

**Caracterización fenotípica de líneas
endogámicas recombinantes de la variedad de
frijol rojo Amadeus 77 en condiciones de baja
fertilidad**

Yitzhak Antonio Morales González

Zamorano, Honduras

Diciembre, 2010

ZAMORANO
CARRERA DE CIENCIA Y PRODUCCIÓN AGROPECUARIA

**Caracterización fenotípica de líneas
endogámicas de la variedad de frijol rojo
Amadeus 77 en condiciones de baja fertilidad**

Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado
Académico de Licenciatura

Presentado por

Yitzhak Antonio Morales González

Zamorano, Honduras
Diciembre, 2010

Caracterización fenotípica de líneas endogámicas de la variedad de frijol rojo Amadeus 77 en condiciones de baja fertilidad

Presentado por:

Yitzhak Antonio Morales González

Aprobado:

Juan Carlos Rosas, Ph.D.
Asesor principal

Abel Gernat, Ph.D.
Director
Carrera Ciencia y Producción
Agropecuaria

Ana Gabriela Vargas, Ing.
Asesora

Raúl Espinal, Ph.D.
Decano Académico

Abelino Pitty, Ph.D.
Coordinador de Fitotecnia

Kenneth L. Hoadley, D.B.A.
Rector

RESUMEN

Morales, Y. 2010. Caracterización fenotípica de líneas endogámicas de la variedad de frijol rojo Amadeus 77 en condiciones de baja fertilidad. Proyecto especial de graduación del programa de Ingeniería Agronómica, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano. Honduras. 21 p.

En Honduras el frijol (*Phaseolus vulgaris*) constituye el segundo rubro en importancia socioeconómica después del maíz. La producción está en manos de pequeños productores en condiciones adversas de sequía y baja fertilidad. El objetivo del estudio consistió en identificar líneas endogámicas recombinantes (LER) de Amadeus 77 con características fenotípicas que le confieran mayor tolerancia a condiciones de estrés. Cincuenta LER y cuatro testigos (los parentales Amadeus 77, L88-13, L88-33 y L88-63) fueron crecidas en un sistema de cilindros con suelo: arena (1:2) de bajo contenido de materia orgánica, nitrógeno (N) y fósforo (P), e inoculadas con dos cepas de *Rhizobium*, CIAT 899 (*R. tropici*) y CIAT 632 (*R. etli*) y un testigo sin inocular. Se utilizó un arreglo factorial en parcelas divididas de un diseño de bloques completos al azar, con las cepas distribuidas en parcelas y los genotipos en sub-parcelas, utilizándose cuatro repeticiones. A la floración se realizaron evaluaciones visuales para determinar la distribución de nódulos (porcentaje) a tres profundidades. Con el programa WinRhizo© se analizaron las raíces escaneadas para medir longitud, área superficial, diámetro promedio y volumen de las muestras de raíces; y el área superficial de nódulos. Se determinaron los pesos secos de la parte aérea, raíces, nódulos y total de las plantas. Se presentaron diferencias debidos a los efectos de las cepas, genotipos y la interacción cepa \times genotipo en los pesos secos de las partes de las plantas, excepto en los nódulos. También se observaron diferencias en las variables de raíces y nódulos medidas usando el programa WinRhizo, y en las raíces adventicias por efecto de genotipos.

Palabras clave: Inoculación, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium tropici*

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de cuadros y anexos.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
4. CONCLUSIONES.....	11
5. RECOMENDACIONES.....	12
6. LITERATURA CITADA.....	13
7. ANEXOS.....	15

ÍNDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadro	Página
1. Efecto de las cepas de <i>Rhizobium</i> y genotipos en los pesos secos de la parte aérea, raíces, nódulos y total a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.	5
2. Efecto de la interacción cepa × genotipo en los pesos secos de la parte aérea, raíces, nódulos y total a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.	7
3. Efectos de cepas y genotipos en la longitud, área superficial, diámetro promedio y volumen de raíces a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.	8
4. Efectos de la interacción cepa × genotipo en la longitud, área superficial, diámetro promedio y volumen de raíces a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.	9
5. Efecto de las cepas y genotipos en el área superficial de nódulos y distribución en porcentaje a diferentes profundidades (cm) a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.	10
Anexo	Página
1. Peso seco aéreo (PSA), raíces (PSR), nódulos (PSN) y total (PST) (g/planta) a la floración de 50 líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.	15
2. Longitud (L), área superficial (AS), diámetro promedio (DP) y volumen (V) de raíces a la floración de 50 líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.	17
3. Valores de área superficial de nódulos (ASN) y distribución en porcentaje a diferentes profundidades (cm) a la floración de 50 líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.	19
4. Resultado de análisis de suelo	21
5. Prueba de gota para estimar la concentración de rizobios en el inóculo.	21

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una actividad de relevancia socioeconómica en Centro América. Desde el punto de vista nutricional, representa la principal fuente proteica en la dieta de familias rurales y urbanas de bajos ingresos y con poca disponibilidad para consumir suficientes proteínas de origen animal (Rosas *et al.* 2000). El grano de frijol contiene aprox. 22% de proteína y su valor biológico en cuanto al aporte de aminoácidos esenciales es alto y comparable a la carne de pollo.

En Honduras, ocupa el segundo lugar en importancia después del maíz por los niveles de consumo y por la superficie sembrada (SAG 2010). Según FAO (1998), el consumo *per capita* en Honduras es de 11.1 kg/año, pero en algunas zonas puede llegar a variar alcanzándose consumos a de 20-45 kg en las áreas de mayor producción del grano (Rosas *et al.* 1999). El 70% de la producción la realizan pequeños agricultores en extensiones menores a 2 ha (Rosas *et al.* 2000).

