro, 2000; Wanek and Arndt, 2002; Salvagiottia et al., 2008; Giller, 2001; Ajebesone, 2015, Burchill et al., 2014). Esta regulación se asocia con los altos costos energéticos que requiere el proceso de FSN correspondientes a 16 moléculas de ATP por cada molécula de N_2 fijada y una demanda del 33% de los asimilados de fotosíntesis

destinados para este proceso (Giller, 2001). Según estas cifras la planta bloquea el proceso en función de un ahorro y optimización energética. Carroll and Mathews, (1990) evidenciaron los efectos inhibitorios en la nodulación y contenidos de ureidos en presencia de nitratos en el suelo. Otros efectos se han observado en nódulos desarrollados donde se detiene la actividad de FSN, al presentarse una reducción de la actividad de la nitrogenasa cuantificada a través de la metodología de ARA (Giller, 2001).

En presencia de nitratos, el proceso de inhibición se le puede dar respuesta a través de una señal interna importante, referida a un sistema de regulación y retroalimentación sistémica que incluye una larga distancia de señalización entre la raíz y parte aérea, llamada proceso de Autorregulación de Nodulación (AON) (Figura 1-5). Este mecanismo fisiológico se activa a través de la producción de señales desde la raíz hasta el tallo y viceversa, esto promueve la supresión del desarrollo de nódulos inhibiendo la producción de factores Nod y reduciendo la actividad de la nitrogenasa de nódulos desarrollados. De esta manera AON genera i) Supresión de la nodulación por completo ii) reducción de la masa de raíces y nódulos y iii) se inhibe la actividad de la Nitrogenasa en nódulos maduros (Taiz and Zeiger, 2002; Giller, 2001). Okamoto et al., (2009) reportaron que el gen LjCLE - RS2, está fuertemente regulando la señal desde las raíces en respuesta a nitrato. Además, el HAR1 – mutante de *Lotus japonicus* exhibe un fenotipo tolerante a nitrato que presenta nodulación y por ende tiene actividad FSN (Oka - Kira et al., 2005).

Figura 1-5. Modelo esquemático de la Autorregulación de la Nodulación (AON). La percepción del factor Nod rhizobial (1) inicia la infección y la Nodulación, sino que también genera un inhibidor de larga distancia desde la raíz (2). LjCLE-RS1 y -RS2 son péptidos que reciben la señal. Esta señal se transporta a la sesión y provoca la producción de la señal derivada a la parte aérea (3). Las quinasas de tipo receptor LLR (LjHAR1 / GmNARK / MtSUNN / PsSYM29) y KLAVER median este proceso. La señal derivada a la parte aérea se transloca a la raíz donde se reprime la Nodulación TML / RDH1 (4). PsNOD3 y MtRDN en la raíz truncan la Nodulación (Adaptado de Cuchi et al., 2010). Adaptado de Taiz y Zeiger, 2002.



Existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de Nitrógeno aplicado ($r=0.68$) y el rendimiento con valores hasta de 450 kg/ha, sin embargo la relación es inversamente proporcional entre N tomado por fijación y aplicaciones de fertilización Nitrogenada superiores a 10 kg/ha (Rennie et al., 1988 citado por Salvagiotti et al., 2008). Takahashi, 1991 muestra que sin la aplicación de fertilizante N, la soja alcanza una cantidad máxima de fijación de N_2 de 337 kg N fix/ha, En contraste, al aplicar 100 y 300 kg/ ha de fertilizante de N se evidencia una reducción con un valor de fijación de N_2 de solo 17 kg N fix ha⁻¹. Wolfgang y Arndt (2002) observaron una reducción en nódulos de las

raíces de soja y una considerable disminución en la fijación de nitrógeno del 84% a 3% de %Ndfa con un aumento en la concentración de nitrato de 0,25 a 25 mM.

1.10.3 Efecto de deficiencias de fósforo (P) en FSN

La FSN se ve afectada considerablemente por deficiencias de P en el suelo. Chagas et al., (2010) sugiere que los niveles de P altos en los suelos aumentan el porcentaje de nitrógeno procedente de la atmósfera (% Ndfa) en hojas de frijol y bajo inoculación de cepas de rizobios. Esto se debe a que las leguminosas para formar las relaciones simbióticas con las bacterias y para convertir el nitrógeno N_2 en amonio (NH_4) requieren de una oferta energética elevada correspondiente a 16 ATPs por cada molécula de N atmosférico (Taiz y Zeiger, 2002). De hecho, se ha demostrado en varios estudios que hay un incremento neto de 5 al 28 % en la fotosíntesis para la producción de ATP en las plantas leguminosas que hacen FSN con inoculación de cepas de *Rhizobium* (Kaschuk et al., 2009). Olivera et al, (2004) cita que la demanda de P en nódulos es mayor que en otros tejidos. Ojiem (2006), observó un aumento del 50% en la acumulación de biomasa y nodulación del frijol común variedad KK8 con la aplicación de 30 kg P ha⁻¹ y concluyó que la aplicación de P es esencial para la fijación de N_2 . Olivera et al., (2004) Explica que en el nódulo, el nitrógeno genera la fijación de amonio NH_4 y que este se procesa a aminoácidos y ureidos a través de la Ciclo de la SG / GOGAT; en este proceso la enzima glutamina sintetasa GS utiliza ATP y forma glutamina, con lo cual, la glutamina se convierte en glutamato por el glutamato sintasa (NADH - GOGAT) y finalmente el N es asimilable como aminoácidos (Cullimore y Bennett 1998). Este proceso y la posterior transformación en aminoácidos y ureidos, son procesos que consumen energía. Por esto, las deficiencias de P generan la inhibición de la enzima Glutamina sintetasa (GS) y GOGAT y por ende la disminución de síntesis de aminoácidos y compuestos nitrogenados.

1.10.4 Efecto de deficiencias nutricionales de Fe, Mo, Ca.

El molibdeno y el hierro están involucrados tanto en la asimilación de N como en la fijación de nitrógeno FSN, una deficiencia de molibdeno puede provocar una deficiencia de nitrógeno, si el nitrógeno fuente es principalmente nitrato o si la planta depende de FSN. Aunque las plantas requieren sólo una pequeña cantidades de molibdeno, las limitaciones de molibdeno en forma molibdato se dan debido a que este elemento es susceptible a la

lixiviación y complejación con la materia orgánica, por su parte el Fe puede ser adsorbido en suelos altamente erosionados (Taiz y Zeiger, 2002).

En el nódulo donde se alberga *Rhizobium* la enzima nitrogenasa está compuesta molecularmente por dos componentes: la proteína - Fe y el proteína Mo-Fe, de manera que esta enzima contiene en su estructura molecular iones de molibdeno (Mo^{4+} a través Mo^{6+}) y Fe que actúan como cofactores sirviendo como puentes en la cadena oxidoreducción de electrones. (Taiz y Zeiger, 2002). De esta manera, la oferta de Mo y Fe es esencial para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa y con ello la FSN. Según Tarek Slatni et al (2008), plantas de frijol con crecimiento bajo deficiencias de Fe mostraron que el crecimiento de nódulos y FSN disminuyeron, al igual que la actividad GS involucrada en el ciclo de GOGAT debido a que el Fe está involucrado en la síntesis de Nitrato reductasa. En el mismo sentido Krouma y Abdelly (2003) evidenciaron diferencias genotípicas en requisito Fe y uso eficiente de Fe (UEF) de los cultivares de frijol en función de la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) Los resultados muestran que el cultivar ARA14 produce más materia seca y más nódulos que Coco blanc. ARA14. ARA 14 se caracterizó por una alta capacidad de fijación de nitrógeno y un mejor uso Fe. Los resultados sugieren que la eficiencia en el uso del Fe en la fijación simbiótica de nitrógeno podría ser utilizado para detectar las líneas de frijol tolerantes a la deficiencia de Fe en la condición de la fijación simbiótica de nitrógeno. Según Ella et al., (2006) las leguminosas, que desarrollan una simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, tienen una mayor demanda de hierro debido a que este elemento es componente de la leghemoglobina. Las deficiencias en hierro pueden afectar la iniciación y el desarrollo del nódulo. Múltiples autores concuerdan en la importancia y las evidencias del Fe en la eficiencia de FSN (Tang et al., 1990, O'Hara et al., 1988, Krouma et al., 2006, Moran et al., 1997, Clément et al., 2005).

2. Metodología

2.1 Localización y condiciones experimentales.

Se realizaron dos ensayos en campo: Finca experimental CIAT Berlín II en Darién (Valle del Cauca), y en la Estación experimental CIAT en la localidad de Popayán (Cauca) de junio a septiembre en el 2014 y 2015 respectivamente. Las localidades variaron en altitud, el contenido de nitrógeno del suelo y la precipitación media anual.

La Finca experimental CIAT en Darién se encuentra situada entre 03°5'0 " N y 76°28'0 " W, con una altitud de 1.523 metros sobre el nivel del mar (msnm). La temperatura media anual es de 20°C y una precipitación anual de 1.650 mm. El suelo en Darién se clasificó como un Inceptisol (Typic Dystrandept) con pH 5.6, 7.1% de materia orgánica determinado por espectrometría Walkley-Black, nitrógeno total 0.25% y 26.6 kg ha⁻¹ de nitrógeno disponible. El P disponible fue determinado por Bray II, el cual correspondió a un valor de 6.45 mg kg⁻¹. adicionalmente la densidad aparente del suelo fue determinada por el método del cilindro con un valor correspondiente a 0.97 g/cm³.

La estación de Popayán está localizada entre 2°25'39" N and 76°37'17" W con un altitud de 1750 msnm. El promedio de temperatura en esta localidad fue de 20.1°C y un régimen de lluvia de 2124 mm anuales. El suelo se clasificó como un Inceptisol (Typic dystandept) derivado de cenizas volcánicas, con pH edáfico de 5.71, 14.4% de materia orgánica, nitrógeno total correspondiente a 0.72% y 72.4 kg ha⁻¹ de N disponible, 4.89 mg kg⁻¹ de P disponible determinado por Bray II. La densidad aparente fue determinada por el método del cilindro correspondiente a 1.1 g/cm³.

Los experimentos fueron establecidos en áreas de 2800 m², con fertilización edáfica correspondiente a: 40 kg ha⁻¹ de P (GranoFOS 40®) and 30 kg ha⁻¹ de K excepto nitrógeno (N) además de una fertilización foliar para suplir de los micronutrientes Mo, Fe, Co, Zn.

Las arvenses fueron controladas en preemergencia y pos emergencia al igual que las plagas y las enfermedades. Durante el ciclo del cultivo en cada uno de los ensayos fue registrada la precipitación acumulada con valores de 190 mm en 2014 y 275 mm en 2015.

2.2 Diagnóstico de línea base

Previo al establecimiento del ensayo, se realizó un diagnóstico de línea base de suelos a través de la cuantificación y mapeo de las variables: Población de *Rhizobium* nativo expresado en (ufc/ g suelo) por medio de la técnica de número más probable (NMP) y conteo de poblaciones en plantas trampa de *macroptilium atropurpureum* antes y después de las inoculaciones con *Rhizobium tropici* (CIAT- UNDP, 1988). Otras de las variables de suelo mapeadas fueron: distribución de P disponible ($P \text{ mg kg}^{-1}$), nitrógeno disponible ($N:\text{kg ha}^{-1}$), y % de materia orgánica mediante un muestreo sistemático en 9 puntos. Esto con el fin de suministrar información y dar futuras repuestas al comportamiento de Fijación de N en Frijol voluble.

2.3 Material Vegetal

El material vegetal de frijol voluble consistía en 100 líneas de frijol voluble, correspondiente a 89 líneas avanzadas denominadas líneas ENF y 11 controles. Las poblaciones parentales de las líneas ENF se obtuvieron a través de cruzamientos simples y dobles. El objetivo de estos cruces fue encontrar materiales resistentes a enfermedades especialmente para antracnosis y / o el virus del mosaico común del frijol, por esta razón su nombre ENF (enfermedades) (CIAT, 2012). Para este estudio se seleccionaron líneas de grano rojo, rojo moteado, crema, blanco y amarillo. Los controles fueron G5702 como control histórico reportado por CIAT como genotipo supernodulante, y dos líneas G2333 y G19839 como padres de algunas líneas ENF evaluadas por Ramaekers et al (2013). También fueron usados como controles genotipos no nodulantes como GLORIABAMBA NN y algunas líneas MAC como MAC 4, MAC 9, MAC 33, MAC 74, MAC 56, MAC 25, MAC 57 con atributos de grano comercial, adaptación a alturas medias y alto rendimiento. La semilla de estos genotipos se obtuvo del programa de mejoramiento genético de frijol del CIAT, Cali Colombia.

2.4 Inoculación con *Rhizobium* cepa CIAT 899

Para garantizar la fijación simbiótica de nitrógeno no se aplicaron fuentes de nitrógeno en el suelo y se inoculó con *Rhizobium Tropici* cepa CIAT 899. La preparación del inóculo se realizó siguiendo la metodología reportada por Remans et al., (2008). La cepa fue aislada y purificada proveniente de ampollitas liofilizadas de la colección de *Rhizobium* del CIAT. La bacteria fue sembrada en medio de cultivo LMA (Levadura Manitol Agar) y en incubación a 28°C a pH 6.8. *Rhizobium tropici* es una cepa de rápido crecimiento, la bacteria se trasladó a un medio LMA líquido donde se llevó a crecimiento por aproximadamente 6 días. Se realizaron las pruebas de viabilidad del inóculo con el fin de garantizar una población superior a 1.0×10^7 ufc/ml. Para la fabricación del inóculo sólido para aplicaciones en campo, se inyectaron 30 ml de medio líquido en bolsas de turba estéril de 50 g. Estas bolsas se sellaron y se agitaron por 7 días a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizan las pruebas de viabilidad para garantizar la población de la cepa en campo. La inoculación se llevó a cabo a los 8 y 15 días después del establecimiento (DDE), aplicado en drench a la base del tallo, previa calibración de la bomba y el operario (Anexo A).

2.5 Diseño experimental

Para cada localidad, se realizó un diseño alpha latice 10 x 10 con tres repeticiones para un total de 600 surcos. Los tratamientos correspondieron a cada uno de los 100 genotipos.

Las unidades experimentales consistían en dos surcos de 2.5 metros de largo y 0.60 entre surcos y 10 cm entre plantas, para un total de 50 plantas por repetición y 150 por genotipo con tres repeticiones.

2.6 Determinación de Fijación Simbiótica de Nitrógeno

Se realizaron muestreos en las etapas de desarrollo fenológico del cultivo: floración (R6), mitad de llenado de vaina (R7/8) y cosecha (R9).

Se asignó previo a los muestreos, un surco para realizar muestreos destructivos y otro para determinación de componentes de rendimiento.

En floración (R6), se cuantificó la Nodulación, esta determinación se realizó mediante la extracción de tres plantas y posteriormente se asignó una calificación a través de una escala de evaluación visual donde 1 se considera pobre Nodulación y 9 excelente habilidad nodulante, esta estimación se asignó teniendo en cuenta la homogeneidad de las tres raíces, número de nódulos, viabilidad, abundancia y tamaño de nódulos (Schoonhoven and Corrales CIAT. 1991) (ver Anexo A protocolo FSN).

Tanto en floración como en mitad de llenado de vaina se determinó biomasa aérea. Para esta variable se tomaron 50 cm (largo del surco) de biomasa aérea correspondiente aproximadamente a 6 plantas. La biomasa fue separada en hojas y tallos y secada a 60°C por dos días, para determinación de materia seca. Una submuestra de materia seca fue molida y almacenada en vacutainers® con el fin de pesar 3.0 mg de tejido en microbalanza y encapsularla para la determinación de isótopo de ¹⁵N. Estas variables fueron analizadas en el Centro de Isótopos Estables de UC Davis, California, USA mediante un analizador elemental PDZ Europa ANCA-GSL interfaz con un espectrómetro de masas de isótopos 20-20 relaciones (PDZ Europa Sercon Ltd., Cheshire, UK; Sharp 2005).

Con los datos de isótopos ¹⁵N, la cantidad de nitrógeno fijado (% Ndfa) fue calculada utilizando la siguiente fórmula: (Shearer and Kohl, 1986 citado por Unkovich, 2008).

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}N \text{ de la planta de referencia (no nodulante, maleza)} - \delta^{15}N \text{ de la planta fijadora de } N_2}{\delta^{15}N \text{ de la planta de referencia} - B \text{ valor}} \times 100$$

Donde $\delta^{15}N$ de la planta de referencia es el valor del genotipo no nodulante GLORIABAMBA NN, $\delta^{15}N$ de la planta fijadora corresponde al valor del genotipo nodulante y el B valor es $\delta^{15}N$ de una planta de hábito IV con crecimiento en arena cuarzo libre de fuente de N y por ende, con total dependencia del suministro de N por FSN. Este B valor fue = -3.32‰ obtenido a partir del promedio de $\delta^{15}N$ corregido por N en semilla, del genotipo MAC 33 de hábito IV evaluado en invernadero (sección 2.7).

Para mitad de llenado (R7/8) de vaina se tomaron 50 cm (largo de surco) de biomasa aérea y raíces del surco de muestreo y se determinaron las mismas variables que en floración. En cosecha se cuantificaron componentes de rendimiento como número y peso seco de vainas y granos, además de la determinación de ¹⁵N a partir de harina de grano.

Los índices NUE, NPI y PHI fueron determinados con los datos de mitad de llenado y cosecha. Estos Índices se calcularon a través de las siguientes formulas:

- i) Uso eficiente del Nitrogeno (NUE):

$$\text{NUE} = ((\text{Rendimiento de grano kg ha}^{-1}) / (\text{N en biomasa aérea en kg ha}^{-1}))$$
- ii) Índice de particionamiento del N (%):

$$\text{NPI} = (\text{rendimiento} \times \% \text{ N grano}) / (\text{Kg Biomasa aérea} \times \% \text{N en Biomasa aérea}) \times 100.$$
- iii) Índice de cosecha de vaina (%):

$$\text{PHI} = (\text{biomasa seca de grano en cosecha}) / (\text{biomasa seca de vainas en cosecha}) \times 100.$$

2.7 Determinación de B valor ensayo en invernadero

Debido a la necesidad de determinar el B valor, y con esto cuantificar con más precisión el Nitrógeno derivado de la atmosfera (%Ndfa) en frijol voluble (sección 2.5), se estableció simultáneamente un ensayo en invernadero.

Los genotipos utilizados en este ensayo fueron determinados por diferir en su hábito de crecimiento así: genotipo CAL 96 para habito I, SMC 140 para habito II, GGR18 para habito III y MAC 33 para habito de crecimiento IV o voluble, como control se evaluó el genotipo BAT 477 NN. Se estableció un diseño de bloques completos al azar con 5 repeticiones para cada etapa fenológica correspondiente a floración, mitad de llenado y cosecha. Con 65 unidades experimentales. Cada unidad experimental consistía en un pote de 8 kg con arena cuarzo estéril y libre de N, las plantas fueron inoculadas con la cepa de *Rhizobium* CIAT 899 y regadas semanalmente con solución nutritiva libre de N. Las variables que fueron evaluadas semanalmente fueron los contenidos de clorofila SPAD y el vigor. En los muestreos correspondientes a floración, mitad de llenado y cosecha se secó el tejido de biomasa aérea, nódulos y grano en cosecha a 60°C por 48 horas. A su vez, una submuestra de tejido seco se molió y encapsuló para la determinación de $\delta^{15}\text{N}$ por espectrofotometría de masas en UC Davis, California. La Corrección de N por semilla se realizó a partir de la fórmula:

$$B = \frac{(\delta^{15}\text{N toda la planta} \times \text{N total de toda la planta}) - (\delta^{15}\text{N en semilla inicial} \times \text{Nitrógeno total de semilla inicial})}{(\text{N total de planta} - \text{N total de semilla})}$$

Fueron necesarios para la corrección de N por semilla los datos de peso inicial de semilla y contenidos de N en semilla antes de iniciar el montaje del ensayo.

