



“Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Fijación biológica de nitrógeno en tres variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) por el método de dilución isotópica de ^{15}N en condiciones de invernadero

Autores

Br. Elvin Adonis Carballo Obando

Br. Donald Steven Flores Medina

Asesores

Ing. MSc. Leonardo García Centeno

Ing. MSc. Martha Gutiérrez Castillo

Ing. José René Jarquín Díaz

Dr. José Antonio Vera Núñez

Managua, Nicaragua
Abril, 2022



"Por un Desarrollo
Agrario
Integral y Sostenible"

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Tesis

Fijación biológica de nitrógeno en tres variedades mejoradas de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) por el método de dilución isotópica de ^{15}N en condiciones de invernadero

Autores

Br. Elvin Adonis Carballo Obando

Br. Donald Steven Flores Medina

Asesores

Ing. MSc. Leonardo García Centeno

Ing. MSc. Martha Gutiérrez Castillo

Ing. José René Jarquín Díaz

Dr. José Antonio Vera Núñez

Presentado a la consideración del honorable comité evaluador como requisito final para optar al grado de Ingeniero Agrónomo

Managua, Nicaragua
Abril, 2022

Hoja de aprobación del Comité Evaluador

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable Comité Evaluador designado por el Decanato de la Facultad de Agronomía como requisito parcial para optar al título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

Miembros del Comité Evaluador

Presidente

Secretario

Vocal

Lugar y Fecha: _____

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios todopoderoso por darme su misericordia y permitirme la vida, la sabiduría y la oportunidad de lograr culminar mis estudios académicos con éxito.

A mis padres Guillermo Carballo Sánchez y Ana Julia Obando Mercado quienes me han enseñado el amor a Dios junta al valor de la vida y que son mi motivación para ser mejor cada día. A mis hermanos y hermanas que han confiado en mí y me brindan su consejo.

A Rachel Thompson, su esposo Kerry Thompson y familia quienes me han apoyado incondicionalmente durante toda esta etapa de formación académica y han sido un ejemplo de vida y superación personal para mí.

A Geysell Jarquin y sus padres José Antonio Jarquín y Josefa Ortiz por su apoyo moral y espiritual.

Al programa de NRN que me beneficio con una beca universitaria y estuvo pendiente de mi con sus oraciones.

A mis compañeros de estudio de la UNA grupo #2 de Agronomía 2015-2019, con quienes siempre han sido solidarios y afectuosos con mi persona; a Donald Flores mi compañero de tesis por su amistad y apoyo; y a mi asesores de tesis Ing. MSc. Leonardo García Centeno, Ing. José René Jarquín Díaz quien nos han brindado su apoyo académico en la redacción de este documento.

A todas las personas que me han brindado su cariño y afecto.

Br. Elvin Adonis Carballo Obando

DEDICATORIA

El presente trabajo lo dedico principalmente a Dios todo poderoso, por darme la vida, fe y sabiduría para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados de mi vida.

A mis padres Donald José Flores Gonzales y Leilin Maribel Medina Rodríguez por su amor incondicional, por el trabajo y sacrificio en todos estos años, por inculcarme el amor a Dios la fuerza y la valentía de no temer a las adversidades que presenta la vida.

Al señor Carlos Flores Castro quien ha sido como un hermano que me ha enseñado el valor de la humildad y el trabajo en familia. A toda mi familia por sus oraciones, consejos motivacionales que hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en mis sueños y metas.

A mis compañeros de estudio de la UNA grupo 2 de Agronomía 2015-2019 con quienes he conocido el valor de la unión y solidaridad y por compartir experiencias. A Elvin Adonis Carballo Obando mi compañero de tesis por su amistad, esfuerzo y apoyo.

Br. Donald Steven Flores Medina

AGRADECIMIENTO

A la Divina Providencia; Padre, Hijo y Espíritu Santo quienes reinan y guían nuestras vidas y a la santísima virgen María por su divina intercesión.

A nuestros padres por darnos la vida y el apoyo incondicional durante nuestra formación en la vida.

A nuestros hermanos (as) amigos fieles en nuestra vida.

A nuestros asesores el Ing. MSc. Leonardo García Centeno, Ing. José René Jarquín Díaz, Ing. M.Sc. Martha Gutiérrez Castillo, Dr. José Antonio Vera Núñez por su amistad y confianza.

A La Universidad Nacional Agraria, que mediante la Facultad de Agronomía nos brindó una formación académica eficiente y competitiva.

Br. Elvin Adonis Carballo Obando

Br. Donald Steven Flores Medina

INDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PAGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	iii
INDICE DE CUADROS	iv
INDICE DE FIGURAS	v
INDICE DE ANEXOS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
III. MARCO DE REFERENCIA	4
3.1. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)	4
3.1.1. Fisiología de la fijación biológica	4
3.1.2. Fijación asociada simbiótica de nitrógeno	5
3.1.3. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) por frijol común	6
3.2. Factores que afectan la fijación biológica de nitrógeno	7
3.3. Métodos para medir la fijación biológica de Nitrógeno en leguminosas de grano	7
3.3.1. Metodología con ¹⁵ N: Técnica de dilución isotópica (DI)	8
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1. Ubicación y descripción del área de estudio	9
4.1.1. Suelo	10
4.2. Diseño experimental	10
4.3. Descripción del material biológico utilizado	12
4.3.1. Inóculos	12
4.3.2. Variedades de frijol	12
4.4. Variables evaluadas	13
4.4.1. Biomasa seca de la planta (g planta ⁻¹)	13
4.4.2. Nitrógeno total (% Nt)	14
4.4.3. Rendimiento del Nitrógeno total (g planta ⁻¹)	14

4.4.4. Nitrógeno derivado del fertilizante (%)	14
4.4.5. Nitrógeno derivado del aire (%)	15
4.4.6. Nitrógeno derivado del suelo (%)	16
4.5. Manejo agronómico del experimento	17
4.5.1. Establecimiento de los cultivos de referencia	17
4.5.2. Marcación del sustrato con ^{15}N	18
4.5.3. Recolección de datos	19
4.6. Procesamiento y análisis de datos	19
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
5.1. Biomasa seca aérea producida (g planta^{-1}), nitrógeno total en biomasa (%) y rendimiento del nitrógeno (g planta^{-1})	21
5.2. Porcentaje de nitrógeno derivado del fertilizante (% Nddf), del aire (% Ndda) y del suelo (% Ndds) en la biomasa aérea	25
5.3. Rendimiento del nitrógeno derivado del fertilizante (RNddf), del aire (RNdda) y del suelo (RNdds) en la biomasa aérea (mg N planta^{-1})	30
VI. CONCLUSIONES	38
VII. RECOMENDACIONES	39
VIII. LITERATURA CITADA	40
IX. ANEXOS	47

INDICE DE CUADROS

CUADRO		PAGINA
1.	Análisis químico del suelo utilizado en el experimento	10
2.	Matriz experimental para el estudio de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis <i>Rhizobium</i> spp. y variedades de frijol rojo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) por medio de la técnica de dilución isotópica de ¹⁵ N en condiciones de invernadero	11
3.	Resultado de biomasa seca aérea (g planta ⁻¹), porcentaje de nitrógeno total (%) y rendimiento de nitrógeno total en la biomasa aérea (g planta ⁻¹) a los 42 dde y 57 dde	23
4.	Porcentaje de nitrógeno en la biomasa aérea derivado del fertilizante (%Nddf), aire (%Ndda) y suelo (Ndds) a los 42 dde y 57 dde	27
5.	Rendimiento de nitrógeno en la biomasa aérea derivado del fertilizante (RNddf), aire (RNdda) y suelo (RNdds) a los 42 dde y 57 dde (mg planta ⁻¹)	31
6.	Resumen del nitrógeno contenido en la biomasa aérea y el proveniente de cada fracción, derivado del fertilizante (Nddf), del aire (Ndda) y del suelo (Ndds) en g N planta ⁻¹ a los 42 y 57 dde.	36

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1. Ubicación geográfica del área experimental	9
2. Aplicación de ^{15}N	18
3. Mezcla del sustrato	18
4. Llenado de macetas	19

INDICE DE ANEXOS

ANEXO		PAGINA
1.	Cultivares de frijol rojo-fortificado/INTA (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) para el estudio de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis <i>Rhizobium</i> spp. -cultivares de frijol rojo (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.) por medio de técnica de dilución isotópica de ¹⁵ N en condiciones de invernadero	47
2.	Fertilizante ¹⁵ N	47
3.	Invernadero UNA-Managua	47
4.	Resultados de los análisis de varianza de las variables evaluadas en el primer momento (42 dde)	48
5.	Resultados de los análisis de varianza de las variables evaluadas para el segundo momento (57 dde)	53

RESUMEN

Las leguminosas tienen la capacidad de fijar biológicamente nitrógeno atmosférico, por tener la cualidad de asociarse simbióticamente con bacterias del género *Rhizobium* spp. La inoculación de las leguminosas especialmente de frijol común, tienen un gran potencial para incrementar los rendimientos con menores costos de producción que usando fertilizantes químicos. El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de tres variedades de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) INTA Ferroso, INTA Nutritivo e INTA Biofortificado en simbiosis con dos cepas del género *Rhizobium* spp., (Inoculo INTA y Zamorano), mediante el método de dilución isotópica de ^{15}N en condiciones de invernadero. Se utilizó un arreglo bifactorial en diseño completamente al azar (DCA), que constó de 6 tratamientos y 8 observaciones; seleccionando los cultivos de arroz (*Oryza sativa* L. cv. INTA Fortaleza Secano) y sorgo (*Sorghum vulgare* L. cv. Tortillero precoz) como planta de referencia para determinar el aporte del nitrógeno atmosférico en el cultivo fijador. La evaluación de las variables en estudio se realizó a través de Análisis de Varianza ($p=0.05$) y pruebas de separación de medias según Tukey ($p=0.05$). Los resultados indican que los Rendimientos de Nitrógeno derivado del aire (RNdda) fluctuaron entre 2.57 a 50.95 mg N planta⁻¹ a los 42 días después de emergencia (dde), y de 32.95 a 137.8 mg N planta⁻¹ a los 57 dde. Los menores aportes de nitrógeno al total acumulado por la planta en ambos momentos de evaluación provinieron del aire, con un promedio de 19.56 %, en comparación al aportado por las otras dos fuentes; suelo (51.24 %) y fertilizante (30.25 %). La combinación con el porcentaje más alto de Nitrógeno derivado del aire (Ndda) y RNdda lo presentó el genotipo INTA Biofortificado con la cepa proveniente del Zamorano. Se considera que es necesario realizar experimentos de campo para evaluar la capacidad de fijación de los factores en estudio bajo condiciones reales de producción.

Palabras clave: fijación simbiótica, Nitrógeno, isótopos, inóculos, leguminosas

ABSTRACT

Legume can biologically fix atmospheric nitrogen, having the quality of symbiotically associating with bacteria of the genus *Rhizobium* spp. The inoculation of legumes, especially common beans, has great potential to increase yields with lower production costs using chemical fertilizers. The objective of this study was to evaluate the biological nitrogen fixation capacity of three varieties of red bean (*Phaseolus vulgaris* L.) INTA Ferroso, INTA Nutritivo and INTA Biofortified in symbiosis with two strains of *Rhizobium* spp., (INTA and Zamorano inoculum), by the ^{15}N isotopic dilution method under greenhouse conditions. A bifactorial arrangement was used in a completely randomized design (CRD), which consisted 6 treatments and 8 observations; selecting the rice crop (*Oryza sativa* L. cv. INTA Fortaleza Secano) and sorgo (*Sorghum vulgare* L. cv. Tortillero precoz) as a reference plant to determine the contribution of atmospheric nitrogen in the fixing crop. The evaluation of the variables under study was carried out through Analysis of Variance ($p=0.05$) and mean separation tests according to Tukey ($p=0.05$). The results indicate that the yield of Nitrogen derived from the air (YNda) fluctuated between 2.57 to 50.95 mg N plant $^{-1}$ at 42 days after emergence (dae), and from 32.95 to 137.8 mg N plant $^{-1}$ at 57 dae. The lowest nitrogen contributions to the total accumulated by the plant at both evaluation times came from the air, with an average of 19.56 %, compared to that provided by the other two sources; soil (51.24%) and fertilizer (30.25%). The combination with the highest percentage of Nitrogen derived from air (Nda) and YNda were presented by the INTA Biofortified genotype with the strain from Zamorano. It is considered necessary to carry out field experiments to evaluate the fixation capacity of the factors under study under real production conditions.

Keywords: symbiotic fixation, Nitrogen, isotopes, inocula, legumes

I. INTRODUCCIÓN

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa de grano para consumo humano de mayor producción en el mundo, y es nativo de América Latina, la cual aporta cerca del 50 % de la producción mundial. Según Beebe *et al.* (2017) esta leguminosa aporta minerales y proteínas a la dieta del ser humano favoreciendo su crecimiento y desarrollo.

Según Delgadillo y Gómez (2015), el caso del cultivo de frijol es importante analizar, ya que es un cultivo que está en manos principalmente de pequeños y medianos productores muchos de ellos de subsistencia que cultivan sobre suelos de laderas, obteniendo bajos rendimientos por área.

Las familias de las leguminosas tienen la capacidad de fijar biológicamente nitrógeno atmosférico, por tener la cualidad de asociarse simbióticamente con bacterias del género *Rhizobium* spp. Según Salmerón y García (1994), estos microorganismos viven en colonias (nódulos) en las raíces de las leguminosas donde la planta huésped aporta el sustrato energético, consistente principalmente en sacarosa, y se beneficia del nitrógeno orgánico reducido por microorganismos; que poseen la enzima nitrogenasa que es la encargada de desdoblar el nitrógeno atmosférico.