Por lo general, estos sistemas agrícolas presentan algunas características comunes. Se encuentran en zonas de laderas y colinas, en suelos con bajo contenido de nutrientes, especialmente de nitrógeno (N) y fósforo (P), propensas a sequías y al ataque de un creciente número de plagas y enfermedades. Estas condiciones agroecológicas adversas limitan el normal crecimiento del cultivo, aunado al poco uso de insumos y la poca disponibilidad de semillas mejoradas, lo que provoca mermas importantes en los rendimientos (IICA 2007).

Las características de raíces son importantes para una óptima adquisición de recursos limitantes del suelo como P, N y agua. Estos nutrientes son pocos disponibles en la mayoría de los sistemas productivos en los trópicos y presentan la característica de ser contrastante en el espacio y tiempo (Robinson 1994). El P es un elemento de muy poca movilidad en el suelo y se concentra en las capas superiores. Por el contrario, la disponibilidad de agua mejora conforme se avanza hacia horizontes más profundos. La obtención de P se ve favorecida si la planta posee un sistema de raíz superficial; mientras que, las raíces profundas mejoran la obtención de agua. La identificación de caracteres de raíces permitirá seleccionar genotipos eficientes para adaptarse a condiciones de bajos nutrientes y agua en el suelo.

La absorción de N por la planta, puede ser maximizada si se seleccionan genotipos que tengan la capacidad de establecer buenas relaciones simbióticas con cepas específicas de bacterias del género *Rhizobium*. Mediante la fijación biológica de nitrógeno, estas bacterias tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico y hacerlo disponible para la

planta, supliendo hasta en un 60% los requerimientos del cultivo (Peña *et al.* 1993); convirtiéndose en una alternativa agroecológica viable al pequeño productor, frente al alto costo de los fertilizantes. En contraparte, estudios revelan que la capacidad de nodulación se ve afectada por las poblaciones de *Rhizobium* nativo, las altas temperaturas y el pH del suelo; por lo que es necesaria la identificación de accesiones que muestren mejor respuesta a cepas seleccionadas. Para lograr este objetivo se diseñaron los siguientes objetivos específicos que abarquen punto por punto los aspectos más concretos a tratar:

Los programas de hibridación, evaluación y selección de germoplasma, orientan sus esfuerzos en la búsqueda de variedades que tengan la capacidad de adaptarse al mayor rango de factores limitantes, expresando buenos rendimientos y conservando las características agradables al consumidor. Para dar respuesta a estas limitantes de la producción, actualmente se trabaja en el desarrollo de multilíneas. Una multilínea consiste en la mezcla de un número determinado de líneas con características contrastantes y complementarias que le permiten un mejor nivel de adaptación a diferentes condiciones adversas.

Durante los años 2002-03 se liberó en Honduras la línea de frijol EAP 9510-77, bajo el nombre de variedad Amadeus 77 (Rosas *et al.* 2004). Destaca entre sus principales características la tolerancia al calor, resistencia al mosaico dorado amarillo del frijol (VMDAF) y al mosaico común (VMCF). Además, debido a sus buenos rendimientos y las características culinarias (cocción rápida, sabor agradable, color y espesor del caldo) tienen buena aceptación entre los consumidores (Rosas y Escoto 2002).

Desde el 2009 se evaluaron en Zamorano cerca de 300 líneas endogámicas recombinantes de frijol rojo que se obtuvieron de cruzamientos utilizando la variedad Amadeus 77 como padre recurrente; y las líneas L88-13, L88-33, L88-62, como padres donantes al ser identificadas con buen sistema radicular, utilizando el método de Retrocruza-Autofecundación (Román 2009). En las líneas endogámicas recombinantes (LER) las características del padre recurrente se manifiestan en un 87.5% y se espera que las diferencias que puedan mostrar las líneas correspondan a los caracteres deseables de los padres donantes, incluyendo un sistema radicular cuya distribución le permita adaptarse a las condiciones sub-óptimas del suelo y agua.

Con evaluaciones anteriores se logró seleccionar un grupo de 50 líneas provenientes de las tres poblaciones, que cuentan con las mejores características radicales y que conservan las características comerciales y agronómicas de Amadeus 77. El presente estudio se realizó con el objetivo de identificar LER de Amadeus 77 con características fenotípicas que le confieran mayor tolerancia a condiciones de baja fertilidad del suelo. Para lograrlo, se evaluaron las LER en cilindros de suelo con bajo contenido de nitrógeno e inoculadas con cepas de *Rhizobium*. Se caracterizaron las raíces utilizando mediciones visuales, escáner de raíces y el programa WinRhizo[®] y determinaciones de materia seca.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 UBICACIÓN

El ensayo se llevó a cabo en el invernadero #2 y en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada del Programa de Investigaciones en Frijol (PIF), de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), Zamorano, departamento de Francisco Morazán, Honduras, a unos 800 msnm, con una temperatura media anual de 24° C y una precipitación promedio anual de 1,100 mm, durante los meses de mayo a septiembre de 2010.

2.2 MATERIALES

Se caracterizaron 50 líneas LER y los padres Amadeus 77 y las líneas L88-13, L88-33 y L88-62, bajo condiciones de baja fertilidad de suelo y tres tratamientos de *Rhizobium*: CIAT 899 (*R. tropici*), CIAT 632 (*R. etli*) y un testigo sin inoculación.

2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un arreglo factorial en parcelas divididas de un Diseño de Bloques Completos al Azar, en donde las cepas fueron distribuidas en parcelas y los genotipos en subparcelas, utilizándose cuatro repeticiones. Cada planta en un cilindro de suelo representó una unidad experimental.