Adicionalmente durante el muestreo se determinó Nodulación y sus componentes, peso y número de nódulos. Al final fue generada una tabla con los resultados de B value por habito de crecimiento, por etapa de fenológica de desarrollo y combinada, los datos fueron congruentes y cercanos a los valores generados para frijol en reportes pasados (Douxchamps, 2010, Uncovich, 2008)

2.8 Medidas fisiológicas y variables complementarias

Con el dato %Ndfa se logró cuantificar Ndfa total expresado en kg N fijado ha⁻¹ y Nitrógeno total derivado del suelo expresado en kg N ha⁻¹ a partir de las siguientes formulas:

$$(i) N \text{ Total en Biomasa aerea o grano} = \% N \times \text{Biomasa o rendimiento en kg / ha}$$

$$(ii) \text{Total Ndfa (kg /ha)} = \%Ndfa \times \text{total N Biomasa aerea o total N en grano kg /ha}$$

$$(iii) \text{Total Ndfs (kg / ha)} = \text{Total N Biomasa aerea o grano} - \text{Total Ndfa Biomasa o grano}$$

En mitad de llenado de vaina, se registraron los valores de contenidos de clorofila (SMCR) en un trifolio intermedio de 10 plantas en el surco de muestreo, esta medición fue determinada con un equipo *SPAD chlorophyll meter model 502*. Adicionalmente, la fenología fue monitoreada y registrado días a floración por genotipo y repetición al igual que días a madurez fisiológica (número de días desde la siembra hasta que al menos el 90% de las plantas alcanzan la madurez fisiológica en una parcela (Ramaekers et al 2013; Ambachew et al, 2015)

En cosecha fueron tomados 0.5 m del surco de muestreo. Se realizó el registro de número de plantas, numero de semillas y vainas, peso de semillas y vainas, peso de 100 semillas, rendimiento kg ha⁻¹, $\delta^{15}\text{N}$, % N el tejido y con esto la determinación de Índice de cosecha de vaina (PHI), Uso eficiente de N (NUE), Particionamiento del N (NPI).

2.9 Validación de resultados nodulación y Ndfa en invernadero de genotipos promisorios y no promisorios en FSN identificados en campo

Después de los resultados obtenidos en Darién donde se identificaron genotipos promisorios y no promisorios tanto en Nodulación como en %Ndfa, se realizó una validación del comportamiento de los genotipos en invernadero. Se evaluaron los genotipos promisorios en FSN de Darién ENF 28, ENF 235, ENF 234, CGA 10, ENF 98 y ENF 130. Y no promisorios ENF 29, ENF 207, ENF 81, CGA 52 y ENF 95 además de los controles no nodulantes Gloriabamba NN y un genotipo promisorio ENF 130 como control absoluto sin suministro de Nutrientes con solución nutritiva y sin inoculación de *Rhizobium* cepa CIAT 899. Todos los genotipos se desarrollaron en potes de 8 kg en sustrato arena cuarzo estéril y soluciones nutritivas libres de N e inóculo líquido con una población superior a (10^7 *Rhizobium* cells/ml). Este ensayo se organizó en un diseño de experimento en bloques completos al azar; para cada genotipo de frijol, se montaron cuatro repeticiones para un total de 52 plantas en el experimento. El muestreo fue en Floración y se valuó Nodulación a partir de la escala visual 1- 9, el vigor de plantas y del contenido de clorofila a lo largo del ensayo. Adicionalmente las determinaciones de $\delta^{15}\text{N}$, %N se obtuvieron con datos de biomasa aérea y grano para hacer los cálculos de %Ndfa y Total Ndfa.

2.10 Análisis estadístico

Los datos fueron analizados por medio del programa estadístico SAS 9.3 con el paquete PROC MIXED y PROC CORR (SAS Institute Inc., 2008). Se determinaron las medias ajustadas por variable para cada genotipo en cada localidad (ambiente) correspondiente a Darién y Popayán. Esto se obtuvo utilizando la teoría de los modelos mixtos junto con el procedimiento MIXED teniendo en cuenta los efectos de las repeticiones y bloques y los genotipos como los tratamientos. Los coeficientes de correlación de Pearson fueron determinados con el paquete PROC CORR donde *, **, *** correspondían a los niveles de significancia a niveles de probabilidad de $p < 0.05$, 0.01 y 0.001 respectivamente. Para el análisis multivariado, la relación entre las variables a nivel fenotípico se evaluó mediante gráficos Biplots y análisis de componentes principales PCA a través del paquete SAS PRINCOMP indicando hasta 8 componentes (SAS Institute Inc., 2008).

3. Resultados

3.1 Diagnóstico de la línea base del suelo

La FSN se ve afectada por múltiples factores entre ellos la condición del ambiente y en especial la condición en la que se encuentra el suelo (Giller, 2001). Se realizó el mapeo de los lotes antes del establecimiento del ensayo para las dos localidades. Los análisis previos al establecimiento de los ensayos mostraron, pH ácido en ambas localidades sin diferencias significativas con valores de 5.5 en Darién y 5.7 en Popayán (Tabla 3-1).

Respecto a la población de *Rhizobium* nativo, los resultados muestran que la población fue baja con valores de a 1.0×10^4 ufc/g suelo en ambas localidades, evidenciando la necesidad de incrementar la población mediante inoculación uniforme con la bacteria *Rhizobium tropici* Cepa CIAT 899. La población de *Rhizobium* se determinó con el fin de identificar las necesidades de inoculación y el éxito del establecimiento de la bacteria en cada lote, teniendo en cuenta que el antecedente de cultivo de cada uno fue en ambos casos, cultivos de pasturas y mantenimiento de ganado.

La determinación posterior a la primera inoculación mostró que hubo un aumento de la población a valores por encima de 1.0×10^7 en la localidad de Darién, aunque en la localidad de Popayán hubo aumento pero no se llegó a los valores esperados, esto debido en gran medida a las concentraciones de NO_3 en el suelo evidenciados en valores altos de %Materia Orgánica (%MO) correspondientes a 14%. Es preciso recordar que tanto la actividad de la bacteria como el proceso de FSN se inhiben bajo condiciones de suelo con altas concentraciones de N (Giller, 2001) (Tabla 3-1).

Esto también es evidente en los contenidos de Nitrógeno total disponible y NO_3 mapeados (Figura 3-1, Figura 3-2 y Figura 3-3), donde la localidad de Popayán muestra valores mayores a pesar de no fertilizar con Nitrógeno ninguno de los dos ensayos. En cuanto a

36 Evaluación de fijación simbiótica de nitrógeno para la identificación de genotipos promisorios en frijol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.)

fosforo, indispensable también para el éxito del proceso de FSN, los valores son similares para las dos localidades correspondientes a 5.1 y 4.9 valores medidos antes de la fertilización de 60 kg ha⁻¹ de P.

Tabla 3-1. Caracterización de suelos en cuento a: cantidad de nitrógeno, %materia orgánica, fósforo disponible y NPM de *Rhizobium* en Darién y Popayán 2014. Eventos de lluvia y temperatura durante el ciclo de cultivo A. Darien 2014 B. Popayán 2015

Características del suelo antes del experimento						
Localidad	pH	%MO	NT %	N disponible (kg ha ⁻¹)	P (mg/kg)	<i>Rhizobium</i> antes de inoculación (MPN) cfu/g soil
Darién 2014	5.5	7.1	0.35	26.63	5.1	1.0x10 ⁴
Popayán 2015	5.7	14.4	0.7	72.4	4.9	5.0 x10 ⁴

Source: Darien and Popayán soil analysis- Nutrition Plants and soil microbiology Laboratory, CIAT.

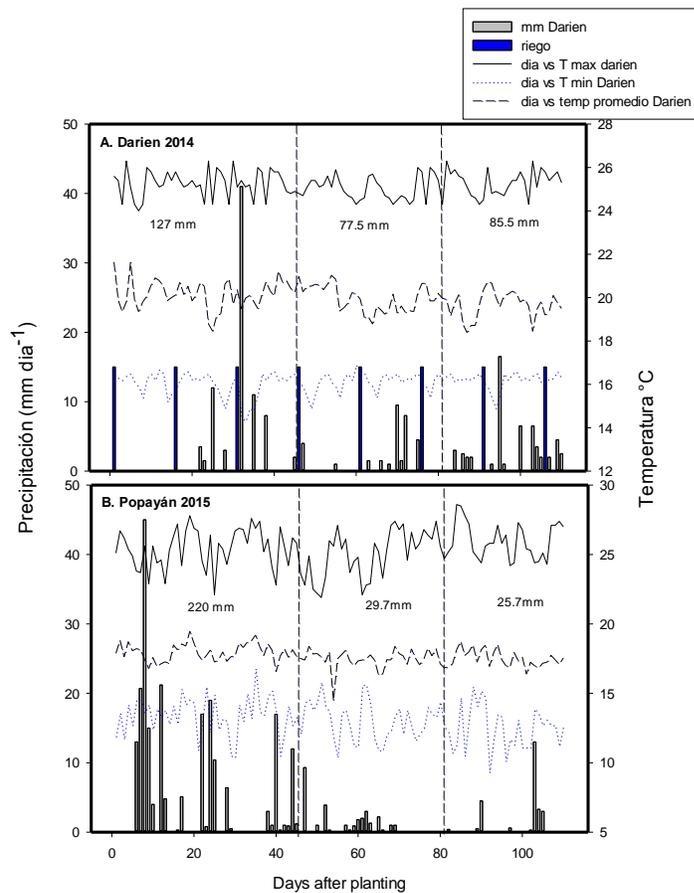


Figura 3-1. Mapeo para definición de línea base antes del establecimiento del ensayo. A. Población de *Rhizobium* en suelo por punto de muestreo UFC/ g suelo

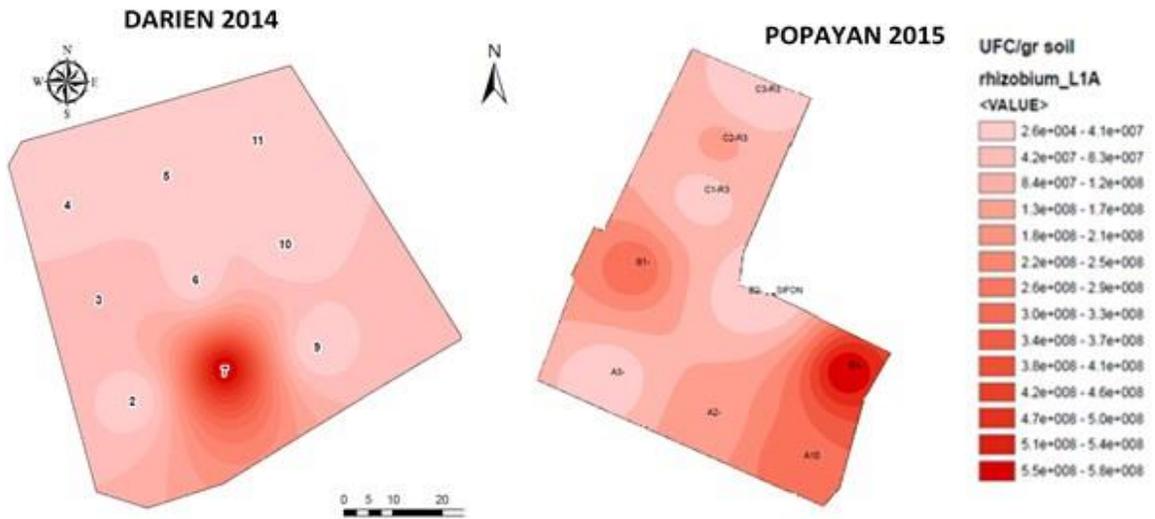


Figura 3-2. Mapeo para definición de línea base antes del establecimiento del ensayo. B. Concentración de P disponible en mg kg^{-1}

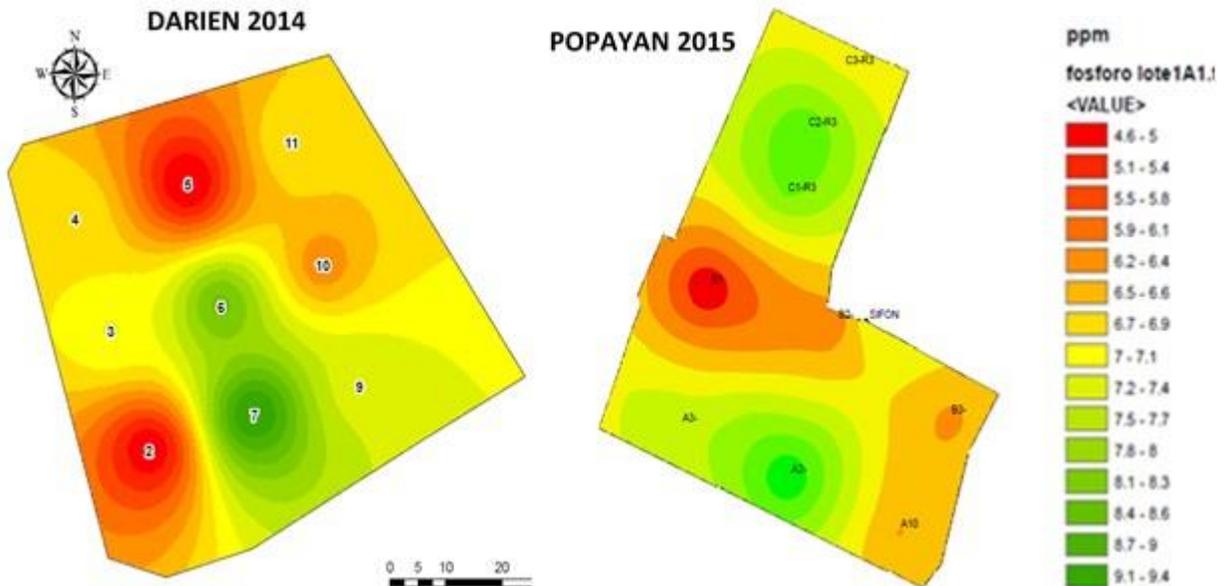
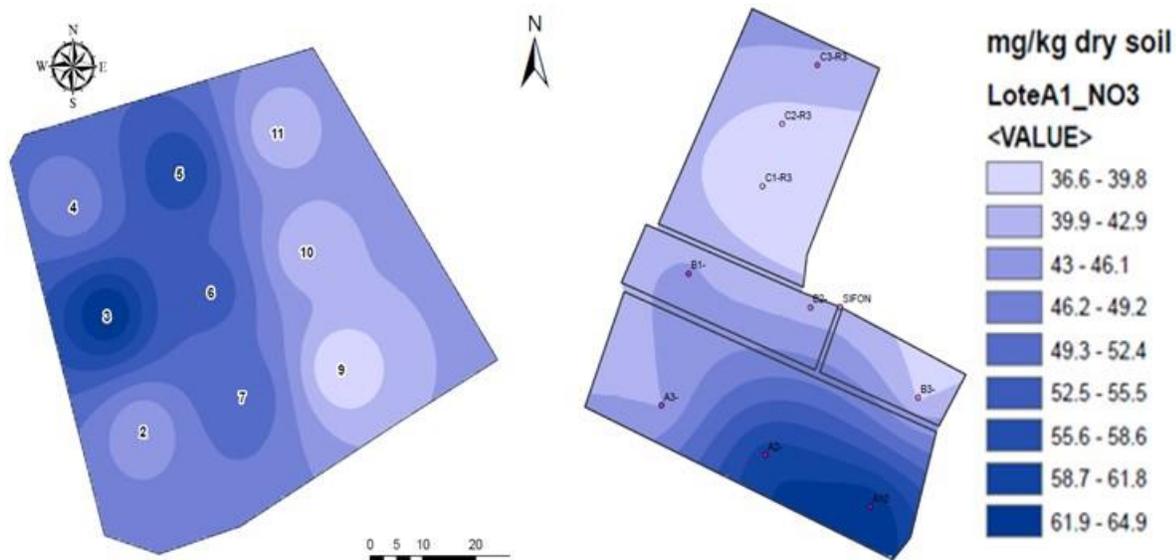


Figura 3-3. Mapeo para definición de línea base antes del establecimiento del ensayo. C. Concentración de Nitratos mg/ kg.



3.2 Habilidad de fijación simbiótica de nitrógeno

3.2.1 Nodulación

Una de las primeras variables a evaluar en floración para ambas localidades fue la habilidad en nodulación a través de la escala visual de 1 a 9, basada en número de nódulos, abundancia, viabilidad, tamaño y homogeneidad entre raíces de muestreo (1 pobre nod y 9 máxima nod).

La nodulación presentó efectos significativos entre localidades. La localidad de Darién presentó mayores valores de nodulación que la de Popayán con valores promedio de calificación de 7.0 y 3.0 respectivamente (Tabla 3-2. Figura 3-4). Los genotipos presentaron diferencias altamente significativas entre localidades. Sin embargo, genotipos como ENF 235 y ENF 28 presentaron la mayor nodulación en las dos localidades. Los genotipos CGA 10 y ENF 234 promisorios para nodulación en la localidad de Darién redujeron la Nodulación drásticamente en la localidad de Popayán. En contraste, el

genotipo ENF 81 presentó los valores más bajos de nodulación en las dos localidades y su comportamiento se clasificó al nivel del genotipo no nodulante GLORIABAMBA NN.

En la Figura 3-5, se observa la apariencia de una raíz clasificada en 8 correspondiente al genotipo ENF 28 de alta nodulación y este comportamiento fue congruente entre las repeticiones en ambas localidades con aproximadamente 1200 nódulos viables, medianos a grandes en tamaños y abundantes. En contraste, se muestra también la apariencia de una raíz con clasificación 2 para el genotipo ENF 81 con menos de 30 nódulos, pobre abundancia y en su mayoría inviábiles.

La evaluación de nodulación presentó una asociación positiva con la biomasa aérea para las dos localidades aunque en la localidad de Popayán la biomasa fue 40% mayor con un promedio de 5594 kg ha⁻¹ comparado con la de Darién con 3753 kg ha⁻¹ (Tabla 2). Genotipos promisorios presentaron buenos valores de biomasa aérea, como ENF 28 con 3878 kg ha⁻¹. Los genotipos no promisorios en nodulación presentaron un valor de biomasa inferior, como ENF 81 con 2135 kg ha⁻¹. Los genotipos no nodulantes presentaron los valores más bajos afirmándose como controles (Figura 3-5).

Figura 3-4. Habilidad en nodulación según escala 1-9 para para los 100 genotipos de frijol voluble en las dos localidades A. Nodulación en la localidad de Darién B. Nodulación en la localidad de Popayán.

