



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

**EFFECTO DE CONCENTRACIONES DE FÓSFORO, NÍQUEL Y SÍLICE EN EL  
CRECIMIENTO, NODULACIÓN Y FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE N<sub>2</sub> en *Vigna unguiculata*  
(L) Walp, *Vigna unguiculata* ssp *sesquipedalis* y *V. radiata*.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad Central  
de Venezuela, por la Br Mariana Vásquez A.

Como requisito parcial para optar al título de

Licenciado en Biología.

Tutora: Dra. Marialuisa Izaguirre.

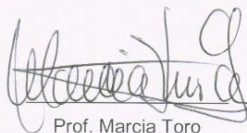
**CARACAS, VENEZUELA**

**ENERO, 2014**

DEL EXAMEN PUBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO DE  
LA Br. MARIANA VÁSQUEZ ARREGOCES

Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Mariana Vásquez Arregoces, C.I: 14992079, titulado "**Efecto de concentraciones de fósforo, níquel y sílice en el crecimiento, nodulación y fijación simbiótica de N<sub>2</sub> en *Vigna unguiculata* (L) walp, *Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis* y *Vigna radiata***", para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los veinte (20) días del mes de enero del año 2014, dejando constar que la Prof. Alicia Cáceres actuó como coordinador del jurado examinador.



Prof. Marcia Toro  
(Jurado)



Prof. Ismael Hernández  
(Jurado)



Prof. Alicia Cáceres  
(Tutora, Coordinador)



Dra. Marialuisa Izaguirre  
(Tutora)

*Dedicado a todos aquellos, capaces*

*de reconocer,*

*La Presencia Divina en una planta.*

## AGRADECIMIENTOS

***“Baruj ata Adon-ay Elo-henu Melej haolam, shehejeianu vekiyamanu vehiguianu lazemán hazé”.*** (Bendito eres Tú, HaShem nuestro D-s, Rey del universo, que nos ha concedido la vida y nos sostuvo, y nos hizo posible llegar a esta ocasión).

*Quiero agradecer a mis padres Rafael Vásquez e Hilda Arregoces quienes con amor me han apoyado y acompañado, en todos los proyectos y etapas, a lo largo de mi vida.*

*A mis hermanos y familia en general, porque sé que este logro lo sienten como propio y de hecho, es de todos nosotros.*

*A mi maestra y amiga Evelys Olivares por acompañarme desde tiempos inmemorables, con inmenso amor, de quien recibí La Vida y de quien día a día recibo y aprendo el aprecio por El Cumplimiento.*

*A mis amigos y colegas Oscar Parraga, Yeznaret Arzolay, Jesús Torres Coy, Eliana Blanco, Ingrid Botero, Jennifer Rodríguez, Michell Alcalá, Elianny López; Eduardo Burgos; Jamileth Moore, Ismael Godoy, Luis Cadenas, Carolina Pérez. Quienes perfilaron gran parte de mi vida académica y profesional; avivaron en mí, con su ejemplo, la pasión y dedicación por la Biología, la Química y por la vida misma. Pero sobretodo les agradezco las vivencias compartidas. Todas ellas dejaron huellas profundas en mí; y son aún fuente de continuos aprendizajes. Agradezco el paso de sus vidas por la mía. Son ustedes, en definitiva, lo mejor de estos años en las aulas de la UCV.*

*Agradezco a los Sres. Alfredo López, Jesús Escobar y William Quintero. Así como a la Lic. Tania Ovalles del Laboratorio de biotecnología y Virología Vegetal, Centro de Microbiología y Biología Celular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, por su incondicional apoyo durante la realización de mi tesis de pregrado. A la Dra. María Luisa Izaguirre Lessmann, por haberme dado todas las facilidades para llevar a cabo los ensayos.*

*A la Sra. Milagros Lovera y Pauline Arrindel del laboratorio de Ecología de Suelos, Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas; por su valioso apoyo, sus enseñanzas y guía, al realizar las determinaciones de fósforo en su laboratorio.*

*En resumen, agradezco a todo aquel que de alguna u otra manera contribuyo a la realización de esta investigación.*

## RESUMEN

Especies del género *Vigna*, constituyen fuentes importantes de proteínas y minerales para la alimentación de las poblaciones localizadas principalmente en países del tercer mundo. Estas especies tienen la capacidad de formar simbiosis con *Rhizobium* lo cual les confiere la capacidad de fijar  $N_2$  atmosférico. Sin embargo, la efectividad de la simbiosis dependerá principalmente de la presencia de niveles óptimos de macro y micronutrientes para el desarrollo de las plantas. Diversos estudios han señalado que, entre los macronutrientes requeridos por las leguminosas, el fósforo (P) es determinante para el establecimiento de las simbiosis con los rizobios mientras que micronutrientes tales como el níquel (Ni) y el sílice (Si) favorecen la formación de los nódulos y la actividad fijadora de los bacteroides.

El principal objetivo de esta investigación fue estudiar el efecto de concentraciones crecientes de P, Ni y Si; en el crecimiento de plantas de frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp), frijol chino (*Vigna unguiculata* ssp *sesquipedalis*) y vainita china (*V. radiata*); inoculadas con cepas efectivas de rizobios. Para estos ensayos, las plantas fueron crecidas en invernadero, en botellas de Leonard conteniendo una solución nutritiva básica, enriquecida con concentraciones crecientes de los nutrientes mencionados a pH 6.8. Antes de la siembra, la mitad de las semillas de cada especie fueron pre-inoculadas con un inoculante comercial de *Bradyrhizobium cowpea* en turba. La solución nutritiva para el resto de las semillas no pre-inoculadas fue fertilizada con 6 mM de N. Los tratamientos incluyeron concentraciones de 1; 5; 15; 30; 60; 100; 250 y 600  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0; 1; 5; 10; 20; 50; 100 y 200  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$ ; 1; 3; y 5  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{SiO}_3$ . Las plantas fueron cosechadas a los 60 días después de la germinación y se determinaron la biomasa aérea y nodular, así como las concentraciones de contenido de ureídos y fósforo en hojas de cada especie.

Los resultados obtenidos en plantas de frijol bayo y vainita china indican una relación directa entre la biomasa aérea de plantas de frijol bayo y la concentración de P en la solución, así como entre las concentraciones de P en hojas y en la solución nutritiva. Mientras que aún la concentración mas baja de Ni tuvo efectos negativos en el crecimiento y nodulación de las plantas. Por el contrario, la adición de Si incrementó la biomasa aérea y nodular y la concentración de ureídos en las hojas. Por su parte el frijol

chino mostró una tendencia a disminuir la biomasa aérea y nodular al aumentar las concentraciones de P y Ni, mientras que se observó un leve incremento en las biomasa aérea y nodulares a concentraciones muy bajas de Si.

Se encontró que la concentración óptima de fósforo, bajo estas condiciones, para las 3 especies es de 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Sin embargo estos resultados indican la necesidad urgente de proseguir con estas investigaciones a fin de determinar los niveles nutricionales óptimos para el desarrollo de estas especies de leguminosas y para la mayor efectividad de la simbiosis con rizobios.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	
1.1. Morfología del género <i>Vigna</i>	3
1.2. Historia y cultivo de <i>Vigna</i>	5
1.3. Fijación simbiótica del N <sub>2</sub> (FSN)	8
1.3.1. Actividad de la ureasa.	12
2. Antecedentes.	
2.1. Nutrientes	14
3. Hipótesis de trabajo	18
4. Objetivos.	
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos específicos	18
5. Materiales y métodos.	
5.1. Material vegetal y siembra	18
5.2. Tratamientos con macro y microelementos	20
5.3. Recolección de muestras	20
5.4. Determinación de parámetros fisiológicos	21
5.5. Análisis estadísticos	21
6. Resultados	
6.1. Efecto de concentraciones crecientes de fósforo, níquel y sílice sobre el crecimiento y la nodulación de <i>Vigna unguiculata</i> , nombre común: frijol común	21



6.2. Efecto de concentraciones crecientes de fósforo, níquel y sílice sobre el crecimiento y la nodulación de <i>Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis</i> , nombre común: vainita china	<b>29</b>
6.3. Efecto de concentraciones crecientes de fósforo, níquel y sílice sobre el crecimiento y la nodulación de <i>Vigna radiata</i> , nombre común: frijol chino	<b>37</b>
7. Discusión de resultados	
7.1. Efecto de concentraciones crecientes de P sobre el crecimiento y la nodulación de <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Vigna unguiculata ssp sesquipedalis</i> y <i>Vigna radiata</i>	<b>45</b>
7.2. Efecto de concentraciones crecientes de Ni sobre el crecimiento y la nodulación de <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Vigna unguiculata ssp sesquipedalis</i> y <i>Vigna radiata</i>	<b>49</b>
7.3. Efecto de concentraciones crecientes de Si sobre el crecimiento y la nodulación de <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Vigna unguiculata ssp sesquipedalis</i> y <i>Vigna radiata</i>	<b>51</b>
8. Conclusiones	<b>54</b>
9. Bibliografía	<b>56</b>
10. Anexos	<b>64</b>

## **INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Concentraciones de nutrientes de la solución nutritiva	<b>19</b>
Tabla 2. Concentraciones de Ni para el crecimiento aéreo y nodular y contenido de ureidos máximo	<b>49</b>
Tabla 3. Concentraciones de Si para el crecimiento aéreo y nodular y contenido de ureidos máximo	<b>52</b>

## **INDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Esquema de semillas de frijol común ( <i>Vigna unguiculata</i> ) y de hojas de vainita china ( <i>Vigna unguiculata ssp sesquipedalis</i> )	<b>4</b>
Figura 2. Esquema de semillas, brotes y hojas de frijol chino ( <i>Vigna radiata</i> )	<b>5</b>

Figura 3. Esquema de la biosíntesis de compuestos nitrogenados en nódulos de leguminosas	10
Figura 4. Esquema de la degradación de urato en alantoína	11
Figura 5. Conversión de alantoína a glioxilato y amonio	11
Figura 6. Estructura química de la ureasa	12
Figura 7. Reacción de la hidrólisis de la urea	13
Figura 8. Biomasa aérea del frijol común ( <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp) con concentraciones crecientes de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	22
Figura 9. Concentraciones de P en hojas de frijol bayo ( <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp) con concentraciones crecientes de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	23
Figura 10. Biomasa aérea del frijol bayo ( <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp) en condiciones crecientes de $\text{NiCl}_2$	24
Figura 11. Biomasa nodular del frijol bayo ( <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp) en condiciones crecientes de $\text{NiCl}_2$	25
Figura 12. Concentración de ureídos en hojas, para frijol bayo ( <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp), en condiciones crecientes de $\text{NiCl}_2$	26
Figura 13. Biomasa aérea del frijol bayo ( <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp) bajo concentraciones crecientes de $\text{H}_2\text{SiO}_3$	27
Figura 14. Biomasa nodular del frijol bayo ( <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp) bajo concentraciones crecientes de $\text{H}_2\text{SiO}_3$	28
Figura 15. Concentración de ureidos en hojas para frijol bayo ( <i>Vigna unguiculata</i> (L) Walp) en concentraciones crecientes de $\text{H}_2\text{SiO}_3$	29
Figura 16. Biomasa aérea de la vainita china ( <i>Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis</i> ) con concentraciones crecientes de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	30