2.4 SIEMBRA

Se manejó un sistema de cilindros de suelo para el crecimiento de las plantas en el invernadero. Las semillas fueron pregerminadas durante dos días, en rollos de papel especial para germinación, posteriormente fueron sembradas en bolsas plásticas de polietileno, conteniendo una mezcla sin esterilizar de suelo:arena (1:2), con condiciones de bajo contenido de nutrimentos, especialmente de N y P (Anexo 4). Éstas se colocaron dentro de tubos PVC de 76 cm de largo × 7.6 cm de diámetro. Para las siembras, se escogieron las semillas que presentaron radículas uniformes y sanas.

2.5 INOCULACIÓN

Las plantas se inocularon con *Rhizobium* a los 4 días después de siembra (DDS) y se reinocularon a los 8 DDS, para asegurar una buena infección. La inoculación se realizó con una micropipeta a la base del tallo, a razón de un 1 ml/planta. El inoculante tuvo una concentración de 12×10^{25} rizobios/ml, determinado mediante la prueba de gota (Anexo 4).

2.6 MANEJO DEL RIEGO

Los riegos se realizaron dos veces al día, en horas frescas (9:00 am y 3:00 pm), suministrando 70 ml de agua a cada planta, tomándose en cuenta las condiciones climáticas. El riego se suspendió a los 20 DDS, para obtener una condición de estrés moderado de agua

2.7 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL

La recolección del material evaluado (parte aérea y raíces) se realizó a los 35 DDS, cuando el 50% de las plantas llegaron a floración. La parte aérea se separó de las raíces con una tijera de podar, luego se determinó el peso seco aéreo en un horno a 70 °C por 48 horas.

Las raíces se lavaron cuidadosamente con agua y jabón líquido sobre un tamiz, evitando pérdidas de raíces o daño de las mismas. Se evaluaron por apreciación visual considerando la distribución de nódulos (porcentaje) en las raíces adventicias, en los primeros 5 cm, entre los 5 y 10 cm y a más de 10 cm de profundidad. Posteriormente se analizaron los nódulos por separado, colocándolos en latas de aluminio para secarlos en horno a 50°C por 48 horas, con lo que se determinó el peso seco de los nódulos.

Las raíces se conservaron en frascos de vidrio con alcohol al 25% para analizarlas con el programa WinRhizo[®] y determinar longitud, área superficial, diámetro promedio y volumen. Después, se determinó el peso seco de raíces, secándolas en un horno a 70 °C por 48 horas.

2.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis de varianza (ANDEVA) y separación de medias mediante la prueba de Diferencia Mínima Significativa (DMS) con una probabilidad de $P \leq 0.05$.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 PESOS SECOS

Cuadro 1. Efecto de las cepas de *Rhizobium* y genotipos en los pesos secos (g) de la parte aérea, raíces, nódulos y total a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.

Fuentes de Variación	Parte Aérea	Raíz	Nódulos	Total
Cepas				
CIAT 899	1.214	0.381	0.024	1.619
CIAT 632	1.156	0.366	0.024	1.547
Testigo (sin inoculación)	1.198	0.358	0.024	1.580
DMS (P≤ 0.05)	0.035 ^{**}	0.014 ^{**}	0.002 ^{ns}	0.045 ^{**}
Genotipos				
BRT 101-214	1.296	0.400	0.024	1.720
BRT 103-239	1.271	0.423	0.020	1.714
BRT 102-192	1.256	0.402	0.027	1.684
BRT 103-204	1.245	0.411	0.021	1.677
BRT 103-220	1.259	0.397	0.018	1.674
BRT 101-212	1.112	0.355	0.022	1.490
BRT 103-208	1.117	0.340	0.021	1.479
BRT 102-183	1.098	0.342	0.024	1.463
BRT 101-189	1.091	0.346	0.023	1.459
BRT 102-242	1.076	0.346	0.019	1.440
Amadeus 77 (testigo)	1.146	0.383	0.029	1.557
Promedio (n=54)	1.189	0.369	0.024	1.582
DMS (P≤ 0.05)	0.150 ^{**}	0.058 ^{**}	0.008 ^{ns}	0.189 ^{**}

Sólo se incluyen los valores más altos y más bajos de cinco genotipos y el testigo Amadeus 77.

^{**}, ^{ns} = Altamente significativo y no significativo.

Los valores de peso seco (PS) de raíces, parte aérea y el total de la planta presentaron diferencias significativas por efectos de las cepas, pero no hubieron diferencias en el PS nódulos (Cuadro 1). Los valores más altos se obtuvieron con la cepa CIAT 899; sin embargo, el tratamiento sin inoculación alcanzó valores similares a la cepa CIAT 632, sugiriendo la importancia del rizobio residente en el lote de donde se obtuvo el suelo para preparar el sustrato usado en los cilindros. La capacidad de las cepas inoculadas de competir con las cepas nativas es una de las características más importantes que debe tener el inoculante en el proceso de colonización del hospedero (Thies *et al.* 1991). En este estudio no se pudo determinar aspectos de competitividad de las cepas, debido a que no se usó ningún método para determinarlo.

Para los PS de los genotipos también se encontraron diferencias significativas. Los datos completos de los 54 genotipos se incluyen en el Anexo 1. Para ilustrar y discutir las diferencias observadas por efectos de genotipos, sólo se incluyen los datos de las cinco LER con valores superiores y las cinco inferiores, y el testigo Amadeus 77 (Cuadro 1). Entre los genotipos superiores destacan las líneas BRT 103-239, BRT 103-204, BRT 103-220, las cuales presentaron altos valores para PS aéreo, PS raíces y PS total, no así para el PS nódulos. Estas tres líneas provienen de la población BRT 103, cuyo padre es la línea L88-62, identificada por su habilidad superior de adaptación a condiciones marginales por su arquitectura de raíz. Las líneas BRT 101-214, BRT 102-192, representan los valores superiores de genotipos de las otras dos poblaciones. Los genotipos inferiores mantuvieron esa tendencia para las cuatro variables, pertenecientes a las tres poblaciones. El padre recurrente (Amadeus 77) presentó el valor más alto para PS de nódulos.