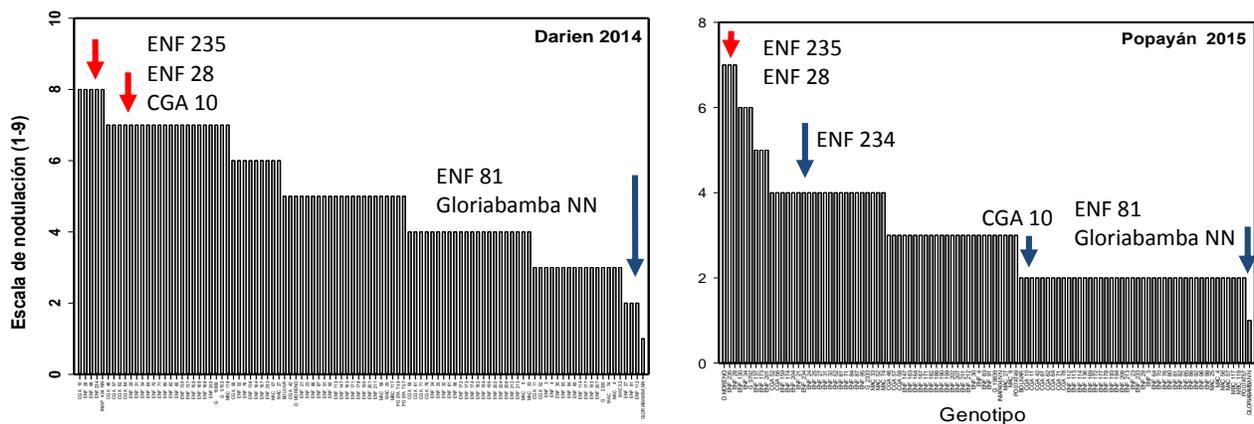


Figura 3-5. Apariencia de nodulación y vigor de biomasa aérea entre genotipos contrastantes para nodulación (A). Genotipo ENF 28 con alta nodulación, promisorio para ambas localidades (B). Genotipo ENF 81, baja nodulación.



3.2.2 Nitrógeno derivado de la atmosfera (%Ndfa)

La fijación de nitrógeno derivado de la atmósfera presentó diferencias altamente significativas entre localidades. La localidad de Popayán presentó una reducción de 30% (Tabla 3-2) probablemente debido a los altos contenidos de MO y N que presentaba este suelo; respecto a los contenidos en la localidad de Darién; resultados acordes a lo reportado, donde altos contenidos de NO_3 en el suelo inhiben el proceso FSN (Giller, 2001; Burchill et al, 2014; Salvagiottia, 2008; Leidi and Rodriguez, 2000, Wolfgang and Arndt, 2002). En contraste, la localidad de Darién que presentó un menor contenido de N en suelo, favoreció un mayor %Ndfa. El %Ndfa para Popayán fue en promedio de 34% en comparación con Darién con 41.3%.

Los índices NUE y NPI fueron 51% menores en Popayán con diferencias significativas ($p < 0.05$), indicando menos eficiencia y removilización de N para la producción de grano. La

translocación de fotosintatos a grano expresada como el índice de cosecha de vainas (PHI), aunque fue mayor en la localidad de Darién, no se presentaron diferencias estadísticas significativas (Tabla 3-2).

Sin embargo, a pesar que los genotipos establecidos en la localidad de Popayán presentaron menores valores para los parámetros de FSN, la biomasa aérea fue 30% superior en relación a la localidad de Darién. La acumulación de N fue 40% mayor al igual que la cantidad de Nitrógeno asimilado desde el suelo (Total Ndfs); y el contenido de clorofila SPAD (Tabla 3-2). El contenido de nitrógeno asimilado derivado del suelo en las dos localidades expresado en kg N ha^{-1} (Total Ndfs) fue superior al Nitrógeno total derivado de la atmosfera kg N ha^{-1} (TNdfa), el 60% del nitrógeno total asimilado provino del suelo, debido a que, la planta de frijol se caracteriza por una asimilación de N compartida (suelo y atmosfera), favoreciendo la del suelo al requerir un menor gasto energético en relación a la asimilación por Fijación Simbiótica de N (Giller, 2001). Por otro lado, fue evidente una relación positiva entre el nitrógeno derivado del suelo (Ndfs total) y el rendimiento (Tabla 3-3). Sin embargo, entre localidades, los genotipos establecidos en Darién presentaron un 40% más de capacidad en fijación de nitrógeno atmosférico proveniente del proceso FSN en relación a la localidad de Popayán. Adicionalmente, las plantas desarrolladas en la localidad de Darién presentaron 12% más rendimiento que en Popayán (Tabla 3-2) con diferencias significativas en el rendimiento de grano entre las dos localidades ($p < 0.05$). Es evidente el efecto positivo del N fijado proveniente de la atmosfera por el proceso de FSN para el rendimiento.

A pesar de las diferencias entre localidades, dentro de cada una, se identificó variabilidad en la capacidad FSN y en rendimiento, identificando genotipos promisorios adaptados a las diferentes concentraciones de N en el suelo.

Tabla 3-2. Promedios y rangos asociados a Fijación Simbiótica de Nitrógeno (FSN) en 100 genotipos de frijol voluble desarrollado en Darién 2014 y Popayán 2015

*, **, *** Significant difference at 0.05 level as estimated from MIXED procedure

42 Evaluación de fijación simbiótica de nitrógeno para la identificación de genotipos promisorios en frijol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.)

Rasgo	Experimento	Media	Min	Max	GxA	
SPAD Contenidos de clorofila	Darien	38.4 ± 0.3	33.7	43.9	a	**
	Popayan	42.5 ± 0.3	37.8	47.7	b	
Escala nodulacion (1-9)	Darien	7.0 ± 0.95	1.0	8.0	a	
	Popayan	3.0 ± 0.7	1.0	7.0	b	**
Biomasa aerea (kg Ha ⁻¹)	Darien	3753 ± 285.3	1527	7488	a	
	Popayan	5594 ± 285.3	2901	8876	b	***
PHI (%)	Darien	74.7 ± 0.2	65.2	83.5	a	
	Popayan	70.3 ± 0.2	57.3	78.2	b	ns
Rendimiento (kg ha ⁻¹)	Darien	3592 ± 157.1	1786	6830	a	***
	Popayan	3172 ± 156.9	1931	4644	b	
N total en biomasa aerea (kg N ha ⁻¹)	Darien	148.1 ± 13.4	59.0	295.7	a	**
	Popayan	251.2 ± 13.5	131.5	401.8	b	
N total en grano (kg N ha ⁻¹)	Darien	130.1 ± 8.0	60.4	200.5	a	ns
	Popayan	120.5 ± 8.0	73.7	183.1	a	
%Ndfa_Grano	Darien	41.3 ± 6.6	0.0	67.8	a	***
	Popayan	34.4 ± 2.8	0.2	43.7	b	
%Ndfa_Biomasa aerea	Darien	24.6 ± 5.5	0.0	44.6	a	***
	Popayan	19.1 ± 3.1	0.0	32.6	b	
Total Ndfa Biomasa (kg N ha ⁻¹)	Darien	35.1 ± 4.4	1.8	85.8	a	**
	Popayan	45.2 ± 4.4	0.1	93.4	b	
Total Ndfa grano (kg N ha ⁻¹)	Darien	49.2 ± 2.0	0.2	91.2	a	***
	Popayan	42.4 ± 2.1	0.3	60.1	b	
Total Ndfs grano (kg N ha ⁻¹)	Darien	81.7 ± 6.7	35.5	144.5	a	ns
	Popayan	78.1 ± 6.8	47.7	181.9	a	
Total Ndfs Biomasa (kg N ha ⁻¹)	Darien	113.1 ± 12.0	48.1	265.0	a	**
	Popayan	205.9 ± 12.0	108.9	340.4	b	
Índice particionamiento de N (%)	Darien	102.4 ± 4.9	45.4	189.5	a	***
	Popayan	53.9 ± 5.0	25.4	94.2	b	
Uso eficiente del N	Darien	27.8 ± 1.3	11.4	60.7	a	***
	Popayan	14.2 ± 1.3	6.5	23.5	b	

3.2.3 Nitrógeno derivado de la atmosfera % Ndfa y el rendimiento de grano

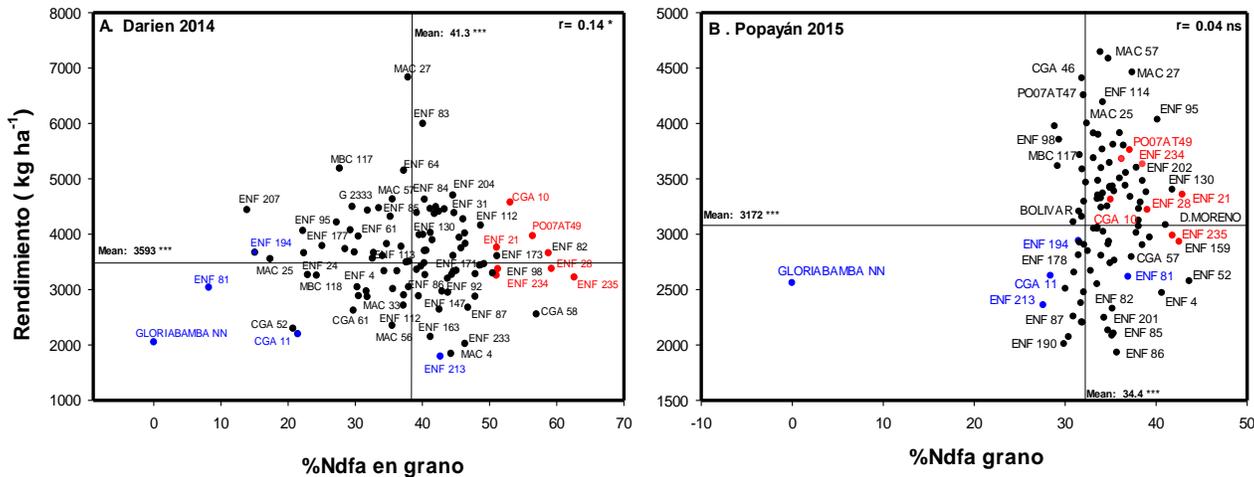
La capacidad para fijar nitrógeno del aire está directamente relacionada con el rendimiento. Sin embargo la correlación entre Ndfa (%) y rendimiento fue baja ($r= 0.14^*$) (Tabla 3-3). Sin embargo, las líneas ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21 and CGA 10 fueron promisorias en FSN en ambas localidades independiente de las condiciones favorables y desfavorables para el proceso de FSN.

Estas líneas promisorias mantuvieron altos niveles de fijación Ndfa superiores a 50% en combinación con buenos rendimientos por encima de 3500 kg ha⁻¹. (Figura 3-6). El

genotipo ENF 235 presentó los valores más altos de %Ndfa en ambas localidades (Figura 3-6). El genotipo ENF 28 fue uno de los mejores fijadores y también presentó tolerancia a antracnosis, atributo evaluado en ensayos anteriores (datos no publicados CIAT, 1995).

El control MAC 27 fue promisorio al presentar valores intermedios de %Ndfa correspondientes a 40% y el más alto de los valores de rendimiento correspondiente a 6827 y 4460 kg ha¹ en Darién y Popayán respectivamente (Figura 3-6). En contraste, los genotipos ENF 213, CGA 11 y ENF 81 fueron inferiores en su capacidad de fijar Nitrógeno con 25% de Ndfa y rendimiento correspondiente a 2500 kg ha⁻¹. GLORIABAMBA NN como genotipo control, evidenció el más bajo rendimiento y 70% del nitrógeno asimilado fue proveniente de suelo (TNdfs) equivalente a 95 kg N ha⁻¹ del total del requerimiento reportado para frijol correspondiente a 136 kg ha⁻¹ (Cardona et al., 1995). Nuestros controles nodulantes G 5702, G 19839, MAC 56, MAC 4, G 2333, MAC 9, MAC 33, MAC 74, MAC 57, MAC 52 and MAC 25 muestran menor %Ndfa y rendimiento que los genotipos identificados como promisorios (Figura 3-6)

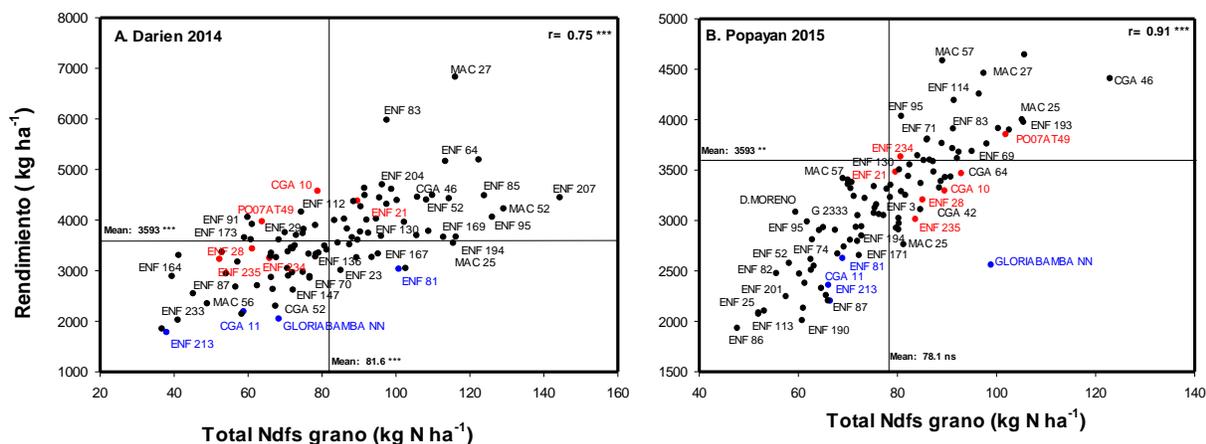
Figura 3-6. La identificación de genotipos que combinan una mayor % Ndfa con el rendimiento de grano (kg / ha) cultivadas en un Inceptisol en Darién en 2014 y Popayán en 2015. Los datos de $\delta^{15}\text{N}$ de grano fueron utilizados para estimar %Ndfa. Los genotipos con valores más altos de rendimiento de grano y %Ndfa fueron identificados en el cuadrante superior derecho. Genotipos marcados en rojo mostraron capacidad FSN superiores en ambos lugares. Genotipos marcados en azul fueron pobres en su capacidad FSN en ambos lugares.



3.2.4 Nitrógeno total derivado de la atmosfera TNdfa (kg N ha⁻¹) y el rendimiento de grano.

Los genotipos ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21, PO 07AT49 y CGA 10 presentaron los valores más altos de nitrógeno fijado en kg N ha⁻¹ (TNdfa). Estas líneas promisorias tuvieron valores de Nitrógeno total derivado de la atmosfera (TNdfa) de hasta 92 kg de N fijado por ha soportado rendimientos de 4600 kg ha⁻¹ sin aplicación de fertilizante (Figura 3-7). Una correlación positiva y significativa fue evidenciada entre Ndfa total y rendimiento de grano para ambas localidades, correspondiente a ($r = 0.40^{***}$) para Darién y ($r = 0.86^{***}$) (Tabla 3-3). Evidenciando que el N fijado a partir del aire es una parte importante del total de N asimilado y que este aporte contribuye positivamente en el rendimiento de grano.

Figura 3-8. . La identificación de genotipos que combinan un mayor Ndfs Total expresado en kg N fijado desde el suelo por ha⁻¹ con el rendimiento de grano (kg ha⁻¹) cultivadas en un Inceptisol en Darién en 2014 y Popayán en 2015. Los datos de δ¹⁵N de grano fueron utilizados para estimar Ndfs total. Los genotipos con valores más altos de rendimiento de grano y Ndfa total fueron identificados en el cuadrante superior derecho. Genotipos marcados en rojo mostraron capacidad FSN superiores en ambos lugares. Genotipos marcados en azul eran pobres en su capacidad FSN en ambos lugares



3.2.6 Fijación Simbiótica de Nitrógeno y extracción de N en biomasa aérea y grano.

Los genotipos establecidos en la localidad de Popayán presentaron 45% más contenido Total de N en parte aérea en kg ha⁻¹ que los de la localidad de Darién (Tabla 3-2). El contenido de N en biomasa se relacionó positivamente con la biomasa de la parte aérea, al igual, que rendimiento con el contenido de N en grano, expresado en (kg ha⁻¹) (Tabla 3-3).

Sin embargo, no se presentaron diferencias significativas entre los genotipos promisorios y no promisorios en cuanto a este rasgo ($p < 0,05$) Tabla 3-2). Los genotipos promisorios en FSN ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21, PO07AT49 y CGA 10 presentaron 33% más de nitrógeno total en grano y parte aérea que los no promisorios, esto ocurrió en ambas localidades . Los controles G 5702, G 19839, MAC 56, MAC 4, G 2333, MAC 9, MAC 33, MAC 74, MAC 57, MAC 52 y MAC 25 mostraron un comportamiento similar con un promedio de 132 kg N ha⁻¹ en cuanto al contenido de N con respecto a los genotipos

promisorios con un valor de 138 kg N ha⁻¹. De manera que, se afirma la existencia de una influencia positiva del N de la capacidad en FSN

Tabla 3-3. Coeficientes de correlación (r) entre % Nitrógeno derivado de la atmosfera estimado usando tejido de parte aérea (**%Ndfa-SH**), % Nitrógeno derivado de la atmosfera usando tejido de grano (**%Ndfa-G**).Nitrógeno Total derivado de la atmosfera en kg N ha⁻¹ usando grano (**TNdfa-G**), Nitrógeno total derivado del suelo en kg N ha⁻¹ usando grano (**TNdfs-G**), Nitrógeno total en grano kg N ha⁻¹ (**N total G**), uso eficiente del nitrógeno en kg de grano producido por N asimilado en parte aérea kg.kg⁻¹ (**NUE**), Biomasa aérea en kg ha⁻¹ y el rendimiento en kg ha⁻¹ de 100 líneas de frijol voluble establecidas en Darién y Popayán Colombia en 2014 and 2015.