La variabilidad genética de los caracteres relacionados con la fijación de Nitrógeno ha sido demostrada para ambos componentes de la simbiosis leguminosa – rizobios, muchos programas han concentrado su atención sobre las pruebas y selección de cepas *Rhizobium* spp., como el principal factor para el mejoramiento de la fijación de nitrógeno en el cultivo. Solo en la última década se ha puesto énfasis sobre el mejoramiento y selección de la leguminosa huésped para incrementar las cantidades de nitrógeno derivado de la fijación. Las leguminosas capaces de fijar más nitrógeno son especialmente importantes en los países de desarrollo, en donde la nutrición nitrogenada es un factor limitante para una mayor productividad de los cultivos.

La eficiencia de diferentes leguminosas y sus microsimbiontes ha sido representada en varias publicaciones por Handarson *et al.* (1987), demostrándose que el frijol común es un pobre fijador de nitrógeno atmosférico en relación con otras leguminosas como la Soya, Frijol Mungo y la Haba. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés), detalla que la aplicación de fertilizantes nitrogenados en cultivos de frijol incrementa considerablemente los rendimientos de este rubro (FAO, 1985), con esto deducimos que el porcentaje de nitrógeno atmosférico que fija el frijol común a través de la simbiosis no es suficiente para obtener altos rendimientos

Cantaro *et al.* (2019) afirman que la inoculación de las leguminosas especialmente de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), tienen un gran potencial para incrementar los rendimientos con menores costos de producción que usando fertilizantes químicos. Por lo tanto, “es ventajoso seleccionar cepas efectivas para variedades específicas de la región donde se cultiva este rubro.” (p.80)

Los métodos para estimar la fijación de nitrógeno han sido descritos y discutidos en varias publicaciones (Handarson y Danso, 1993; Fonseca-Lopez *et al.*, 2020). El método de dilución isotópica de ^{15}N permite hacer estimaciones globales de la fijación biológica de Nitrógeno, utilizando fertilizante ^{15}N en condiciones variables de la producción de frijol común. El método está basado en la dilución diferencial en la planta del fertilizante marcado con ^{15}N por el nitrógeno del suelo y de la fijación (Fried y Middelboe, 1977).

Existen pocas investigaciones (Gaitán y Mairena, 2017; Juarez y Sanchez, 1999) en cuanto al estudio de la simbiosis *Rhizobium* spp. con frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) en nuestro país, por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de tres variedades de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) en simbiosis con dos cepas del género *Rhizobium* spp., mediante el método de dilución isotópica de ^{15}N en condiciones de invernadero.

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la capacidad de la fijación biológica de nitrógeno de tres variedades de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) en simbiosis con dos cepas del género *Rhizobium* spp., por el método de dilución isotópica del ^{15}N en condiciones de invernadero.

2.2. Objetivos específicos

Comparar la capacidad de fijación biológica de nitrógeno de tres variedades de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculadas con dos cepas del género *Rhizobium* spp.

Identificar las interacciones que expresan mayor capacidad de fijación biológica de nitrógeno entre las tres variedades de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) y las dos cepas del género *Rhizobium* spp.

III. MARCO DE REFERENCIA

3.1. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)

Según Castillo Rodríguez *et al.* (2005), el nitrógeno forma parte de aminoácidos, nucleótidos y amino azucres, así como de sus correspondientes polímeros. Este elemento representa uno de los principales factores limitantes que restringen el crecimiento de los cultivos, dado su complejo comportamiento en el suelo. Uno de los procesos más importantes que determinan la disponibilidad de este nutriente para los cultivos es el proceso de fijación biológica.

Calvo García (2011) define la fijación biológica del nitrógeno (FBN) como la conversión del Nitrógeno atmosférico (N_2) a formas asimilables para las plantas, que puedan ser el ion amonio (NH_4^+) o el ion nitrato (NO_3^-). Vázquez (1996) expresa que la FBN es realizada por organismos procariotas y ésta se realiza en tres formas básicas: libre (*Klebsiella* sp., *Clostridium* sp.), asociada no simbiótica (*Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp.) y asociada simbiótica (*Rhizobium* sp.). Sin embargo, la fijación simbiótica es la más importante desde el punto de vista agrícola; por ello se han realizado estudios complejos para entender los mecanismos fundamentales de dicha interacción.

3.1.1. Fisiología de la fijación biológica

Según Fernández-Pascual *et al.* (2002), se ha demostrado que la fijación biológica de nitrógeno depende de un complejo enzimático conocido como nitrogenasa presente exclusivamente en los organismos fijadores. Este complejo presenta dos tipos de componentes: componente I, en esta parte se localiza el sitio de unión y reducción del sustrato teniendo como cofactor al Hierro-Molibdeno y el componente II cuyo papel es el de reducir al componente I (Phillips, 1980).

La FBN es un proceso en el cual el nitrógeno debe ser primero reducido y luego fijado, es decir, combinado en una forma utilizable (NH_4^+), sin embargo, el primer producto de la reacción es amoníaco (NH_3), pero es rápidamente protonado, formándose amonio (NH_4^+), de tal manera que el amonio es la forma de Nitrógeno predominante y la que forma parte en las reacciones de

asimilación (Sprent y Sprent, 1990). Posteriormente es metabolizado en las células nodulares a amidas o ureidos, que luego son exportados vía xilema al resto de la planta. Este proceso se puede generalizar de la siguiente manera; la enzima nitrogenasa necesita 16 moléculas de ATP por Nitrógeno reducido:



3.1.2. Fijación asociada simbiótica de nitrógeno

El establecimiento de la simbiosis para atrapar el Nitrógeno entre *Rhizobium* spp., y la leguminosa, es un proceso complejo, donde la formación de nódulos y la captación del Nitrógeno se dan en etapas sucesivas. Según Arias *et al.*, (2007):

El *Rhizobium* induce en la leguminosa el desarrollo de nódulos en su raíz, luego los dos organismos establecen una cooperación metabólica: las bacterias reducen N_2 a amonio (NH_4), el cual lo exportan al tejido vegetal para su asimilación en proteínas y otros compuestos nitrogenados complejos, las hojas reducen el CO_2 en azúcares durante la fotosíntesis y lo transportan a la raíz donde los bacteroides de *Rhizobium* lo usan como fuente de energía para proveer ATP al proceso de inmovilizar N_2 . (p.71)

Desde el punto de vista energético, Atkins (1986) propone que “el proceso de fijación de Nitrógeno consume de tres a cuatro veces más energía metabólica que la absorción y asimilación de N mineral” (p.130), es decir que para realizar el proceso de fijación de Nitrógeno las leguminosas deben tener un estado de nutrición eficiente.

Los sistemas simbióticos juegan un papel importante en los sistemas agrícolas, ya que además de reducir los costos de producción, evitan la contaminación de las aguas subterráneas, aumentan la producción de proteína (al incrementar la concentración de proteína de las leguminosas), contribuyen con nitrógeno para cultivos sucesivos y fortalecer la fertilidad de los suelos (Hardarson, 1993).

En la agricultura, específicamente dos ejemplos de fijación biológica han sido explotados de manera satisfactoria. Primeramente, las cianobacterias (algas azul-verdes) que son de gran importancia en las áreas del cultivo del arroz a nivel mundial, seguidas por las bacterias del género *Rhizobium* spp., que se encuentran representadas globalmente en zonas templadas, tropicales, forestales y suelos cultivables (Jones, 1991).

3.1.3. Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) por frijol común

En comparación con otras leguminosas de grano, el frijol se ha considerado como una planta pobre en la fijación de nitrógeno, lo cual podría ser debido a la baja eficiencia relativa (ER) de su simbiosis (Hungria y Neves, 1986).

En este sentido, López-Alcocer (1989), evaluó 360 genotipos de frijol, seleccionando 120; 58 por su capacidad simbiótica, 43 por rendimiento en grano y 19 por ambos parámetros. Los genotipos fueron seleccionados a partir de tratamientos inoculados + fósforo (40 kg ha⁻¹) y testigos sin inocular + fósforo. Algunos estudios en condiciones de campo como los de Hardarson *et al.*, (1993) empleando el método de dilución isotópica de ¹⁵N, han encontrado que las leguminosas de grano pueden obtener entre un 35 y 58 % del nitrógeno total acumulado en su biomasa proveniente de la atmósfera.

Otros estudios han establecido en cuanto a la cantidad de Nitrógeno fijado, que este cultivo alcanza valores de 25 a 71 kg de nitrógeno por hectárea, en un período de 100 a 120 días (Graham y Rosas, 1977), mientras que Renie y Kemp (1983) reportaron valores de hasta 125 kg de nitrógeno fijado y porcentajes de hasta un 68 % nitrógeno derivado del aire (N_{da}), con un promedio de 51.8 %. Hardarson y Danso (1993), señalan que para asegurar un manejo apropiado y óptimo beneficio de la simbiosis leguminosa-rizobios, es necesario realizar cuantificaciones de la cantidad de Nitrógeno fijado. Dichas cuantificaciones permitirían conocer la potencialidad de inoculación de las semillas con rizobios y obtener una simbiosis eficiente para aumentar los rendimientos del cultivo de frijol.

3.2. Factores que afectan la fijación biológica de nitrógeno

Algunos factores pueden ser severos limitantes para el proceso de fijación, como el crecimiento de las raíces, la actividad de la planta hospedera, las condiciones de suelo y factores ambientales, los cuales pueden afectar la formación de nódulos, hasta el punto de verse restringida la efectividad de la simbiosis y la fijación de nitrógeno (Hungria y Neves, 1987).

Por su parte, una revisión de Graham (1990) agrega que factores agronómicos y ambientales específicos como temperatura, humedad, acidez, competencia con cepas nativas, disponibilidad del contenido de nitrógeno, fósforo, calcio, molibdeno, toxicidad de aluminio y manganeso afectan significativamente la capacidad de nodulación y fijación biológica del nitrógeno en frijol común.

3.3. Métodos para medir la fijación biológica de Nitrógeno en leguminosas de grano

Existen varios métodos para estimar el porcentaje de nitrógeno que fijan las leguminosas, cada uno tiene sus ventajas y desventajas, por tanto, el método a utilizar está en dependencia del objetivo del experimento. Hardarson y Danso (1993), describen dichos métodos entre ellos: método de la producción de materia seca (MS); método de la diferencia de nitrógeno total; observación de nódulos; actividad de reducción de acetileno (ARA); técnica de solutos en la xilema; metodologías con ^{15}N (uso de gas $^{15}\text{N}_2$), uso de fertilizantes o sustratos enriquecidos con ^{15}N - método de dilución isotópica (DI), método del valor-A (VA) y el método de abundancia natural (AN). Para fines de estudio, a continuación, se describirá el principio básico del método de dilución isotópica del ^{15}N .

3.3.1. Metodología con ¹⁵N: Técnica de dilución isotópica (DI)

Este método se considera como uno de los que ofrece las mejores cuantificaciones globales de la FBN, ya que permiten distinguir la proporción de nitrógeno en la planta que procede del suelo, de un fertilizante o de la atmósfera, y entregan valores de fijación biológica de nitrógeno integrados para todo un ciclo de crecimiento de un sistema leguminosa-rizobios (Danso, 1995). Según Fried y Middelboe, (1977) citado por Handarson y Danso, (1993)

Este método involucra el crecimiento de plantas fijadoras de N₂ y plantas de referencia no fijadoras en suelos tratados con fertilizantes orgánicos o inorgánicos enriquecidos con ¹⁵N. El método está basado en la dilución diferencial en la planta del fertilizante marcado con ¹⁵N por el nitrógeno del suelo y de la fijación. (p.21)

El método de dilución isotópica permite que las plantas fijadoras como las de referencias no fijadoras sean cultivadas en un suelo al cual se ha aplicado la misma cantidad de fertilizante marcado con ¹⁵N. En la ausencia de cualquier otro aporte de nitrógeno que el del suelo y el fertilizante marcado con ¹⁵N, ambas plantas deben poseer la misma relación de ¹⁵N/¹⁴N, dado que están absorbiendo nitrógeno de composición ¹⁵N/¹⁴N similar, pero no necesariamente la misma cantidad total de nitrógeno. Sin embargo, en la presencia de N₂, la planta fijadora presenta una relación ¹⁵N/¹⁴N aún más baja debido a la incorporación de nitrógeno del aire no marcado, mientras que esto no ocurre en la planta de referencia. El cálculo del porcentaje de nitrógeno derivado de la atmósfera (% N_{da}) se puede efectuar mediante la siguiente ecuación:

$$\% N_{da} = \left(1 - \frac{\% N_{dff F}}{N_{dff NF}} \right) * 100$$

Donde % N_{dff F} y % N_{dff NF} son los porcentajes de nitrógeno derivado del fertilizante por las plantas fijadoras y no fijadora, respectivamente.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación y descripción del área de estudio

El experimento se realizó en el recinto central de la Universidad Nacional Agraria (UNA), ubicada en el km 12 ½ carretera norte con coordenadas Universal Transverse Mercator (UTM) 591076.5 E y 1342855.9 N con una elevación de 63 msnm (Instituto Nacional de Estudios Territoriales [INETER], 2012). El experimento se estableció en el mes de abril de 2019 y finalizó en el mes de junio del mismo año, bajo condiciones controladas en invernadero.