Dada la gran diversidad del género *Rhizobium* y su alta especificidad en la nodulación no se puede generalizar. Se conoce que la eficiencia en la fijación depende de la interacción adecuada entre cepa \times genotipo (López 2005). Para ilustrar los resultados de los efectos de la interacción $C \times G$ en los PS de la planta, en el Cuadro 2 se presentan las interacciones $C \times G$ con valores mayores y menores; se puede observar que las cepas interactúan con diferentes genotipos, pero que el genotipo BRT 101-205 tuvo su mayor PS con la cepa CIAT 632, pero a su vez fue muy inferior con la cepa CIAT 899, sugiriendo que bajo las condiciones de bajo N en el medio, la respuesta de los genotipos a la inoculación con diferentes cepas puede afectar significativamente la acumulación de materia seca. Algunos genotipos presentaron valores similares de PS con cepas diferentes; sin embargo, otros como BRT 101-205 tuvieron resultados contrastantes debido al efecto de su interacción con las cepas; sugiriendo la importancia de la especificidad frijol/cepa *Rhizobium*.

Cuadro 2. Efecto de la interacción cepa \times genotipo en los pesos secos (g) de la parte aérea, raíces, nódulos y total a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.

Interacción C \times G	Parte Aérea	Raíces	Nódulos	Total
CIAT 899 \times BRT 103-209	1.373	0.413	0.019	1.805
CIAT 632 \times BRT 101-205	1.301	0.406	0.028	1.735
Testigo (si) [§] \times BRT 102-225	1.357	0.432	0.020	1.809
CIAT 899 \times BRT 101-205	1.108	0.309	0.020	1.437
CIAT 632 \times BRT 103-208	0.932	0.290	0.022	1.244
Testigo (si) [§] \times BRT 102-242	0.982	0.306	0.013	1.300
DMS ($P \leq 0.05$)	0.067 ^{**}	0.025 ^{**}	0.003 ^{**}	0.080 ^{**}

Sólo se incluyen las interacciones cepa \times genotipo con valores más altos y más bajos.

^{**} altamente significativo.

[§] sin inoculación

3.2 DIMENSIONES DE RAÍCES

Las características fenotípicas de raíces son elementales en la utilización adecuada de los recursos en condiciones de estrés hídrico y con pocos nutrientes (Huang y Gao 2000); sistemas radicales profundos y densos contribuyen a un mejor aprovechamiento del agua y nutrimentos. Los tratamientos de cepas y genotipos tuvieron efectos significativos en las dimensiones de las raíces (Cuadro 3). Los valores de longitud y área fueron superiores con la cepa CIAT 899; pero el diámetro fue mayor con la CIAT 632.

Los efectos de genotipos en las variables de las raíces mostraron diferencias significativas, de los cuales se muestran solo los cinco superiores y los cinco inferiores, y el testigo Amadeus 77. Los datos completos se muestran en el Anexo 2. Los identificados con mejores características de raíces, serán utilizados en estudios posteriores en finca y en invernadero.

Se presentaron efectos significativos de la interacción C \times G en las cuatro variables de raíces (Cuadro 4). Para propósito de la interpretación de los resultados, sólo se indican las interacciones C \times G con valores más altos y más bajos. Por ejemplo, el genotipo BRT 101-197 fue superior con la CIAT 899, lo cual contrasta con el genotipo BRT 102-209, que en interacción con la misma cepa presentó valores significativamente menores. Valores contrastantes también se presentaron con las interacciones de las cepas CIAT 632 y el testigo sin inoculación que afectaron a genotipos diferentes en sus dimensiones de raíces. La especificidad *Rhizobium*- frijol se manifestó también en las dimensiones de raíces evaluadas.

Cuadro 3. Efectos de cepas y genotipos en la longitud, área superficial, diámetro promedio y volumen de raíces a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.

Fuentes de Variación	Longitud (m)	Área (m²)	Diámetro (mm)	Volumen (cm³)
Cepas				
CIAT 899	33.55	0.86	3.16	17.87
CIAT 632	31.80	0.83	3.38	19.00
Testigo (sin inoculación)	31.91	0.83	3.09	18.02
DMS (P≤ 0.05)	1.07**	0.03**	0.12**	0.83**
Genotipos				
BRT 102-192	35.62	0.93	3.51	19.95
BRT 103-204	34.93	0.93	3.59	20.86
BRT 103-261	37.39	0.95	3.52	19.61
BRT 103-239	33.20	0.90	3.45	20.12
BRT 103-255	35.50	0.90	3.57	18.41
BRT 101-205	29.23	0.76	2.62	16.22
BRT 101-228	30.02	0.76	2.91	15.75
BRT 103-176	29.19	0.72	2.88	14.23
BRT 101-167	28.39	0.73	2.71	15.49
BRT 102-209	27.63	0.73	2.59	15.72
Amadeus 77	32.31	0.85	3.18	18.36
Promedio (n=54)	32.42	0.85	3.21	18.29
DMS (P≤ 0.05)	4.56**	0.11 ^{ns}	0.50**	3.51*

Sólo se incluyen los valores más altos y más bajos de cinco genotipos y el testigo Amadeus 77.

*, **, ^{ns} = Significativo, altamente significativo y no significativo, respectivamente.

Cuadro 4. Efectos de la interacción cepa \times genotipo en la longitud, área superficial, diámetro promedio y volumen de raíces a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.