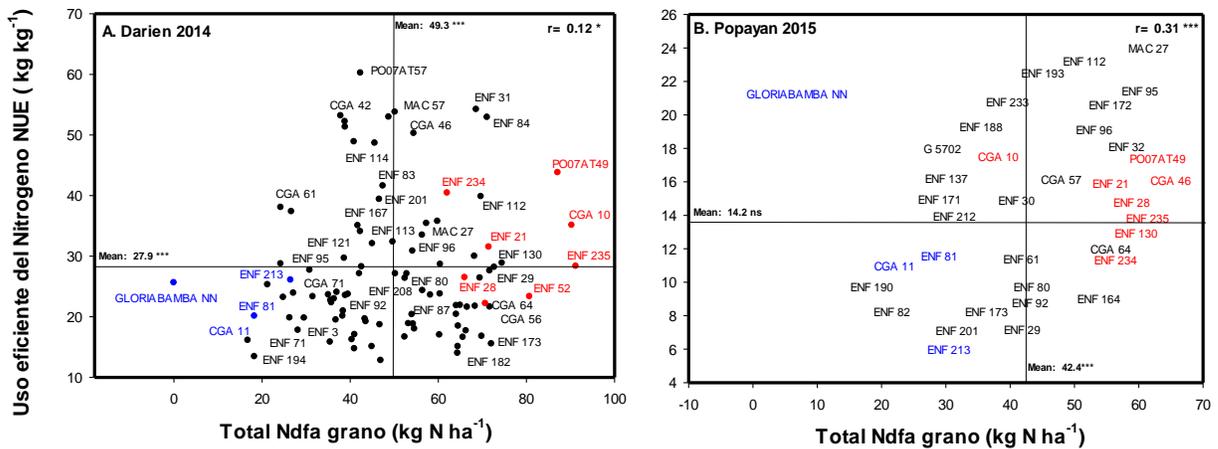
Darién									
Rasgo	% Ndfa-SH	%Ndfa-G	TNdfa-G	TNdfa-SH	TNdfs-G	N total G	NUE	SB	GY
% Ndfa-SH	1								
%Ndfa-G	0.42***	1							
TNdfa-G	0.21**	0.72***	1						
TNdfa-SH	0.76***	0.29**	0.30**	1					
TNdfs-G	0.34***	-0.67***	0.07	0.10*	1				
N total G	-0.16*	0.15*	0.52***	0.09	0.81***	1			
NUE	0.11	0.12*	0.12*	0.39***	0.33***	0.35***	1		
SB	0.05	0.04	0.21**	0.48***	0.28**	0.36***	-0.59***	1	
GY	0.14*	0.14*	0.40***	0.06	0.75***	0.94***	0.33***	0.31***	1
Popayán									
Rasgo	% Ndfa-SH	%Ndfa-G	TNdfa-G	TNdfa-SH	TNdfs-G	N total G	NUE	SB	GY
% Ndfa-SH	1								
%Ndfa-G	0.46***	1							
TNdfa-G	0.02	0.35***	1						
TNdfa-SH	0.58***	0.20**	0.24**	1					
TNdfs-G	-0.32**	-0.34***	0.73***	0.09	1				
N total G	-0.23**	-0.09	0.89***	0.15*	0.96***	1			
NUE	0.02	0.03	0.31***	0.45***	0.31***	0.33***	1		
SB	0.20*	-0.07	0.32***	0.60***	0.37***	0.37***	-0.60***	1	
GY	0.21*	0.04	0.86***	0.20**	0.91***	0.95***	0.33***	0.41***	1

3.2.7 Índice de eficiencia de uso e índice de particionamiento de nitrógeno

Los genotipos establecidos en la localidad de Popayán en la localidad de Popayán presentaron mayor acumulación de N en parte aérea aunque una menor acumulación de N en grano. Dentro de las localidades se evidencia que los genotipos promisorios tienen mayor eficiencia en uso y particionamiento del nitrógeno (NUE y %NPI) hacia la producción de grano, estos genotipos se caracterizaron por presentar mayor producción de grano por unidad de N asimilado en comparación con genotipos con una menor capacidad en fijación de N atmosférico.

NUE mostró un asocio positivo con Ndfa total correspondiente a $r= 0.12$ y $r= 0.31$ para Darién y Popayán respectivamente (Tabla 3-3). Los genotipos promisorios en Fijación Simbiótica de N, **ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21, PO 07AT49 y CGA 10** en Darién mostraron una mayor eficiencia de uso de N con 33 kg kg^{-1} de grano por kg de N asimilado en comparación con Popayán con sólo 16 kg kg^{-1} . Por el contrario, los genotipos no promisorios en fijación **ENF 213, CGA 11 y ENF 81** y el no nodulante GLORIABAMBA NN presentaron menores valores de NUE y NPI correspondientes a 20 kg kg^{-1} para Darién y 13 kg kg^{-1} en promedio para frijol voluble en Popayán (Figura 3-9). Los controles **G 5702, G19839, MAC 56, MAC 4, G 2333, MAC 9, MAC 33, MAC 74, MAC 57, MAC 52 y MAC 25**, presentaron un comportamiento similar a los genotipos promisorios en cuanto a NUE y NPI en la localidad de Popayán, por el contrario, estos controles fueron 10% menos eficientes en el uso del Nitrógeno en la localidad de Darién comparado con los promisorios (Figura 3-9)

Figura 3-9. La identificación de genotipos que combinan una mayor N total derivado de la atmósfera (TNdfa) en kg de N por hectárea con NUE cultivadas en un Inceptisol en Darién 2014 y en Popayán en 2015. Los genotipos con valores más altos de y TNdfa fueron identificados en el cuadrante superior derecho. Genotipos marcados en rojo mostraron capacidad FSN superiores en ambos lugares. Genotipos marcados en azul fueron pobres en su capacidad FSN en ambos lugares

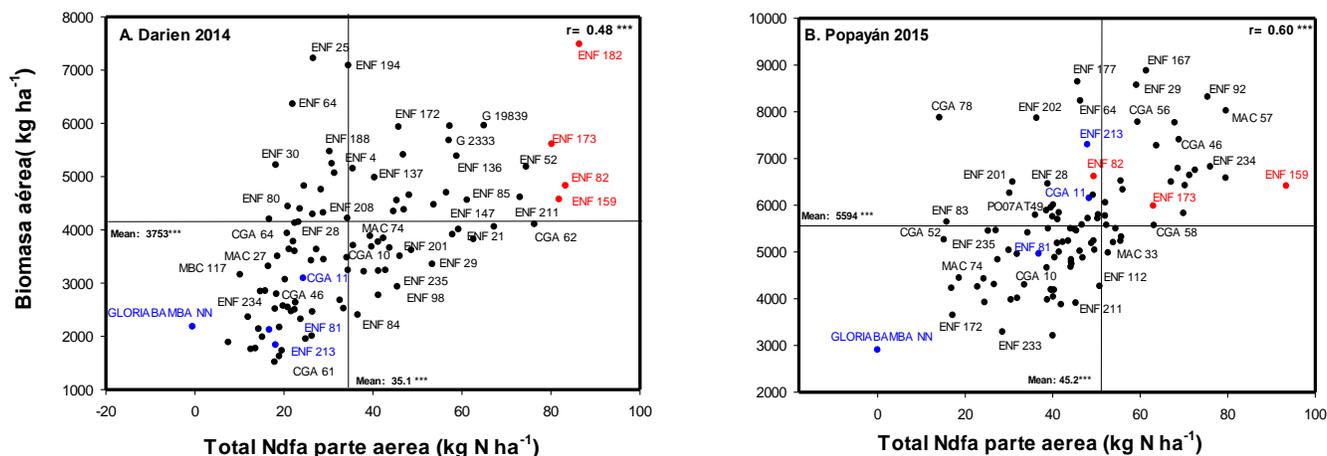


3.2.8 Fijación Simbiótica de nitrógeno y producción de biomasa aérea.

Se presentaron diferencias altamente significativas para producción de biomasa aérea entre localidades. La biomasa aérea fue 30% mayor en Popayán que en Darién. Sin embargo, genotipos en la localidad de Popayán presentaron menor Fijación de N y rendimiento (Tabla 3-2). La relación fue positiva y significativa entre la capacidad fijadora de N de los genotipos y la cantidad de biomasa aérea producida correspondiente a $r = 0.48$ y $r = 0.60$ para la localidad de Darién y Popayán respectivamente (Tabla 3-3) Se presentó variación entre el TNdfa (kg N ha^{-1}) de los genotipos y la producción de en ambos lugares, esto se debe probablemente a las diferencias entre genotipos en su capacidad para adquirir N del suelo (TNdfs) y también a las diferencias en la eficiencia de uso de N para la producción de biomasa de parte aérea. ENF 182 fue un genotipo muy vigoroso con un mayor valor de TNdfa (kg N ha^{-1}) en Darién, mientras ENF 167 combinó mayor vigor y valor de TNdfa (kg N ha^{-1}). ENF 173, ENF 82 y ENF 159 fueron genotipos superiores en

su capacidad FSN en Darién, mientras ENF 159 presento una capacidad superior en Fijación Simbiótica de N pero moderado en su producción de biomasa aérea (Figura 3-10). La línea MAC 27 presentó un nivel moderado de biomasa aérea en Darién con un rendimiento excepcional. Aunque su FSN fue moderada. Genotipos promisorios en FSN ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21, PO07AT49 y CGA 10 presentaron una biomasa de copa de moderada a buena en ambas localidades relacionándose positivamente con Ndfa y Rendimiento.

Figura 3-10. La identificación de genotipos que combinan una mayor Biomasa de parte aérea (SB) en kg de N por hectárea cultivados en un Inceptisol en Darién 2014 y en Popayán en 2015. Los genotipos con valores más altos de SB y TNdfa fueron identificados en el cuadrante superior derecho. Genotipos marcados en rojo mostraron capacidad FSN superiores en ambos lugares. Genotipos marcados en azul fueron pobres en su capacidad FSN en ambos lugares.



3.3 Análisis multivariado componentes principales (PCA) y biplots

3.3.1 Análisis multivariado componentes principales CP

El análisis multivariado muestra que los tres primeros componentes explican el 83% de la variabilidad observada en el fenotipaje de FSN de los 100 genotipos de frijol voluble en las localidades de Darién y Popayán (Tabla 3-4). En el componente 1 los rasgos que más contribuyeron a la variabilidad fueron: %Ndfa, nitrógeno total de parte aérea expresado en kg ha^{-1} , nitrógeno derivado del suelo (TNdfs).

Uso eficiente del nitrógeno (NUE) y % de particionamiento del N (NPI). En el componente 2, las variables fueron: Biomasa de parte aérea, Contenido total de N en grano, nitrógeno derivado del suelo (TNdfsG) a partir de grano y el rendimiento. En el componente 3 se encontraron: estimación visual de Nodulación y nitrógeno total derivado de la atmosfera (TNdfa) a partir de grano y parte aérea. PHI estaba en el cuarto componente con menor influencia en el rendimiento de grano. El análisis de PC sugiere que bajo condiciones nitrógeno favorables y desfavorables para el proceso FSN (ubicaciones Darién y Popayán), el rendimiento se asocia principalmente con el nitrógeno del suelo y su acumulación en la biomasa, y también con la capacidad de usar y particionar eficientemente el N asimilado.

Otros rasgos que influyen en gran medida el rendimiento fueron la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico y la biomasa aérea. La Nodulación tiene una influencia moderada, sin embargo, se demuestra que no necesariamente a mayor Nodulación existe una mayor fijación y rendimiento y que es probable que estas variables dependan más de la calidad de nódulos de la cantidad. Estos rasgos demuestran la importancia de la asimilación tanto de N del suelo como de N del aire complementándose como fuentes alternas que contribuyen juntas a la productividad de frijol voluble.

Tabla 3-4. Nodulación: Evaluación visual de nodulación , biomasa aérea (kg ha⁻¹), NG: N total en grano (kg ha⁻¹), Nsh: N total en biomasa aérea (kg ha⁻¹), %Ndfa-G: % N derivado de la atmosfera usando grano, TNdfa-Sh: N total fijado derivado del aire a partir de biomasa aérea (kg N ha⁻¹), TNdfs-Sh: N total derivado del suelo a partir de biomasa aérea (kg N ha⁻¹), TNdfa-G: N total fijado derivado del aire a partir de grano (kg N ha⁻¹), TNdfs-G: N total derivado del suelo a partir de grano (kg N ha⁻¹), rendimiento (kg ha⁻¹), NUE: Uso eficiente del Nitrógeno (kg g kg N⁻¹), NPI: Índice de particionamiento del nitrógeno and PHI: Índice de cosecha de vaina.

Componentes principales	1	2	3	4	5	6
Eigenvalues	4.230	3.360	1.553	0.639	0.503	0.392
% Varianza acumulada	0.385	0.690	0.831	0.889	0.935	0.971
Matriz de componentes						
Nodulación	0.064	0.134	0.620	-0.611	0.140	0.444
Biomasa aerea	0.416	0.240	-0.106	-0.042	0.208	-0.097
NG	-0.154	0.497	0.004	-0.024	-0.334	-0.036
Nsh	0.413	0.254	-0.116	0.039	0.255	0.019
%Ndfa-G	0.314	0.302	0.218	0.047	-0.262	-0.663
TNdfa-Sh	0.276	0.153	0.350	0.729	0.052	0.415
TNdfs-Sh	0.375	0.234	-0.281	-0.245	0.294	-0.159
TNdfa-G	-0.067	0.348	0.507	0.075	-0.115	-0.639
TNdfs-G	-0.166	0.406	-0.345	-0.082	-0.343	0.424
Rendimiento	-0.171	0.472	-0.099	0.055	0.036	-0.021
NUE	0.413	0.139	-0.062	0.106	0.502	0.082
NPI	0.424	0.090	0.009	0.067	0.537	-0.004
PHI	0.044	0.134	0.411	-0.630	0.120	0.243

3.4 Análisis de Biplots

En análisis de biplots permite observar el agrupamiento de genotipos según características en común y su relación con los componentes principales. Los 100 genotipos fueron analizados y agrupados en tres clúster relacionados con los valores de las variables de fijación de nitrógeno, biomasa y rendimiento. Los genotipos fueron agrupados en 3 clúster para las localidades de Darién y Popayán donde se identificaron los mejores agrupamientos y los peores. Para la localidad de Darién (Figura 3-11) las variables de rendimiento y fijación presentaron valores deseables con agrupamiento en el clúster #3 seguido por el #1 y por último el clúster #2 con valores menos favorables. Para la localidad de Popayán (Figura 3-12) en términos de fijación de Nitrógeno, eficiencia del uso de N y rendimiento, los mejores genotipos se ubicaron en el Clúster #3, seguido por Clúster # 2 y clúster #1.

3.4.1 Análisis de clúster localidad Darién

3.4.1.1 Clúster #3:

Se encuentran los genotipos con mayor fijación de nitrógeno ($>60 \text{ kg N ha}^{-1}$) tanto en Grano como en parte aérea, además de buen rendimiento (3916 kg ha^{-1}), mayor cantidad de biomasa (4882 kg ha^{-1}), nitrógeno en grano ($147.9 \text{ kg N ha}^{-1}$) y parte aérea ($195.0 \text{ kg N ha}^{-1}$). Sin embargo, estos genotipos tienen menos Uso eficiente del Nitrógeno (NUE) y particionamiento (NPI), es decir que, producen 22 kg de grano por kg de nitrógeno, este valor en frijol es bueno, sin embargo, hubo genotipos en el clúster # 1 que produjeron más grano con la misma cantidad de N asimilado, con un valor promedio de 48 kg de grano por kg de N siendo más eficientes.

En general los genotipos en este clúster tomaron nitrógeno tanto de la atmosfera como del suelo y lo removilizaron adecuadamente a grano al evidenciar buen rendimiento, buen particionamiento y contenidos de N en grano. Dentro de este clúster podemos encontrar 44/100 genotipos, sin embargo de estos 44, 18 genotipos presentaron rendimiento superior a $> 4000 \text{ kg ha}^{-1}$. Continuando con la selección se encontraron 12 genotipos con ambos atributos tanto mayor rendimiento como mayor Fijación derivada de la atmosfera TNdfaG ($>60 \text{ kg N fijado ha}$), estos genotipos correspondieron a: CGA 10, CGA 56, CGA 57, D. MORENO, ENF 21, ENF 52, ENF 64, ENF 85, ENF 130, ENF 182, ENF 188 y ENF 204.

De esos 12 genotipos 9 /100 tienen Biomasa superior a 4000 kg ha⁻¹ correspondientes a: CGA 10, CGA 56, D. MORENO, ENF 52, ENF 64, ENF 85, ENF 182, ENF 188, ENF 204. Estos 9 Genotipos tienen a parte de los atributos anteriores valoración de Nodulación de >6. El genotipo destacado para este clúster fue CGA 10. A pesar de esto, en este clúster hay genotipos con TNdfa bajo <40 kg N ha como CGA 71, ENF 4, ENF 24, ENF 95, ENF 177, ENF 194, ENF 207, G 2333 y MAC 74.

Estos están en este clúster a pesar de tener baja fijación de N porque presentaron valores altos de biomasa aérea 4950 kg ha y rendimiento promedio 3700 kg ha. No tienen un valor alto de NUE (21.8 kg de grano por cada kg de N) y tiene un valor alto de Nitrógeno derivado del suelo. Estos genotipos toman más N de suelo (111 kg N ha) que de la atmosfera (30.5 kg N ha) y lo que toman lo translocan adecuadamente a rendimiento. Solo 5 genotipos en este clúster tuvieron PHI superior a 80% correspondiente a: ENF 24, ENF 159, ENF 173, ENF 174 y ENF 177, la correlación con YDHA y Ndfa fue de 0.24 y 0.17 respectivamente.

3.4.1.2 Clúster #2:

Este agrupamiento es grande con 37 Genotipos con los menores valores en rendimiento, fijación de N tanto de la atmosfera y N en grano, este se divide en dos subgrupos 2A y 2B: Clúster 2A: Este agrupamiento está más influenciado por las variables NUE, NPI y rendimiento, sin embargo los genotipos más cercanos al eje TNdfa tienen valores significativos de fijación de N superiores a 60 kg N ha , NUE de 32kg de grano por kg de N , biomasa intermedia inferior a Clúster #3 con 3200 kg ha y rendimiento de 3600 a 4000 kg ha , correspondiente a los genotipos CGA 64, ENF 28, ENF 29, ENF 96, ENF 112, ENF 113, ENF 201, ENF 234 y ENF 235.

De estos 10 genotipos 6 tienen valores de fijación destacados > 65 kg N ha CGA 64, ENF 28, ENF 29, ENF 112, ENF 234 y ENF 235 además presentaron valores altos de Nodulación y de estos solo ENF 112 tuvo esta característica más un rendimiento superior a 4.0 ton ha⁻¹.

Cluster 2B: Este subagrupamiento está caracterizado por presentar los valores más bajos en rendimiento de 1700 a 3100 kg ha, baja fijación de Nitrógeno de 36 kg N ha, valores bajos de NUE (20.4) y NPI y biomasa (3000 kg ha) aquí se encuentran 19 genotipos

correspondientes a CGA 11, CGA 52, CGA 58, ENF 3, ENF 23, ENF 70, ENF 81, ENF 86, ENF 87, ENF 92, ENF 147, ENF 163, ENF 164, ENF 212, ENF 213, ENF 233, MAC 4, MAC 33, MAC 56.

3.4.1.3 Cluster #1:

Este Agrupamiento es pequeño con 17 genotipos. Es el clúster que contienen a los genotipos con menor producción de Biomasa aérea (2227 kg ha) pero con el mayor rendimiento (4015 kg ha), esto se debe en gran medida a sus altos valores de NUE y NPI (48.5 kg de grano por cada kg de N y 173.1 %) comparado con los demás clúster (28.3 promedio), estas plantas también tienen capacidad de fijar Nitrógeno (47.3 kg N fijado ha) aunque con valores menores a los genotipos contenidos en clúster 3 (55 a 60 kg N ha). El NUE y NPI fueron las variables que más influyeron a este clúster, en él están los genotipos más eficientes en el uso del Nitrógeno. De los 17 genotipos encontrados en este clúster solo 6 genotipos tienen valores superiores de TNdfa ó nitrógeno fijado superiores a 60 kg N ha⁻¹ , rendimientos de casi 5000 kg ha⁻¹ (4914 kg) y NUE y NPI sobresalientes > 45 NUE correspondientes a ENF 31, ENF 84, MAC 27, CGA 46 y PO 07A T 49.