Figura 17. Contenido de fósforo en hojas de vainita china ( <i>Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis</i> ) en concentraciones crecientes de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	<b>31</b>
Figura 18. Biomasa aérea de la vainita china ( <i>Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis</i> ) en condiciones crecientes de $\text{NiCl}_2$	<b>32</b>
Figura 19. Biomasa nodular de la vainita china ( <i>Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis</i> ) en condiciones crecientes de $\text{NiCl}_2$	<b>33</b>
Figura 20. Concentración de ureídos en hojas de vainita china ( <i>Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis</i> ) en condiciones crecientes de $\text{NiCl}_2$	<b>34</b>
Figura 21. Biomasa aérea de la vainita china ( <i>Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis</i> ) a concentraciones crecientes de $\text{H}_2\text{SiO}_3$	<b>35</b>
Figura 22. Biomasa nodular de la vainita china ( <i>Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis</i> ) bajo concentraciones crecientes de $\text{H}_2\text{SiO}_3$	<b>36</b>
Figura 23. Concentración de ureidos en hojas en condiciones crecientes de Si	<b>37</b>
Figura 24. Biomasa aérea del frijol chino ( <i>Vigna radiata</i> ) en condiciones crecientes de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	<b>38</b>
Figura 25. Concentración de fósforo en hojas de frijol chino ( <i>Vigna radiata</i> ) en condiciones crecientes de $\text{KH}_2\text{PO}_4$	<b>39</b>
Figura 26. Biomasa aérea del frijol chino ( <i>Vigna radiata</i> ) en condiciones crecientes de $\text{NiCl}_2$	<b>40</b>
Figura 27. Biomasa nodular del frijol chino ( <i>Vigna radiata</i> ) en condiciones crecientes de $\text{NiCl}_2$	<b>41</b>
Figura 28. Concentración de ureidos en hojas de frijol chino ( <i>Vigna radiata</i> ) en condiciones crecientes de $\text{NiCl}_2$	<b>42</b>
Figura 29. Biomasa aérea del frijol chino ( <i>Vigna radiata</i> ) en condiciones crecientes de $\text{H}_2\text{SiO}_3$	<b>43</b>

Figura 30. Biomasa nodular del frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de

H<sub>2</sub> SiO<sub>3</sub>

**44**

Figura 31. Concentración de ureídos en hojas de frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de H<sub>2</sub> SiO<sub>3</sub>

**45**

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Morfología del género *Vigna*

En Venezuela, después de la cañote, distintas variedades de frijol tales como *Vigna unguiculata* (L) Walp, *Vigna unguiculata ssp sesquipedalis* y *Vigna radiata* forman parte importante de la dieta de los venezolanos (Higuera, 1992). El género *Vigna* pertenece a la familia Fabaceae y está formado por hierbas anuales perennes o subarborescentes, trepadoras, rastreras o erectas, sin pelos uncinados. La raíz es a veces tuberosa, frecuentemente lignificada, muy poco fibrosas y las hojas son trifoliadas y pinnaticompuestas, raramente unifoliadas. El exagerado polimorfismo de los taxones de *Vigna*, hace que el género no esté de momento, definido desde el punto de vista morfológico, y que incluso se considere un conjunto heterogéneo.

En Venezuela se siembran comúnmente las especies *Vigna unguiculata* (L) Walp, *Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis* y *Vigna radiata*. conocidas localmente como frijol bayo, frijol chino y vainita china, respectivamente. El frijol bayo y el frijol chino se caracterizan por sus tallos y hojas glabros, estípulas prolongadas por debajo del punto de inserción en 2 aurículas oblongas, y bractéolas mas largas que las brácteas, o que el tubo del cáliz. Como es característico de especies ampliamente cultivadas, son extremadamente polimórficas, particularmente a lo que respecta al tamaño del fruto. Por otra parte, la vainita china es una leguminosa anual que posee cultivares de porte erecto pudiendo alcanzar una altura hasta de 1 m, con crecimiento principalmente indeterminado y tipo compacto. Su raíz principal es ramificada y extensa; y las inflorescencias racimosas tienen flores de color amarillo, las legumbres contienen semillas de color verde brillante u opaco (Skerma y col., 1991).

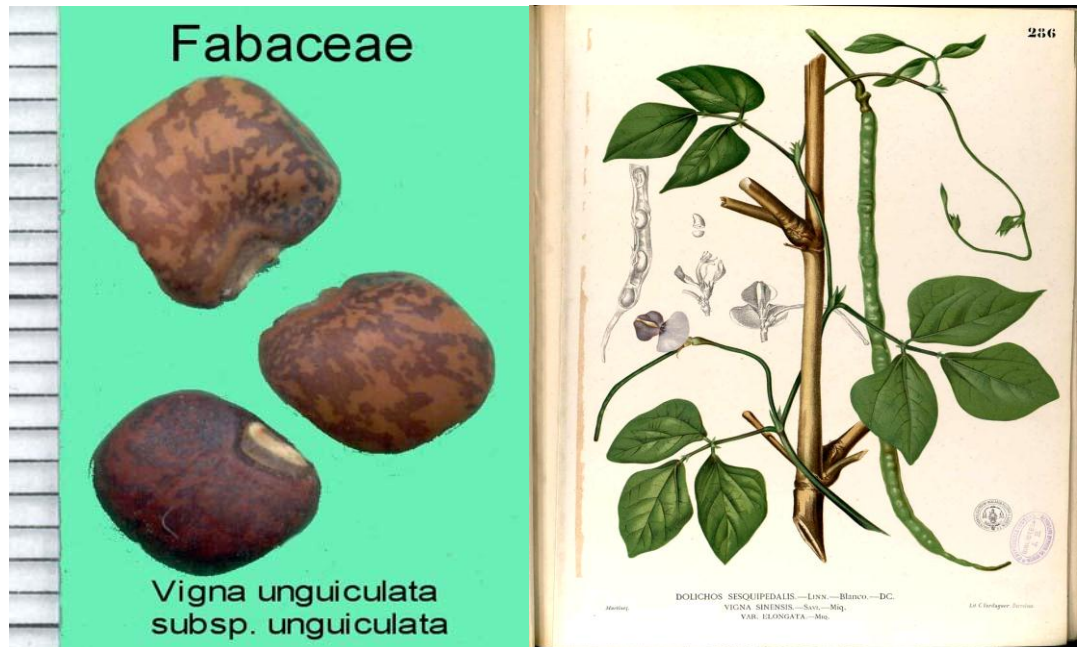


Figura 1. Esquema de semillas de frijol común (*Vigna unguiculata* (L) Walp) y de hojas de vainita china (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) . Imágenes extraídas de [www.commonswikipedia.org](http://www.commonswikipedia.org)

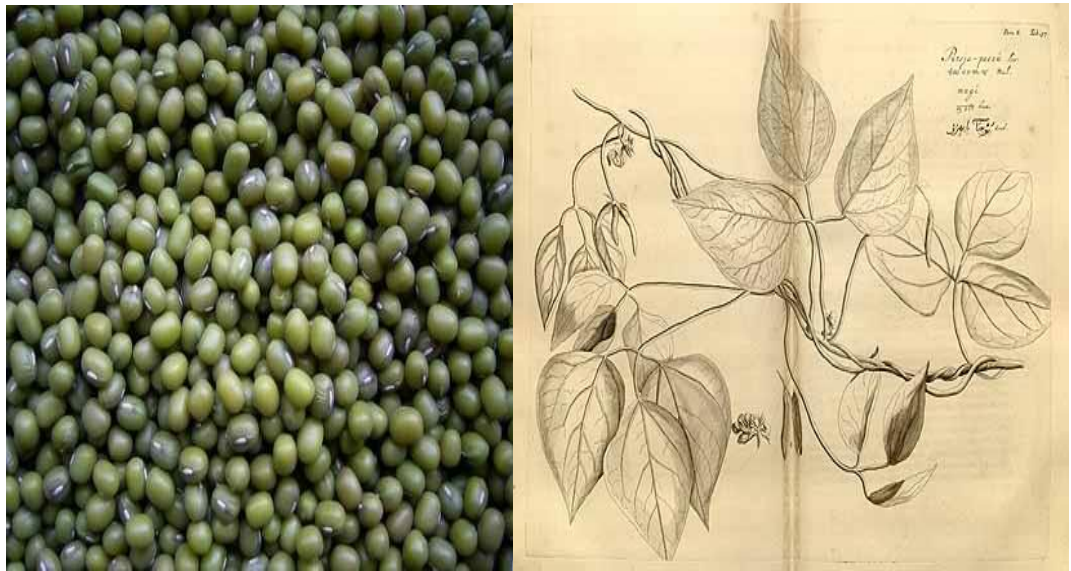


Figura 2. Esquema de semillas, brotes y hojas de frijol chino (*Vigna radiata*). .

Imágenes extraídas de [www.commons.wikipedia.org](http://www.commons.wikipedia.org)

## 1.2. Historia y cultivo de *Vigna*

El cultivo del frijol común (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) es uno de los más extendidos en el mundo, siendo la base de la alimentación de millones de personas en países de climas cálidos y en vías de desarrollo. Incluye unas 20 especies de importancia económica originadas en las zonas cálidas del viejo y nuevo mundo; todos importantes

ingredientes en la cocina asiática y africana y algunos de ellos usados hoy en día a nivel global (Fery, 2002; Coe, 2004). En el caso particular del frijol común (*V. unguiculata*), se ha dado una amplia extensión de su distribución y consumo por su adaptabilidad y escasos requerimientos de cultivo, siendo además una especie muy variable de la que se han explotado distintas características, surgiendo así distintas variedades dependiendo del interés con el cual se cultive la planta. Además de sus uso como vegetal fresco, fuente de fibras textiles, y granos para el consumo *V. unguiculata* ha sido reportada como fuente de alimento para el ganado, así como vegetal de hoja (Larkom, 2008). En Venezuela el cultivo del frijol es mucho menos relevante que el de otras leguminosas, siendo bastante conocida la preferencia que se le da en el país a la caraota (*Phaseolus vulgaris*) a la hora de cultivar y consumir granos. Sin embargo, algunos autores destacan al frijol entre los granos más importantes en el país, junto a las mencionadas caraotas, el quinchoncho (*Cajanus cajan*) y la arveja (*Cicer arietinum*) (Infante y col., 2004; De Gouveia y col., 2005). El frijol se cultiva en la zona de los llanos centrales, en los estados Guárico, Carabobo, Aragua, Portuguesa y Anzoátegui. Si bien se encuentran sistemas tecnificados para su cultivo, éste es en mayor parte de tipo conuco, es decir, a pequeña escala y en muchos casos para consumo propio del productor. Además hay que destacar, que suele ser un cultivo de secano, es decir que los productores no invierten en riegos para las plantas, permitiendo en su lugar que estas absorban el agua de lluvia o la almacenada en el suelo (De Gouveia y col., 2005).