Interacción C \times G	Longitud	Área	Diámetro	Volumen
	(m)	(m ²)	(mm)	(cm ³)
CIAT 899 \times BRT 101-197	43.1	1.05	3.87	20.6
CIAT 632 \times BRT 103-239	35.8	1.02	4.06	23.6
Testigo (si) [§] \times BRT 102-192	37.7	0.98	3.58	20.9
CIAT 899 \times BRT 102-209	25.4	0.60	2.19	11.5
CIAT 632 \times BRT 101-149	27.8	0.71	2.67	15.1
Testigo (si) [§] \times BRT 103-176	28.1	0.64	2.64	11.6
DMS (P \leq 0.05)	1.99**	0.05**	0.22**	1.52**

Sólo se incluyen las interacciones cepa \times genotipo con valores más altos y más bajos.

**= Altamente significativo.

§ = Sin inoculación.

Algunos estudios sugieren que la ubicación de los nódulos en las raíces juega un rol determinante en la eficiencia de los mismos. Aquellos ubicados en zona de la corona se desarrollan mejor y probablemente fijan más nitrógeno que los ubicados en otras partes inferiores de la raíz, ya que es el área más favorable para la infección temprana. Cuando se cuenta con cepas que nodulan rápidamente en dicha zona radical, existe mayor oportunidad de tener mayor número de nódulos de mayor tamaño y mayor fijación de nitrógeno por mayor tiempo, que aquellas que aparezcan en raíces secundarias o terciarias, que producen nódulos de menor tamaño a una mayor profundidad (Vlassak 1994).

Se encontraron diferencias significativas por efecto de las cepas para el área superficial de nódulos, pero no en las raíces a diferentes profundidades (Cuadro 5). La mayor proporción de nódulos se formaron de 0-5 cm de profundidad; sin embargo, la proporción de nódulos a >10 cm también fue importante. En un estudio adicional, será necesario especificar las proporciones en las raíces separando en número y peso (masa) nodular, y ver si la distribución tiene algún efecto importante.

Se encontraron diferencias en significativas para el área superficial de nódulos y para la distribución de nódulos entre 0-5 cm por efecto de genotipo. Para ilustrar las diferencias observadas en genotipos en el Cuadro 5, sólo se incluyen los cinco genotipos con valores superiores y los cinco genotipos con valores inferiores y el testigo Amadeus 77.

Cuadro 5. Efecto de las cepas y genotipos en el área superficial de nódulos y distribución en porcentaje a diferentes profundidades (cm) a la floración de líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.

Fuentes de Variación	Área Superficial de Nódulos (cm ²)	Distribución (%) según profundidad de raíces (cm)			
		Adv. [§]	0-5	5-10	>10
Cepas					
CIAT 899	7.7	9.5	51.7	5.7	33.1
CIAT 632	8.7	6.2	51.8	5.4	36.7
Testigo (sin inoculación)	7.8	6.7	51.6	6.8	35.1
DMS (P≤ 0.05)	0.6 ^{**}	1.8 ^{ns}	3.1 ^{ns}	ns	ns
Genotipos					
BRT 101-239	8.5	10.4	54.2	9.6	25.8
BRT 102-192	9.5	9.3	45.4	3.3	41.9
BRT 102-196	8.5	9.3	55.8	3.2	31.7
BRT 101-167	7.8	9.2	58.8	6.6	26.3
BRT 103-188	7.7	10.0	55.0	7.5	27.5
BRT 101-159	7.3	5.1	56.7	3.7	34.6
BRT 103-204	6.3	7.8	64.2	4.8	23.3
BRT 101-180	6.9	7.9	48.8	2.9	40.4
BRT 102-222	7.9	3.1	53.5	1.8	41.7
BRT 103-220	5.9	6.3	62.5	1.8	29.4
Amadeus 77 (testigo)	9.1	5.0	50.8	3.8	40.4
Promedio (n=54)	8.0	7.5	51.7	6.0	35.0
DMS (P≤ 0.05)	2.4 ^{**}	7.7 ^{**}	13.3 ^{ns}	ns	ns

Sólo se incluyen los valores más altos y más bajos de cinco genotipos y el testigo Amadeus 77.

^{**}, ^{ns} = Altamente significativo y no significativo.

[§] = Raíces adventicias

4. CONCLUSIONES

- Para pesos secos (parte aérea, raíces y total) se presentaron diferencias debidas a los efectos individuales de cepas (C), genotipos (G) y de la interacción $C \times G$. Sólo hubo efecto de la interacción $C \times G$ en el peso seco de nódulos.
- En las dimensiones de raíces (longitud, área superficial, diámetro y volumen), se presentaron diferencias por efectos de cepas (C), genotipos (G) y de la interacción $C \times G$; excepto para el área superficial en los genotipos. Las cepas seleccionadas presentaron valores superiores para un mayor número de variables evaluadas.
- Se observaron efectos de cepas y de genotipos en el área superficial de los nódulos; y de genotipo en la distribución de nódulos en las raíces adventicias.
- Se identificaron genotipos que difieren en peso seco de partes diversas de las plantas, dimensiones de raíces y área superficial de nódulos.
- Se observó formación de nódulos en el tratamiento no inoculado, causada por el rizobio presente en el suelo usado en el sustrato del estudio. Esta nodulación presentó numerosos nódulos pequeños, que son considerados inefectivos para la fijación biológica de nitrógeno.

5. RECOMENDACIONES

- Utilizar la información generada en este ensayo para la selección de líneas LER para su validación en el campo usando inoculación con cepas individuales y en mezcla.
- Estimar la ocupancia de nódulos de las cepas en presencia de rizobio residente, y su contribución a la Fijación Biológica de Nitrógeno, N total y rendimiento de las líneas LER seleccionadas, en condiciones de baja fertilidad en invernadero y campo.