Por otra parte, Genotipos No sobresalientes con valores de fijación inferiores a 40 kg N ha, Biomasa aérea de 1860 kg ha y rendimientos de intermedios a bajos (3200 kg ha) corresponden a los genotipos CGA 42, CGA 61, CGA 78, ENF 61, ENF 81 y ENF 114.

Incluyendo todos los clúster para Darién, genotipos con rendimientos > 3500 kg ha y TNdfa > 50 kg N ha corresponden a 33/100 entre los cuales tenemos a ENF 235, CGA 10, PO 07A T 49, ENF 52, ENF 29, ENF 204, ENF 173, CGA 56, CGA 57, ENF 21, ENF 84, ENF 82, ENF 174, ENF 112, ENF 31 y ENF 28.

3.4.2 Análisis de clúster localidad de Popayán

En términos de fijación de nitrógeno, eficiencia del uso de N y rendimiento del mejor al peor los clúster se organizaron así: Clúster #3, Clúster # 2 y Clúster #1 (Figura 3-12)

3.4.2.1 Clúster #3:

En este clúster se albergan 52/100 Genotipos más de la mitad de la población evaluada y en él se caracteriza el CP 1 con una varianza de 42.8% donde influyen en mayor medida las variables de rendimiento, Uso eficiente del N además de fijación de N del aire y del suelo determinadas ambas a partir de Grano (TNdfaG y TNdfaSh).

Los genotipos cercanos a los ejes de este clúster tienen buen rendimiento 3354 kg ha, mayor fijación Simbiótica de N (46.6 kg N fijado ha), a su vez la mayor asimilación de N derivado del Suelo (82.3 kg de N ha derivado desde el suelo), evaluación visual de nodulación con escala 3.3 y Uso eficiente del N (16.6 kg de grano por cada kg de N asimilado), se afirma, que es el mejor clúster para variables de interés como el rendimiento y la fijación de N.

Sin embargo, en este clúster están los genotipos con menor valor de biomasa de parte aérea 4800 kg ha comparado con los genotipos agrupados en el 7200 en el clúster 2. De los 52 genotipos contenidos en este clúster hay 16/100 con TNdfa superior a 50 kg N fijado ha con promedio de 53.3, estos genotipos corresponden a CGA 52, ENF 112, ENF 130, ENF 172, ENF 174, ENF 21, ENF 235, ENF 28, ENF 32, ENF 84, ENF 95, MAC 25, MAC 27, MAC 52, MAC 74, PO07AT49.

De estos 19 genotipos, 10/100 presentaron combinación de TNdfa > 50 kg N ha y rendimiento superior a 3600 kg ha , estos corresponden a CGA 52, ENF 235, ENF 28, ENF 32, ENF 84, ENF 95, MAC 25, MAC 27, MAC 52 y PO07AT49. Por otra parte, hay genotipos que se comportan opuestos a los ejes de este clúster donde la fijación de N es inferior a 40 kg N fijado ha y el rendimiento < 3600 kg ha⁻¹ BOLÍVAR, CGA 71, ENF 137, ENF 171, ENF 188, ENF 194, ENF 199, ENF 207.

3.4.2.2 Clúster #2:

Las variables que se contemplan aquí son Biomasa de parte aérea, nitrógeno derivado de la atmosfera y el suelo (TNdfs TNdfa) y N total. Los 25 genotipos que se encuentran en este clúster presentan mayor rendimiento con 3407 kg ha⁻¹, el mayor valor de NUE 11.78 kg de grano por kg de N asimilado y de al igual manera, la mayor Biomasa aérea aproximadamente de 7267 kg ha⁻¹, hay que destacar que la fijación de N proveniente del suelo es mayor que la de la atmosfera, este clúster presenta los valores mayores de TNdfs 266.63 kg de N fijado desde el suelo comparado con 44.86 desde la atmosfera, por ende el valor de N en parte aérea también es el mayor 328.9 kg ha⁻¹.

Se puede decir que el rendimiento depende en mayor medida del N suministrado por el suelo que por la simbiosis además hubo un buen uso del N a grano 11.78, sin embargo recordemos que estos valores fueron menores a Darién con 48.5 kg de N por cada kg de N asimilado. La nodulación en todos los clúster fue baja, en este en particular fue escala visual de nodulación de 2.6.

En cuanto a fijación atmosférica de nitrógeno, los genotipos con valores de TNdfa superiores a 50 kg N fijado ha corresponden a CGA 46, CGA 64, ENF 159, ENF 204, ENF 164, ENF 167, ENF 234, MAC 57, destacando a CGA 46 con 60.1 kg N fijado ha. Y de estos, genotipos tienen valores de rendimiento por encima de los 3600 kg ha⁻¹. CGA 46, ENF 167, ENF 234, MAC 57. En cuanto a biomasa de Copa los 25 genotipos en este clúster tienen valores superiores a los 5000 hasta 8000 kg ha⁻¹, son genotipos con un valor de biomasa alto. Recordemos que en Darién el máximo fue de 7000 y un promedio menor con 4700 contra 7200 kg ha⁻¹ en Popayán.

Los valores de fijación derivado de la atmósfera en parte aérea TNdfa-Sh fue mayor que en grano con 19 genotipos sobresalientes >50 kg N fijado ha. Y en promedio TNdfa-Sh de 69.3 kg N fijado ha. Los genotipos que corresponden a un valor > 60 kg N ha de TNdfa son CGA 42, CGA 46, CGA 62, CGA 64, ENF 159, ENF 164, ENF 208, ENF 234, ENF 70, ENF 71, ENF 91, ENF 92 y MAC 57.

Por otro lado, los genotipos No promisorios para fijación de N atmosférico con valores menores a 40 kg N ha corresponden a CGA 56, CGA 78, ENF 213, ENF 23, ENF 29,

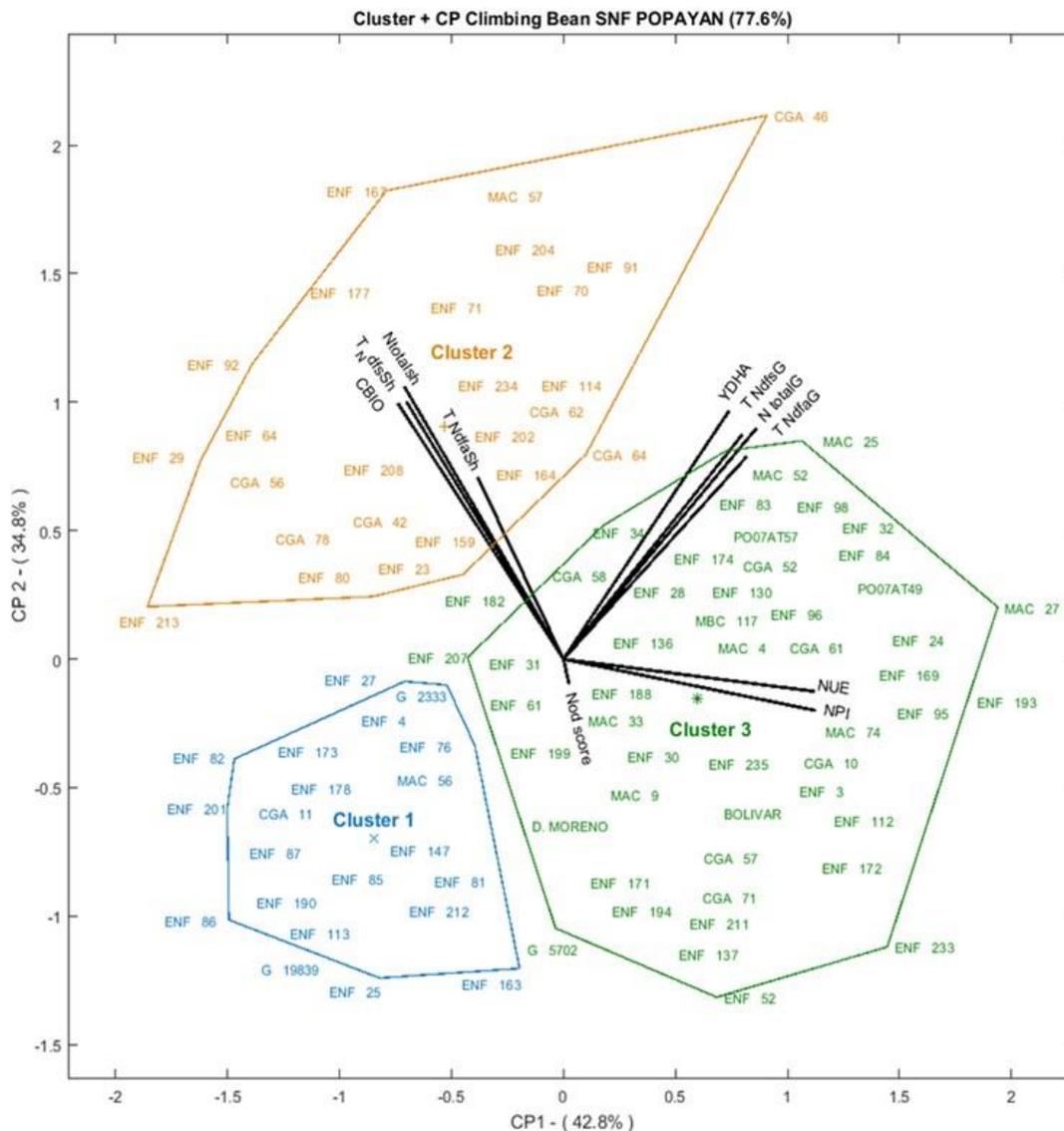
ENF 64, ENF 80, ENF 92. Todos estos genotipos tuvieron rendimientos inferiores a 3600 kg ha⁻¹.

3.4.2.3 Clúster # 1:

Este clúster abarca 21 /100 genotipos y es el menos promisorio de los tres debido a que los genotipos contenidos aquí presentaron los menores valores de rendimiento 2402 kg ha promedio, valores de FSN que no superan los 50 kg de N ha correspondiente a 31.5 kg N fijado por ha, menor uso eficiente de N de 10.6 y solo el 40% de N fue a grano como NPI, los contenidos de N en grano son los menores con 60.6 comparado con 82.2 en clúster 3 y hasta menor Nitrógeno derivado del suelo con 180.87 kg N ha comparado con 266.4 en clúster #2. Adicionalmente los genotipos de este clúster tienen alta TNdfs 198 kg N ha, de lo que se infiere que toman más N del suelo que fijado de la atmosfera. Todos los genotipos aquí contenidos tienen TNdfa inferior a 50 kg N ha⁻¹., lo que los hace no promisorios. Por otro lado se encuentran los no promisorios con valores < 30 kg N ha CGA 11, ENF 113, ENF 178, ENF 190, ENF 201, ENF 212, ENF 25, ENF 81, ENF 82, ENF 85, ENF 86 y G 19839, los más alejados y opuestos los CP 1 y CP 2.

En términos Generales en Popayán para los tres Clúster, la fijación de N fue menor tanto en Nodulación como en valores de TNdfa, sin embargo dentro de los 100 genotipos encontramos 25/100 con valores > 50 Kg N fijado ha FSN. De esos 25 genotipos 18/100 se encuentran en el clúster 3 y 7/100 en el clúster #2, lo cual reitera la importancia de variables de FSN especialmente TNdfa-G para el rendimiento. Estos genotipos promisorios presentaron de 3000 hasta los 4500 kg ha en rendimiento. Algunos de los destacados fueron CGA 46, PO07AT49, MAC 27, ENF 95, MAC 25, MAC 52, CGA 52, ENF 167, ENF 32, ENF 84, ENF 234, ENF 28, ENF 235.

Figura 3-12. Variables de FSN biomasa y rendimiento representadas en Biplots de 100 genotipos de frijol voluble establecidos en la localidad de Popayán (2015). Los clúster o agrupamientos se identifican por colores y la magnitud de los vectores indica el CP de cada variable.



3.5 Validación de resultados FSN en Invernadero

La validación del comportamiento de genotipos promisorios en campo arrojó resultados positivos, debido a que la respuesta fue congruente tanto para genotipos promisorios como para genotipos identificados con poca habilidad en FSN. Los genotipos en este ensayo dependían exclusivamente del N que eran capaces de asimilar a través de fijación, gracias

a que su desarrollo fue llevado a cabo en arena cuarzo estéril con inoculación de *Rhizobium tropici* y sustentado nutricionalmente con soluciones nutritivas sin fuente de N. Gracias a estas condiciones la respuesta en crecimiento y desarrollo no se vio sesgada por ningún otro factor que no fuera FSN.

Tabla 3-5 Evaluación de nodulación y determinación de %Ndfa-G en genotipos identificados como promisorios y no promisorios bajo condiciones de invernadero
Evaluación de Nodulación y determinación de %Ndfa-G en genotipos identificados como promisorios y no promisorios bajo condiciones de invernadero.

LÍNEA	Nodulación campo	Nodulación invernadero	%Ndfa-G invernadero	Total Ndfa-G inver.
CGA 10	8.0	8.0	53.1	90.3
ENF 234	8.0	8.0	51.1	62.0
ENF 28	8.0	8.0	59.3	68.4
ENF 98	8.0	3.0	50.5	35.8
ENF 130	7.0	8.0	41.2	68.2
ENF 235	7.0	7.0	62.7	91.2
ENF 29	7.0	9.0	51.1	74.5
CGA 52	3.0	6.0	20.8	18.3
ENF 207	3.0	6.0	13.9	21.3
ENF 95	3.0	2.0	22.3	30.8
ENF 81	2.0	2.0	8.2	8.9
GLORIABAMBA NN	1.0	1.0	0.0	0
ENF 130 SIN INOCULO SIN S/N	7.0	2.0	20.8	16.7
ENF 130 SIN INOCULO	7.0	2.0	13.9	25.3
Media promisorios	7.6	8.0	52.7	70.1
dif.sig (a)	0.6**	0.4**	19.4***	33.3**
desvest	0.5	0.6	6.4	17.4
%cv	6.5	7.2	12.1	24.9

Según la (Tabla 3-5). Genotipos promisorios en FSN identificados previamente en campo como CGA 10, ENF 28, ENF 235, ENF 130 presentaron un comportamiento similar en invernadero con clasificación en la evaluación visual de Nodulación de 8.0. El genotipo ENF 98 fue uno de los que no mostró congruencia en la validación. Sin embargo, la mayoría de genotipos estuvieron acordes con lo presentado en campo (Figura 3-13). Por otro lado, los genotipos no promisorios ENF 81, ENF 95, ENF 207 y CGA 52 presentaron

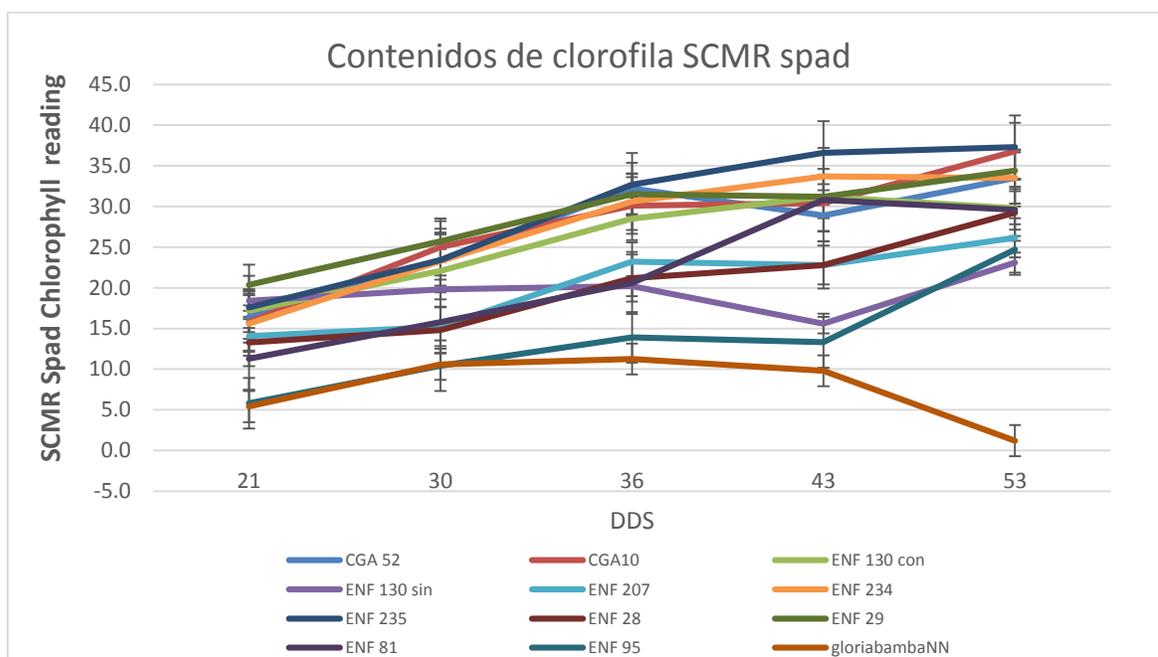
de igual forma congruencia en su comportamiento bajo la condición de invernadero. Se demostró la veracidad del ensayo con el genotipo no nodulante, al presentar un crecimiento significativamente inferior al resto de genotipos sin éxito en la continuación de sus etapas fenológicas (Figura 3-13. Otro de los controles, ENF 130 sin suplemento de soluciones nutritivas ni inoculación con *Rhizobium*, presentó un vigor inferior sin llegar a culminar el ciclo fenológico al igual que GLORIABAMBA NN. En cuanto a los valores de %Ndfa a partir de grano los valores fueron mayores en genotipos promisorios identificados en campo que en genotipos con menor habilidad en FSN (Tabla 3-5).

Figura 3-13. Validación de habilidad en FSN en sustrato arena cuarzo estéril de genotipos identificados como promisorios y no promisorios en campo en campo. A. Contrastes de vigor de planta entre genotipos promisorios en FSN CGA 10 y No promisorios ENF 81. B. Contraste en apariencia de Nodulación genotipos promisorios ENF 235 y no promisorio ENF 81.



La determinación de los contenidos de clorofila SPAD a los largo del ensayo, muestra que genotipos promisorios en FSN sintetizaron clorofila adecuadamente a partir exclusivamente de N asimilado por FSN. Los contenidos de clorofila descienden en genotipos con menor fijación y para los controles los valores son reducidos (Figura 3-14). Esta variable demuestra una relación positiva entre en N asimilado y los contenidos de clorofila y por ende el éxito del desarrollo de las plantas solo bajo en efecto de N asimilado por la FSN.

Figura 3-14. Contenidos de clorofila en genotipos promisorios y no promisorios en FSN durante todo el ciclo de cultivo



3.6 Validación del uso de ¹⁵N abundancia natural a partir de grano

La variación fenotípica de la capacidad fijadora de nitrógeno es usualmente estimada usando $\delta^{15}\text{N}$ del tejido de parte aérea y no es usual el uso de grano para estas determinaciones. Por esto se realizó la cuantificación del asocio entre la determinación a partir de parte aérea y la de grano en ambas localidades con el fin de validar el uso de este último y con esto reducir los altos costos que implica el uso y manejo de biomasa aérea

(Figura 3-15). Adicionalmente, la relación directa entre el % Ndfa en grano con % Ndfa en biomasa darían a los mejoradores la posibilidad de seleccionar genotipos para FSN basados en los valores de grano sin la necesidad de secar, moler y encapsular grandes volúmenes de biomasa aérea.