Se conocen registros de la aparición de *V. unguiculata* ssp. *unguiculata* desde el 2000 A.C., siendo entonces recolectada –si no cultivada– por sus semillas en el África Subsahariana. El cultivo pasa a Europa y Asia entre el 200 y 300 A.C. y en Asia se vuelve muy popular en China e India por sus largas vainas, las cuales son usadas como legumbres frescas estando aún inmaduras (Paludosi, 1997). Además de sus múltiples usos como vegetal fresco, alimento para animales y fuente de granos, tiene la ventaja de crecer en condiciones agroecológicas muy pobres, es decir, suelos ácidos y de baja fertilidad, fuertes sequías o altas temperaturas (Timko y col., 2007; Larkom, 2008). Además, el periodo de cultivo es extremadamente rápido pudiéndose obtener la primera cosecha antes de los 2 meses luego de la siembra y en las principales variedades el periodo de cosecha suele ser lo suficientemente largo como para proveer vainitas frescas durante meses (Vaughan y col., 2009). Si bien no suelen reportarse datos sobre el cultivo



de las distintas subespecies de frijol por separado, es bien sabido que los principales productores de *V. unguiculata* son los países africanos, reconociéndose a Nigeria como el mayor productor a nivel mundial (Phillips, 2013). En dichos países suele presentarse el cocultivo de frijol con cereales o tubérculos para mantener la fertilidad del suelo por medio de la fijación de nitrógeno en los nódulos de la leguminosa. Esta práctica resulta particularmente importante para productores de escasos recursos o con limitaciones en la extensión de terreno fértil (Blade y col., 1997). En Venezuela, la vainita china se cultiva de forma muy restringida, siendo apenas conocida una localidad (Turén) en el estado Portuguesa en la cual se considera importante este rubro. Se cultiva al final de la época de lluvias (cultivo de secano) y por su corto ciclo y aportes al suelo, suele ser parte de la rotación de cultivos (Infante y col., 2003). Sus bajos requerimientos nutricionales, e hídricos, su corto periodo de crecimiento, su valor nutritivo y su adaptabilidad a climas cálidos hacen de estos cultivos una opción atractiva para los productores del país.

El frijol chino o a veces llamado frijolito chino, surge alrededor del 2000 A.C., originalmente en India y Pakistán (Brink y Belay, 2006; Krishna, 2010). Su cultivo se ha extendido al resto de Asia, África, América y Oceanía (Infante y col., 2004, Madriz, 2004), siendo usado en la cocina oriental y apreciado por su alto valor nutritivo (Coe, 2004, Lambrides y Godwin, 2007). Este cultivo presenta mayores dificultades y menor rendimiento que el de la vainita china, ya que está más limitado por su baja resistencia a altas temperaturas, sequía, condiciones edafológicas, así como por enfermedades y pestes (Lambrides y Godwin, 2007). La duración del cultivo es de dos a tres meses y si bien requiere riego periódico, debe cuidarse que el suelo tenga buen drenaje ya que la planta es susceptible a daños por inundación. Gracias a la corta duración de su ciclo, *V. radiata* suele cocultivarse o alternarse con cereales, los cuales se benefician del nitrógeno absorbido por la planta de forma simbiótica (Krishna, 2010). El cultivo de frijol chino, es relativamente reciente en Venezuela, sembrándose en Portuguesa, Zulia y el oriente del país. Se produce a salida de lluvias con la finalidad de recuperar el suelo (Santella y col., 2000). Estos mismos autores señalan que la especie presenta un buen comportamiento en periodos lluviosos en contraste con otras leguminosas (caraota, frijol común) que ven disminuida su producción en periodos más húmedos. Sin embargo, acotan que la selección de fenotipos de rápido crecimiento dificulta la cosecha, ya que la altura de las plantas hace que caigan al suelo con las lluvias

### 1.3. Fijación simbiótica del N<sub>2</sub> (FSN)

De manera resumida se puede indicar que son las leguminosas el único grupo de plantas capaces de establecer simbiosis con  $\alpha$ -proteobacterias gram negativas de vida libre, pertenecientes a la familia de las *Rhizobiaceas* (Cocking, 2003). Mediante esta simbiosis específica, los rizobios fijan el nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) y se lo donan a la planta a cambio de fotosintetatos para su metabolismo. El establecimiento de esta simbiosis entre leguminosas y los rizobios es un proceso bien coordinado de intercambio de señales entre ambos simbioses, que se inicia con la síntesis de flavonoides e isoflavonoides en las raíces de las plantas, los cuales al ser excretados a la rizósfera, ejercen un efecto quimiotrópico sobre los rizobios. Estas moléculas de señal, activan, a su vez, en los rizobios: a) la expresión coordinada de los genes *Nod* y *nif* localizados en islas simbióticas, plásmidos o cósmidos, b) la síntesis de proteínas *NodD*, c) la excreción de factores de nodulación que canalizan la adhesión de los rizobios a la punta de los pelos radicales, redireccionando su crecimiento lateral, formando una curvatura o rizo, d) la formación del canal de infección que conlleva a un rearrreglo de los microfilamentos de actina (Cárdenas y col., 2003) y, e) la rápida división de las células basales del pelo radical a ser colonizadas por los rizobios (Prasad y col. 2007).

Por su parte los pelos radicales son extensiones subcelulares de la epidermis de la raíz y constituyen el sitio de entrada de los rizobios, por lo cual han sido objeto de numerosos estudios, que describen en detalle las cuatro deformaciones típicas que sufren durante los eventos tempranos de la simbiosis (Jungk, 2001). En un trabajo recientemente publicado por Muñoz y col. (2012), los pelos modificados en radículas de soya por la adhesión de los rizobios, se clasificaron en rizados, ondeados, ramificados y abultados. Sin embargo, una investigación realizada por Yan y Lynch (1998), señala una altísima variabilidad genética, con respecto a la localización y morfología de los pelos en distintos genotipos de *P. vulgaris*.

Finalmente, la colonización de las células basales del pelo por los rizobios y la activa multiplicación celular conllevan a la formación de una estructura denominada nódulo, en donde el N<sub>2</sub> es convertido en compuestos nitrogenados, que son transportados

hacia los órganos de la planta (Essenling y col., 2003). Una vez dentro del nódulo, los rizobios sufren un proceso de re-diferenciación convirtiéndose en bacteroides, en los cuales se ensambla la enzima nitrogenasa responsable de reducción del  $N_2$  a  $NH_3$  (Schubert, 1986), cuyos co-factores son el hierro (Fe) y el molibdeno (Mo) (Leigh, 1995; Ribbe y col., 1997). Los bacteroides, en números variables, son encapsulados dentro de una membrana peribacteroidal, conformándose así las unidades fijadoras de  $N_2$  conocidas como simbiosomas (Izaguirre-Mayoral y col., 1992), localizadas principalmente en la zona central del nódulo, en la denominada zona de infección en cuyas células se sintetiza la leghemoglobina. Esta hemo-proteína, es la enzima encargada de reducir al mínimo la concentración de  $O_2$  intracelular, ya que el metabolismo en los bacteroides es microaeróbico. A su vez, la leghemoglobina confiere el típico color rojo al interior de los nódulos, por lo que es comúnmente considerado como un indicador de la efectividad de los simbiosomas.

En la zona de infección del nódulo co-existen las células conteniendo los simbiosomas y las células intersticiales, donde ocurre la transformación enzimática del  $NH_3$  en ureídos (alantoína y ácido alantoico) (Shelp y Ireland, 1985; Winkler y col., 1985; Vadez y Sinclair, 2001). La actividad de las enzimas uricasa y alantoinasa, ya ha sido demostrada en nódulos de caraotas (Izaguirre-Mayoral y col, 1992). Esta zona de infección, está rodeada por una corteza interna de 1-2 capas de células y 4-6 capas de células epidérmicas, en las cuales se encuentran los haces vasculares responsables de transportar los ureídos, hacia la parte aérea de la planta. Estos haces vasculares, a su vez, suplen a los simbiosomas con los fotosintetatos bacteroides, para sus funciones metabólicas y generación de ATP.

En este trabajo se midió la concentración de ureídos en hojas para estimar la fijación simbiótica de  $N_2$  (FSN), ya que las leguminosas consideradas típicamente tropicales como la soya, la caraota y el frijol han sido clasificadas, específicamente como exportadoras de ureídos (Taíz, 2006). Los ureídos se encuentran mayormente en el xilema de las leguminosas (Figura 3). Aunque algunos autores han propuesto que también podrían ser formados por la condensación de la urea con uno o dos compuestos de carbono (glioxilato parece ser el mejor candidato); de lo que no hay duda es que los ureídos son producto del catabolismo de las purinas (Todd y col., 2006).