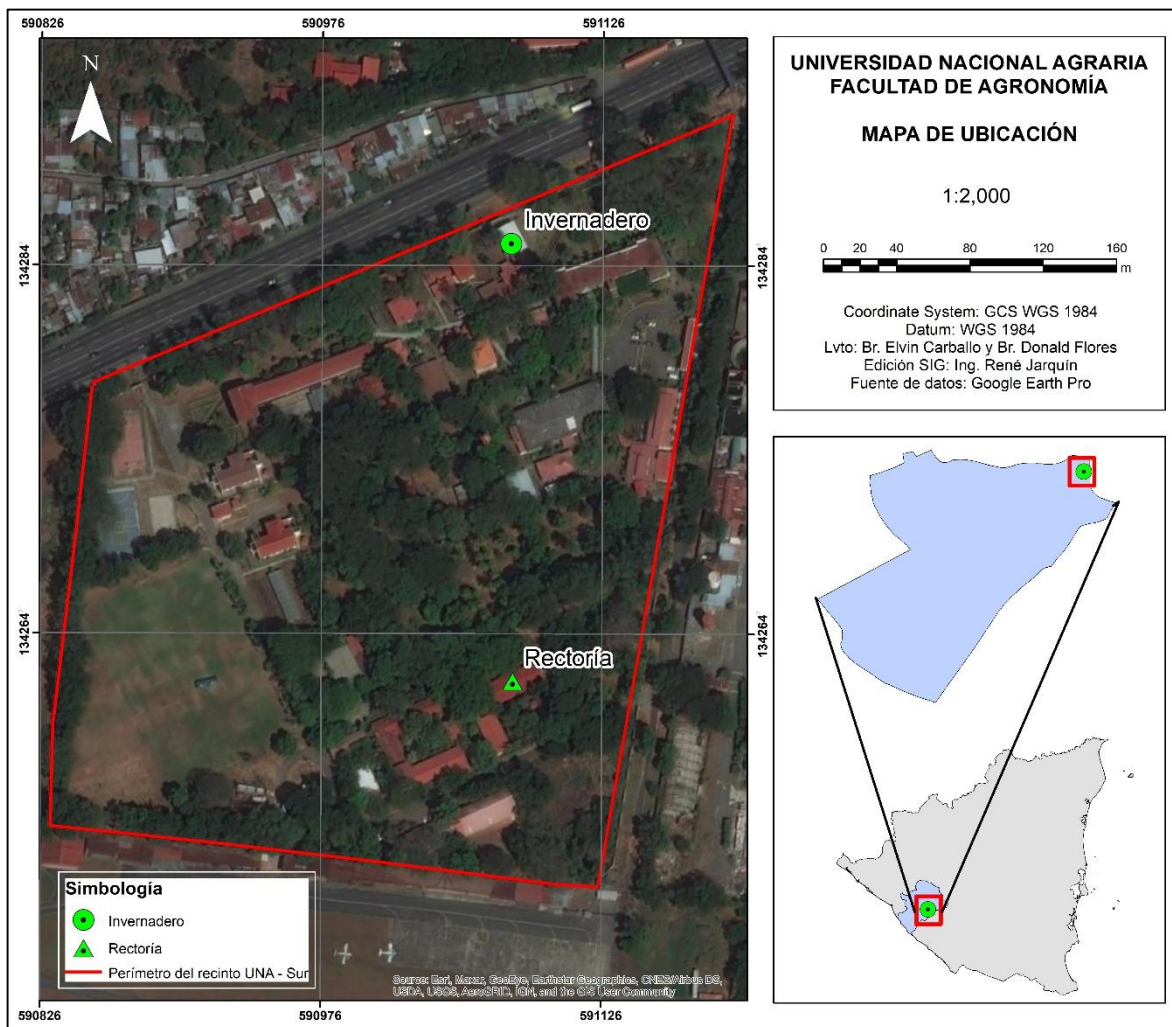


Figura 1. Ubicación geográfica del área experimental.

4.1.1. Suelo

El sustrato utilizado en el experimento está constituido por suelo recolectado en el recinto central de la UNA, posee textura franco-arcillosa-arenosa y se preparó en el sitio donde se estableció el ensayo. Los resultados del análisis del suelo que se le realizó al suelo utilizado se presentan en el cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis químico del suelo utilizado como sustrato en el experimento

Parámetros	Unidad de medida	Resultado	Interpretación
pH-H ₂ O	-	7.6	Ligeramente alcalino
Materia orgánica	%	2.9	Medio
Nitrógeno		0.1	Medio
Potasio	meq 100 g ⁻¹ suelo	2.8	Alto
Calcio		20.5	Alto
Magnesio		7.9	Alto
Fosforo	ppm	19.6	Medio
Hierro		15.1	Bajo
Cobre		0.8	Alto
Manganeso		66.2	Alto
Zinc		2.4	Bajo

4.2. Diseño experimental

El experimento fue establecido en condiciones de invernadero, controlando estrictamente la variabilidad de los factores ambientales. Dadas las exigencias en cuanto a la precisión del experimento, se utilizó un arreglo bifactorial en un diseño completamente al azar (DCA), que constó de 6 tratamientos con 8 observaciones (repeticiones), para un total de 48 unidades experimentales. Se establecieron 3 cultivos de referencia con 8 observaciones cada uno, que suman 24 unidades experimentales adicionales. El ensayo estuvo conformado por un total de 72 unidades experimentales (48 del cultivo fijador y 24 del cultivo de referencia).

Los factores en estudio fueron dos tipos de inoculantes bacterianos del género *Rhizobium* spp, uno proveniente del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)¹ y un inóculo proveniente de la Escuela Panamericana El Zamorano (CIAT 899) que conforman el factor A. Se utilizaron tres variedades mejoradas de frijol rojo: INTA Ferroso, INTA Nutritivo/Rendidor e INTA Biofortificado, que representan el factor B.

Los cultivos de referencia establecidos fueron arroz (*Oryza sativa* L. cv. INTA Fortaleza Secano), sorgo (*Sorghum vulgare* L. cv. Tortillero precoz) y maíz (*Zea mays* L. cv. NB-S). Estos cultivos se seleccionaron debido a la similitud que existe entre su sistema radicular, ciclo de vida y mecanismos de absorción con respecto a los del cultivo fijador.

Cuadro 2. Matriz experimental para el estudio de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis con *Rhizobium* spp. y variedades de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) por medio de la técnica de dilución isotópica de ¹⁵N en condiciones de invernadero

	Tratamientos	Unidades experimentales (N°)
Factor A: Inóculos	a ₁ : INTA	-
	a ₂ : Zamorano	-
Factor B: Variedades	b ₁ : INTA-Ferroso	-
	b ₂ : INTA Nutritivo/Rendidor	-
	b ₃ : INTA Biofortificado	-
Interacciones	a ₁ b ₁ : INTA + Ferroso	8
	a ₁ b ₂ : INTA + Nutritivo	8
	a ₁ b ₃ : INTA + Biofortificado	8
	a ₂ b ₁ : Zamorano + Ferroso	8
	a ₂ b ₂ : Zamorano + Nutritivo	8
	a ₂ b ₃ : Zamorano + Biofortificado	8
Cultivos de referencia (no fijadores)	C _{R1} : Maíz	8
	C _{R2} : Sorgo	8
	C _{R3} : ARROZ	8
	Total	72

¹ Que consistió en una mezcla de dos cepas nativas de rizobium (cepa 2 y cepa 18).

4.3. Descripción del material biológico utilizado

4.3.1. Inóculos

El inóculo proveniente del Zamorano es una cepa denominada CIAT 899 (*Rhizobium tropici*) que tiene las siguientes características: borde liso, color transparente, aspecto translucido brillante, formar circular irregular, textura muy mucosa, su diámetro mide aproximadamente 4.4 mm, tiempo de aparición 2 días. Resistentes a pH ácidos de 4.0, 4.4, 4.6, 5.0, con alta efectividad de nodulación.

El inóculo proveniente del INTA posee las siguientes características: son autóctonas del departamento de Estelí-Nicaragua, crecimiento rápido, presentan una forma redonda, apariencia opaca o brillante, crecen en suelo que tengan un rango de pH 5 a 8, y se desarrolla en temperatura de 15 hasta 37° C.

4.3.2. Variedades de frijol

Las variedades de frijol común usadas en este experimento fueron tres variedades comerciales difundidas y de amplia aceptación, proporcionadas por el INTA. Las variedades son INTA Ferroso, INTA Biofortificado e INTA Nutritivo y rendidor.

INTA Ferroso

INTA (2015) destaca que esta variedad de frijol presenta un ciclo corto, y se cosecha a los 75 días después de ser sembrado, resistente a la sequía, por lo que se recomienda para el corredor seco del país, esta variedad tiene un alto contenido de proteínas, carbohidratos, vitaminas y micronutrientes, con una cantidad de semillas por vaina de 5-7, número de vainas por planta de 13-20, color de semilla rojo claro, resistente a la enfermedad del mosaico común, maduración fisiológica de 66-68 días.

INTA nutritivo y rendidor

INTA (2018) señala que esta variedad presenta un hábito de crecimiento erecto, arbustiva de guía corta, tolerante a la humedad, plagas y enfermedades como el mosaico dorado y mosaico común, mancha angular y bacteriosis común, mayor contenido nutricional, contiene altos contenidos de hierro y zinc, presenta un tiempo de floración de 34 a 36 días, de maduración fisiológica de 66 a 68 días y tiempo de cosecha de 74 a 76 días, con un rendimiento de 34 a 36 quintales por manzana, con un color de grano rojo vino brillante, apropiado para su producción en zona intermedia y húmeda.

INTA biofortificado

INTA (2018) indica que esta variedad es apropiada para sembrar en zonas secas e intermedias, siendo tolerante a la sequía, plagas y enfermedades como el mosaico dorado, mancha angular y bacteriosis común, presenta un hábito de crecimiento arbustivo indeterminado guía corta, un tiempo de floración de 32 a 34 días, una distribución de vaina en la parte media de la planta, una maduración fisiológica de los 60 a 64 días y tiempo de cosecha de 72 a 74 días, un rendimiento de 28 a 34 quintales por manzana y color de grano rojo claro brillante.

4.4. Variables evaluadas

4.4.1. Biomasa seca de la planta (g planta⁻¹)

Se recolectaron plantas a los 42 dde y 57 dde, luego se llevaron al laboratorio de Fisiología Vegetal de la UNA donde con una tijera se separó la parte aérea (hojas, tallos y ramas) de la raíz. Posteriormente, la muestra se sometió a un proceso de secado al horno a temperatura de 65°C por 72 horas y se determinó su peso seco en gramos a través de una balanza digital. Estos resultados se utilizaron para relacionar la cantidad de Nitrógeno que aportan las variedades de frijol evaluadas con la producción de biomasa seca (g planta⁻¹).

4.4.2. Nitrógeno total (% Nt)

Las muestras de biomasa seca aérea se sometieron al proceso de molienda y empaque en bolsas ziploc codificadas según número de muestra y fecha de corte, las mismas fueron enviadas al laboratorio molecular de la Universidad de Florida en Estados Unidos donde se realizó un análisis molecular mediante la técnica de espectrometría de masas y así obtener el porcentaje de nitrógeno total y el porcentaje de átomos en exceso de ^{15}N (%aexc ^{15}N).

4.4.3. Rendimiento del Nitrógeno total (g planta $^{-1}$)

Este cálculo se hizo a través de los resultados de nitrógeno total en la biomasa seca aérea (g planta $^{-1}$), utilizando la siguiente formula.

$$RNT = \frac{Nt (\%) * RTO (g \text{ planta}^{-1})}{100}$$

En donde:

RNT: Rendimiento de nitrógeno total (g planta $^{-1}$)

Nt (%): Porcentaje de nitrógeno total

RTO: Rendimiento de biomasa seca (g planta $^{-1}$)

4.4.4. Nitrógeno derivado del fertilizante (%)

El Nitrógeno derivado del fertilizante (Nddf) se calculó a través de los resultados del análisis de espectrometría de masa, dicha prueba determinaría también el % de átomos de ^{15}N en abundancia presentes en la muestra. Para conocer el % Nddf se utilizó la siguiente formula:

$$\%Nddf = \frac{\% \text{ At. } ^{15}\text{N} \text{ ex. } P}{\% \text{ At. } ^{15}\text{N} \text{ ex. } F} * 100$$

En donde:

% Nddf: Porcentaje de Nitrógeno derivado del fertilizante

% At. ¹⁵N ex. P: Porcentaje de átomos de ¹⁵N en exceso en la planta

% At. ¹⁵N ex. F: Porcentaje de átomos de ¹⁵N en exceso del fertilizante

Una vez calculado el % Nddf, se determinó el rendimiento de Nitrógeno derivado del fertilizante con la siguiente formula:

$$RNddf = \frac{RNt * \%Nddf}{100}$$

En dónde:

RNddf: Rendimiento de Nitrógeno derivado del fertilizante (mg N planta⁻¹)

RNt: Rendimiento de Nitrógeno total (mg N planta⁻¹)

%Nddf: Porcentaje de Nitrógeno derivado del fertilizante (%)

4.4.5. Nitrógeno derivado del aire (%)

El Nitrógeno derivado del aire (Ndds) se obtuvo a través de los porcentajes de Nitrógeno derivado del fertilizante tanto como para el cultivo fijador como el no fijador. Para calcular el porcentaje de Nitrógeno derivado del aire se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%Ndda = \left(1 - \frac{\%Nddf_{cf}}{\%Nddf_{nf}}\right) * 100$$

En donde:

%Ndda: Porcentaje de Nitrógeno derivado del aire (%)

%Nddf_{cf}: Porcentaje de Nitrógeno derivado del fertilizante en cultivo fijador

$\%Nddf_{nf}$: Porcentaje de Nitrógeno derivado del fertilizante en cultivo no fijador (cultivo de referencia)