Como resultado de la validación, se encontró una relación positiva y significativa entre los valores de % Ndfa estimados con abundancia natural de $\delta^{15}\text{N}$ en biomasa aérea y los valores % Ndfa estimados con abundancia natural de $\delta^{15}\text{N}$ de grano con valores de $r = 0.41^{***}$ para la localidad de Darién y $r = 0.46^{***}$ para la localidad de Popayán (Tabla 3-3). Estos resultados indican que la determinación de $\delta^{15}\text{N}$ de muestras de grano en la cosecha puede ser más fácil para la estimación de FSN y la identificación de genotipos superiores en los programas de mejoramiento. Gloriabamba NN fue el genotipo de frijol voluble utilizado como control absoluto. Se observaron diferencias significativas tanto en grano como en tejido de parte aérea entre los genotipos fijadores de N y no fijadores en ambas localidades ($p < 0.05$) (Tabla. 3-6).

Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de biomasa aérea para los genotipos no fijadores fueron de 9.1‰ y 7.2‰ en Darién y Popayán (Tabla 3-6, Figura 3-15). El $\delta^{15}\text{N}$ de biomasa aérea de los 100 genotipos de frijol voluble (Excluyendo Gloriabamba NN) varió de -0.7‰ a la 7.5‰ en Darién y de 0,2 a la 7,2 en Popayán. El $\delta^{15}\text{N}$ de grano de los 100 genotipos varió de 0,8‰ a la 7,9‰ en Darién y desde 0,3‰ a la 7,5‰ en Popayán (Tabla 3-6). Para ambas localidades los genotipos promisorios en habilidad FSN ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21, PO 07AT49 y CGA 10, mostraron un menor valor de $\delta^{15}\text{N}$ de grano y de biomasa con valores promedio de 2.5‰ y 5.0‰ respectivamente. En contraste, genotipos ENF 213, CGA 11, ENF 81 y el control no nodulante GLORIABAMBA NN que demostraron menor habilidad en fijar N atmosférico, presentaron mayores valores de $\delta^{15}\text{N}$ correspondientes a 7.0‰ en grano y biomasa. Para las dos localidades la correlación fue positiva y significativa entre abundancia natural de $\delta^{15}\text{N}$ en grano y biomasa aérea con un $r = 0.51^{***}$, lo que demuestra que es factible el uso de grano como muestra representativa para la cuantificación de FSN entre genotipos, y facilitar con ello el proceso y aumentar la probabilidad de selección de genotipos en FSN (Fig. 3-15).

Figura 3-15. Relación entre $\delta^{15}\text{N}$ de biomasa aérea y $\delta^{15}\text{N}$ a partir de grano de 100 genotipos en ambas localidades. Genotipos promisorios en habilidad FSN fueron marcados con color rojo. Genotipos no promisorios fueron marcados con color azul.

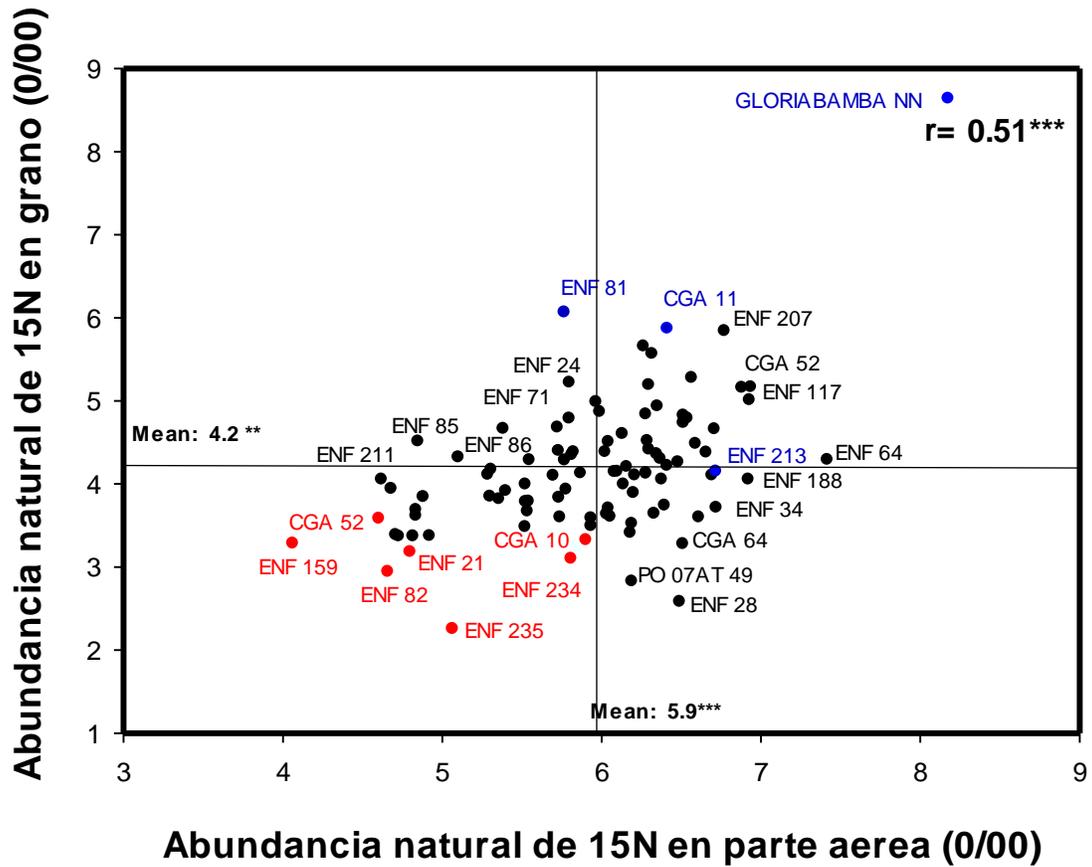


Tabla 3-6. Diferencias genotípicas en % de nitrógeno derivado de la atmósfera estimadas usando tejido foliar (% Ndfa-SH), % de nitrógeno derivado de la atmósfera estimado usando tejido de grano (% Ndfa-G), Abundancia natural de ¹⁵N de tejido foliar (‰) y Abundancia natural de ¹⁵N de grano (‰) de genotipos de común frijol sembrados en Darién y Popayán, 2014 y 2015 Colombia

Genotipo	% Ndfa-Grano		%Ndfa-Biomasa aerea		15N abundancia Natural-G (‰)		15N abundancia Natural-SH (‰)		
	Darién	Popayan	Darién	Popayán	Darién	Popayan	Darién	Popayán	
	2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015	
Promisorios en %Ndfa-G	ENF 235	68	39	41	14	1.2	3.3	4.3	5.8
	ENF 28	64	38	17	19	1.8	3.4	7.6	5.4
	PO 07A T 49	61	37	20	19	2.1	3.5	7.1	5.3
	CGA 10	57	32	26	18	2.6	4.0	6.4	5.4
	ENF 29	56	33	42	17	2.8	4.0	4.3	5.5
	CGA 64	55	35	11	25	2.8	3.7	8.3	4.8
	ENF 173	55	34	37	25	2.8	3.9	4.9	4.8
	ENF 234	55	39	24	25	2.8	3.3	6.9	4.7
	ENF 130	45	39	19	24	4.1	3.3	7.2	4.9
	CGA 46	44	32	22	23	4.2	4.1	6.9	4.9
	MAC 27	41	37	15	22	4.6	3.5	7.7	5.0
	ENF 21	50	43	37	25	3.5	2.9	4.9	4.7
	ENF 174	50	37	23	16	3.5	3.6	6.8	5.6
CGA 56	49	31	30	15	3.6	4.1	5.8	5.7	
Intermedios %Ndfa-G	ENF 91	49	36	15	23	3.6	3.6	8.3	4.9
	ENF 159	49	43	43	33	3.7	2.9	4.2	4.0
	ENF 31	48	34	29	21	3.7	3.9	5.9	5.1
	ENF 204	48	32	18	22	3.7	4.1	7.4	5.0
	MAC 4	47	34	34	20	3.8	3.9	5.3	5.3
	ENF 3	47	38	20	22	3.8	3.4	7.1	5.0
	ENF 171	47	31	25	14	3.8	4.2	6.4	5.9
	CGA 57	47	37	28	23	3.9	3.5	6.1	5.0
No promisorios % Ndfa - G	G 2333	31	42	28	19	5.8	3.0	6.1	5.4
	CGA 71	30	34	22	14	6.0	3.9	6.9	5.8
	MAC 74	24	35	25	11	6.7	3.7	6.4	6.2
	ENF 95	23	40	20	24	6.8	3.2	7.1	4.8
	CGA 11	23	30	21	16	6.9	4.3	7.0	5.7
	ENF 213	46	28	23	14	4.0	4.5	7.1	5.9
	ENF 207	15	34	17	20	7.9	3.9	7.6	5.2
	ENF 81	9	37	25	22	8.6	3.5	6.5	5.0
	Gloriabamba NN	0	0	0	0	9.7	7.5	9.1	7.2
Mean	42.9	34.5	23.7	19.4	4.4	3.8	6.7	5.3	
Sig. diff.	***	***	***	***	**	**	***	***	

4. Discusión

4.1 Diferencias en la habilidad FSN entre localidades y genotipos

Este estudio permitió identificar las diferencias fenotípicas en fijación Simbiótica de nitrógeno (FSN) y las mejores líneas de frijol voluble con esta habilidad. La evaluación de FSN no se había realizado antes en líneas elite de frijol voluble y la mayoría de estudios reportados han sido realizados para líneas de frijol arbustivo (Marique et al, 1993; Douxchamps et al, 2010; Kipe et al., 1993; Kipe and Giller, 1993; Hardarson et al, 1993; Kamfwa et al 2015, Polania et al, 2016). En frijol voluble, el número de estudios que comparan diferentes genotipos en la capacidad FSN señalan que este hábito tiende a tener un mayor potencial en la asimilación de N atmosférico para la producción de grano, y es por esto, que tanto en potencial de rendimiento como el fijación simbiótica de N los genotipos de frijol voluble son superiores en comparación a los de habito I, II, III o arbustivos. Se conoce que este tipo de frijol tiene la capacidad para fijar más de 80 kg de N ha⁻¹ en condiciones en las N es el único factor limitante (Graham and Rosas, 1977; Graham and Temple, 1984; Kipe-Nolt and Giller, 1993; Bliss, 1993, Remaekers, 2013).

Sin embargo, a pesar de las ventajas competitivas que suministra el proceso de fijación a la planta de frijol, este proceso se ve afectado por múltiples factores, entre los que encontramos la sequía (Devi et al., 2013, Polania et al., 2016) y factores de condición de suelo como las altas concentraciones de nitratos (Leidi and Navarro, 2000; Wanek and Arndt, 2002; Salvagiottia et al, 2008; Giller, 2001; Ajebesone, 2015, Burchill et al, 2014). Este último factor, se presentó en la localidad de Popayán con contenidos de materia orgánica del 14% y altos niveles de N, condiciones de suelo negativas para el proceso de Fijación Simbiótica de N. En contraste, la localidad de Darién presentó menos nitrógeno disponible según el diagnóstico de línea base. La condición de N del suelo de Popayán afecto negativamente el proceso FSN evidenciándose inicialmente una drástica reducción

en la Nodulación de los genotipos. Nuestros resultados confirman informes anteriores sobre la sensibilidad de FSN en frijol (Giller, 2001; Ajebesone, 2015). En la localidad de Popayán genotipos susceptibles redujeron su capacidad de %Ndfa hasta en un 80% mientras que genotipos con menor sensibilidad la reducción presentada fue solo del 30%. Esta respuesta se produce debido a que, en condiciones de alta concentración de N en el suelo, las plantas leguminosas disponen de mecanismos específicos para controlar el contenido de nitratos y el número de nódulos en respuesta a estos estímulos. Una señal interna importante es el sistema de retroalimentación sistémica de la raíz al tallo denominado Regulación Automática de la Nodulación (por sus siglas en inglés AON). (Giller, 2001, Taiz y Zeiger, 2002).

Este mecanismo muestra que la nodulación se suprime por completo, la masa total de nódulos se reduce y además se inhibe la actividad de la Nitrogenasa de nódulos maduros, esto con el fin de reducir los costos de energía innecesarios y mantener la eficiencia de uso. Se puede decir, que la planta bajo una alta oferta de N en el suelo, reduce su inversión energética en asimilación de N a partir de FSN. Parson et al, (1993) sugirió que una mayor regulación del crecimiento y la actividad de los nódulos se desencadena por la concentración de la reducción de compuestos de N en el floema que son mediados a través de señales. El mecanismo de retroalimentación de N ofrece una elegante explicación de cómo la planta huésped puede regular tanto la infección como la actividad de fijación de N en los nódulos. El Frijol voluble establecido en Popayán, presentó reducción en la nodulación y %Ndfa. Adicionalmente, una reducción de 43% en la removilización de N a grano, por ende mayor acumulación de N en parte aérea y un 50% menos de la eficiencia del uso de nitrógeno comparado con los volubles en la localidad de Darién. Esta respuesta se explica debido a que, la acumulación de N en los brotes y las hojas es una de las principales evidencias de la inhibición de FSN (Purcell et al., 2000; Vadez and Sinclair, 2001; King and Purcell, 2005). Otros reportes citan que una de las respuestas de la inhibición de la FSN por sequía es la acumulación de ureidos en el tallo (Coletto et al, 2014) demás esta reportado que el frijol prefiere acumular y removilizar N fijado a partir del aire que el fijado a partir del suelo (Westermann et al., 1985; Dubois and Burris, 1986; Wolyn et al., 1991). Esto sugiere que el proceso metabólico de señalización: regulación de la Nodulación (AON), se presentó en los volubles como una respuesta a las condiciones desfavorables de N para el proceso de FSN, presentándose la inhibición de la nodulación,

reducción en Ndfa y acumulación de N en parte aérea, menos NUE y %NPI, además de la producción excesiva de biomasa aérea.

A pesar del diferenciado comportamiento de los genotipos entre las dos localidades evaluadas, se identificaron genotipos estables y prometedores en la habilidad de FSN, exhibiendo buenos valores de Ndfa superiores a 80% equivalentes a 90 kg N ha⁻¹ en condiciones favorables de N y 60% de Ndfa equivalentes a 60 kg N ha⁻¹ bajo condiciones desfavorables, estos valores son acordes a estudios reportados donde un valor Ndfa sobresaliente se encuentra por encima del 60% (Unkovich and pate, 2000; Hardarson G. & Craig Atkins, 2003; Wortmann, 2001; Kumarasinghe et al., 1992). Esto es de importancia, debido a que la eficiencia de los principales cultivos en la recuperación de N aplicado como fertilizante es baja y no supera el 30%. De esta manera, el nitrógeno fijado se convierte en una alternativa debido a que el N asimilado representa cerca de 150 kg de N aplicado por hectárea como fertilizante (Subbarao et al, 1995). En el mismo sentido, los genotipos promisorios en Fijación Simbiótica de N encontrados también se asociaron positivamente con los rasgos de biomasa aérea, el contenido de N total en el grano, rendimiento, NUE y NPI para ambas localidades. Las líneas con mayor capacidad de Fijación Simbiótica de N presentaron mayores valores de biomasa aérea lo cual indica la importancia del vigor de la planta para apoyar el proceso de FSN, además de contribuir a la movilidad tanto de C y N a los granos en desarrollo (Polania et al, 2016). Plantas de frijol vigorosas permiten mayores contenidos de N tanto fijado a partir del suelo como del aire, manteniendo y mejorando la removilización (NUE y NPI) contribuyendo así, al aumento de la producción total del contenido N (Wolyn et al., 1991).

Se observó en estudios previos con frijol común, que genotipos superiores en Fijación Simbiótica de N en condición de estrés por sequía, tienen la capacidad de generar adaptación a través de control interno y presentar asocio positivo con el rendimiento de grano, la biomasa aérea y eficiencia en la removilización de N (Beebe et al., 2014; Polania et al, 2016). Por esto, mayor biomasa aérea, acumulación de N en grano y eficiencia en la removilización de N son rasgos para seleccionar líneas promisorias en Fijación Simbiótica de N (Beebe et al., 2014; Sinclair and Vadez, 2012).

Fue evidente un asocio positivo entre el rendimiento de grano y TNdfa (kg N ha^{-1}) tanto en condiciones desfavorables como favorables para la inhibición de Fijación Simbiótica de N. Las líneas que se identificaron como promisorias ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21, PO 07AT49 y CGA 10 se caracterizaron por acumular más N a partir de fijación simbiótica, mayor capacidad para ignorar el efecto de N y una menor regulación interna de la nodulación (AON), garantizando la continuidad del proceso de fijación y con ello una buena producción de granos a través del uso eficiente de N. Las líneas de ENF 28 y ENF 235 presentaron la menor inhibición de la capacidad en Fijación Simbiótica de N en condiciones desfavorables de N, estas líneas podrían ser usadas como potenciales padres para mejorar la capacidad de FSN.

Por el contrario, el control absoluto Gloriabamba NN mostró menor capacidad de fijar N y rendimiento de grano, lo cual indica que el N del aire es igual o más importante que el N del suelo demostrando que ambas fuentes de N trabajan juntas para la productividad en frijol. El hecho de que el genotipo no nodulante posea una capacidad limitada para Fijación Simbiótica de N afecta considerablemente el rendimiento de frijol (Westermann et al., 1985; Dubois and Burris, 1986; Wolyn et al., 1991). Por esto, los genotipos no promisorios ENF 213, CGA 11 y ENF 81 fueron determinantes para comprobar la importancia de los rasgos asociados con FSN. Estos genotipos tuvieron un comportamiento similar al No nodulante Gloriabamba NN; los rasgos evaluados como biomasa aérea, los índices removilización y uso eficiente del N, y el rendimiento de grano presentaron los menores valores comparados con las líneas que mostraban mayor habilidad en Fijar N.

Por otro lado, los genotipos ENF de frijol voluble evaluados fueron superiores a las líneas control. Estos mostraron 30% más de capacidad en fijación que las líneas control MAC 33, 52 MAC, MAC 9, 4 MAC, MAC 25, G19839, G5702 y G2333. Sólo el control MAC 27 presentó 38% Ndfa equivalente a 50,2 kg de N fijado por ha, considerándose este valor dentro del rango óptimo para genotipos prometedores en FSN. También MAC 27 fue excelente en rendimiento, con una producción superior a 4000 kg ha^{-1} y presentó además tolerancia antracnosis, rasgo evaluado en experimentos anteriores (CIAT, datos no publicados). ENF 28 fue el único de los genotipos identificados como promisorios que tiene tolerancia a la antracnosis, atributo evaluado en experimentos anteriores. En este orden de ideas, MAC 27 y ENF 28 pueden ser utilizados como padres en el programa de

mejoramiento por su buena capacidad en Fijación Simbiótica de N en combinación con tolerancia a enfermedades y rendimiento.