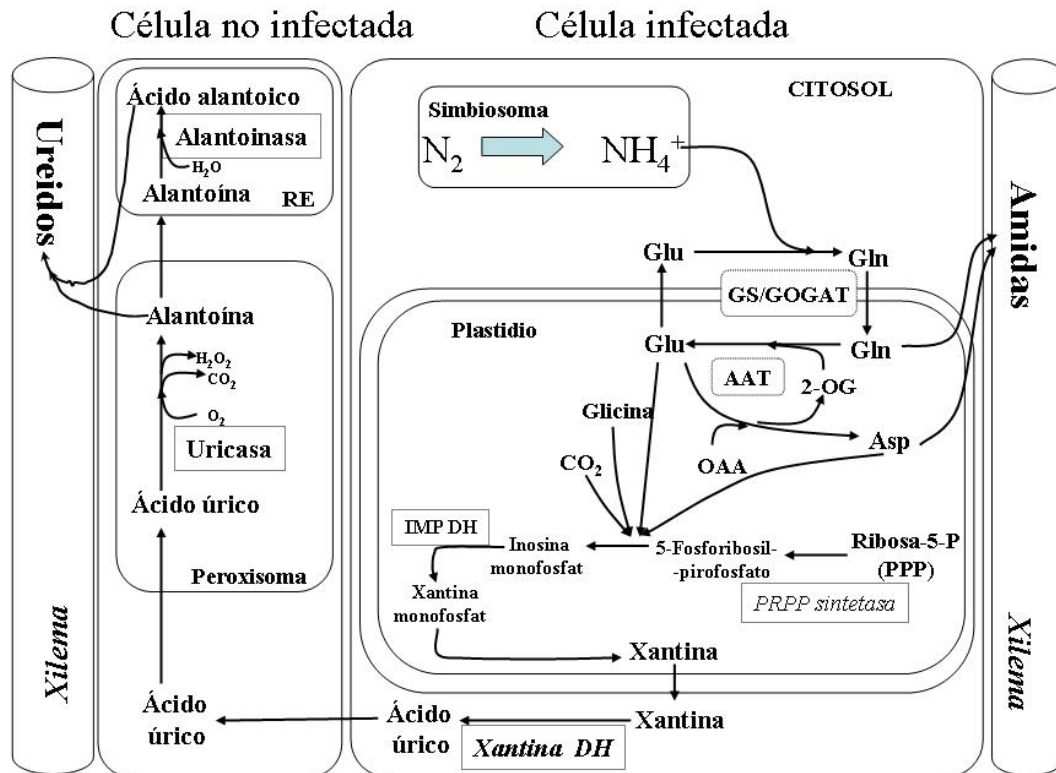


Figura 3. Esquema de la biosíntesis de compuestos nitrogenados en nódulos de leguminosa. Imagen extraída de [www.unavarra.es](http://www.unavarra.es)

En la figura 3, observamos que en las células infectadas de los nódulos, la xantina deshidrogenasa actúa sobre las xantinas, dando como producto ácido úrico. El ácido úrico se mueve a las células no infectadas del nódulo donde se oxida formando alantoína (Atkins y Smith, 2002). Esta reacción es catalizada por la urato oxidasa (uricasa) y ocurre en los peroxisomas, mientras que en el retículo endoplasmático la alantoinasa actúa sobre la alantoína, dando como producto el ácido alantoico. La reacción de degradación de urato a alantoína se muestra en la figura 4

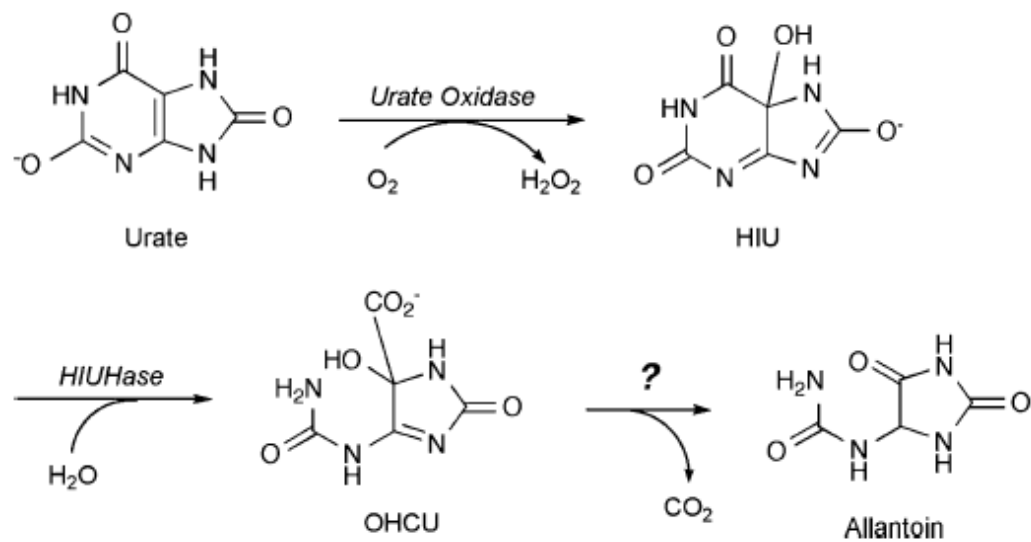


Figura 4. Esquema de la degradación de urato en alantoína.

La completa utilización del N presente en el ácido alantoico, requiere que los dos grupos de ureidos sean convertidos amoniaco. De acuerdo a la siguiente reacción:

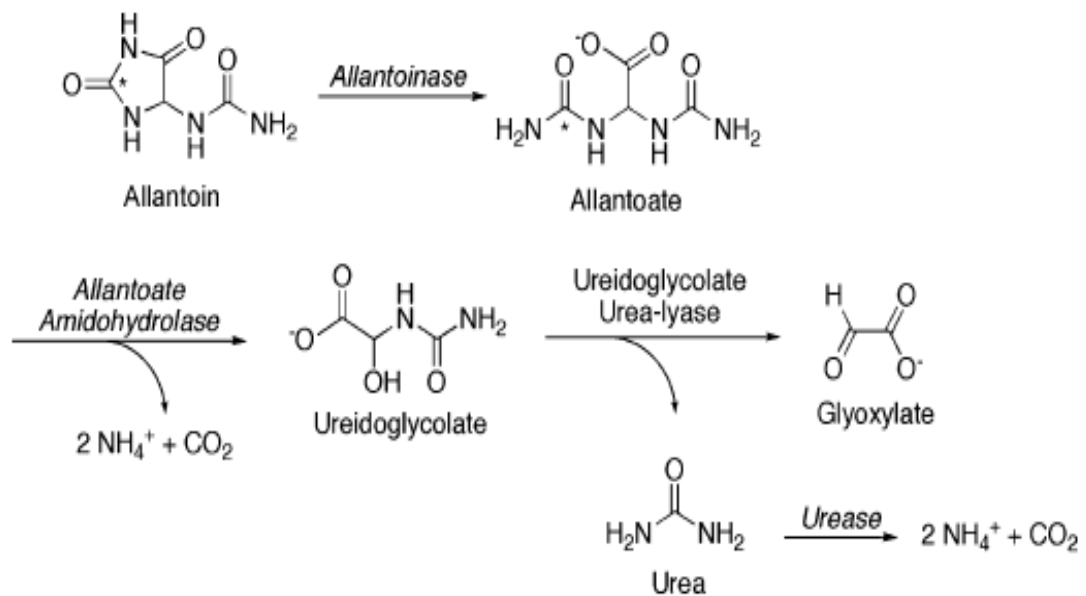


Figura 5. Conversión de alantoína a glioxilato y amonio.

Se puede observar que en el último paso de esta serie de reacciones, por la acción de la ureasa se generan 2 iones amonio y se libera dióxido de carbono.

### 1.3.1. Actividad de la ureasa.

La ureasa es una enzima dependiente de níquel que cataliza la hidrólisis de la urea. Tiene un peso molecular de 545,000 Da y consiste en seis subunidades idénticas de 90.790 Da, organizada en una estructura bipiramidal trigonal. El sitio activo está compuesto por un dímero de Ni (II), siendo la geometría de coordinación octaédrica distorsionada (Figura 6)

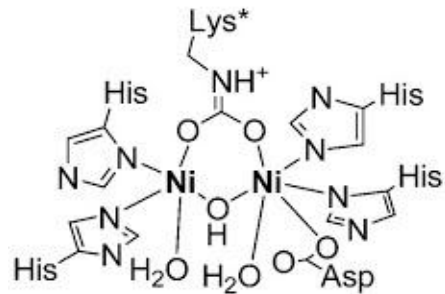


Figura 6. Estructura química de la ureasa

Esta enzima participa en el proceso de hidrólisis de la urea constituyendo un factor crítico en la regulación de nitrógeno; debido a la correlación existente entre el N de la biomasa microbiana con el N mineralizable y la actividad ureasa (Zantua y col., 1997, Hassett y Zak, 2005).

Es una de las diferentes enzimas que existen en el suelo y pertenece al grupo de las amidohidrolasas; cuya función principal es actuar sobre enlaces C-N (Figura 7) rompiendo en secuencias de dos dicho enlace, donde el carbamato es el compuesto intermedio en la reacción, de manera que éste es el sustrato obligado para el segundo paso de la reacción hidrolítica total (Tabatabai,1994; Pascual y col., 2002).



Si el pH es menor que 6.2, la hidrólisis de la urea es la siguiente:



Figura 7. Reacción de la hidrólisis de la urea

Debido a su origen microbiano su actividad es extracelular. Esta enzima puede formar complejos muy estables (ureasa-humus) con los coloides del suelo (Pascual y col., 2002).

El establecimiento de esta simbiosis con rizobios, constituye un ahorro significativo para los agricultores que siembran leguminosas de grano, al requerir menores aplicaciones de fertilizantes nitrogenados.

Entre las leguminosas de grano con interés comercial, encontramos diferentes frijoles que pertenecen a distintas especies del género *Vigna*. Sin embargo, la situación de este rubro agrícola en el campo se complica ya que, en Venezuela la selección de variedades locales de frijoles se lleva a cabo fertilizando las plantas con nitrógeno químico y las siembras son en base a fertilización nitrogenada sin el uso de biofertilizantes, a pesar del cúmulo de información publicada. Los datos señalan que el establecimiento de esta simbiosis con rizobios permite a las leguminosas, en general, explorar suelos deficientes en N (Sicardi de Mallorca y Izaguirre-Mayoral, 1994; Izaguirre-Mayoral y col., 1995; Izaguirre-Mayoral y Vivas 1996; Izaguirre-Mayoral y col., 2000; Izaguirre-Mayoral y col., 2002). Según información suministrada por agricultores locales, la ausencia de inoculantes en base a rizobios no favorece su uso pero, además, ensayos previos señalan una respuesta muy baja de las variedades locales de frijol a la inoculación. Esto último ha sido atribuido a la combinación de bajos niveles nutricionales en los suelos tropicales (Izaguirre-Mayoral y col. 1992; 1995).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Nutrientes

Entre los macronutrientes, el fósforo (P) es muy importante en el establecimiento de las simbiosis con rizobios en plantas de soya, caraota y frijol (Izaguirre-Mayoral y col., 2002; Izaguirre-Mayoral y Sinclair, 2005; Izaguirre-Mayoral y Olivares, 2006); mientras que son escasas las publicaciones que describen la importancia de micronutrientes tales como el sílice (Si), y el níquel (Ni) para el establecimiento de la simbiosis (Klucas y col., 1983; González y col., 2005).