6. LITERATURA CITADA

Ho, M.D., B.C. McCannon y J.P. Lynch. 2004. Optimization modeling of plant root architecture for water and phosphorus acquisition. *Journal of Theoretical Biology* 226: 331-340.

Ho, M.D. , J.C. Rosas, K.M. Brown y J.P. Lynch. 2005. Root architectural tradeoffs for water and phosphorus acquisition. *Functional Plant Biology* 32:737-748.

Henry, A., J.C. Rosas, J.S. Beaver y J. P. Lynch. 2010. Multiple stress response and belowground competition in multilines of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Research* 117:209-218.

Huang, B. y H. Gao. 2000. Root physiological characteristics associated with drought resistance in tall fescue cultivars. *Crop Sci.* 40:196-203.

IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura). 2007. Mapeo de las Cadenas Agroalimentarias de Maíz Blanco y Frijol en Centroamérica. Managua, Nicaragua. 132p.

López, I. 2005. *Rhizobium* y su destacada participación con las leguminosas. Centro de Investigación de Nitrógeno, Universidad Autónoma de México. 16p.

Peña, J.J., O. A. Grajeda, V. Kola y G. Hardarson. 1993. Time course and N₂ fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 152:115-121.

Robinson, D., 1994. The responses of plants to non-uniform supplies of nutrients. *New Phytol* 127:635-674.

Roman, F. 2009. Evaluación de líneas endogámicas de la variedad de frijol Amadeus 77 bajo condiciones de estrés hídrico y baja fertilidad. Tesis Ing. Agr. El Zamorano, Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. 22 p.

Rosas, J.C., A. Castro y E. Flores. 2000. Mejoramiento Genético del frijol rojo y negro Mesoamericano para Centroamérica y El Caribe. *Agronomía Mesoamericana* 11(002):37-43.

Rosas, J.C., y D. Escoto. 2002. Presentación de la nueva variedad de frijol rojo claro brillante Amadeus 77. EAP/Zamorano, DICTA/SAG, Bean/Cowpea, CRSP/USAID, Profrijol. 12p.

Rosas, J.C., J.S. Beaver, S. Beebe y S. Viana. 2004. Nomenclatura de variedades de frijol común liberadas en Centro América y El Caribe. *Agronomía Mesoamericana* 13(2):221-224.

Rosas, J.C.; Beaver, J.S; Escoto, D.; Pérez, C.A; Llano, A.; Hernández, J.C.; Araya, R. 2004. Registration of “Amadeus 77” small red common bean. *Crop Sci* 44:1867-1868.

SAG (Secretaria de Agricultura y Ganadería, Hn). 2010. El Cultivo de Frijol en Honduras (en línea). Consultado 22 de octubre de 2010. Disponible en http://www.sag.gob.hn/files/Infoagro/Cadenas%20Agro/Granos%20Basicos/OtraInfo/Bol etin_Cultivo_Frijol.pdf

Somasegaran, P. y H. Hoben. 1985. Handbook for Rhizobia. Methods in legume-*Rhizobium* Technology. Paia, Hawaii, USA, Edwards Brothers, Inc. 450 p.

Thies, Y.E., P.W. Singleton y B.B. Bohlool. 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field grown legumes. *Appl Environ Microbiol* 57: 19-28

Vlassak, K., J. Vanderleyden y A. Franco. 1996. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. *Biol. Fertil .Soil* 21:61-68.

7. ANEXOS

Anexo 1. Peso seco aéreo (PSA), raíces (PSR), nódulos (PSN) y total (PST) (g/planta) a la floración de 50 líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.

Línea	PSA	PSR	PSN	PST
BRT 101-149	1.21	0.35	0.024	1.59
BRT 101-157	1.14	0.36	0.026	1.53
BRT 101-159	1.26	0.29	0.020	1.57
BRT 101-167	1.16	0.31	0.025	1.50
BRT 101-180	1.19	0.35	0.023	1.56
BRT 101-189	1.09	0.35	0.023	1.46
BRT 101-197	1.25	0.39	0.027	1.67
BRT 101-205	1.18	0.30	0.024	1.51
BRT 101-211	1.18	0.35	0.026	1.55
BRT 101-212	1.11	0.36	0.022	1.49
BRT 101-214	1.30	0.40	0.024	1.72
BRT 101-215	1.27	0.36	0.023	1.66
BRT 101-219	1.21	0.38	0.021	1.61
BRT 101-228	1.15	0.35	0.023	1.52
BRT 101-232	1.18	0.34	0.025	1.54
BRT 101-237	1.23	0.34	0.036	1.61
BRT 101-239	1.13	0.35	0.026	1.50
BRT 101-248	1.16	0.38	0.025	1.56
BRT 102-183	1.10	0.34	0.024	1.46
BRT 102-192	1.26	0.40	0.027	1.68
BRT 102-196	1.24	0.37	0.024	1.63
BRT 102-198	1.18	0.36	0.023	1.56
BRT 102-200	1.21	0.41	0.019	1.63
BRT 102-209	1.27	0.35	0.027	1.64
BRT 102-219	1.27	0.35	0.027	1.65
BRT 102-221	1.15	0.38	0.027	1.56
BRT 102-222	1.20	0.39	0.018	1.61
BRT 102-225	1.21	0.36	0.025	1.60
BRT 102-239	1.20	0.39	0.027	1.62
BRT 102-242	1.08	0.35	0.019	1.44
BRT 102-247	1.21	0.37	0.031	1.61