4.2 Validación de estimación de Ndfa a partir de grano y diferencias en abundancia natural ^{15}N en biomasa aérea y grano

Es factible cuantificar la capacidad de FSN a partir de %Ndfa de grano. Este estudio permitió comparar la estimación de Ndfa% usando tejido foliar (% Ndfa-SH) vs. Tejido de grano (% Ndfa-G), para cuantificar las diferencias fenotípicas en frijol común en la capacidad de FSN en frijol voluble, y para probar si Ndfa% -G podría ser un rasgo útil para cuantificar fácilmente FSN en programas de mejoramiento. Los resultados de las dos localidades muestran que valores de % Ndfa estimados a partir de muestras de tejido foliar en la etapa mitad de llenado de vaina (% Ndfa-SH) y muestras a partir de tejido de grano en el momento de la cosecha (% Ndfa-G), presentan valores similares, por ende, los valores de %Ndfa-G son válidos y se comprobó que la metodología de grano es factible para cuantificar la capacidad de FSN en diferentes genotipos. La correlación fue positiva ($r = 0,51$) entre ambos métodos y lugares lo que valida esta afirmación.

Estudios previos han validado el uso del grano en vez de biomasa aérea para cuantificar FSN. Polania et al (2016) encontró una muy buena correlación entre Ndfa%-G y %Ndfa-SH correspondiente a $r = 0,81^{***}$ en 2012 y $r = 0,66$ en el año 2013 en 36 genotipos de frijol arbustivo élite evaluados para FSN en condiciones de sequía. Kamfwa et al., (2015) utilizando ambos tipos de tejido, sugirió la selección de alta capacidad basado en el tejido de grano que además el uso de esta metodología podría ser fácil integrar en los programas de mejoramiento. También se han reportado resultados similares para Ndfa% utilizando la técnica de abundancia natural de $\delta^{15}\text{N}$ en el grano y biomasa aérea para otras especies de leguminosas (Bergersen et al., 1985).

Este comportamiento tiene relación directa con la removilización de N a partir de estructuras vegetativas a grano y toma importancia la cantidad y calidad del N fijado a partir de FSN (Bergersen et al., 1992; Unkovich y Pate, 2000). Se ha demostrado en reportes anteriores que frijol común es capaz de trasladar alrededor de 80 a 93% del total de su N al grano, y que la mayoría de N asimilado se transloca al grano sin importar si la fuente

72 Evaluación de fijación simbiótica de nitrógeno para la identificación de genotipos promisorios en frijol voluble (*Phaseolus vulgaris L.*)

proviene del suelo, el aire o ambos (Ramaekers et al., 2013). Las líneas evaluadas en este estudio, presentaron movilización de N hasta del 90% de biomasa aérea a grano para la localidad de Darien, y 60% para la localidad de Popayán. Genotipos con mayor acumulación de N en biomasa aérea presentaron mayores valores de acumulación de N en el grano durante la cosecha y los genotipos que acumularon menos N en biomasa aérea, acumularon menos N en el grano. Esta tendencia valida el uso de grano como tejido para la cuantificación rápida y factible de Fijación Simbiótica de N.

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

Diferencias genotípicas en la habilidad de FSN fueron evidentes para genotipos de frijol voluble entre las localidades y entre genotipos por localidad. Presentándose mayor FSN y rendimiento en Darién que en Popayán debido a los niveles de N en suelo. En cada localidad se identificó variabilidad genotípica a través de la identificación de genotipos promisorios y no promisorios en la capacidad para fijar nitrógeno atmosférico.

La habilidad en FSN está asociada positivamente con el rendimiento. La respuesta de los genotipos de frijol voluble en FSN es determinante para la respuesta productiva. El nitrógeno fijado del aire y el asimilado del suelo trabajan conjuntamente para la productividad del frijol. A su vez, menores rendimientos se asocian con menor habilidad en FSN.

El uso eficiente del nitrógeno (NUE) y el índice de partición de nitrógeno (NPI) además de la biomasa aérea se relacionan positivamente con la capacidad de frijol voluble en fijar N. Genotipos promisorios en FSN fueron más eficientes en la producción de grano por unidad de N asimilado, y a su vez, la removilización de N desde biomasa a grano es completa. Estos índices sirven como atributos de selección para la habilidad FSN en genotipos de frijol voluble.

Las líneas ENF 235, ENF 234, ENF 28, ENF 21, PO 07AT49 y CGA 10 se caracterizaron por presentar una mayor capacidad de fijar N a través del proceso de FSN. Estas líneas mantuvieron su capacidad FSN tanto en condiciones favorables y desfavorables en cuanto a las concentraciones de N en el suelo presentando mayor capacidad para ignorar el efecto de N y una menor regulación interna de la nodulación (AON), Por esto, estas líneas pueden ser incluidas como padres en el programa de mejoramiento genético.

Se valida el uso de %Ndfa-G para la cuantificación de FSN. Los valores de %Ndfa a partir de parte aérea y grano presentaron una asociación positiva y significativa para ambas localidades. De esta forma, el uso de grano se convierte en la mejor metodología para cuantificar la capacidad de genotipos de frijol para fijar Nitrógeno. Su implementación en programas de mejoramiento genético reducirá los costos de mano de obra y será factible este parámetro en tiempo de cosecha.

5.2 Recomendaciones

Esta investigación soportó los datos existentes sobre la capacidad y habilidad en fijación de Nitrógeno de frijol voluble y se logró identificar genotipos con potencial en FSN para incluirlos como progenitores en el programa de mejoramiento. Ahora con la validación para la determinación de %Ndfa a partir de grano, será posible la inclusión de este atributo de forma fácil y rápida en próximas generaciones. Conociendo a los genotipos promisorios será posible también el inicio de cruzas con otros genotipos con atributos deseables en color, forma y tamaño comercial de grano además de tolerancia a enfermedades. Adicionalmente, los genotipos tendrán que ser evaluados bajo condiciones de estrés abiótico en sequía, concentraciones bajas de fosforo en el suelo y calor, con el fin de seguir caracterizando y acercarnos cada vez más al ideotipo de frijol.

A. Anexo: Phenotyping Common Beans for Symbiotic Nitrogen Fixation (SNF): Protocol for field evaluation



Phenotyping Common Beans for Symbiotic Nitrogen Fixation (SNF): Protocol for field evaluation



The common bean *Phaseolus vulgaris* L. is an important legume for food security, with a worldwide production of 23'250.253 tons (FAOSTAT, 2013). It is rich in iron, protein, fiber and carbohydrate and essential for the nutrition of the population, especially that of developing countries. This legume is produced by small resource-poor farmers in Latin America, Asia and Africa under marginal environments affected by drought and low soil fertility, especially nitrogen and phosphorus (Beebe et al, 2008).

Symbiotic nitrogen fixation (SNF) – through association with root-nodulating rhizobia for the uptake of atmospheric nitrogen – effectively contributes to improved nitrogen nutrition and is an ecologically sound and low cost strategy to improve the productivity of common bean cultivation in the face of an increasing world population and climate change. However, it

should be considered that one of the main factors determining the efficiency of SNF is the plant genotype.

Identification of key plant traits and mechanisms that contribute to improved Symbiotic Nitrogen Fixation (e.g., visual evaluation of root nodulation, ^{15}N Nitrogen isotope in tissue and grain, canopy biomass, photosynthesis, nitrogen uptake, pod partitioning index, pod harvest index) can increase the efficiency of breeding programs through the selection of superior genotypes.

The following protocol allows for the identification of phenotypic differences in SNF under field conditions through the quantification of traits related to nitrogen fixation plant capacity (% nitrogen derived from the atmosphere based on ^{15}N natural abundance in tissue and grain -%Ndfa-) and visual evaluation of root nodulation.

Contacts:

Norma Barbosa: n.c.barbosa@cgiar.org
José A. Polanía: j.a.polania@cgiar.org
Mariela Rivera: m.rivera@cgiar.org
Jaumer Ricaurte: j.ricaurte@cgiar.org
Idupulapati M. Rao: i.rao@cgiar.org

Contents

1. **Planting Design**
 - *Rhizobium tropici* inoculation
2. **Sampling at Flowering**
 - Determining “Flowering”
 - SPAD Chlorophyll Meter Readings (SCMR)
 - Photosystem II Quantum Yield (QY)
 - Visual evaluation of root nodulation
 - Visual evaluation of plant growth Preparation of samples for analysis $\delta^{15}\text{N}$ and % N (UC Davis, California)
3. **Sampling at Mid pod filling**
 - Determining “Mid pod filling”
 - SPAD Chlorophyll Meter Readings (SCMR)
 - Photosystem II Quantum Yield (QY)
 - Shoot Biomass
 - Preparation of samples for analysis $\delta^{15}\text{N}$ and % N Total N and %N (mg/g tissue) (UC Davis, California)
4. **Sampling at harvest time**
 - Determining “harvest time”
 - Biomass (pods and grain)
 - Preparation samples for GRAIN analysis $\delta^{15}\text{N}$ and % N Total N and %N (UC Davis, California)

5. Evaluation of Symbiotic Nitrogen Fixation

- Visual scale of nodulation/genotype (1-9)
- % Ndfa
- Shoot nitrogen uptake
- Nitrogen use efficiency
- Nitrogen partitioning index
- Pod harvest index
- Pod partitioning index
- Harvest index
- Yield production efficiency
- Seed production efficiency
- Pod production efficiency
- 100 seed weight, and days to flowering and maturity

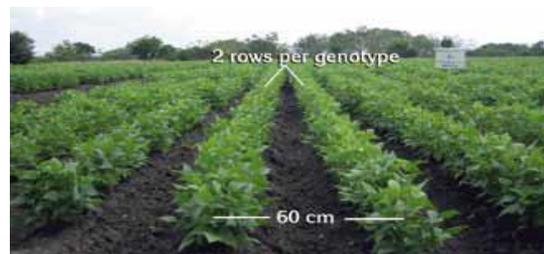
6. References

1. Planting design

Field trials need to be conducted during the wet season (irrigated for no stress), without nitrogen fertilization and with inoculation of *Rhizobium Tropici* CIAT 899. Trials could include germplasm accessions, bred lines, and recombinant inbred lines as entries. These conditions need to be applied to quantify the effects of SNF on crop growth and seed yield.



Depending on the number of genotypes to be evaluated, a partially balanced lattice design with 3 replicates could be used. The field trials can be planted in continuous rows with each genotype per replicate planted in 2 side-by-side rows (or 4 rows for small trials) of 2 to 4 m of length. Rows should be spaced 60 cm apart. Seeds should be planted 7.5 cm apart (i.e. 15 seeds per m), thus yielding 10 to 15 plants per meter.



Sterile turba bags of Inoculum *Rhizobium tropici* (CIAT 899) must be applied at a dose of 3 kg/ha or 15 inoculum bags per 50 L tap water, in drench directed at the root base and soil for each plant with a first trifoliolate leaf. The inoculum must have 2.2×10^7 CFU/g guaranteed per viability test in



2. Sampling at Flowering

2.1 Determining “Flowering”

Days and status to flowering is measured individually for each plot. This is at the moment when 50% of the plants are flowering (e.g., the majority of plants have flowers totally developed).



2.2 SPAD Chlorophyll Meter Readings (SCMR)

SCMR is measured by using a non-destructive, hand-held chlorophyll meter (e.g., SPAD-502 Chlorophyll Meter). SPAD-502 determines the relative amount of chlorophyll that is present in the leaf by measuring the absorbance of the leaf in two wavelength regions. Chlorophyll has absorbance peaks in the blue (400-500 nm) and red (600-700 nm) regions, with no transmittance in the near-infrared region. SPAD-502 measures the absorbance of the leaf in the red and near-infrared regions. Using these two transmittances, the meter calculates a numerical SPAD (Soil Plant Analysis Development) value, ranging from 0 to 80 which is proportional to the amount of chlorophyll present in the leaf. SPAD is measured on a fully expanded young leaf of one plant for each replicate.



Photo: Polania.J (2012)

2.3 Photosystem II Quantum Yield (QY)

Photosystem II quantum yield (QY) is measured by using a non-destructive, hand-held QY meter (e.g., Fluorpen FP100). Fluorpen FP100 is a fluorometer that enables quick and precise measurement of chlorophyll fluorescence parameters. FP100 measures FT (continuous fluorescence yield in non-actinic light). QY (Photosystem II quantum yield) is measured on a fully expanded young leaf of one plant for each replicate (the same leaf that is used for SPAD measurement).



2.4 Visual evaluation of root nodulation

The visual scale of 1-9 is used to evaluate the extent of nodulation.

#	Description	Approximate nodule number	
		Climbing bean	Bush bean
9	Excellent nodule amount	>240	>80
8	Very abundant nodule amount	240	80
7	Abundant	121 -240 (big size)	80-41
6	Intermediate -high	121 -240 (small size)	40-21 (big size)
5	Intermediate	61-120 (big size)	40-21 (small size)
4	Intermediate - low	61-120 (small size)	20-10 (big size)
3	Low	60-30	20-10 (small size)
2	Very low	<30	<10
1	Nothing	0	0



Note: To evaluate the nodule viability the color inside a nodule can be used as a guide and if it is pink or red the nodule is viable and effective, and if it is green or white the nodule is considered non-viable or ineffective. The numbers in the table can deviate between different experiments. Therefore it is recommended to have a reference plant for classification 1 and classification 8-9 define the number and appearance of the nodules in both cases. This requires some training.

2.5 Visual evaluation of plant growth

The evaluation is based on a visual scale of 1-9 for plant vigor (adaptation).

Scale	Climbing/bush bean
#	Description
9	Excellent
7-8	Good
5-6	Intermediate
3-4	Poor
1-2	Very poor



Note: evaluation should be based on a control plant or reference with the score of 1. This requires some training.

2.6 Preparation of samples for analysis $\delta^{15}\text{N}$ and % N (University of California (UC), Davis, California, USA)

To determine the shoot $\delta^{15}\text{N}$ and % N content, one plant of each genotype from each plot or treatment is selected for destructive sampling. The plant is cut to the soil surface, put in a paper bag, and transported to the laboratory.



The plant is then washed with deionized water and dried in the oven at 60°C for 2 days. If analysis by plant part is desired, the plants can be separated into leaves, stems and other plant parts before drying.



After oven drying, the plant is ground using a mill. The samples should be fine and homogenous. The ground samples are packed in glass tubes. Each Vacutainer (glass tube) must have 10 g of ground tissue.



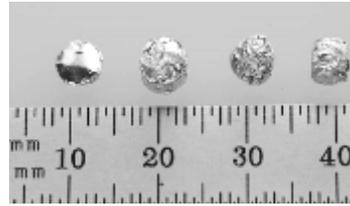
3.0 mg of ground tissue is weighed on a microbalance. The samples are packed in tin capsules for solid samples (5x9mm) (Fisher Scientific). This process requires a lot of precision.



Each capsule is wrapped carefully in a regular form. Each sample is placed into a well of 96 well tissue culture plates with a flat bottom (Ref. 353072 box per 50 units (Falcon)). Consider the order of sequence: 1 to 12 corresponds to columns and A to H corresponds to rows. More details can be found at www.stableisotopefacility.ucdavis.edu/13cand15ntips.html



Each box is identified for its sending to UC Davis California. $\delta^{15}\text{N}$ and total nitrogen concentration (%) is determined using PDZ Europa ANCA-GSL elemental analyzer interfaced to a PDZ Europa 20-20 isotope ratio mass spectrometer (Sercon Ltd., Cheshire, UK)



UC Davis, 2014

3. Sampling at Mid-pod filling

3.1 Determining “Mid-pod filling”

Mid-pod filling occurs just before leaves begin to turn yellow, when the plant has no more flowers and seeds are clearly defined in pods.



Photo: Polania.J (2012)

3.2 – 3.3 SPAD Chlorophyll Meter Readings (SCMR) and Photosystem II Quantum Yield (QY)

For these variables the process is the same as for flowering.



3. 4 Shoot Biomass

A row length of 0.5 m for each plot should be selected for destructive sampling. The plants are counted, cut to the soil surface, cut to the soil surface, put in a plastic bag, and transported for processing.



Each sample is put in separate paper bags for oven drying at 60°C for 2 days. Total dry matter production and the distribution of dry matter into different plant parts (leaf biomass, stem biomass, pod biomass, total above-ground biomass) is quantified on a balance.



Photos: Polania.J (2012)

3.5 Preparation samples for analysis $\delta^{15}N$ and % N (UC Davis, California)

For these variables the process is the same as for flowering.



4. Sampling at harvest time

4.1 Determining “harvest time”

Harvest time occurs when leaves have turned yellow, when the plant has no more flowers and seeds are clearly defined in pods. The pods are dry and the seeds sound when the pods are shaken.



4.2 Biomass (pods and grain)

A 0.5 m long row is selected for each genotype. The number of plants are counted and cut to the soil surface. The samples are put into a paper bag and transported for analysis.



Plants are separated into stems, pods and seeds. The number of pods and seeds per harvested area is counted.

Stems, pods and seeds are dried in the oven at 60°C for 2 days and dry weights are recorded.



4.3 Preparation of samples for $\delta^{15}\text{N}$ in grain and % total N in grain (UC Davis, California).

Grain is weighed (8-14 g approx.) and washed with tap water and also with bi-distilled water. Each sample is put in separate paper bag for oven drying at 60°C for 2 days.



86 Evaluación de fijación simbiótica de nitrógeno para la identificación de genotipos promisorios en frijol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.)

Grain samples are ground for 4 minutes in porcelain cups with small balls inside each one.



The samples should be fine, homogenous and identified. The ground samples are packed in glass tubes for analysis. Each Vacutainer (glass tube) must have 10 g of ground grain.



3.0 mg of ground tissue is weighed on a microbalance. The samples are packed in tin capsules for solid samples (5x9mm) (Fisher Scientific). This process requires a lot of precision. The samples are placed into each vial of tissue culture plate 96 well. Send samples with proper identification to UC Davis (California).



5. Evaluation of Symbiotic Nitrogen Fixation

- **Visual scale of nodulation/genotype (1-9):**
Visual evaluation According to scale: 1 corresponding to excellent nodulation and 9 corresponding to very poor nodulation. Consider the size of nodules, because bigger nodules will have better ratings than small and medium sized nodules.
- **Percentage Nitrogen derived from the atmosphere (% Ndfa) : the data of UC Davis must be used in this formula in order to calculate the % Ndfa**

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}N \text{ of reference plant} - \delta^{15}N \text{ of } N_2 \text{ fixing legume}}{\delta^{15}N \text{ of reference plant} - B} \times \frac{100}{1}$$

Where:

$\delta^{15}N$ of reference plant refers to a control plant or Non N_2 fixing plant ‰

$\delta^{15}N$ of N_2 fixing legume refers to N_2 fixing plant in these case : bean genotypes ‰

B' is $\delta^{15}N$ of shoots of legumes that are fully dependent of N_2 fixation and grown on a N free medium, sampled at the same growth stage as the field plants.

- **Shoot nitrogen uptake:**

$\delta^{15}\text{N}$ and %Nitrogen (of shoot or grain (sample 3.0 mg) are results from isotope ratio mass spectrometer analysis from UC Davis. The values of %N in shoot tissue are used together with shoot biomass to quantify shoot N uptake in kg/ha.

- **Nitrogen use efficiency (NUE):**

NUE (kg of grain produced per kg of N uptake in shoot biomass) = ((Grain yield in kg/ha) / (shoot N uptake in kg/ha in biomass)).

- **Nitrogen partitioning index (%):**

NPI = (kg of N in grain per hectare/kg of N per hectare in shoot biomass) x 100.

- **Pod harvest index (%):**

The PHI for each genotype = (seed biomass dry weight at harvest) / (pod biomass dry weight at harvest) x 100.