El P forma parte de las moléculas de ATP, que son las responsables de la liberación e intercambio de la energía indispensable para los procesos de fijación simbiótica de N<sub>2</sub> (FSN) por la alta energía que este proceso requiere (16 moléculas de ATP/N<sub>2</sub> fijado) a lo que se debe sumar el consumo para la formación de los tejidos de los nódulos y para los procesos de reconocimiento genético (señales entre la planta y el rizobio). El P también es un constituyente de estructuras macromoleculares como la molécula de ADN, portadora de la información genética, y del ARN, estructura responsable de la traducción de la información genética al formar un puente entre las unidades de ribonucleósido para formar las mismas (Marschner, 1995). Sin embargo del análisis de los resultados publicados hasta el presente; es posible detectar la escasa o casi nula información disponible sobre la respuesta de variedades locales de frijoles dependientes de la fijación simbiótica de N<sub>2</sub> a deficiencias nutricionales. Según Bell y col. (1990), se requieren contenidos de P entre 0.3-0,5% del peso seco para el desarrollo óptimo de la planta, mientras que contenidos superiores al 1% de la materia seca son tóxicos. Por ejemplo, leguminosas tropicales como el grano negro (*Vigna mungo*), son bastantes sensibles al P y la toxicidad tiene lugar alrededor de contenidos de fósforo del 0,6- 0,7% (Bell y col., 1990). Es sabido que deficiencias de P limitan la expansión y el área foliar (Fredeen y col., 1989), así como también del número de hojas (Lynch y col., 1995).

Por su parte el crecimiento de las raíces es mucho menos inhibido (en comparación con el tallo) en virtud de la deficiencia de fósforo, lo que lleva a una disminución en la relación tallo- raíz. De acuerdo a Marschner (1995) en caraota



(*Phaseolus vulgaris*), esta relación disminuyó de 5,0 con suficiente P a 1,9 en plantas deficientes en fósforo. Como regla general, la disminución de la relación tallo-raíz está correlacionada con un incremento en la partición de carbohidratos alrededor de la raíz indicado por un aumento pronunciado en el contenido de sacarosa de las raíces de las plantas deficientes en P. La deficiencia de P puede incluso estimular la tasa de elongación de las células individuales de la raíz y la raíz (Marschner, 1995). Las raíces de frijol también pueden cambiar su curvatura geotrópica en respuesta a la baja disponibilidad de P, cambiando así el volumen total de suelo explorado por el paraguas de raíces basales, así como la proporción del sistema de raíces en la capa superior del suelo, donde la disponibilidad de P es normalmente mayor que en el subsuelo. La variación genética también se ha observado para el gravitropismo bajo estrés por P. Este tipo de explotación selectiva de microambientes específicos del suelo, podría contribuir significativamente a la eficiencia del sistema radicular, mediante la asignación de los gastos de C a las porciones del medio ambiente con la mayor disponibilidad de P (Lynch y Beebe, 1995).

Otros estudios han señalado al Ni como micronutriente importante para la actividad de las enzimas ureasa e hidrogenasa en los nódulos de canavalia y soya (Dixon y col., 1975; Welch, 1981; Klucas y col., 1983; Eskew y col., 1984; Bai y col., 2006). Debido a que la ureasa se encuentra en los órganos y los tejidos de las plantas, y que el Ni es un cofactor necesario, se esperaría que la deficiencia de Ni influya en el catabolismo de los ureidos y por lo tanto en la disponibilidad de N almacenado como compuestos para los procesos de crecimiento y desarrollo. Existe actualmente un compendio de literatura que avala el uso del Ni en cultivos de leguminosas, ya que estimula el funcionamiento de la simbiosis y la resistencia a patógenos (Brown y col., 1987; Mishra y Gerendas, 1999; Malavolta y col., 2007). Resultados de experimentos en el campo señalan un incremento de la nodulación y el rendimiento de soya y frijol por la adición de hasta 40 g de Ni ha (Welch, 1981). Resultados publicados anteriormente también indican que la deficiencia de Ni en cebada, frijol, soya y trigo, entre otras especies, altera el metabolismo de aminoácidos, malato, y de varios aniones inorgánicos, así como también de intermediarios del ciclo de la urea (Arg, Orn y citrulina) (Brown y col., 1990). Sin embargo, la importancia biológica y agrícola del Ni ha sido cuestionada debido a los bajos niveles requeridos por las plantas (alrededor de 1-100 ng.g<sup>1</sup> de peso seco) en relación con la abundancia relativa

de Ni en la mayoría de los suelos ( $\geq 5 \text{ Kg ha}^{-1}$ ) (Bai y col., 2006). En el suelo, las concentraciones más altas de Ni se presentan en suelos arcillosos y limosos y con alto contenido de materia orgánica. Aunque fuentes antropogénicas de Ni, en particular la actividad industrial, pueden incrementar su concentración en los mismos. La bioacumulación del Ni en el humus es pronunciada y esta favorecida por la presencia de ligandos orgánicos que contienen nitrógeno y azufre, y a concentraciones elevadas puede ser tóxico para las plantas (Sauerbeck y Hein, 1991). En suelos ácidos la movilidad del Ni es media y puede llegar a ser muy baja en suelos neutros a alcalinos (McBridge, 1995), siendo la solubilidad del Ni inversamente proporcional al pH afectando además la absorción por la planta. Los compuestos solubles de  $\text{Ni}^{+2}$  pueden ser absorbidos por la planta mediante difusión pasiva, transporte activo y a través del sistema de transporte de iones  $\text{Mg}^{+2}$  (Seregin y col., 2006). Entre los demás factores que afectan el proceso de absorción destacan la concentración de  $\text{Ni}^{+2}$ , el metabolismo de la planta, la presencia de otros metales y la composición orgánica (Seregin y col., 2006).

En paralelo, Clarkson y col. (1980) han señalado que el Si incrementa la productividad y calidad de las cosechas agrícolas de arroz, maíz, trigo, cebada, caña de azúcar y frijol, entre otros. Sin embargo y a pesar de su enorme importancia en la nutrición de plantas, el papel del Si en el crecimiento de las plantas solo ha sido estudiado en profundidad en la última década, pues se le consideraba anteriormente como un micronutriente de poca importancia. En leguminosas, estudios recientes (Newalmondo y Dakora, 1999) han proporcionado evidencias del incremento de la fijación simbiótica de  $\text{N}_2$  (FSN) en frijoles suplementados con Si, además de promover el crecimiento de las plantas de soya, el frijol y el trigo (Williams y Vlamis, 1957; Horst y Marschner, 1978; Miyake y Takahashi, 1985). La estimulación de la FSN en frijoles por Si parece estar asociada al incremento en el número de bacteroides y simbiosomas en los nódulos de las raíces (Newalmondo y col., 2001). Aparentemente, el Si promueve el crecimiento de las plantas mediante un aumento en la capacidad de almacenamiento y distribución de carbohidratos requeridos para el crecimiento, incremento de la resistencia a enfermedades causadas por hongos y bacterias y plagas (Aery y Jagetiya, 2000) y mayor tolerancia a las condiciones desfavorables de clima, al estimular el desarrollo y la actividad de estructuras poliméricas en la cutícula, los tricomas y fitolitos en la superficie de las hojas (Epstein, 1994; Lima- Filho, 2010). Por ejemplo, Lux y col. (2003) señalaron

que la aplicación de Si incrementa el crecimiento vegetativo de *Phyllostachys heterocycla*. Por su parte, Guo y col. (2006) así como Mali y Aery (2007) observaron que la adición de Si en los suelos con deficiencia de este micronutriente, daba como resultado el incremento de la raíz y de la biomasa aérea en alfalfa.

También se ha encontrado que la presencia del Si, además de permitir la colonización por microorganismos simbióticos (bacterias y hongos), promueve igualmente la colonización de las raíces por algas, líquenes, bacterias y micorrizas, de esta manera mejora la FSN y absorción de P entre otros minerales (González y col., 2005). De hecho, Kalapathy y col. (2002) reportan que el Si aumenta la nutrición del P en las plantas de un 40 a 60 % e incrementa la eficiencia de la aplicación de roca fosfórica de un 100 a 200 %, promoviendo de esta manera la transformación del P no disponible para la planta en formas asimilables y previniendo la transformación de fertilizantes ricos en fósforo en compuestos inmóviles. Incluso fertilizantes de lenta liberación se pueden fabricar con materiales ricos en Si (Kalapathy y col., 2002). Por otra parte, Epstein (2009) indica que el Si jugará un papel preponderante cuando, debido al aumento de la población del planeta, se deban cultivar de forma más intensiva las buenas tierras o hacer las tierras marginales productivas colocando a los cultivos bajo tensión. El autor estima que de 6,8 billones de habitantes la población crecerá hasta alcanzar los 9 billones en tres décadas y que para ese entonces tendremos que producir una mayor cantidad de alimentos en un área finita de la tierra (Epstein, 2009) valiéndonos de los beneficios de estos micronutrientes. Es importante señalar que tratamientos con Si incrementan la fertilidad del suelo a través de mejoras en la retención y disponibilidad del agua, así como de sus propiedades físicas y químicas, manteniendo los nutrientes en forma disponible para la planta (Della y col., 2002, Kalapathy y col., 2002). Entre otros beneficios se menciona la disminución de la toxicidad por metales pesados, como por ejemplo Al y Mn en plantas de frijol (Horst y Marschner, 1978; Iwasaki y col., 2002).

### 3. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las leguminosas son capaces de establecer relaciones simbióticas con las bacterias del suelo, tales como rizobios. Esta simbiosis pareciese estar condicionada por los nutrientes presentes en el suelo. Concentraciones óptimas de P, Ni y Si podrían favorecer la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN)

### 4. OBJETIVOS.

#### 4.1. Objetivo general

- Establecer las concentraciones de Ni, Si y P que determinan el óptimo desarrollo de plantas en dos variedades locales de *Vigna unguiculata* (L) Walp ssp. *sesquipedalis* y *Vigna radiata*.

#### 4.2. Objetivos específicos:

- Cuantificar el efecto de concentraciones crecientes de P sobre el crecimiento en dos variedades locales de *Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* y *Vigna radiata*.
- Cuantificar el efecto de concentraciones crecientes de Ni y Si sobre el crecimiento y la fijación simbiótica de N<sub>2</sub> en dos variedades locales de *Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* y *Vigna radiata*.
- Cuantificar el efecto de concentraciones crecientes de Ni y Si sobre la nodulación en dos variedades locales de *Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis* y *Vigna radiata*

### 5. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 5.1. Material vegetal y siembra.

En este trabajo de investigación se utilizaron semillas de *Vigna unguiculata* (L) Walp, *Vigna unguiculata* (L) Walp ssp. *sesquipedalis*, y *Vigna radiata*, conocidas localmente como frijol bayo, frijol chino y vainita china, respectivamente. Las semillas de frijol chino y vainita china fueron suministradas por el Prof. Dr. Mario Garrido (Facultad de

agronomía, UCV, Maracay) y las de frijol bayo fueron donadas por el Sr. Saúl Flores (Centro de ecología, IVIC).