Una vez calculado el $\% Ndda$ se calculó el rendimiento de Nitrógeno derivado del aire con la siguiente formula:

$$RNdda = \frac{RNt * \%Ndda}{100}$$

En donde:

RNddf: Rendimiento de Nitrógeno derivado del aire (mg planta⁻¹)

RNt: Rendimiento de Nitrógeno total (mg N planta⁻¹)

$\%Ndda$: Porcentaje de Nitrógeno derivado del aire (%)

4.4.6. Nitrógeno derivado del suelo (%)

El nitrógeno derivado del suelo (Ndds) se obtuvo a través de la diferencia del porcentaje de nitrógeno fijado por el fertilizante y la atmosfera. Para ello se utilizó la siguiente formula:

$$\%Ndds = 100 - (\%Nddf + \%Ndda)$$

En donde:

$\%Ndds$: Porcentaje de nitrógeno derivado del suelo (%)

$\%Nddf$: Porcentaje de nitrógeno derivado del fertilizante (%)

$\%Ndda$: Porcentaje de nitrógeno derivado del aire (%)

Una vez calculado el $\% Ndds$ se determinó el rendimiento de Nitrógeno derivado del suelo con la siguiente formula:

$$RNdds = RNtotal - (RNddf + RNdda)$$

En donde:

RNdds: Rendimiento de nitrógeno derivado del suelo (mg N planta⁻¹)

RNddf: Rendimiento de nitrógeno derivado del fertilizante (mg N planta⁻¹)

RNdda: Rendimiento de nitrógeno derivado del aire (mg N planta⁻¹)

4.5. Manejo agronómico del experimento

La preparación del suelo se realizó una semana antes de la siembra, se tamizó la tierra recolectada, separando las partículas de 2 mm de las más gruesas (>2 mm), una vez tamizado el suelo, una parte se marcó con nitrógeno ¹⁵N, mezclando cada capa marcada para lograr un sustrato homogéneamente marcado con ¹⁵N, como se indica en la sección 4.5.2. Posteriormente se realizó la mezcla para el llenado de las 72 macetas (cultivo fijador y no fijador). El proceso de inoculación de los microorganismos a las semillas de frijol se realizó en el Centro Nacional de Investigación Agropecuaria (CNIA).

La siembra de las variedades de frijol se realizó por golpes, se depositó tres semillas por cada maceta a un distanciamiento de 10 cm, para un total de 144 semillas en 48 macetas de cultivo fijador (leguminosa). En cuanto a los cultivos de referencia, se depositó 2 semillas por golpe para un total de 6 semillas por macetas, teniendo un resultado 144 semillas en 24 macetas, para el cultivo de referencia Maíz se realizó un raleo a 3 plantas por macetas. El manejo de arvenses se realizó de forma manual con controles de 1 vez por semana.

4.5.1. Establecimiento de los cultivos de referencia

En el método de dilución isotópica, tanto las plantas fijadoras como las plantas de referencia son cultivadas en un suelo al cual se le ha aplicado la misma cantidad de fertilizante enriquecido con ¹⁵N (Hardarson y Danso 1993). Los cultivos de referencia se establecieron en macetas, ubicadas a la par del cultivo fijador, los utilizados en este experimento fueron arroz (*Oryza sativa* L. cv. INTA Fortaleza Secano) para el primer muestreo, y en la segunda toma de datos se

utilizó el sorgo (*Sorghum vulgare* L. cv. Tortillero precoz). Los cuales fueron seleccionados para utilizar sus datos y poder calcular la cantidad de Nitrógeno aportado por el aire en las tres variedades evaluadas.

4.5.2. Marcación del sustrato con ^{15}N

El suelo utilizado fue marcado con urea enriquecida al 10 % de átomos en exceso de ^{15}N (dosis equivalente a 29 g de urea 46 % enriquecidas con ^{15}N en 650 kg de suelo). La marcación consistió primeramente en el tamizado con malla 2 mm del suelo, posteriormente se expandió en delgadas capas sobre un plástico y con una bomba de fumigación de 5 litros se asperjó cada capa de suelo hasta lograr una aplicación homogénea, luego se procedió al llenado de las macetas (7 a 8 kg suelo maceta⁻¹). El proceso se muestra en las figuras 2, 3 y 4.



Figura 2. Aplicación de ^{15}N .



Figura 3. Mezcla del sustrato.



Figura 4. Llenado de macetas.

4.5.3. Recolección de datos

Los datos se recolectaron en dos momentos, a los 42 dds (primer momento) se muestrearon 24 unidades experimentales del cultivo fijador y 12 del cultivo de referencia, y a los 57 días (segundo momento) se recolectó el resto del ensayo. Posteriormente, todas las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación en el horno para luego medir la producción de biomasa seca (g planta^{-1}). Las muestras recolectadas fueron enviadas a la Universidad de Florida para la determinación de la cantidad de nitrógeno acumulado en la biomasa aérea (hojas, tallos y ramas), usando un espectrómetro de masas.

4.6. Procesamiento y análisis de datos

Para el procesamiento de los datos, se procedió a construir una base de datos en hoja de cálculo del programa Microsoft Excel 2013. Las variables evaluadas se analizaron mediante el procedimiento de Análisis de Varianza (ANDEVA), posteriormente se realizó una prueba de separación de medias según el criterio de Tukey ($p=0.05$) mediante el software estadístico INFOSTAT versión 2020. El modelo aditivo lineal del experimento fue el siguiente:

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

En donde:

$i = 1, 2, 3, \dots, a = 2$: Niveles del factor A (Inóculos)

$j = 1, 2, 3, \dots, b = 3$: Niveles del factor B (Variedades de frijol)

$k = 1, 2, 3, \dots, n = 8$: observaciones

Y_{ijk} = La k-ésima observación del i-ésimo tratamiento

μ = Estima a la media poblacional

α_i = Efecto del i-ésimo nivel del factor A (Inoculo)

β_j = Efecto debido al j-ésimo nivel del factor B (Variedades de frijol)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de interacción entre los factores A y B (Inoculo x Variedad)

ε_{ijk} = Efecto aleatorio de variación

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Biomasa seca aérea producida (g planta^{-1}), nitrógeno total en biomasa (%) y rendimiento del nitrógeno (g planta^{-1})

La deficiencia de nitrógeno limita la producción de frijol común, lo que es indicado por la respuesta positiva a los fertilizantes nitrogenados. Sin embargo, las aplicaciones de estos no son del todo eficientes, según Raun y Jhonson, (1999), solo un 33 % del nitrógeno aplicado es utilizado por las plantas. Lawlor (2002), explica que el suministro de nitrógeno es crucial para el desarrollo de la biomasa en la planta y será expresada como unidad de biomasa generada por unidad de nutriente aplicado.

En el primer muestreo a los 42 dde, el análisis de varianza detectó diferencias significativas en la producción de Biomasa Seca Aérea (BSA), donde se observa que la variedad INTA Nutritivo fue la que tuvo la mayor producción ($4.17 \text{ g planta}^{-1}$). Mientras que en la variable Nitrógeno Total (% NT) no hay diferencia estadística, presentando un promedio de 3.65 % en cada variedad, y un rendimiento de $0.14 \text{ g planta}^{-1}$ de nitrógeno en el genotipo INTA Nutritivo.

Para el factor inoculo, la cepa donde se registró la mayor producción de biomasa fue la proveniente del INTA, con $4.06 \text{ g planta}^{-1}$. En cuanto a las variables NT y Rendimiento del Nitrógeno Total en la Biomasa aérea (RNTBA) no se detectó diferencias estadísticas ($P\text{-valor} > 0.05$). Al analizar su efecto combinado, se mantiene la misma tendencia, ya que el tratamiento que obtuvo la mayor producción de BSA, fue la combinación de la inoculación de la cepa INTA en la variedad INTA Nutritivo con $4.73 \text{ g planta}^{-1}$, en cambio, el tratamiento que obtuvo la producción más baja fue el tratamiento Zamorano + INTA Biofortificado ($2.03 \text{ g planta}^{-1}$).

Para la variable NT no se encontró diferencias estadísticas. De forma numérica el más alto porcentaje lo presentó la variedad INTA Nutritivo en simbiosis con la cepa Zamorano (3.94 % respectivamente) y el más bajo lo produjo el cultivar INTA Nutritivo en combinación con la cepa INTA (3.40 %).

Respecto a la variable de RNTBA, no se detectó diferencias estadísticas. Sin embargo, los tratamientos INTA + INTA Nutritivo, Zamorano + INTA Ferroso y Zamorano + INTA Nutritivo registraron un promedio de 0.14 g planta⁻¹ de nitrógeno en su biomasa aérea, siendo superior a las demás interacciones, mientras que la combinación Zamorano + INTA Biofortificado obtuvo el valor más bajo (0.07 g planta⁻¹)

En cambio, a los 57 dde la variedad que produjo el promedio más alto de BSA fue la INTA Biofortificado (19.95 g planta⁻¹), de igual forma este genotipo obtuvo los valores más alto de NT y RNTBA con 3.11 % y 0.56 g planta⁻¹ respectivamente. Por tanto, se reflejó en el cultivar INTA Nutritivo que produjo solo 13.88 g planta⁻¹ de BSA, 2.61 % de NT y 0.35 g planta⁻¹ de RNTBA. Para el factor inóculo la cepa INTA fue la que se expresó mejor con 16.95 g planta⁻¹ de BSA, 2.94 % para la variable de NT, a pesar de que no se detectó diferencia significativa, no obstante, para la variable RNTBA fue estadísticamente superior con una media de 0.50 g planta⁻¹.

En el análisis de las interacciones se mantiene la misma tendencia a los 57 dde, pese a que no se detectó significancia, pues los mayores resultados se expresan en la variedad INTA Biofortificado inoculados con la cepa INTA con 18.90 g planta⁻¹ de BSA, en cambio el tratamiento con la producción más baja fue la cepa Zamorano en interacción con el cultivar INTA Ferroso con 11.43 g planta⁻¹. En relación con la variable NT en la biomasa aérea, no se detectaron diferencias significativas (P-valor > 0.05). Mientras que el tratamiento con el mayor rendimiento de BSA también presentó el contenido más alto de NT en su biomasa (0.59 g planta⁻¹). El tratamiento con los datos más bajos para estas mismas variables fue el genotipo INTA Ferroso con la cepa Zamorano.

Cabe destacar que el promedio de los porcentajes de NT en la biomasa aérea registrado en las interacciones para el segundo muestreo (2.8 %) fueron menores en comparación al muestreo realizado a los 42 dde (3.7 %) lo que se atribuye al efecto de dilución. En el Cuadro 3, se muestra el peso BSA (g) y porcentaje de NT (%) en la planta y RNTBA (g planta⁻¹) a los 42 dde y 57 dde.

Cuadro 3. Resultado de biomasa seca aérea (g planta⁻¹), porcentaje de nitrógeno total (%) y rendimiento de nitrógeno total en la biomasa aérea (g planta⁻¹) a los 42 dde y 57 dde.

Factores/tratamientos		BSA	NT	RNTBA	BSA	NT	RNTBA
		(g planta ⁻¹)	(%)	(g de N planta ⁻¹)	(g planta ⁻¹)	(%)	(g de N planta ⁻¹)
		42 dde			57 dde		
Variedades	INTA Ferroso	3.65 ab	3.66	0.13 ab	14.10 b	2.75 ab	0.40 b
	INTA Nutritivo	4.17 a	3.67	0.14 a	13.88 b	2.61 b	0.35 b
	INTA Biofortificado	2.78 b	3.63	0.10 b	17.95 a	3.11 a	0.56 a
p-valor		0.0195	0.9737	0.0152	0.0087	0.016	<0.0001
Inóculo	INTA	4.06 a	3.49	0.13	16.95 a	2.94	0.50 a
	Zamorano	3.01 b	3.82	0.12	13.67 b	2.7	0.37 b
p-valor		0.0101	0.0507	0.1056	0.0061	0.0814	<0.0001
Inoculo+Variedad	INTA + INTA Ferroso	3.90	3.42	0.13	16.78	3.02	0.50 ab
	INTA + INTA Nutritivo	4.73	3.4	0.14	15.18	2.67	0.40 b
	INTA + INTA Biofortificado	3.53	3.64	0.12	18.9	3.14	0.59 a
	Zamorano + INTA Ferroso	3.40	3.89	0.14	11.43	2.48	0.21 c
	Zamorano + INTA Nutritivo	3.60	3.94	0.14	12.58	2.55	0.31 c
	Zamorano + INTA Biofortificado	2.03	3.61	0.07	17	3.08	0.52 ab
p-valor		0.5395	0.2868	0.0796	0.3906	0.2884	0.038
CV (%)		25.19	10.55	21.22	2.22	11.33	13.08

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). // NT: Nitrógeno total en la biomasa aérea. BSA: Biomasa seca aérea. RNTBA: Rendimiento de Nitrógeno total en la biomasa aérea. CV: Coeficiente de variación.

Los resultados sobre la BSA en el primer momento (42 dde), son similares a los encontrados por Tsai *et al.* (1993a), quienes evaluaron niveles de fertilización con P, K y S sobre la fijación biológica de nitrógeno en frijol común, registrando 4.1 g planta⁻¹ de BSA bajo un nivel medio de fertilización, este dato no está alejado del que presentaron los tratamientos evaluados en este estudio quienes promedian un rendimiento de 3.53 g planta⁻¹ para esta misma variable.