- **Pod partitioning index (%):**

The pod partitioning index for each genotype = (pod biomass dry weight at harvest) / (total shoot biomass dry weight at mid-pod filling) x 100.

- **Harvest index (%):**

The HI for each genotype = (seed biomass dry weight at harvest) / (total shoot biomass dry weight at mid-pod filling) x 100.

- **Yield production efficiency:**

The yield production efficiency for each genotype = (seed biomass dry weight at harvest) / (total shoot biomass dry weight at mid-pod filling).

- **Seed production efficiency (number g⁻¹):**

The seed production efficiency for each genotype = (seed number per area) / (total shoot biomass dry weight at mid-pod filling per area)

- **Pod production efficiency (number g⁻¹):**

The pod production efficiency for each genotype = (pod number per area) / (total shoot biomass dry weight at mid-pod filling per area).

- **100 seed weight**

The weight of 100 seeds in grams recorded.

Statistical analysis: For all of the above quantifications, variance is calculated by using a statistical software system, such as SAS/STAT Software. A probability level of 0.05 is considered statistically significant.

6. References

- Beebe, S. E., I. M. Rao, M. W. Blair and J. A. Acosta-Gallegos. 2010. Phenotyping common beans for adaptation to drought. In: J. M. Ribaut and P. Monneveux (eds.) Drought Phenotyping in crops: from theory to practice. Generation Challenge Program Special Issue on Phenotyping, pp. 311-334
- Douxchamps S., F. Humbert., R. Hoek., M. Mena., S. M. Bernasconi., A. Schmidt., I.M Rao., E., Frossard and A. Oberson. 2010. Nitrogen balances in farmers fields under alternative uses of a cover crop legume: a case study from Nicaragua. *Nutr Cycl Agroecosyst* (2010) 88:447–462.
- FAO STAT. 2013. accessed at: <http://faostat.fao.org/beta/en/#data/QC>
- Graham P.H and J.C Rosas. 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *J Agric Sci* 88: 503-508.
- Manual of *Rhizobium* legume symbiosis: Evaluation, selection and agronomic management. 1988. CIAT-UNDP
- Polania J, M.Rivera., J.Ricaurte., I.M.Rao (2012 Phenotyping Common Beans for Adaptation to Drought: protocol for field evaluation. Centro Internacional de agricultura tropical CIAT
- Ramaekers L., C.H. Galeano., N. Garzon., J. Vanderleyden., M.W. Blair. 2012. Identifying quantitative trait loci for symbiotic nitrogen fixation capacity and related traits in common bean. *Mol Breeding* (2013) 31:163–180
- Schoonhoven A., M. Corrales. 1991. Sistema Estandar para la evaluación de germoplasma de frijol. Centro Internacional de Agricultura tropical CIAT
- Unkovich M., D. Herridge, M. Peoples, G. Cadisch, B. Boddey, K. Giller, B. Alves and P. Chalk. 2008. Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems. ACIAR Research that works for developing countries and Australia.

Bibliografía

- Ajebesone, F. (2009). Quantify the effects of organic and inorganic sources of phosphorus on nitrogen fixation of common bean. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 3(2): 168-177.
- Ambachew, D., Mekbib, F., Asfaw, A., Beebe, S. E., Blair, M. W. (2015). Trait associations in common bean genotypes grown under drought stress and field infestation by BSM bean fly. *The Crop Journal* 3 (4), 305–316.
- Barbosa, N., Polania, J. Rivera, M., Ricaurte, J. Rao, I. (2014). Phenotyping Common Beans for Symbiotic Nitrogen Fixation (SNF): Protocol
- Barracough, P., Bellido Lopez, R., Hawkesford, M. (2014). Genotypic variation in the uptake, partitioning and remobilization of nitrogen during grain filling in wheat. *Fiel crop research* (156): 242-248.
- Beatty, P. H. and Wong, J. (2016). Nitrogen use efficiency. *Encyclopedia of applied Plant Science* (second edition) volume 1: 278- 284
- Beebe, S. (2012). Common bean breeding in the tropics. *Plant reviews* (36): 357-427
- Beebe, S., Rao, I. M., Cajiao, C. y Grajales, M. (2008). Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Sci.* 48, 582-592.
- Beebe, S., Rao, I. M., Devi, M., and Polania, J. (2014). Common beans, biodiversity, and multiple stress: challenges of drought resistance in tropical soils. *Crop Pasture Sci.* 65(7): 667-675.

- Bergersen, F. J., Turner, G. J. Gault, R. R. Chase, D. L., and Brockwell, J. (1985). The natural abundance of ^{15}N in an irrigated soybean crop and its use for the calculation of nitrogen fixation. *Crop Pasture Sci.* 36(3): 411–423.
- Bergersen, F. J., Turner, G. L., Gault, R. R., Peoples, M. B., Morthorpe, L. J. and Brockwell, J. (1992). Contributions of nitrogen in soybean crop residues to subsequent crops and to soil. *Crop Pasture Sci.* 43(1): 155–169.
- Bliss, F. A. (1993). Breeding common bean for improved nitrogen fixation. *Plant Soil* 152):71-79.
- Boddey, R. M., Alves, B. J., De Henrique, B., Soares, L., Jantalia, C. P., Urquiaga, S. (2009). Biological nitrogen fixation and the mitigation of greenhouse gas emissions. In: Emerich DW, Krishnan HB (eds) *Nitrogen fixation in crop production*. Crop Science Society of America, Madison, pp 387–413.
- Burchill, W. E. K., James, D. Li G., J. Lanigan, M., Williams, P. P., Lannetta, M. and Humphreys, J. (2014). Comparisons of biological nitrogen fixation in association with white clover (*Trifolium repens L.*) under four fertiliser nitrogen inputs as measured using two ^{15}N techniques. *Plant Soil* (385):287–302
- Cardona, C. Flor, F., Pastor, A. M. (1995). Problemas de campo en los cultivos de frijol en el trópico. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 220 p. (Publicación CIAT no. 241)
- Charlson, D. V, Korth, K. L., Purcell, L. C. (2009). Allantoate amidohydrolase transcript expression is independent of drought tolerance in soybean. *Journal of Experimental Botany* (60): 847–851
- CIAT-UNDP. (1988). Legume *Rhizobium* Symbiosis, Methods manual for evaluation, selección and agronómico management .

- Coletto, I., M., Pineda, A., P., Rodino, A. M. De Ron and Alamillo, J. M. (2014). Comparison of inhibition of N₂ fixation and ureide accumulation under water deficit in four common bean genotypes of contrasting drought tolerance. *Annals of Botany* 1 - 12
- Devi, M., Sinclair, T. R., Beebe, S. and Rao, I. M. (2013). Comparison of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes for nitrogen fixation tolerance to soil drying. *Plant Soil* 364(1-2): 29–37.
- Douxchamps, S. L., Francois-L, Rein van der Hoek, Mena, M., Bernasconi, S.M., Schmidt, A., Rao, I., Frossard, E. and Oberson, A. (2010). Nitrogen balances in farmers fields under alternative uses of a cover crop legume: a case study from Nicaragua. *Nutr Cycl Agroecosyst* (88):447–462.
- Dubois, J., and Burris, R. H. (1986). Comparative study of N uptake and distribution in three lines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at early pod filling stage. *Plant Soil* 93(1): 79–86.
- FAO. 2015. Estado de inseguridad alimentaria en el mundo 2015. Consultado en: <http://www.fao.org/3/a-i4646s.pdf>
- Fatma, T and J. Drevon. 2014. Phosphorus use efficiency for symbiotic nitrogen Fixation varies among common bean recombinant Inbred lines under p deficiency. *Journal of Plant Nutrition* (37):532–545.
- Garzon, L. N., Ligarreto, G. A., Blair, M. W. (2008). Molecular marker-assisted backcrossing of anthracnose resistance into Andean climbing beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Crop Sci.*, 48(2):562-570
- Giller, K. E. (2001). Nitrogen fixation in tropical cropping systems. CABI Publishing, Oxon, UK. 423 pp.

- Graham, P. H., Rosas, J. C. (1977). Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. J. Agr. Sci., 88: 503-508.
- Graham, P., Rosas, J., Estévez de Jensen, C., Peralta, E., Tlustý, B., Acosta-Gallegos, J., Arraes Pereira, P. (2003). Addressing edaphic constraints to bean production: the bean/cowpea CRSP project in perspective. Field Crops Res 82:179–192
- Graham, P. H. (2009). Soil biology with an emphasis on symbiotic nitrogen fixation. In: Emerich DW, Krishnan HB (eds) Nitrogen fixation in crop production. Crop Science Society of America, Madison.
- Graham, P. H and Halliday, J. (1976). Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. In: Vincent J. M, Graham, P. H., Rosas, J.C. (1977). Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. J. Agr. Sci., 88: 503-508.
- Graham, P.H., Ranalli, P. (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Fields Crops Research, 53: 131-146
- Graham, P. H., Temple, S. R. (1984). Selection for improved nitrogen fixation in *Glycine max* L. and *Phaseolus vulgaris* L. Plant Soil (82): 315-327
- Graham, P. H., Vance, C. P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. Field Crops Res. (65):93-106.
- Graham, P. H., Vance, C. P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Phys. (131):872-877.
- Hardarson, G. and Craig Atkins. (2003). Optimising biological N₂ fixation by legumes in farming systems. Plant and Soil (252): 41–54.
- Hardarson, G., Bliss, F. A., Cigales-Rivero, M. R., Henson, R. A., Kipe-Nolt, J. A., Longeri, L., Manrique, A., Peña-Cabriales, J. J., Pereira, P. A., Sanabria, C. A. and Tsai, S.

- M. (1993). Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant Soil* 152: 59–70.
- Hauggaard-Nielsen, J.E. (2003). How can increased use of biological N₂ fixation in agriculture benefit the environment? *Plant Physiol* 127:390–397.
- Herridge, D. and Peoples, M. (2008). Global inputs of Biological nitrogen Fixation in Agricultural systems. *ACIAR Monograph No. 136* pp 256.
- Kamfwa, K., Cichy, K. and Kelly, J. D. (2015). Genome-wide association analysis of symbiotic nitrogen fixation in common bean. *Theoretical and applied genetics*. (128): Issue: 10:1999-2017.
- Kimani, P., Gicharu, G. K., Mburugu, N., Boga, H. and Cheruiyot, R. (2007). Nodulation and yield of bush and climbing beans inoculated with rhizobia strains. *Bean Improvement Cooperative USDA Annual Report (USA)*. 50:181-182
- King, C.A., Purcell, L. C. (2005). Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiology* (137): 1389–1396.
- Kipe-Nolt, J. A., Vargas, H. and Giller, K. E. (1993). Nitrogen fixation in breeding lines of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*. (152) Issue 1, 103-106.
- Kipe-Nolt, J. A., Giller, K. E. (1993). A field evaluation using the ¹⁵N isotope dilution method of lines of *Phaseolus vulgaris* L. bred for increased nitrogen fixation. *Plant Soil* (152): 107-114.
- Kornegay, J., White, J. W., Ortiz de la Cruz, O. (1992). Growth habit and gene pool effects on inheritance of yield in common bean. *Euph*, (62):171-180.
- Kumarasinghe, K. S., Danso, S. K. A., Zapata, F. (1992). Field evaluation of atmospheric nitrogen and N partitioning in climbing bean *Phaseolus vulgaris* using ¹⁵N. *Biol Fert Soils* 13: 142-146.

- Leidi, E. O. and Rodríguez-Navarro, N. (2000). Nitrogen and phosphorus availability limit N₂ fixation in bean. *New Phytol* (147):337-346.
- Lynch, J. Rodríguez, N. (1993). Photosynthetic Nitrogen-Use Efficiency in Relation to Leaf Longevity in Common Bean. *Crop Science Society of America Vol. 34 No.5*, p.1284-1290
- Mafongoya, P. L., Mpeperekwi, S., Mudyazhezha, S. (2009). The importance of biological nitrogen fixation in cropping systems in nonindustrialized nations. In: Emerich DW, Krishnan HB (eds) *Nitrogen fixation in crop production*. Crop Science Society of America, Madison, pp 329–348.
- Mahuku, G. S., Jara, C., Cuasquer, J. B., Castellanos, G. (2002). Genetic variability within *Phaeoisariopsis griseola* from Central America and its implication for resistance breeding of common bean. *Plant Pathology* (51): 594- 604.
- Manrique, A., Manrique, K., Nakahodo, J. (1993). Yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Peru. *Plant and Soil*. (152), Issue 1, pp 87-91.
- Martinez Romero. (1991). *Rhizobium tropici* a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. *International Journal of Systematic bacteriology* (41): 417 – 426.
- Oka-Kira, E., Tateno, K., Miura, K., Haga, T., Hayashi, M., Harada, K., Sato, S., Tabata, S., Shikazono, N., Tanaka, A., Watanabe, Y., Fukuhara, I., Nagata, T., Kawaguchi, M. (2005). klavier (klv), a novel hypernodulation mutant of *Lotus japonicus* affected in vascular tissue organization and floral induction. *Plant J.*, 44:505-515.

- Olivera M, Tejera N, Iribarne C, Ocana A, Lluch C. 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiol Plant* (121) :498–505
- Peoples, M. B, Hauggaard-Nielsen, H., Jensen, E. S (2009). The potential environmental benefits and risks derived from legumes in rotations. In: Emerich DW, Krishnan HB (eds) *Nitrogen fixation in crop production*. Crop Science Society of America, Madison, pp 349–385
- Polania, J., Poschenrieder, C., Rao, I., Beebe, S. (2016). Estimation of phenotypic variability in symbiotic nitrogen fixation ability of common bean under drought stress using ^{15}N natural abundance in grain. *Europ. J. Agronomy* (79): 66–73 pp 171–209
- Purcell, L. C, Serraj, R., Sinclair, T. R., De A. (2004). Soybean N_2 fixation estimates, ureide concentration, and yield responses to drought. *Crop Science* (44): 484–492
- Ramaekers, L., Galeano, C. H., Garzon, N., Vanderleyden, J. and Blair, M. (2013). Identifying quantitative trait loci for symbiotic nitrogen fixation capacity and related traits in common bean. *Mol Breeding* (31):163–180
- Rao, I. M. 2001. Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: The case of common bean and tropical forages. In *Handbook of Plant and Crop Physiology* (Ed. M. Pessarakli), pp. 583–613. New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- Rao, I. 2013. *Handbook of Plant and Crop Physiology*. Capitulo 39 : Advances in Improving Adaptation of Common Bean and Brachiaria Forage Grasses to Abiotic Stresses in the Tropics 847-889.
- Rao, I., Beebe, S., Polania, J., Ricaurte, J., Cajiao, C., Garcia, R. and Rivera, M. (2013). Can tepary bean be a model for improvement of drought resistance in common bean? *African Crop Science Journal*, Vol. 21, No. 4, pp. 265 – 281.

- Remans, R., Ramaekers, L., Schelkens, S., Hernández, G., Garcia, A., Reyes, J. L., Mendez, L., Toscano, N., Mulling, M., Galvez, L and Vanderleyden, L. (2008). Effect of Rhizobium–Azospirillum coinoculation on nitrogen fixation and yield of two contrasting *Phaseolus vulgaris* L. genotypes cultivated across different environments in Cuba. *Plant Soil* (312):25–37
- Remans, R., Croonenborghs, A., Torres-Gutierrez, R., Michiels, J., Vanderleyden, J. (2007). Effects of PGPR on nodulation of *Phaseolus vulgaris* L. are dependent on plant P nutrition. *Eur. J. Plant Path.* (119):341-351.
- Sanabria and Tsai, S. M. (1993). Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant and Soil*. (152) Issue: 1, Publisher: Kluwer Academic Publishers, Pages: 59-70
- Salvagiottia, F., Cassmana, K. G., Spechta, J. E., Waltersa, D. T., Weissb, A., Dobermann, A. (2008). Nitrogen uptake, fixation and response to fertilizer N in soybeans: A review. *Field Crops Research* 108: 1–13.
- Schoonhoven, A. and Corrales, P., .CIAT. (1991). Sistema estándar para la evaluación de germoplasma de frijol. Cali Colombia. 61p.
- Shearer, G., Kohl, D. H. (1986). N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. *Aust J Plant Phys* (13):699–756 *Soil* 252:177–186.
- Sinclair, T. R., and Vadez, V. (2012). The future of grain legumes in cropping systems. *Crop Pasture Sci.* 63(6): 501–512.
- Strodtman, K. N., Emerich, D. W. (2009). Nodule metabolism. In: Emerich DW, Krishnan HB (eds) *Nitrogen fixation in crop production*. Crop Science Society of America, Madison, pp 95–124
- Subbarao, G.V., C. Johansen, A. E. Slinkard, R. C. Nageswara Rao, N.P, Saxena, and Y.S. Chauhan. 1995. Strategies For Improving Drought Resistance In Grain Legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 14(6):469-523.

- Taiz and Zeiger. (2002). *Plant Physiology*, 3rd ed. Sunderland: Sinauer: Sinauer Associates.
- Unkovich, M, and Pate, S. (2000). An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research* (65): 211- 228.
- Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddley, B., Giller, K., Alves, B., Chal, .P. (2008). Measuring plant associate nitrogen fixation in agricultural systems. *ACIAR Monograph*. (136): 258 pp.
- Vadez, V., Sinclair, T. R. (2001). Leaf ureide degradation and N(2) fixation tolerance to water deficit in soybean. *Journal of Experimental Botany* (52): 153–159.
- Vance, C. P. (2001). Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. *Plant nutrition in a world of declining renewable resources*. *Plant Physiol.* 127 (2): 390-7.
- Vlassak, K. M., Luyten, E., Verreth, C., Van Rhijn, P., Bisseling, T. and Vanderleyden, J. (1998). The *Rhizobium* sp. BR816 nod gene can function as a determinant for nodulation of *Leucaena leucocephala*, *Phaseolus vulgaris* and *Trifolium repens* by a diversity of *Rhizobium* spp. *Mol Plant Microbe Interact* (5):383–392
- Wanek, W. and Arndt, S. K. (2002). Nitrogen: Difference in delta-15-N signatures between nodulated roots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic N₂ fixation to plant nitrogen. . *J. Exp. Bota.*, 53: 1109-1118
- Westermann, D. T., Porter, L. K. and O'Deen, W. A. (1985). Nitrogen Partitioning and Mobilization Patterns in Bean Plants. *Crop Sci.* 25(2): 225–229.
- Wolfgang, W. and Arndt, S. (2002). Difference in delta-15-N signatures between nodulated roots of soybean is indicative of the contribution of symbiotic N₂ fixation to plant nitrogen. *J. Exp. Bota.*, (53): 1109-1118.

Wortmann, C. (2001). Nutrient dynamics in a climbing bean and sorghum crop rotation in the Central Africa Highlands. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* (61): 267–272.

Wolyn, D. J., Clair, D.A.S., DuBois, J., Rosas, J.C., Burris, R. H. and Bliss, F. A. (1991). Distribution of nitrogen in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) genotypes selected for differences in nitrogen fixation ability. *Plant Soil* 138(2): 303–311.

Zhiquin, W., Zhang, W., Beebout, S., Zhang, H., Liu, L., Yang, J. and Zhang, J. (2016). Grain yield, water and Nitrogen use efficiencies of rice as influenced by irrigation regimes and their interaction with nitrogen rates. *Field crop research* (193): 54-69.