Las semillas se esterilizaron sumergiéndolas en una solución de etanol al 70%, con agitación suave, por aprox. 5 min; posteriormente fueron lavadas con agua destilada hasta la total eliminación del etanol. Una vez desinfectadas, las semillas fueron embebidas por 12 h en agua destilada a temperatura ambiente.

Antes de la siembra, la mitad de las semillas de cada especie fueron pre-inoculadas con un inoculante comercial en base a turba que contiene un mínimo de  $10^9$  células de *Bradyrhizobium cowpea*/g turba (Novoenzimes, USA), en una proporción de 2 g/100 semillas.

Las semillas pre-inoculadas se sembraron en número de 4-6 en botellas estériles de Leonard que contenían 1 Kg de arena estéril en el compartimento superior y 1 L de solución básica nutritiva en el compartimento inferior (Tabla 1). Las plantas crecieron en un invernadero a prueba de insectos en el Centro de Microbiología y Biología Celular del IVIC, ubicado a 1500 m.s.n.m con temperatura media entre 28/20 °C día/noche la cual se mantuvo gracias a una combinación de extractores y resistencias de activación automática; bajo condiciones de luz natural incrementada por un campo de luces fluorescentes y fosforescentes con fotoperiodo de 12 h.

En el invernadero, las botellas fueron colocadas a una distancia aproximada de 20 cm entre ellas. Cada dos días, o según era necesario, la solución nutritiva se complementó para reponer las pérdidas por evapotranspiración. Luego de la germinación las plantas eran raleadas a una planta por botella

Tabla 1. Concentraciones de nutrientes de la solución nutritiva

<b>CaSO<sub>4</sub></b>	<b>4 mM</b>
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	1mM
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	0,1 μM

<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	1 mM
<b>MnSO<sub>4</sub></b>	20 μM
<b>Fe-EDTA</b>	20 μM
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	4 μM
<b>ZnSO<sub>4</sub></b>	1,6 μM
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	1,6 μM
<b>NaMoO<sub>4</sub></b>	0,1 μM
<b>pH= 6,8</b>	
<b>* KNO<sub>3</sub> 6mM se le colocaron a las plantas que no fueron previamente inoculadas</b>	

## 5.2. Tratamientos con macro y microelementos

Las plantas fueron crecidas en las siguientes concentraciones crecientes de P 1, 5, 15, 30, 60 y 100 μM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. La concentración de P de la solución nutritiva que resultó en el mayor desarrollo de la biomasa aérea (100 μM) fue utilizada para la evaluación de la respuesta de las plantas a concentraciones crecientes de Ni (0, 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 μM NiCl<sub>2</sub>); y a concentraciones crecientes de Si (1, 3 y 5 μM H<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>). En cada caso se ajustó el pH de la solución a 6,8 con KOH ó HCl según fuera necesario. Cada tratamiento constó de un mínimo de 5 plantas.

## 5.3. Recolección de muestras

Las plantas se cosecharon a las 6 semanas después de la germinación, y fueron inmediatamente separadas en hojas, tallos, raíces y nódulos. Cada uno de los compartimentos de las plantas fue colocado en bolsas de papel previamente identificadas, y secados en una estufa a 80°C, hasta peso seco constante.

#### **5.4. Determinaciones de parámetros fisiológicos.**

El desarrollo de las plantas se determinó midiendo el peso seco de hojas, tallos, raíces y nódulos en una balanza analítica. Posteriormente, las hojas secas, sin pecíolos, se molieron en un molinillo de café marca Moulinex hasta obtener un polvo fino. Submuestras de 100 mg de hojas molidas se colocaron en tubos de ensayo. A cada muestra se le agregó 3 mL de 50 mM buffer fosfato potasio, pH 7-7.2, y se congelaron en un congelador a -20 °C hasta su procesamiento. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente, se les añadió 3 mL de etanol técnico y fueron sometidas a hervor, 3 veces entre 3-5 horas, cada vez, reponiéndose el etanol que se evaporaba. El extracto final fue aforado a un volumen final de 25 mL con agua destilada. De estos extractos, se tomaron 3 ml para la determinación colorimétrica de ureidos en hojas, con NaOH y HCl, según protocolos estandarizados en el laboratorio (Izaguirre-Mayoral y col., 1992)

Paralelamente se realizó la digestión enzimática de muestras de 300 mg de hoja/tratamiento, con ácidos nítrico y perclórico, de acuerdo al protocolo descrito por Miller (1998). Posteriormente la extracción de P en hojas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Murphy y Riley (1962).

#### **5.5. Análisis estadísticos**

Los resultados se presentan como la media estadística de 5 replicados  $\pm$  el error estándar de la media estadística. Todos los resultados fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con  $p \leq 0.05$  usando el programa Graph Prism, versión 2007.

### **6. RESULTADOS**

#### **6.1. Efecto de concentraciones crecientes de P, Ni y Si sobre el crecimiento y la nodulación de *Vigna unguiculata* (L) Walp, nombre común: frijol bayo**

Las plantas de frijol bayo mostraron su máximo desarrollo y máximos contenidos de P en las hojas cuando fueron crecidas en 60  $\mu$ M P (Fig. 8 y Fig 9), encontrándose que concentración de P <60  $\mu$ M y >60  $\mu$ M fueron deficientes y tóxicas respectivamente para esta variedad local de frijol.

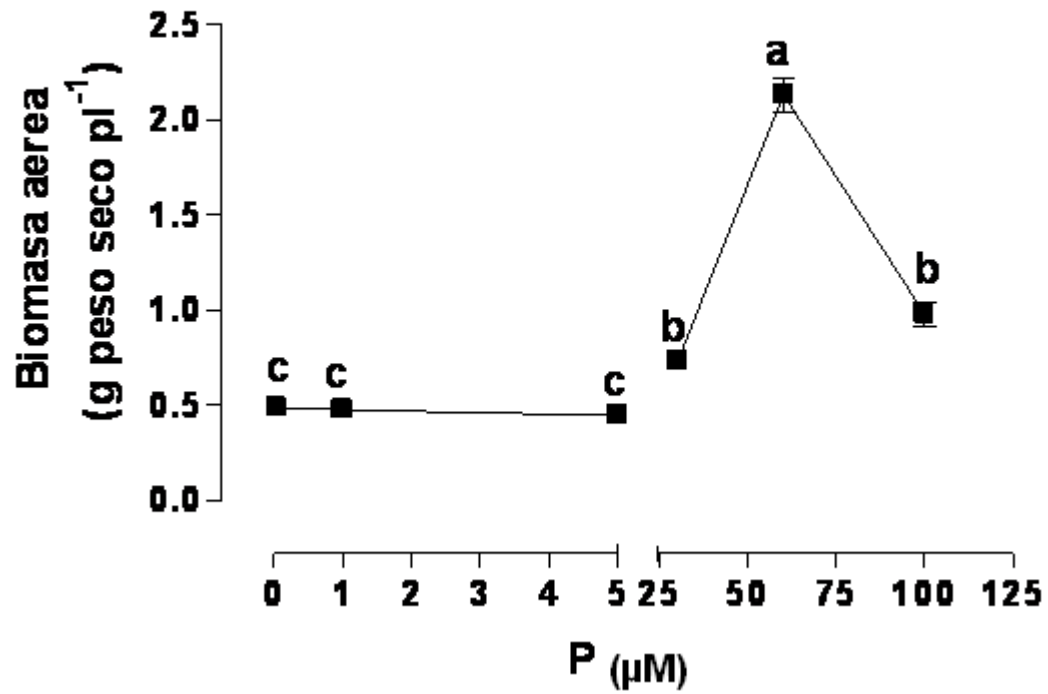


Figura 8. Biomasa aérea del frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp) con concentraciones crecientes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .



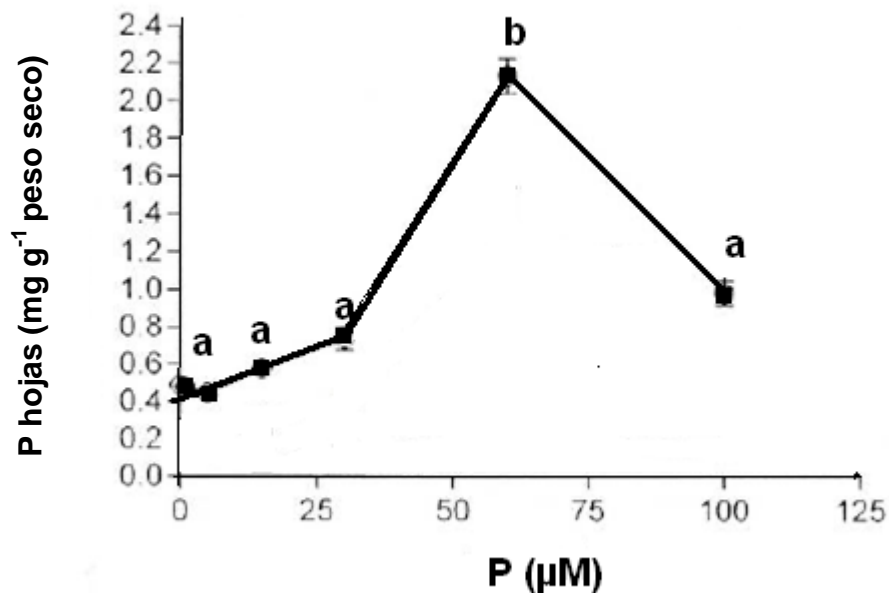


Figura 9. Concentraciones de P en hojas de frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp) con concentraciones crecientes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .

En presencia de concentraciones crecientes de Ni, se observó la reducción progresiva de la biomasa aérea (Fig. 10). Inicialmente, con las menores concentraciones utilizadas, la diferencia de la biomasa aérea no fue estadísticamente significativa. Al someter las plantas a concentraciones de 5  $\mu\text{M}$  Ni se estimó que la reducción fue de 14,3% con respecto al tratamiento que contenía una concentración de 1  $\mu\text{M}$ ; seguido por un porcentaje de disminución del 42,8% y del 75% en presencia de 20  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente, hasta alcanzar un 91% de reducción en la solución de mayor concentración 100  $\mu\text{M}$  Ni. En paralelo se pudo observar una reducción en la biomasa nodular en presencia de Ni, con un comportamiento muy similar al mostrado por la biomasa aérea (Fig 11). Sin embargo, para las menores concentraciones evaluadas (1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ ), la diferencia en la respuesta de las plantas no fue significativa, mientras que concentraciones mayores a 50  $\mu\text{M}$ , la reducción de la biomasa nodular fue de un 50% hasta una reducción total en presencia de concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  y 200  $\mu\text{M}$  de Ni.