Así mismo, los rendimientos de BSA observados a los 57 dde, son mayores a los expuestos por Sabine Müller *et al.* (1993a), en su evaluación acerca del efecto de nitrógeno mineral sobre la fijación de nitrógeno atmosférico de dos cultivares de frijol; este autor reporta rendimientos de 13.28 y 13.55 g planta⁻¹ de BSA en las dos variedades evaluadas en este mismo periodo, por otra parte, la amplitud del rendimiento de biomasa seca reportado en este experimento oscila entre 11.43 y 18.90 g planta⁻¹ indicando una producción de biomasa ligeramente superior por parte de los cultivares evaluados en este estudio.

Los valores de NT son relativamente similares a los registrados por López-Alcocer *et al.* (2020), quienes al evaluar la eficiencia de FBN de 27 cepas de *Rhizobium* spp., en frijol obtuvieron promedios de 3.49 % hasta 4.38 % en la etapa de prefloración, del mismo modo, los datos concuerdan con Gaitán y Mairena (2017), que al cuantificar la fijación biológica de nitrógeno de cuatro leguminosas incluida frijol común, encontró un promedio de 3.38 % de NT en la biomasa aérea de la planta a los 30 días después de siembra.

Es preciso señalar que la disminución en el rango de NT en la biomasa aérea en el segundo muestreo (2.5 – 3.1 %) con respecto al primero (3.4 – 3.9 %), sea debido a que, al avanzar las etapas fenológicas del cultivo, haya ocurrido una reducción de la concentración de nitrógeno en la planta debido a un efecto de dilución, ya que a medida que ésta se va desarrollando vegetativamente, la concentración del nutriente disminuye debido al aumento de volumen de biomasa (Gaitán y Mairena, 2017).

El RNTBA de la planta presente en los cultivares estudiados es similar a los encontrados por Sabine Müller *et al.* (1993) quienes al evaluar el efecto del nitrógeno mineral sobre la nodulación y fijación de nitrógeno en frijol común registró promedios de 0.22 g planta⁻¹ de nitrógeno en el follaje en la etapa R7 del cultivo. Así mismo, Peña-Cabriales *et al.* (1993) expusieron datos de aproximadamente 0.12 g de N planta⁻¹ a los 42 dds y de 0.301 g de N planta⁻¹ respectivamente a los 63 dds en su investigación acerca de las tasas de fijación de N₂ a través del ciclo de desarrollo del frijol común en la variedad M4403.

Los rendimientos de BSA fueron mayores en los tratamientos donde hubo más absorción de NT, y por ende los que contenían los mayores promedios de nitrógeno en su biomasa; indicando que dicha absorción favoreció a un notable desarrollo foliar de las plantas. No obstante, es a través de los análisis posteriores que se determinará si este efecto fue consecuencia de la simbiosis entre los cultivares y las cepas de *Rizhobium* spp.

5.2. Porcentaje de nitrógeno derivado del fertilizante (% Nddf), del aire (% Ndda) y del suelo (% Ndds) en la biomasa aérea

El Cuadro 4 indica que a los 42 dde, el cultivar INTA Nutritivo presentó el valor más alto de Nddf con 36.67 % , mientras que INTA Ferroso e INTA Biofortificado fueron estadísticamente similares, con un aporte inferior de 30 % proveniente de esta misma fuente. Sin embargo, estas mismas variedades registran los mejores valores en cuanto al porcentaje de Ndda con 25.3 % y 26.09 % respectivamente, siendo estadísticamente superiores al cultivar INTA Nutritivo quien obtuvo el porcentaje más bajo con 9.87 %. Respecto al porcentaje de Ndds la variedad INTA Nutritivo e INTA Biofortificado expresaron los mayores valores (53.77 % y 50.92 %) respectivamente.

Al analizar el factor inoculo, la cepa proveniente del INTA presentó los valores más altos de Nddf y Ndds (36.16 % y 53.46% respectivamente), por el contrario, en la variable Ndda el inoculo Zamorano sobresalió con un porcentaje de 30.46 % en relación con la cepa INTA (10.38 %).

En la combinación de los factores, se observa que el tratamiento con la mayor cantidad de nitrógeno derivado del fertilizante y del suelo fue INTA + INTA Nutritivo, con 39.60 % y 58.54 % respectivamente, en cambio, el que obtuvo el menor aporte de estas dos fuentes fue Zamorano + INTA Ferroso (24.75 % Nddf y 36.59 % Ndds). Los mayores porcentajes de Ndda se registraron al inocular los cultivares INTA Ferroso e INTA Biofortificado con la cepa Zamorano, obteniendo valores de 38.66 % y 34.84 % consistentemente. El aporte más bajo se registró en el tratamiento INTA + INTA Nutritivo con 1.86 % de nitrógeno atmosférico.

A los 57 días después de la emergencia (dde), el ANDEVA muestra que los resultados para las variables Nddf, Ndda y Ndds no expresan diferencias estadísticas, tanto en los factores independientes como en sus combinaciones. Sin embargo, numéricamente la variedad INTA Ferroso tuvo valores de 30.50 % de Nddf y 56.81 % de Ndds, superiores a los demás cultivares. Un comportamiento opuesto presentó el genotipo INTA Nutritivo que absorbió el 26.99 % de nitrógeno derivado del fertilizante y 50.27 % de la fuente del suelo, estos datos son inferiores a los que presentó dicho cultivar en el primer muestreo, donde este se ubicaba en la primera categoría.

Para el factor inoculo, numéricamente la cepa del Zamorano destacó en el RNdda (19.15 %), y la cepa INTA en el RNdds (53.19 %). En la combinación de los factores, el tratamiento Zamorano + INTA Ferroso obtuvo el valor más alto de porcentaje de Nddf (31.20 %) y Ndds (58.11 %), dichos datos son superiores a los reflejados en el primer momento. En consecuencia, este tratamiento expuso el valor más inferior de Ndda (10.69 %). El tratamiento Zamorano + INTA Biofortificado reportó un valor de 27.38 % de Ndda, superior a los demás, mientras que para Nddf y Ndds fue el que absorbió las menores cantidades.

Cuadro 4. Porcentaje de nitrógeno en la biomasa aérea derivado del fertilizante (%Nddf), aire (%Ndda) y suelo (Ndds) a los 42 dde y 57 dde

Factores/tratamientos		Nddf	Ndda	Ndds	Nddf	Ndda	Ndds
		%			%		
		42 dde			57 dde		
Variedades	INTA Ferroso	29.82 b	26.09 a	44.09 b	30.5	12.68	56.81
	INTA Nutritivo	36.37 a	9.87 b	53.77 a	26.99	20.69	50.27
	INTA Biofortificado	30.14 b	25.30 a	50.92 a	27.7	12.68	51.61
p-valor		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.2322	0.2047	0.2324
Inóculo	INTA	36.16 a	10.38 b	53.46 a	28.56	18.25	53.19
	Zamorano	28.06 b	30.46 a	45.72 b	28.24	19.15	52.61
p-valor		<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.8558	0.9112	0.8555
Inoculo+Variedad	INTA + INTA Ferroso	34.89	13.52	51.59 b	29.81	14.66	55.53
	INTA + INTA Nutritivo	39.60	1.86	58.54 a	25.82	26.08	48.1
	INTA + INTA Biofortificado	33.98	15.77	50.25 b	30.04	14.01	55.95
	Zamorano + INTA Ferroso	24.75	38.66	36.59 c	31.2	10.69	58.11
	Zamorano + INTA Nutritivo	33.14	17.87	48.99 b	28.16	19.39	52.45
	Zamorano + INTA Biofortificado	26.29	34.84	51.59 b	25.37	27.38	47.26
p-valor		0.1429	0.1427	<0.0001	0.2183	0.2399	0.2186
CV (%)		5.6	21.84	5.04	14.69	61.74	14.7

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). // Nddf: Nitrógeno derivado del fertilizante. Ndda: Nitrógeno derivado del aire. Ndds: Nitrógeno derivado del suelo. CV: Coeficiente de variación.

Los porcentajes de nitrógeno atmosférico en los cultivares, son menores en comparación a los derivados del fertilizante y del suelo; estos varían en un rango de 1.86 % a 38.66 % en el primer momento (42 dde), mientras que el segundo (57 dde) va de 10.69 % a 27.38 %. Dichas tasas de fijación no son comparables a las reportadas por Tsai *et al.*, (1993a), quienes bajo diferentes niveles de fertilidad de suelo, obtuvieron un promedio de 51.9 % de nitrógeno atmosférico. Otros autores como Rosas y Varela (1995) en su evaluación sobre habilidad combinatoria del crecimiento, fijación de nitrógeno y rendimiento de grano en frijol común llevado a cabo en Honduras; reportan valores de 28.3 % a 36 % de Ndda tomados a los 60 dds.

Investigaciones más recientes han expuesto mejores resultados en cuanto a la capacidad del frijol común para fijar el nitrógeno de la atmósfera, tales como la de Farid (2015), quien evaluó doce genotipos modernos de frijol común, reportando que la capacidad de fijación de nitrógeno oscilaba entre 2.7 y 69.7 kg N ha⁻¹, que representó un aporte que varió en un rango de 5.2 a 78.5 % de nitrógeno aportado por el aire. Así mismo, Heilig (2015) examinó 79 cultivares comerciales de frijol y líneas de mejoramiento avanzadas bajo producción orgánica y encontró un rango similar para la capacidad de fijación de nitrógeno (16 a 94 kg N ha⁻¹) y para porcentaje de Ndda (9.8 a 71.7%).

Es notable que los resultados de este ensayo indican que los mayores porcentajes de nitrógeno en la planta fueron aportados por el suelo, y variaron en un rango de 36.59 a 58.54 % en el primer momento (42 dde) y en el segundo muestreo de 47.26 a 58.11 %. Estos datos son similares a los expuestos por García *et al.* (2003) quienes, al evaluar el efecto del encalado sobre la respuesta vegetal y fijación de nitrógeno en frijol común, reportaron porcentajes de Ndds en un rango de 49.7 y 61.3 % a los 42 dds. Esta misma investigación registró promedios de 18.4 a 23.3 % de Nddf que son bajos en referencia a los de esta investigación, donde los tratamientos evaluados necesitaron utilizar en un primer momento (42 dde) 25.37 a 39.60 % de Nddf y en un segundo momento (57 dde) de 47.26 a 58.11 %.

Según Arias *et al.* (2007), las condiciones edáficas, el tipo de variedad, y el proceso y condiciones de la inoculación pueden limitar la fijación por parte del frijol común y obligar a la planta a depender del nitrógeno del suelo o de los fertilizantes nitrogenados aplicados al cultivo. Por lo tanto, se considera que los bajos porcentajes de N₂ en los tratamientos evaluados fueron influenciados por las concentraciones de nitrógeno en el sustrato utilizado; que presentó un contenido de 2.9 % de materia orgánica y 0.14 % de nitrógeno, clasificados por Quintana *et al.* (1983) como niveles medios de fertilidad para los suelos de Nicaragua, sin embargo, estos valores se consideran altos para la mayoría de los suelos agrícolas del mundo donde se cultiva frijol común.

Aunado a esto, es probable que las condiciones en las que se desarrolló el experimento favorecieran a una mayor actividad biológica por parte de los microorganismos, los cuales se encargan de descomponer la materia orgánica, y de esta manera garantizar el suministro de nitrógeno para la planta en sus formas disponibles de absorción, provocando una disminución en su capacidad de fijación. Así lo explica Fernández-Canigia (2020), al expresar que niveles medios o altos de nitrógeno en el suelo especialmente en forma de nitratos, tienen un efecto inhibitorio sobre la simbiosis, desde la infección, formación del nódulo y la fijación de Nitrógeno.

Por otra parte, la fijación biológica de nitrógeno es un proceso reductor que consume gran cantidad de energía (se estima entre 12 a 24 ATP por mol de N₂ fijado) por lo que constituye una vía metabólica alternativa para los microorganismos, por tal motivo, el suministro de amonio por parte de los microorganismos probablemente fue el principal inhibidor de la fijación ya que provee los grupos amino para la formación de los aminoácidos sin el gasto energético de la fijación (Calvo García, 2011).

Es importante señalar que las variedades utilizadas en el experimento son consideradas como de ciclo corto (precoces), por lo tanto, su eficiencia de fijación de nitrógeno es baja, ya que según Graham y Halliday (1977) los genotipos tardíos fijan más nitrógeno que los precoces. A esto se le suma que las variedades liberadas actualmente tienen el fin de ser más eficientes en

producir mayores rendimientos de grano (1 000 a 1 500 kg ha⁻¹) bajo determinados niveles de aplicación de insumos y no en ser eficientes fijadores de nitrógeno en simbiosis.

5.3. Rendimiento del nitrógeno derivado del fertilizante (RNddf), del aire (RNdda) y del suelo (RNdds) en la biomasa aérea (mg N planta⁻¹)

Zapata (1990) explica que el método isotópico del ¹⁵N permite medir la absorción de nitrógeno por la planta, proveniente de los fertilizantes, del suelo y de la atmósfera en el caso de las leguminosas. Por tanto, las variables de RNdda, RNdds y RNddf expresan las cantidades en mg N planta⁻¹ de dicho nutriente.

A los 42 dde, los resultados del ANDEVA indican que la variedad INTA ferroso fue la que resultó con un valor más alto de RNdda en la biomasa aérea con un 34.48 mg N planta⁻¹. Con respecto a las variables de RNddf y RNdds la variedad que presentó mayor rendimiento fue la INTA Nutritivo con 51.80 y 76.58 mg N planta⁻¹ respectivamente. No obstante, este cultivar fue el que tuvo menos RNdda con un 13.50 mg N planta⁻¹, en relación con las otras variedades. Por otra parte, el genotipo INTA Biofortificado produjo menor rendimiento de nitrógeno proveniente del fertilizante y del suelo con un volumen de 31.24 y 46.19 mg N planta⁻¹, que resultaron estadísticamente inferiores en comparación de las otras variedades en estudio.