Línea	PSA	PSR	PSN	PST
BRT 103-176	1.24	0.33	0.022	1.60
BRT 103-179	1.16	0.37	0.018	1.54
BRT 103-182	1.19	0.35	0.024	1.56
BRT 103-184	1.20	0.36	0.027	1.58
BRT 103-188	1.23	0.36	0.021	1.61
BRT 103-197	1.20	0.37	0.023	1.59
BRT 103-200	1.24	0.37	0.027	1.64
BRT 103-201	1.20	0.38	0.024	1.61
BRT 103-204	1.25	0.41	0.021	1.68
BRT 103-208	1.12	0.34	0.021	1.48
BRT 103-209	1.24	0.39	0.021	1.65
BRT 103-212	1.14	0.35	0.022	1.52
BRT 103-219	1.24	0.37	0.023	1.63
BRT 103-220	1.26	0.40	0.019	1.67
BRT 103-239	1.27	0.42	0.027	1.71
BRT 103-255	1.17	0.38	0.025	1.58
BRT 103-259	1.14	0.37	0.028	1.54
BRT 103-261	1.18	0.40	0.026	1.60
BRT 103-267	1.13	0.35	0.025	1.51
Amadeus 77	1.13	0.38	0.029	1.56
L 88-13	1.15	0.43	0.032	1.55
L 88-33	1.11	0.41	0.024	1.54
L 88-63	1.25	0.45	0.026	1.73
DMS ($P \leq 0.05$)	0.15^{**}	0.06^{**}	0.008^{ns}	0.19^{**}

^{**}, ^{ns} = Altamente significativo y no significativo.

Anexo 2. Longitud (L), área superficial (AS), diámetro promedio (DP) y volumen (V) de raíces a la floración de 50 líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.

Línea	L (m)	AS (m²)	DP (mm)	V(cm³)
BRT 101-149	28.71	0.76	2.92	17.07
BRT 101-157	28.66	0.80	2.98	18.53
BRT 101-159	32.52	0.85	3.34	18.73
BRT 101-167	28.39	0.73	2.71	15.49
BRT 101-180	31.76	0.82	3.03	17.13
BRT 101-189	29.59	0.78	2.85	17.26
BRT 101-197	36.10	0.91	3.46	18.39
BRT 101-205	29.22	0.76	2.62	16.22
BRT 101-211	31.55	0.82	3.24	17.57
BRT 101-212	31.91	0.82	2.95	16.95
BRT 101-214	31.97	0.88	3.25	19.86
BRT 101-215	31.81	0.83	3.25	17.80
BRT 101-219	33.85	0.90	3.47	19.47
BRT 101-228	30.04	0.76	2.91	15.75
BRT 101-232	32.11	0.84	3.22	17.80
BRT 101-237	33.11	0.84	3.26	17.48
BRT 101-239	29.34	0.78	2.90	16.88
BRT 101-248	30.97	0.81	3.14	17.23
BRT 102-183	30.97	0.77	2.88	15.97
BRT 102-192	35.63	0.93	3.52	19.95
BRT 102-196	28.70	0.78	3.08	17.15
BRT 102-198	33.52	0.87	3.23	18.28
BRT 102-200	32.28	0.83	3.23	17.44
BRT 102-209	27.62	0.73	2.59	15.73
BRT 102-219	32.04	0.83	3.05	17.89
BRT 102-221	30.70	0.85	3.24	19.55
BRT 102-222	33.26	0.87	3.16	18.82
BRT 102-225	30.13	0.80	3.12	17.53
BRT 102-239	31.15	0.88	3.30	21.40
BRT 102-242	33.17	0.83	3.11	16.79
BRT 102-247	34.37	0.89	3.29	18.78
BRT 103-176	29.19	0.72	2.89	14.23
BRT 103-179	33.20	0.86	3.29	18.07
BRT 103-182	33.83	0.84	3.27	17.01

Línea	L (m)	AS (m²)	DP (mm)	V(cm³)
BRT 103-184	33.44	0.86	3.42	18.15
BRT 103-188	32.81	0.84	3.43	17.51
BRT 103-197	32.22	0.89	3.69	19.94
BRT 103-200	32.74	0.86	3.27	18.73
BRT 103-201	39.18	0.90	3.39	20.11
BRT 103-204	34.93	0.93	3.59	20.86
BRT 103-208	31.65	0.81	3.41	16.97
BRT 103-209	32.24	0.84	3.16	17.64
BRT 103-212	31.35	0.82	3.04	17.62
BRT 103-219	35.27	0.87	3.21	17.56
BRT 103-220	33.85	0.91	3.50	20.10
BRT 103-239	33.20	0.91	3.46	20.12
BRT 103-255	35.50	0.90	3.57	18.41
BRT 103-259	33.46	0.86	3.44	17.89
BRT 103-261	37.39	0.95	3.48	16.61
BRT 103-267	32.16	0.82	2.87	17.09
Amadeus 77	32.31	0.85	3.18	18.36
L 88-13	40.01	1.10	3.77	24.72
L 88-33	33.62	0.91	3.17	20.22
L 88-63	39.01	1.06	3.65	23.55
DMS (P ≤ 0.05)	4.56 ^{**}	0.11 ^{ns}	0.50 ^{**}	3.51 [*]

^{*}, ^{**}, ^{ns} = Significativo, altamente significativo y no significativo, respectivamente.

Anexo 3. Valores de área superficial de nódulos (ASN) y distribución en porcentaje a diferentes profundidades (cm) a la floración de 50 líneas endogámicas recombinantes de Amadeus 77. Zamorano, Honduras.