También se pudo observar el aumento en la concentración de ureídos en hojas al aumentar las concentraciones de Ni, especialmente para concentraciones de 50  $\mu\text{M}$ , cuyo incremento fue 4 veces mayor que el contenido del control (Fig 12); a concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  la concentración de ureídos en hojas disminuyó hasta un 90% del valor del control

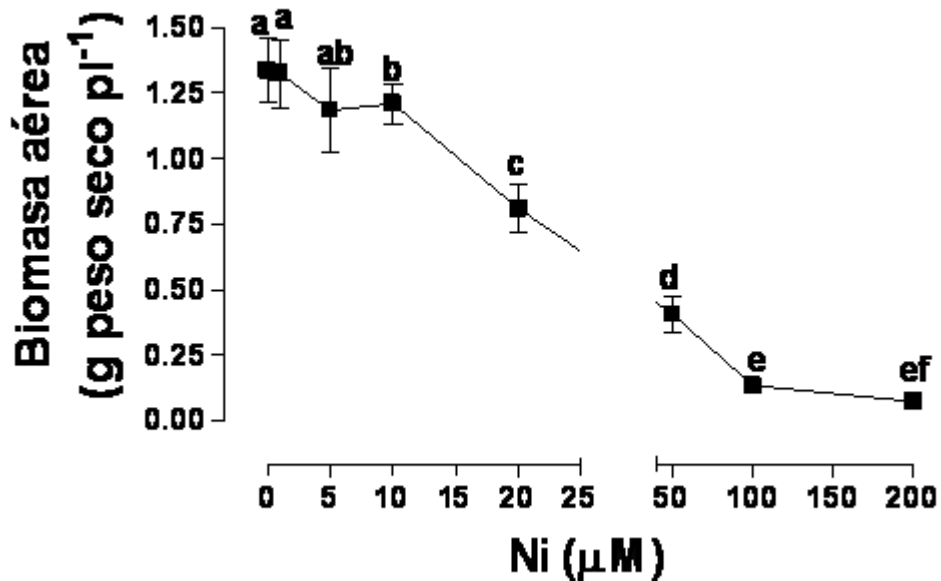


Figura 10. Biomasa aérea del frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp) en condiciones crecientes de  $\text{NiCl}_2$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .

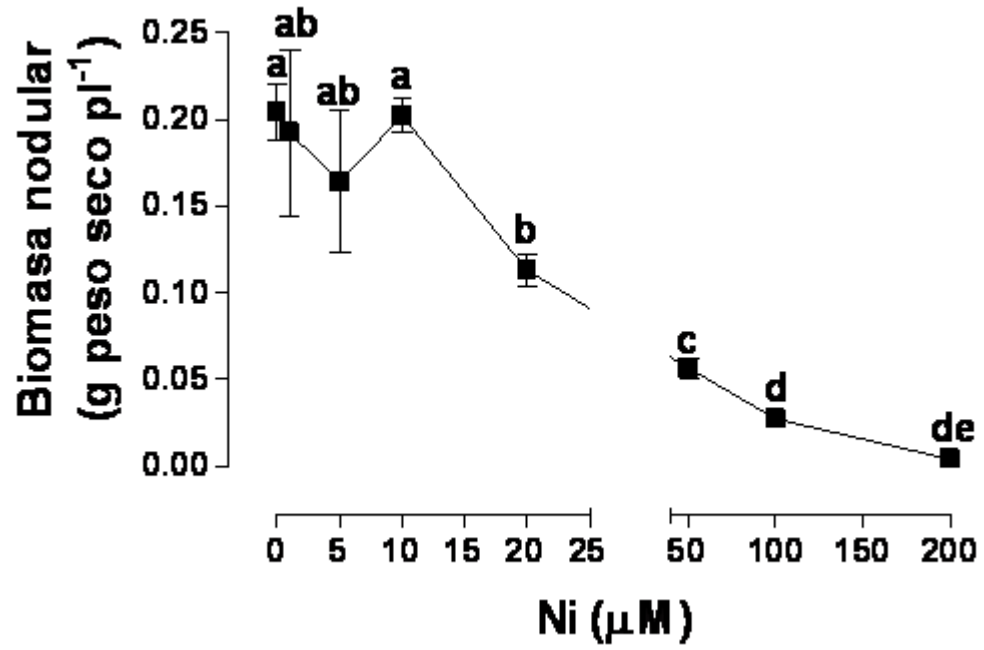


Figura 11. Biomasa nodular del frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp) en condiciones crecientes de  $\text{NiCl}_2$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .

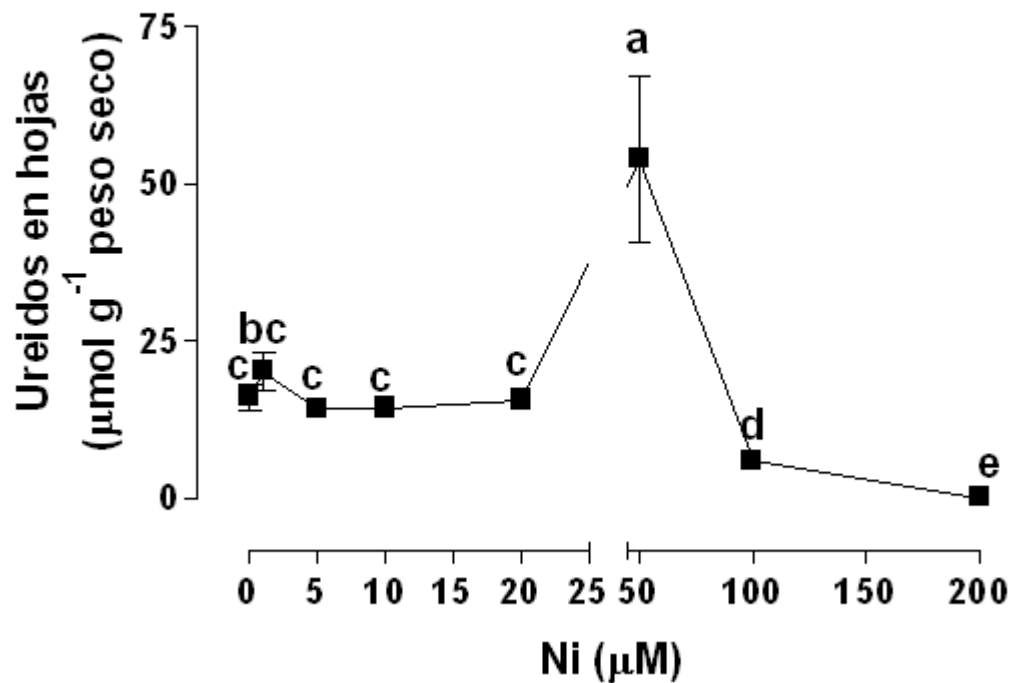


Figura 12. Concentración de ureídos en hojas, para frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp), en condiciones crecientes de NiCl<sub>2</sub>. Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a p≤0.05.

En el caso de los tratamientos con Si, se observó un aumento en la biomasa aérea de 1,5 veces el valor del control con 1 µM Si, no se observaron posteriores incrementos de la biomasa, al aumentar las concentraciones del micronutriente (Fig. 13).

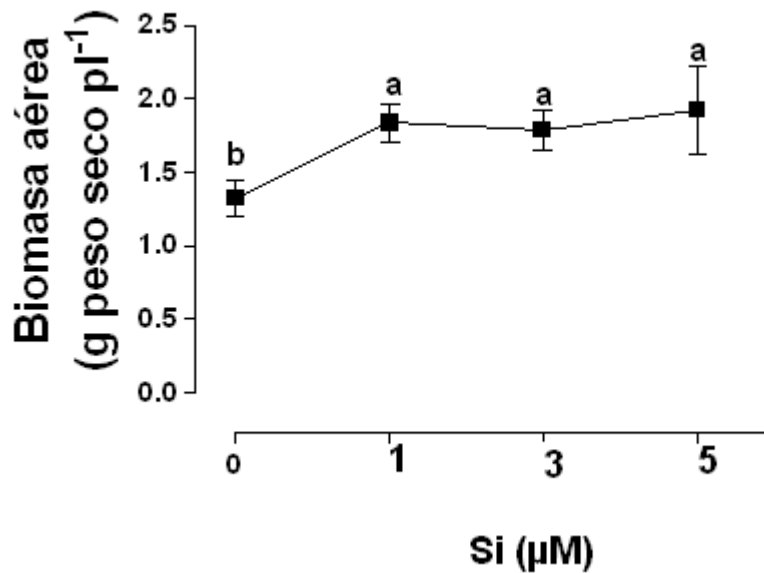


Figura 13. Biomasa aérea del frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp) bajo concentraciones crecientes de  $H_2SiO_3$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .

En cuanto a la biomasa nodular (Fig. 14) se observó un incremento de la misma a  $1 \mu M$ , estimándose un incremento de 1,5 veces el valor del control en presencia de  $1 \mu M$ . Sin embargo, con  $3 \mu M$  y  $5 \mu M$  Si, se observó la reducción de la biomasa nodular a los valores observados en plantas crecidas en ausencia de Si.

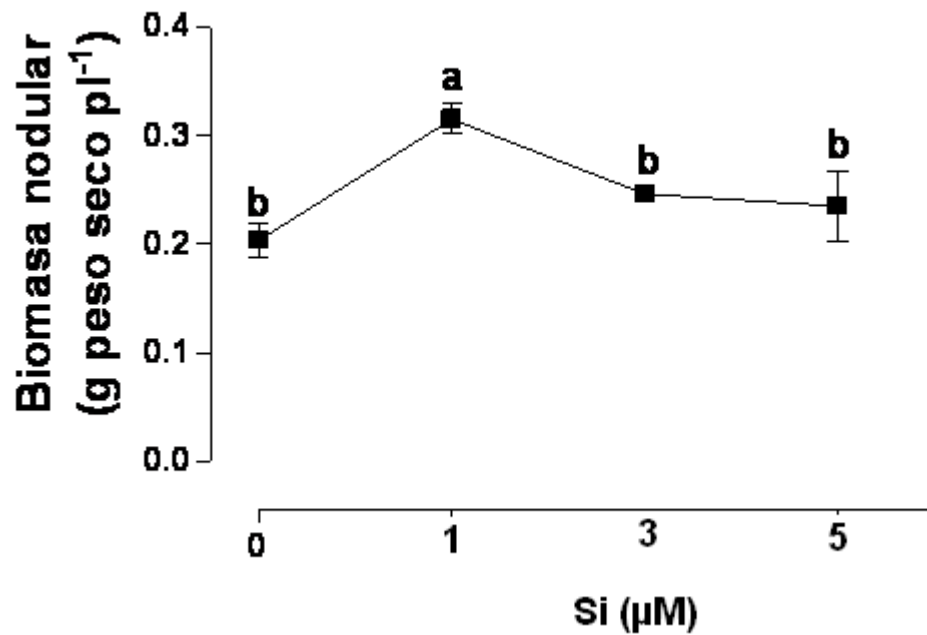


Figura 14. Biomasa nodular del frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp) bajo concentraciones crecientes de H<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>. Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a p≤0.05.