El mayor rendimiento de nitrógeno derivado del fertilizante y del suelo, se registró en la cepa del INTA con un 48.76 y 72.10 mg N planta⁻¹ correspondientemente, cabe destacar que para la variable de RNdda ocurre lo contrario, donde el inoculo del Zamorano obtiene un rendimiento de 33.75 mg N planta⁻¹, siendo superior con relación a la cepa del INTA.

Cuadro 5. Rendimiento de nitrógeno en la biomasa aérea derivado del fertilizante (RNddf), aire (RNdda) y suelo (RNdds) a los 42 dde y 57 dde (mg N planta⁻¹)

Factores/tratamientos		RNddf	RNdda	RNdds	RNddf	RNdda	RNdds
		(mg N planta ⁻¹)			(mg N planta ⁻¹)		
		42 dde			57 dde		
Variedades	INTA Ferroso	39.50 ab	34.48 a	58.40 ab	119.1	52.65	221.85 b
	INTA Nutritivo	51.80 a	13.50 c	76.58 a	94.04	84.2	175.16 b
	INTA Biofortificado	31.24 b	22.96 b	46.19 b	130.71	109.49	314.65 a
p-valor		0.0036	<0.0001	0.0036	0.1367	0.1406	0.0009
Inóculo	INTA	48.76 a	13.54 b	72.10 a	143.96 a	83.81	268.15 a
	Zamorano	32.93 b	33.75 a	48.69 b	85.28 b	80.41	206.29 b
p-valor		0.0016	<0.0001	0.0016	0.0008	0.8117	0.0248
Inoculo+Variedad	INTA + INTA Ferroso	46.26	18.01 bc	68.39	150.02	72.35	279.45
	INTA + INTA Nutritivo	56.64	2.57 c	83.74	103.72	97.91	193.2
	INTA + INTA Biofortificado	43.40	20.05 b	64.16	178.13	88.03	331.8
	Zamorano + INTA Ferroso	32.74	50.95 a	48.41	88.18	32.95	164.26
	Zamorano + INTA Nutritivo	46.96	24.44 b	69.43	84.35	70.49	157.12
	Zamorano + INTA Biofortificado	19.09	25.87 b	28.23	83.3	137.80	297.5
p-valor		0.3708	0.0015	0.3709	0.1324	0.2691	0.3494
CV (%)		25.64	26.45	25.64	31.0	69.16	26.07

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). // RNddf: Rendimiento de Nitrógeno derivado del fertilizante. RNdds: Rendimiento de Nitrógeno derivado del suelo. RNdda: Rendimiento de Nitrógeno derivado del aire. CV: Coeficiente de variación.

Al analizar las combinaciones de los dos factores a los 42 dde, el ANDEVA no detectó diferencias estadísticas, sin embargo, para el RNddf, las variedades INTA Ferroso (46.26 mg N planta⁻¹) e INTA nutritivo (56.64 mg N planta⁻¹) inoculadas con la cepa del INTA y el tratamiento Zamorano + INTA Nutritivo (46.96 mg N planta⁻¹) presentaron los mejores rendimientos. Lo mismo ocurrió para el RNdds, donde dichos tratamientos promedian un rendimiento de 74 mg N planta⁻¹. Los valores más bajos de RNddf y RNdds en la biomasa aérea se observaron en las variedades INTA Biofortificado inoculada con la cepa del Zamorano con rendimientos de 19.09 mg N planta⁻¹ y 28.23 mg N planta⁻¹.

Para la variable RNdda si se detectaron diferencias estadísticas; la variedad INTA Ferroso inoculada con la cepa del Zamorano fue estadísticamente superior a los demás tratamientos, pues obtuvo un rendimiento de 50.95 mg N planta⁻¹. No obstante, el tratamiento INTA + INTA Nutritivo resultó con el rendimiento más bajo 2.57 mg N planta⁻¹ para dicha variable.

El Cuadro 5 indica que a los 57 dde, las variedades no fueron estadísticamente diferentes en cuanto a su efecto sobre las variables RNddf, RNdda, no obstante, la variedad que presentó los mejores rendimientos para estas dos variables fue INTA Biofortificado con 130.71 y 109.49 mg N planta⁻¹ respectivamente. Por otra parte, este genotipo produjo un rendimiento de 314.65 mg N planta⁻¹ de RNdds, donde sí se detectó significancia (p-valor < 0.05) superando a INTA Ferroso (175.16 mg N planta⁻¹) e INTA Nutritivo (221.85 mg N planta⁻¹).

El mayor rendimiento de nitrógeno proveniente de las fuentes del fertilizante y del suelo lo registró la cepa del INTA (143.96 y 268.15 mg N planta⁻¹ en orden de variables) quien fue superior estadísticamente al inóculo Zamorano, mientras que en la variable RNdda, ambos inóculos no difieren entre sí.

Al analizar las interacciones, no se registraron diferencias significativas para ninguna de las tres variables, pero es destacable que los resultados indican que el tratamiento INTA + INTA Biofortificado presentó los mejores rendimientos de nitrógeno proveniente de las fuentes del fertilizante y del suelo con un 178.13 mg N planta⁻¹ y 331.80 mg N planta⁻¹. Por otra parte, los valores más bajos para RNddf en la biomasa aérea se observaron en las variedades INTA

Ferroso, INTA Nutritivo y INTA Biofortificado inoculadas con la cepa Zamorano, con rendimientos de 88.18, 84.35 y 83.30 mg N planta⁻¹ respectivamente. Para la fuente de nitrógeno proveniente del suelo, los tratamientos que presentaron los menores rendimientos fueron INTA + INTA nutritivo (193.20 mg N planta⁻¹), Zamorano + INTA Ferroso (164.26 mg N planta⁻¹), y Zamorano + INTA Nutritivo (157.12 mg N planta⁻¹).

Para la variable de RNdda, numéricamente el tratamiento que presentó mayor rendimiento fue la combinación de Zamorano + INTA Biofortificado (137.80 mg N planta⁻¹), y el rendimiento más bajo lo presentó la variedad INTA Ferroso inoculada con la cepa el Zamorano, con 32.95 mg N planta⁻¹ respectivamente. Los datos expuestos en este estudio sobre los RNdda, RNdds y RNddf siguen la misma tendencia que los porcentajes de nitrógeno provenientes del aire, suelo y fertilizante. La planta tomó del aire a través de la simbiosis de 2.57 a 50.95 mg N planta⁻¹ de nitrógeno a los 42 dde, y a los 57 dde absorbió de 32.95 a 137.8 mg N planta⁻¹, no obstante, los valores RNdds y RNddf son notablemente más altos.

Los valores de RNdda son inferiores a los encontrados por Sabine Müller *et al.* (1993), quienes estimaron un rendimiento de 212 mg N planta⁻¹ en la etapa R7 de la variedad PUEBLA 152, con una aplicación nula de fertilizante; y al aplicar 25 mg de N kg⁻¹ de suelo al momento de la siembra obtuvieron un promedio de 189 mg de N planta⁻¹ en la misma etapa vegetativa. Estos autores infirieron que existe una influencia del nitrógeno mineral en la actividad de la nitrogenasa y por ende en la efectividad de la fijación en los genotipos evaluados.

Podríamos afirmar que los resultados encontrados en este estudio indican una baja efectividad simbiótica por los tratamientos evaluados, que se reflejan en los bajos valores del nitrógeno aportado por el aire, ya que, en promedio, en los dos momentos esta fuente aportó alrededor de 19.56 % del nitrógeno total en la planta, que en términos de rendimiento fue de 52.88 mg N planta⁻¹. Estos resultados se atribuyen principalmente a las condiciones en que se estableció y desarrolló el experimento, donde las condiciones de temperatura, humedad relativa, radiación solar, así como las condiciones edáficas fueron controladas, generando un ambiente que favoreció la absorción de las otras dos fuentes de nitrógeno potenciales para el cultivo.

Barrios *et al.* (2012) agregan que, las pérdidas más comunes de nitrógeno se dan por volatilización, lixiviación y erosión hídrica en los sistemas de producción, dichas condiciones no se presentaron en el experimento debido a que el suelo utilizado fue puesto en macetas y no estuvieron expuestas a factores adversos como las precipitaciones y temperaturas variables que favorecen estos procesos de pérdida. Al controlar estas condiciones, se aumenta la eficiencia del fertilizante, además, es probable que las condiciones ambientales controladas en el experimento, favorecieron una tasa de mineralización constante de la materia orgánica, de manera que, al descomponerse las formas orgánicas de este macronutriente presentes en contenidos relativamente altos en el sustrato por acción de los microorganismos, se formara nitrógeno mineral fácilmente asimilable para la planta reduciendo la efectividad del proceso de simbiosis (Figueroa-Barrera *et al.*, 2012).

Con estos resultados, se observa claramente que hubo una mayor dependencia del nitrógeno proveniente del suelo y del fertilizante en los tratamientos evaluados, lo que inhibió el proceso de fijación, puesto que, el costo energético que representa este proceso para la planta, induce a que bajo determinadas condiciones ambientales como las descritas y discutidas previamente, induzcan a la planta hacia una mayor absorción del nitrógeno fácilmente asimilable, como el proporcionado por el suelo por acción de los microorganismos, y por la aplicación directa del fertilizante, ya que esto evitaría recurrir a un gasto extra de energía para obtener el mismo nutriente.

Además, otro factor que probablemente condicionó estos resultados, fueron las características litológicas del suelo utilizado en este experimento, ya que éste pertenece a la serie La Calera, los cuales se caracterizan por ser de origen volcánico y cementados por el alto contenido de carbonatos de calcio en todo el perfil (García y López, 2006). En este sentido, Munns (2005) afirma que entre las sales que principalmente afectan las plantas, se encuentran las relacionadas con sulfatos y cloruros de cationes citotóxicos provenientes de metales alcalinos y alcalinotérreos como calcio, sodio y magnesio, los cuales son abundantes en estos suelos.

Por tal razón, se asume que esta característica del suelo afectó la fijación de nitrógeno en las variedades utilizadas. Por otra parte, en términos concretos del proceso de fijación, Fernández-Pascual *et al.* (2002), agrega que entre los factores que afectan la simbiosis leguminosa-Rizhobium se encuentran medioambientes que presentan altos grados de salinidad en sus suelos, ya que afectan el funcionamiento de la enzima nitrogenasa. Además, Zuñiga-Davila (1997), también explica que la presencia de estas sales puede influir en el crecimiento y supervivencia de rizobios en el suelo restringiendo la colonización radical.

Por último, es importante destacar que el inóculo proveniente del Zamorano estableció una mejor simbiosis con las variedades INTA Biofortificado e INTA Ferroso en comparación con el inóculo INTA, puesto que estos tratamientos presentaron los mejores porcentajes y rendimientos de nitrógeno en la biomasa aérea proveniente del aire. No obstante, sería muy valioso establecer éstas y las demás combinaciones en condiciones de campo para analizar y cuantificar su efecto en cuanto a la absorción de nitrógeno atmosférico a través de simbiosis, puesto que bajo las condiciones en las que fue desarrollado este experimento, probablemente esta característica no expresó todo su potencial.

Cuadro 6. Resumen del nitrógeno contenido en la biomasa aérea y el proveniente de cada fracción, derivado del fertilizante (Nddf), del aire (Ndda) y del suelo (Ndds) en g N planta⁻¹ a los 42 y 57 dde

Factores/tratamientos		RNTBA Nddf Ndda Ndds				RNTBA Nddf Ndda Ndds			
		mg N planta ⁻¹				mg N planta ⁻¹			
		42 dde				57 dde			
Variedades	INTA Ferroso	130	40	30	60	400	120	50	230
	INTA Nutritivo	140	50	10	80	350	90	70	180
	INTA Biofortificado	110	30	30	50	560	160	70	290
Media		126.67	40	23.3	63.3	436.67	123.33	63.33	233
%		100	31.58	18.42	50.00	100	28.24	14.50	53.43
Inóculo	INTA	130	50	10	70	500	140	90	270
	Zamorano	120	30	40	50	370	110	70	190
	Media	125	40	25	60	435	125	80	230
%		100	32.00	20.00	48.00	100	28.74	18.39	52.87
Inoculo+Variedad	INTA + INTA Ferroso	130	50	20	70	500	150	70	280
	INTA + INTA Nutritivo	140	60	0	80	400	110	110	190
	INTA + INTA Biofortificado	120	40	20	60	590	180	80	330
	Zamorano + INTA Ferroso	140	30	50	50	210	70	20	120
	Zamorano + INTA Nutritivo	140	50	30	70	310	90	60	160
	Zamorano + INTA Biofortificado	70	20	20	40	520	130	140	250
Media		123.33	41.67	23.3	61.7	421.67	121.67	80	222
%		100	33.79	18.92	50.00	100	28.85	18.97	52.57

RNTBA: Rendimiento de Nitrógeno total en la biomasa aérea. Nddf: Nitrógeno derivado del fertilizante. Ndda: Nitrógeno derivado del aire. Ndds: Nitrógeno derivado del suelo.