Fuentes de Variación	ASN (cm ²)	Distribución (%) según profundidad de raíces (cm)			
		Adv. §	0-5	5-10	>10
BRT 101-149	8.3	11.4	46.7	3.6	38.3
BRT 101-157	8.0	7.5	50.8	4.6	37.1
BRT 101-159	7.3	5.0	56.7	3.7	34.6
BRT 101-167	7.8	9.2	58.8	6.6	26.3
BRT 101-180	6.9	7.9	48.8	2.9	40.4
BRT 101-189	8.3	3.0	51.7	7.4	37.9
BRT 101-197	8.9	7.9	50.4	5.8	35.8
BRT 101-205	8.2	13.4	46.7	4.9	35.0
BRT 101-211	8.1	7.5	48.8	5.8	37.9
BRT 101-212	7.1	6.4	54.2	10.3	26.2
BRT 101-214	8.6	4.8	55.8	3.5	35.8
BRT 101-215	7.9	11.0	52.1	2.5	24.4
BRT 101-219	7.7	7.1	53.3	3.8	35.8
BRT 101-228	9.2	18.2	47.8	4.9	29.2
BRT 101-232	7.7	3.2	48.8	3.8	44.3
BRT 101-237	10.2	5.4	52.1	4.2	38.3
BRT 101-239	8.5	10.4	54.2	9.6	25.8
BRT 101-248	9.8	18.3	57.5	3.5	30.7
BRT 102-183	8.2	17.8	55.0	3.5	23.8
BRT 102-192	9.5	9.3	45.4	3.3	41.9
BRT 102-196	8.5	9.3	55.8	3.2	31.7
BRT 102-198	9.0	5.8	57.9	3.8	33.8
BRT 102-200	8.3	8.8	49.8	5.6	35.8
BRT 102-209	8.1	3.3	49.6	10.8	36.3
BRT 102-219	8.2	11.3	47.1	5.0	36.7
BRT 102-221	7.7	6.7	51.3	3.8	38.3
BRT 102-222	7.9	3.1	53.5	1.8	41.7
BRT 102-225	9.2	2.6	52.9	9.5	35.0
BRT 102-239	9.5	3.2	49.6	7.3	40.0
BRT 102-242	8.2	6.0	54.2	5.3	37.8
BRT 102-247	9.5	6.3	46.7	7.5	39.6
BRT 103-176	7.9	13.8	42.1	2.1	42.1

Fuentes de Variación	ASN (cm ²)	Distribución (%) según profundidad de raíces (cm)			
		Adv. §	0-5	5-10	>10
BRT 103-179	5.6	7.1	51.7	9.6	31.7
BRT 103-182	7.2	11.8	51.2	9.2	27.9
BRT 103-184	7.8	7.1	52.9	3.3	36.7
BRT 103-188	7.1	10.0	55.0	7.5	27.5
BRT 103-197	7.6	5.3	47.1	9.1	38.6
BRT 103-200	9.3	5.0	42.5	6.7	45.8
BRT 103-201	7.6	4.0	57.5	3.5	35.0
BRT 103-204	6.3	7.8	64.2	4.8	23.3
BRT 103-208	6.6	8.3	47.5	6.3	37.9
BRT 103-209	6.7	6.3	57.5	9.2	27.1
BRT 103-212	6.9	4.5	54.6	6.3	34.6
BRT 103-219	6.6	12.9	50.8	11.7	24.6
BRT 103-220	5.9	6.3	62.5	1.8	29.4
BRT 103-239	7.1	3.8	43.8	12.4	40.0
BRT 103-255	7.6	8.2	54.6	2.5	34.8
BRT 103-259	8.5	3.2	53.3	6.9	36.6
BRT 103-261	8.1	5.2	52.9	7.8	34.2
BRT 103-267	7.6	8.0	53.8	5.8	32.4
Amadeus 77	9.1	5.0	50.8	3.8	40.4
L 88-13	9.7	10.8	47.1	14.6	27.5
L 88-33	7.6	6.0	46.3	6.5	40.8
L 88-63	10.4	2.2	38.3	9.1	50.4
Promedio (n=54)	8.0	7.5	51.7	6.0	35.0
DMS (P≤ 0.05)	2.4**	7.7**	13.3 ^{ns}	ns	ns

** , ns = Altamente significativo y no significativo respectivamente.

§ = Raíces adventicias

Anexo 4. Resultado del análisis de suelo.

pH (H ₂ O)	% M.O	% N total	mg/Kg (Extractante)								
			P	K	Ca	Mg	Na	Cu	Fe	Mn	Zn
5.98	Bajo 1.67	Bajo 0.08	Medio 17	Alto 328	Medio 1240	Medio 160	Normal 100	Bajo 1.1	Alto 155	Medio 88	Bajo 1.3

	2.00	0.2	13					1.7	56	28	1.7	Rango
	4.00	0.5	30					3.4	112	112	3.4	Medio

Anexo 5. Prueba de gota para estimar la concentración de rizobios en el inóculo.

Para la prueba de gota, se usan platos Petri con medio ALM (agar-levadura-manitol) + Rojo Congo refrigerado por tres días y secados dos horas antes. Se divide cada plato en ocho secciones iguales en el fondo externo rotulado con la dilución a usarse (dos repeticiones por dilución) para un total de cuatro diluciones por plato. Se procede de la siguiente manera:

Se diluye 1.0 g de inoculante en 9 ml de agua destilada estéril para obtener la dilución de 1/10; y continuar las diluciones hasta lograr la dilución 1/10⁸.

Se siembra cada dilución en los platos Petri con pipetas Pasteur cortas y estériles.

Se deja reposar el plato hasta que el medio absorba el líquido y se procede a sellarlos, invertirlos e incubarlos a 30 °C × 24 horas.

Se cuentan las colonias de bacterias cuando se observa su crecimiento.

Considerando que una pipeta Pasteur tiene capacidad para 1.0 ml de agua y que su punta más fina permite la salida de 0.03 ml de agua por gota, se determina la cantidad de *Rhizobium* en el inoculante empleado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de células / ml} = \frac{\text{Tamaño de pipeta (ml)} \times \text{No. colonias} \times \text{Factor dilución}}{\text{Tamaño de gota (ml)}}$$