La técnica de dilución isotópica de ^{15}N permitió cuantificar en los tratamientos evaluados la cantidad de nitrógeno en la biomasa aérea de la planta (mg N planta^{-1}), a la vez se determinó el aporte de este macronutriente de las tres fuentes disponibles para este tipo de especies vegetales: fertilizante, atmosfera y suelo. Los datos contenidos en el cuadro 6, permiten identificar que el aporte del nitrógeno por fijación biológica en las tres variedades evaluadas (INTA Ferroso, INTA Nutritivo, INTA Biofortificado) fue menor en relación con el aporte de las otras dos fuentes, pues de los $123.33 \text{ mg N planta}^{-1}$ y $421.67 \text{ mg N planta}^{-1}$ medido a los 42 y 57 dde respectivamente, el aporte del nitrógeno atmosférico representó el 18 % correspondientemente para ambos momentos.

Los resultados reflejan claramente que los mayores aportes de nitrógeno se debieron al contenido en el suelo, con 50 % ($61.7 \text{ g N planta}^{-1}$) a los 42 dde y 52.5 % ($222 \text{ mg N planta}^{-1}$) a los 57 dde. En segundo lugar, se encuentra el nitrógeno aportado por el fertilizante aplicado, que aportó en promedio 33.79 % ($41.67 \text{ mg N planta}^{-1}$) y 28.85 % ($121.67 \text{ mg N planta}^{-1}$) a los 42 y 57 dde respectivamente.

Estos resultados se atribuyen a las condiciones en las que se desarrolló el experimento, donde el sustrato utilizado favoreció la absorción del nitrógeno proveniente del suelo y del fertilizante, al presentar características inhibitorias de este proceso, ya sea por la presencia y/o acumulación de sales en las unidades experimentales, también al mantener un suministro constante del nitrógeno por las tasas de mineralización contraladas por las condiciones ambientales del área experimental, o bien, al estar establecidas las plantas en macetas se evitaron pérdidas de nitrógeno por lixiviación, volatilización y erosión hídrica aumentando la eficiencia de recuperación del fertilizante. Esta disponibilidad del macronutriente proveniente de estas dos fuentes determinado por los factores mencionados, suministró los grupos aminos para la formación de aminoácidos requeridos por las plantas, sin incurrir al gasto energético que representa el proceso de fijación para las mismas.

VI. CONCLUSIONES

Los cultivares de frijol en simbiosis con los inóculos utilizados presentaron una disminución del 2 % de Ndda al avanzar sus etapas fenológicas, promediando 20.42 % de fijación a los 42 dde y 18.70 % a los 57 dde.

El aporte de nitrógeno por fijación biológica de las tres variedades evaluadas en simbiosis con las dos cepas de *Rizhobium* spp, fue inferior al aporte del suelo (51.24 %) y del fertilizante (30.25 %), puesto que esta fuente representó alrededor del 19.56 % del nitrógeno total acumulado en los dos momentos evaluados.

Se identificó que los mayores valores de Ndda (%) y RNdda (mg N planta⁻¹) los expresaron las variedades INTA Ferroso e INTA Biofortificado, ambas inoculadas con la cepa proveniente del Zamorano, tanto a los 42 dde como a los 57 dde.

VII. RECOMENDACIONES

Realizar experimentos de campo con los tratamientos de este estudio, para evaluar su capacidad de fijación biológica de nitrógeno en condiciones reales de producción.

Valorar la fertilización nitrogenada y las condiciones de suelo al establecer los tratamientos evaluados, ya que estos factores podrían enmascarar el potencial de fijación de nitrógeno de la simbiosis entre las variedades y las cepas bacterianas.

VIII. LITERATURA CITADA

- Arias Restrepo, J. F., Rengifo Martinez, T., Jaramillo Carmona, M., & de Seguridad, G. D. A. C. G. (2007). Buenas practicas agricolas (BPA) en la producción de frijol voluble. <https://www.fao.org/3/a1359s/a1359s.pdf>
- Atkins, CA. (1986). La simbiosis leguminosa / rizobio: limitaciones para maximizar la fijación de nitrógeno. *Out Look on Agriculture*, 15(3), 129-134. <https://doi.org/10.1177%2F003072708601500305>
- Barrios, M., García, J., & Basso, C. (2012). Efecto de la fertilización nitrogenada sobre el contenido de nitrato y amonio en el suelo y la planta de maíz. *Bioagro*, 24(3), 213-220.
- Beebe, Steve., Ramírez Villegas, Julian., Ricaurte, Jaumer., Álvarez, Patricia., Mora, Andrea., Rosa, Juan Carlos y Van den Berg, Maurits. (2017). *Modelación del frijol en Latinoamérica*. http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC110112/modelacion_de_frijol_en_latinoame%CC%81rica_20180202_final_online.pdf.
- Calvo García, Sergio. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Universidad de Salamanca*, 3(1), 173-186.
- Cantaro-Segura, H., Huaranga-Joaquín, A., Zúñiga-Dávil, D., Cantaro-Segura, H., Huaranga-Joaquín, A., & Zúñiga-Dávil, D. (2019). Efectividad simbiótica de dos cepas de *Rhizobium* sp. En cuatro variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Perú. *Idesia (Arica)*, 37(4), 73-81. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292019000400073>
- Castillo Rodriguez, Francisco., Roldan Ruiz, M.D., Blasco Pla, Rafael., Huertas Romera, M.J., Caballero Dominguez, F.J. (2005). *Bioteología Molecular*. Madrid: EDITORIAL TEBAR, S, L.

- Danso, SKA (1995). Evaluación de la fijación biológica de nitrógeno. *Investigación sobre fertilizantes*, 42 (1), 33-41. <https://doi.org/10.1007/BF00750498>
- Delgadillo Chavarría, A.M y Gómez García, J.A. (2015). *Análisis de la producción, exportaciones y precios del frijol (Phaseolus vulgaris) de Nicaragua periodo 2011-2013* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.
- Farid, M. (2015). Fijación simbiótica de nitrógeno en frijol común. (Doctoral dissertation).
- Fernández-Canigia, M. (2020). *Factores determinantes de la nodulación*. Recuperado de https://images.engormix.com/externalFiles/6_factores_determinantes_de_la_nodulacion.pdf
- Fernández-Pascual, M., María, N. D., & Felipe, M. (2002). *Fijación biológica del nitrógeno: Factores limitantes*. <https://digital.csic.es/handle/10261/128283>
- Figueroa Barrera, A., Álvarez Herrera, J. G., Forero, A. F., Salamanca, C., & Pinzón, L. P. (2017). Determinación del nitrógeno potencialmente mineralizable y la tasa de mineralización de nitrógeno en materiales orgánicos. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/handle/123456789/402>
- Fried, M., & Middelboe, V. (1977). Medición de la cantidad de nitrógeno fijado por un cultivo de leguminosas. *Plant and soil*, 47(3), 713-715. <https://doi.org/10.1007/BF00011042>
- Fried, M., Middelboe, V., & Middleboe, V. (1977). Use of ^{15}N methodology to assess biological nitrogen fixation. <https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/Public/21/086/21086591.pdf>

- Fonseca-López, D., Vivas-Quila, N. J., y Balaguera-López, H. E. (2020). Técnicas aplicadas en la investigación agrícola para cuantificar la fijación de Nitrógeno: Una revisión sistemática. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(1), 1-19. https://doi.org/10.21930/rcta.vol21_num1_art:1342
- Gaitán, M., y Mairena, H. (2017). *Cuantificación de la fijación biológica de Nitrógeno por cuatro especies de leguminosas mediante el método de abundancia natural* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.
- García, A., Dueñas, G., Hernández, G., Herrero, G., Nuviola, A., Méndez, N., & Zapata, F. (2003). Efecto del encalado en la respuesta vegetal y fijación simbiótica del nitrógeno en frijol común. *Agronomía Mesoamericana*, 14(2), 207-214.
- Graham, P. (1990). Problemas de la nodulación y la fijación de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris* L. Una reevaluación. *Terra*, 8, (Número Especial). 71-82.
- Graham, P. H., & Rosas, J. C. (1977). Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *The Journal of Agricultural Science*, 88(2), 503-508. <https://doi.org/10.1017/S0021859600035024>
- Graham, P.H. y J. Halliday. (1977). Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. pp. 313-314. En: J. M. Vincent, A. S. Whitney y J. Bose (eds.). *Tropical Agriculture*.
- Graham, PH y Halliday, J. (1977). Inoculación y fijación de nitrógeno en el género *Phaseolus*. *Explotación de la simbiosis leguminosa-rizobio en la agricultura tropical*, 145.
- Hardarson G. (1993) Métodos para mejorar la fijación simbiótica de nitrógeno. En: Bliss FA, Hardarson G. (ED) Mejora de la fijación biológica de nitrógeno del frijol común en América Latina (pp 1-17). OIEA y FAO

- Hardarson, G., & Danso, S. K. A. (1993). Methods for measuring biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and soil*, 152(1), 19-23. <https://doi.org/10.1007/BF00016330>
- Hardarson, G., Bliss, F. A., Cigales-Rivero, M. R., Henson, R. A., Kipe-Nolt, J. A., Longeri, L., ... & Tsai, S. M. (1993). Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. In *Enhancement of Biological Nitrogen Fixation of Common Bean in Latin America* (pp. 59-70). Springer, Dordrecht.
- Hardarson, G., Danso, S.K.A y Zapata F. (1987). Biological nitrogen fixation in field crops. In handbook of plant science in agricultura Ed. B R Christie pp 165-192.
- Heilig, JA. (2015). *Mapeo QTL de la fijación simbiótica de nitrógeno en frijol seco; Comportamiento del frijol seco bajo sistemas de producción orgánicos* (Tesis doctoral), Universidad Estatal de Michigan, East Lansing, MI.
- Hungria, M., & Neves, M. C. (1987). Cultivar and Rhizobium strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, 103(1), 111-121. <https://doi.org/10.1007/BF02370675>
- Hungria, M., & Neves, M. C. P. (1986). Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 21(2), 127-140. <https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/view/14680>
- García Estrada, F. J., & López García, H. A. (2006). *Manejo del agua potable y aguas grises en el Barrio El Rodeo, Managua*. Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua.
- Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. (2015). *Frijol INTA Ferroso*. <https://lac.harvestplus.org/variedad-de-frijol-inta-ferroso-candidata-para-ser-promovida-en-nicaragua/>

- Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. (2018a). *Frijol Biofortificado* (Brochure). Harvestplus. <https://inta.gob.ni/wp-content/uploads/2019/11/Brochure-Frijol-Biofortificado-HarvesPlus-2019.pdf>
- Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria. (2018b). *Frijol Nutritivo y Rendidor* (Brochure). Harvestplus. <https://inta.gob.ni/wp-content/uploads/2019/11/Brochure-Frijol-Nutritivo-y-Rendidor-2019.pdf>
- Jones, D. G. (1991). Symbiotic nitrogen fixation—exploitation and unachieved potential. *Annals of applied biology*, 118(2), 249-259. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1991.tb05626.x>
- Juárez Cortéz, V. C., & Sánchez Salgado, J. I. (1999). *Evaluación de Rhizobium tropici UMR 1899 en tres variedades de frijol común (Phaseolus vulgaris L.) y la extracción de macronutrientes primarios por el cultivo* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional Agraria, UNA).
- Lawlor, DW (2002). Asimilación de carbono y nitrógeno en relación con el rendimiento: los mecanismos son la clave para comprender los sistemas de producción. *Revista de botánica experimental*, 53 (370), 773-787. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.773>
- Lopez Alcocer., L. (1989). Selecting bean lines (Phaseolus vulgaris L.) and determination of nitrogen symbiotic fixing and yield seed variables. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=MX19900116022>
- López-Alcocer, J. de J., Lépiz-Ildefonso, R., González-Eguiarte, D. R., Rodríguez-Macías, R., & López-Alcocer, E. (2020). Eficiencia en fijación biológica de nitrógeno de cepas de Rhizobium spp. Recolectadas en frijol cultivado y silvestre. *Revista Terra Latinoamericana*, 38(4), 841-852. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i4.654>

- Müller, S., Pereira, P. A. A., & Martin, P. (1993). Effect of different levels of mineral nitrogen on nodulation and N₂ fixation of two cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil*, 152(1), 139-143. <https://doi.org/10.1007/BF00016343>
- Munns, R. (2005). Genes y tolerancia a la sal: juntándolos. *Nuevo fitólogo*, 167 (3), 645-663.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (1985). *Legume Inoculants and Their Use*. Autor.
- Peña-Cabriales, J.J., Grageda-Cabrera, O.A., Kola, V y Handarson, G. (1993). Tasas de fijación de N₂ a través del ciclo de desarrollo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). En: F. Bliss y G. Hardarson (Eds). Aumento de la fijación biológica de Nitrógeno en el frijol común en América Latina (pp. 129– 135). OIEA y FAO
- Phillips, D. J. (1980). Quantitative aquatic biological indicators: their use to monitor trace metal and organochlorine pollution. <https://www.osti.gov/etdeweb/biblio/6267904>
- Quintana, J. O., Blandón, J., Flores, A., & Mayorga, E. (1983). Manual de Fertilidad para los suelos de Nicaragua. Managua Nicaragua.
- Raun, WR y Johnson, GV (1999). Mejora de la eficiencia del uso de nitrógeno para la producción de cereales. *Revista de agronomía*, 91 (3), 357-363. <https://doi.org/10.2134/agronj1999.00021962009100030001x>
- Rennie, R. J., & Kemp, G. A. (1983). N₂-Fixation in Field Beans Quantified by ¹⁵N Isotope Dilution. II. Effect of Cultivars of Beans 1. *Agronomy Journal*, 75(4), 645-649. <https://doi.org/10.2134/agronj1983.00021962007500040016x>
- Rosas, J. C., & Varela, O. I. (1995). Habilidad combinatoria del crecimiento, fijación de nitrógeno y rendimiento de grano en frijol común. *Ceiba*, 36(2), 237-245.

- Salmerón, F y García, L. (1994). *Fertilidad y fertilización del suelo*. Managua, Nicaragua: Universidad Nacional Agraria. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/2804>
- Sprent, J. I., & Sprent, P. (1990). *Organismos fijadores de nitrógeno: aspectos puros y aplicados*. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19911956126>
- Tsai, S., Bonetti, S., Agbala, R., y Rosetto, R. (1993a). Reducción del efecto del Nitrógeno mineral sobre la fijación biológica de Nitrógeno en frijol común incrementando los niveles de nutrimentos. En: F. Bliss y G. Hardarson (Eds). Aumento de la fijación biológica de Nitrógeno en el frijol común en América Latina (pp. 145 – 153). OIEA y FAO
- Vásquez, J. (1996). *Fijación biológica de Nitrógeno en frijol de temporal y la diversidad genética de las poblaciones nativas de Rhizobium* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Nuevo León. México. <http://eprints.uanl.mx/451/1/1080073260.PDF>
- Zapata, F. (1990). Isotope techniques in soil fertility and plant nutrition studies. https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:21086590
- Zúñiga-Dávila, D. E. (1997). *Contribución relativa de los simbioses en la fijación de nitrógeno por phaseous vulgaris en condiciones de estrés salino*. Universidad de Granada.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Cultivares de frijol rojo-fortificado/INTA (*Phaseolus vulgaris* L.) para el estudio de la capacidad de fijación biológica de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium* spp. -cultivares de frijol rojo (*Phaseolus vulgaris* L.) por medio de técnica de dilución isotópica de ^{15}N en condiciones de invernadero.

Genotipo Frijol Rojo (CF)	Rendimiento (kg ha ⁻¹)	Contenido Fe (ppm)
Frijol INTA-Ferroso	1600	71
Frijol INTA Nutritivo/Rendidor	1811	80
Frijol INTA-Biofortificado	1747	84

CF: cultivo con capacidad de fijación biológica de nitrógeno (FBN)

Anexo 2. Fertilizante ^{15}N
Managua



Anexo 3. Invernadero UNA-



Anexo 4. Resultados de los análisis de varianza de las variables evaluadas en el primer momento (42 dde)

Nueva tabla : 15/11/2021 - 11:21:28 - [Versión : 1/11/2014]

Análisis de la varianza

BSA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BSA	24	0.52	0.39	25.19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	15.39	5	3.08	3.88	0.0145
Ino	6.54	1	6.54	8.26	0.0101
Gen	7.82	2	3.91	4.94	0.0195
Ino*Gen	1.02	2	0.51	0.65	0.5359
Error	14.26	18	0.79		
Total	29.65	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.76341

Error: 0.7922 gl: 18

Ino Medias n E.E.

1	4.06	12	0.26	A
2	3.01	12	0.26	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.13580

Error: 0.7922 gl: 18

Gen Medias n E.E.

2	4.17	8	0.31	A
1	3.65	8	0.31	A B
3	2.78	8	0.31	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

NT

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NT	24	0.28	0.08	10.55

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.06	5	0.21	1.42	0.2633
Ino	0.65	1	0.65	4.38	0.0507
Gen	0.01	2	4.0E-03	0.03	0.9737
Ino*Gen	0.40	2	0.20	1.34	0.2868
Error	2.67	18	0.15		
Total	3.72	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.33028

Error: 0.1483 gl: 18

Nddf

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Nddf	24	0.91	0.89	5.60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	625.63	5	125.13	38.69	<0.0001
Ino	393.42	1	393.42	121.66	<0.0001
Gen	218.16	2	109.08	33.73	<0.0001
Ino*Gen	14.05	2	7.02	2.17	0.1429
Error	58.21	18	3.23		
Total	683.83	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.54236

Error: 3.2337 gl: 18

Ino Medias n E.E.

1	36.16	12	0.52	A
2	28.06	12	0.52	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.29473

Error: 3.2337 gl: 18

Gen Medias n E.E.

2	36.37	8	0.64	A
3	30.14	8	0.64	B
1	29.82	8	0.64	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Ndda

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ndda	24	0.91	0.89	21.84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3842.92	5	768.58	38.65	<0.0001
Ino	2417.43	1	2417.43	121.57	<0.0001
Gen	1339.04	2	669.52	33.67	<0.0001
Ino*Gen	86.45	2	43.22	2.17	0.1427
Error	357.93	18	19.89		
Total	4200.85	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.82472

Error: 19.8852 gl: 18

Ino Medias n E.E.

2	30.46	12	1.29	A
1	10.38	12	1.29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.69041

Error: 19.8852 gl: 18

Gen Medias n E.E.

1	26.09	8	1.58	A
3	25.30	8	1.58	A
2	9.87	8	1.58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Ndds

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ndds	24	0.90	0.87	5.04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1031.75	5	206.35	33.00	<0.0001
Ino	359.06	1	359.06	57.42	<0.0001
Gen	395.74	2	197.87	31.64	<0.0001
Ino*Gen	276.95	2	138.48	22.15	<0.0001
Error	112.55	18	6.25		
Total	1144.30	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.14474

Error: 6.2529 gl: 18

Ino Medias n E.E.

1	53.46	12	0.72	A
2	45.72	12	0.72	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.19094

Error: 6.2529 gl: 18

Gen Medias n E.E.

2	53.77	8	0.88	A
3	50.92	8	0.88	A
1	44.09	8	0.88	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.61931

Error: 6.2529 gl: 18

Ino Gen Medias n E.E.

1	2	58.54	4	1.25	A
1	1	51.59	4	1.25	B
2	3	51.59	4	1.25	B
1	3	50.25	4	1.25	B
2	2	48.99	4	1.25	B
2	1	36.59	4	1.25	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

RNddf

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RNddf	24	0.64	0.53	25.64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3446.21	5	689.24	6.28	0.0015
Ino	1504.17	1	1504.17	13.71	0.0016
Gen	1711.99	2	855.99	7.80	0.0036
Ino*Gen	230.05	2	115.03	1.05	0.3708
Error	1974.17	18	109.68		
Total	5420.37	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=8.98235

Error: 109.6759 gl: 18

Ino Medias n E.E.

1	48.76	12	3.02	A
2	32.93	12	3.02	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=13.36393

Error: 109.6759 gl: 18

Gen Medias n E.E.

2	51.80	8	3.70	A
1	39.50	8	3.70	A B
3	31.24	8	3.70	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

RNdda

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rndda	24	0.88	0.84	26.45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	4961.13	5	992.23	25.37	<0.0001
Ino	2451.07	1	2451.07	62.66	<0.0001
Gen	1765.94	2	882.97	22.57	<0.0001
Ino*Gen	744.13	2	372.06	9.51	0.0015
Error	704.08	18	39.12		
Total	5665.21	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.36426

Error: 39.1156 gl: 18

Ino Medias n E.E.

2	33.75	12	1.81	A
1	13.54	12	1.81	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=7.98093

Error: 39.1156 gl: 18

Gen Medias n E.E.

1	34.48	8	2.21	A
3	22.96	8	2.21	B
2	13.50	8	2.21	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=14.05461

Error: 39.1156 gl: 18

Ino Gen Medias n E.E.

2	1	50.95	4	3.13	A
2	3	25.87	4	3.13	B
2	2	24.44	4	3.13	B
1	3	20.05	4	3.13	B
1	1	18.01	4	3.13	B
1	2	2.57	4	3.13	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

RNdds

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RNdds	24	0.64	0.53	25.64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	7532.76	5	1506.55	6.28	0.0015
Ino	3287.47	1	3287.47	13.71	0.0016
Gen	3742.46	2	1871.23	7.80	0.0036
Ino*Gen	502.83	2	251.42	1.05	0.3709
Error	4315.74	18	239.76		
Total	11848.49	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=13.28084

Error: 239.7631 gl: 18

Ino Medias n E.E.

1	72.10	12	4.47	A
2	48.69	12	4.47	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=19.75921

Error: 239.7631 gl: 18

Gen Medias n E.E.

2	76.58	8	5.47	A
1	58.40	8	5.47	A B
3	46.19	8	5.47	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

RNTBA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RNTBA	24	0.52	0.39	21.22

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.01	5	2.7E-03	3.88	0.0146
Ino	2.0E-03	1	2.0E-03	2.90	0.1056
Gen	0.01	2	3.7E-03	5.33	0.0152
Ino*Gen	4.1E-03	2	2.0E-03	2.92	0.0796
Error	0.01	18	6.9E-04		
Total	0.03	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.03363

Error: 0.0007 gl: 18

Gen Medias n E.E.

2	0.14	8	0.01	A
1	0.13	8	0.01	A B
3	0.10	8	0.01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 5. Resultados de los análisis de varianza de las variables evaluadas para el segundo momento (57 dde)

Nueva tabla : 15/11/2021 - 11:28:23 - [Versión : 1/11/2014]

Análisis de la varianza

BSA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BSA	24	0.57	0.45	16.92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	161.93	5	32.39	4.83	0.0057
Ino	64.68	1	64.68	9.64	0.0061
Gen	83.94	2	41.97	6.25	0.0087
Ino*Gen	13.30	2	6.65	0.99	0.3906
Error	120.81	18	6.71		
Total	282.74	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.22203

Error: 6.7117 gl: 18

Ino Medias n E.E.

1	16.95	12	0.75	A
2	13.67	12	0.75	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=3.30593

Error: 6.7117 gl: 18

Gen Medias n E.E.

3	17.95	8	0.92	A
1	14.10	8	0.92	B
2	13.88	8	0.92	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

NT

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
NT	24	0.48	0.33	11.33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.69	5	0.34	3.31	0.0270
Ino	0.35	1	0.35	3.41	0.0814
Gen	1.07	2	0.54	5.25	0.0160
Ino*Gen	0.27	2	0.14	1.33	0.2884
Error	1.84	18	0.10		
Total	3.53	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.40784

Error: 0.1021 gl: 18

Gen Medias n E.E.

3	3.11	8	0.11	A
1	2.75	8	0.11	A B
2	2.61	8	0.11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Nddf

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Nddf	24	0.27	0.06	14.69

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	113.57	5	22.71	1.30	0.3059
Ino	0.59	1	0.59	0.03	0.8558
Gen	55.22	2	27.61	1.59	0.2322
Ino*Gen	57.76	2	28.88	1.66	0.2183
Error	313.45	18	17.41		
Total	427.02	23			

Ndda

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ndda	24	0.27	0.06	63.90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	931.03	5	186.21	1.30	0.3060
Ino	4.89	1	4.89	0.03	0.8553
Gen	452.62	2	226.31	1.58	0.2323
Ino*Gen	473.53	2	236.76	1.66	0.2183
Error	2570.36	18	142.80		
Total	3501.39	23			

Ndds

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ndds	24	0.27	0.06	14.70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	393.99	5	78.80	1.30	0.3064
Ino	2.07	1	2.07	0.03	0.8555
Gen	191.58	2	95.79	1.58	0.2324
Ino*Gen	200.35	2	100.18	1.66	0.2186
Error	1088.49	18	60.47		
Total	1482.49	23			

RNddf

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RNddf	24	0.58	0.47	31.00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	32005.94	5	6401.19	5.07	0.0045
Ino	20659.47	1	20659.47	16.37	0.0008
Gen	5622.34	2	2811.17	2.23	0.1367
Ino*Gen	5724.14	2	2862.07	2.27	0.1324
Error	22720.76	18	1262.26		
Total	54726.71	23			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=30.47260

Error: 1262.2646 gl: 18

Ino Medias n E.E.

1 143.96 12 10.26 A

2 85.28 12 10.26 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

RNdda

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rndda	24	0.27	0.07	72.70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	23995.46	5	4799.09	1.35	0.2901
Ino	69.39	1	69.39	0.02	0.8906
Gen	12975.94	2	6487.97	1.82	0.1905
Ino*Gen	10950.12	2	5475.06	1.54	0.2421
Error	64147.39	18	3563.74		
Total	88142.85	23			

RNdds

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RNdds	24	0.62	0.51	26.07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	112158.85	5	22431.77	5.86	0.0022
Ino	22956.25	1	22956.25	6.00	0.0248
Gen	80667.17	2	40333.58	10.54	0.0009
Ino*Gen	8535.44	2	4267.72	1.12	0.3494
Error	68863.66	18	3825.76		
Total	181022.51	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=53.05094

Error: 3825.7590 gl: 18

Ino Medias n E.E.

1 268.15 12 17.86 A

2 206.29 12 17.86 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=78.92912

Error: 3825.7590 gl: 18

Gen Medias n E.E.

3 314.65 8 21.87 A

1 221.85 8 21.87 B

2 175.16 8 21.87 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

RNTBA

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RNTBA	24	0.84	0.79	13.08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.30	5	0.06	18.55	<0.0001
Ino	0.09	1	0.09	28.30	<0.0001
Gen	0.18	2	0.09	28.28	<0.0001
Ino*Gen	0.03	2	0.01	3.94	0.0380
Error	0.06	18	3.2E-03		
Total	0.36	23			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.04871

Error: 0.0032 gl: 18

Ino Medias n E.E.

1 0.50 12 0.02 A

2 0.37 12 0.02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.07247

Error: 0.0032 gl: 18

Gen Medias n E.E.

3 0.56 8 0.02 A

1 0.40 8 0.02 B

2 0.35 8 0.02 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.12762

Error: 0.0032 gl: 18

Ino Gen Medias n E.E.

1 3 0.59 4 0.03 A

2 3 0.52 4 0.03 A B

1 1 0.50 4 0.03 A B

1 2 0.40 4 0.03 B C

2 2 0.31 4 0.03 C

2 1 0.29 4 0.03 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)