Finalmente se pudo observar un incremento progresivo en la concentración de ureídos en hojas, con el aumento de la concentración de Si en la solución nutritiva (Fig. 15). Para concentraciones de 3 μM el aumento fue de 1,2 el valor del control, mientras que con 5 μM el aumento fue 1,5 veces el valor del control.

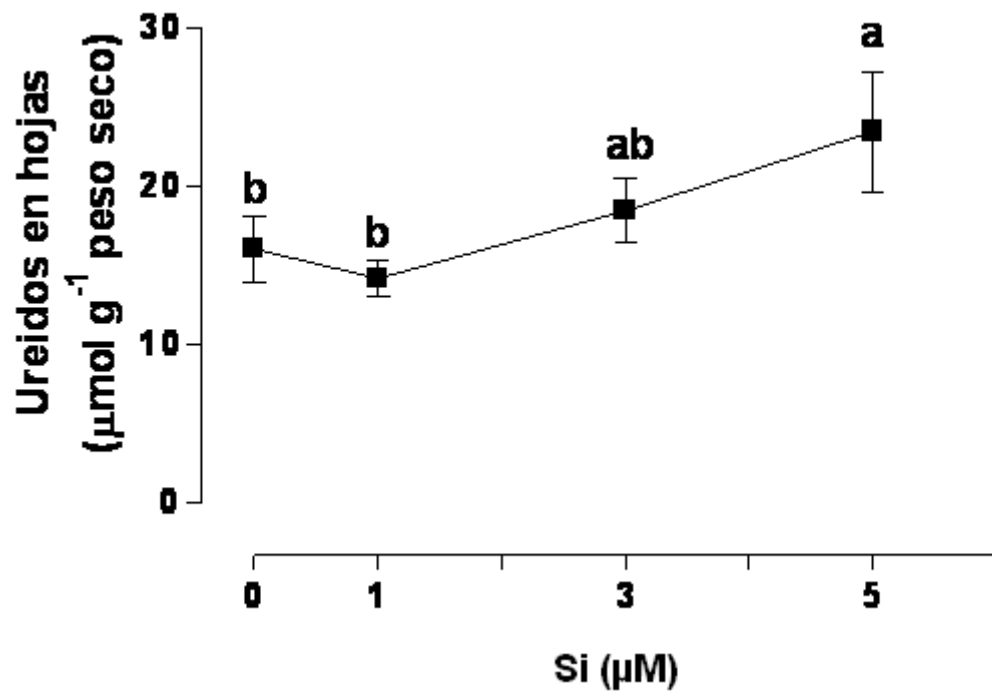


Figura 15. Concentración de ureidos en hojas para frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp) en concentraciones crecientes de  $H_2SiO_3$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .

## 6.2. Efecto de concentraciones crecientes de P, Ni y Si sobre el crecimiento y la nodulación de *Vigna unguiculata ssp sesquipedalis*, nombre común: vainita china

El máximo desarrollo de las plantas de vainita china y la mayor concentración de P en hojas ocurrió a 60 µM P (Fig. 16 y 17), aunque inicialmente el cambio en el crecimiento no fue significativo.

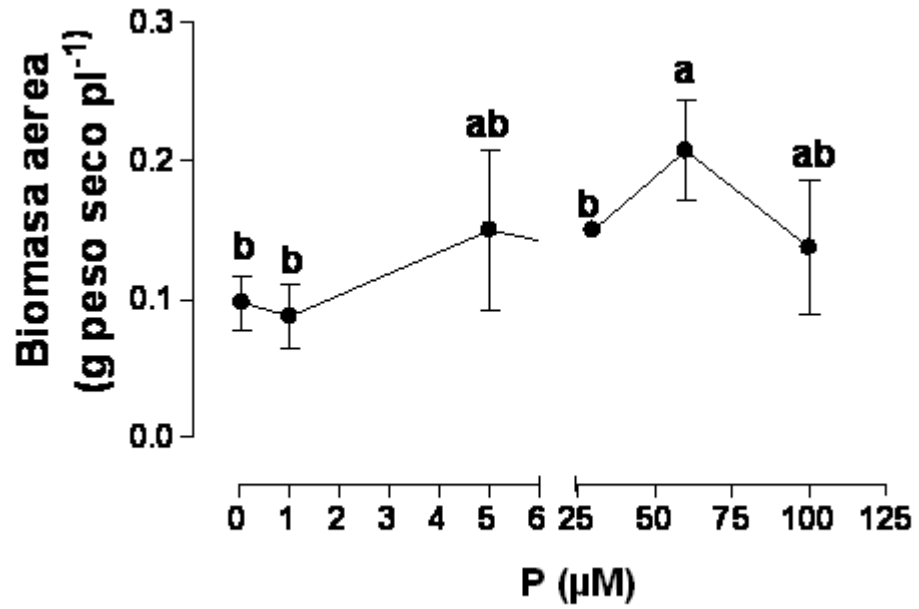


Figura 16. Biomasa aérea de la vainita china (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) con concentraciones crecientes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$



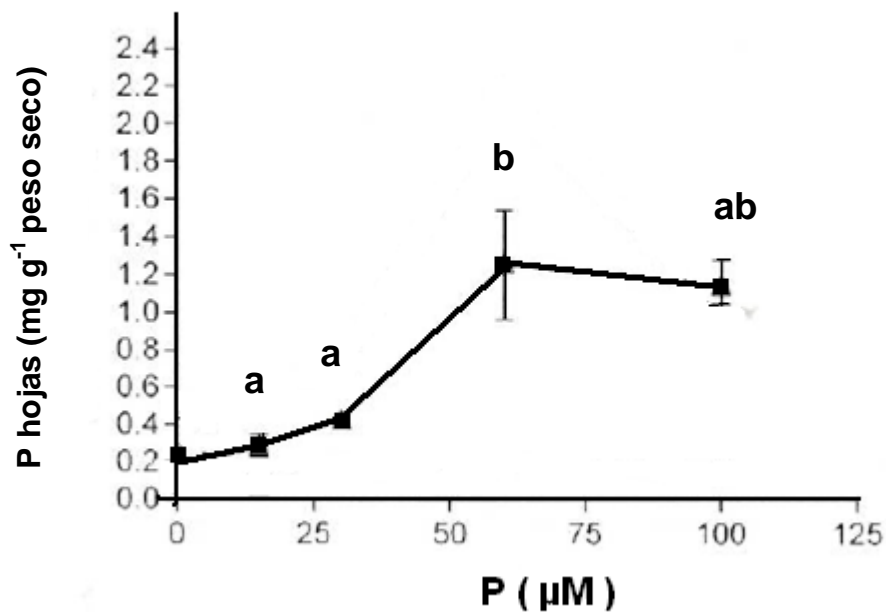


Figura 17. Contenido de fósforo en hojas de vainita china (*Vigna unguiculata ssp. sesquipedalis*) en concentraciones crecientes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .

El mayor desarrollo de las plantas ocurrió a 1 µM Ni, seguido por una reducción a valores observados en el control. En presencia de concentraciones crecientes de Ni la biomasa aérea disminuyó (Fig.18) A concentraciones de Ni > 200 µM. la reducción fue del 83% con respecto el valor del control.

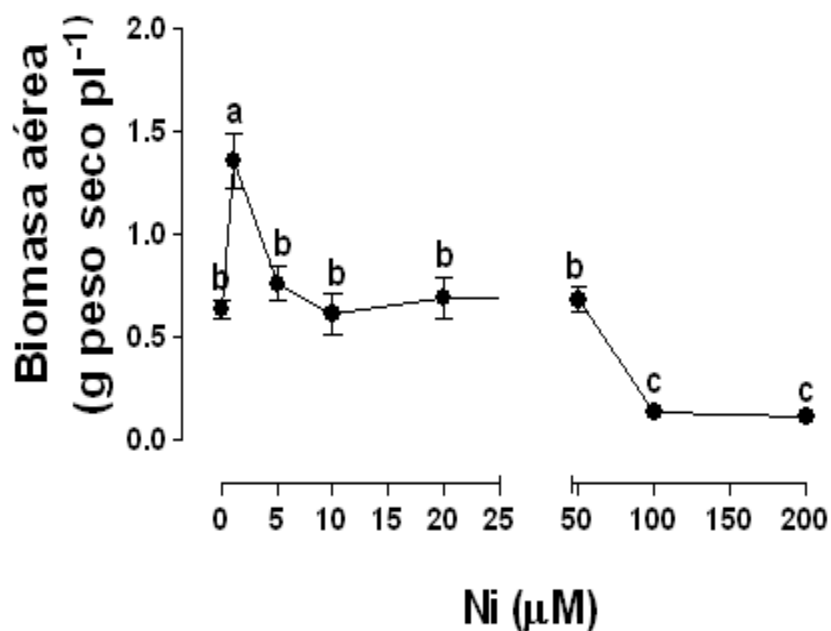


Figura 18. Biomasa aérea de la vainita china (*Vigna unguiculata ssp sesquipedalis*) en condiciones crecientes de NiCl<sub>2</sub>. Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$

La mayor masa nodular, con un aumento de 2,8 veces mayor al valor del control, ocurrió en las plantas crecidas en 1 μM Ni, mientras que los valores más bajos fueron detectados en plantas crecidas a Ni ≥ 100 μM Ni (Fig. 19). Se estimó un porcentaje de disminución del 57% con respecto al valor del control, en presencia de concentraciones de 5 μM, mientras que el porcentaje de disminución pasó de 66 % a 71% para concentraciones de 20 μM y 50 μM respectivamente, hasta llegar a un máximo de reducción del 94% con respecto al valor del control, al utilizar la máxima concentración de 200 μM.

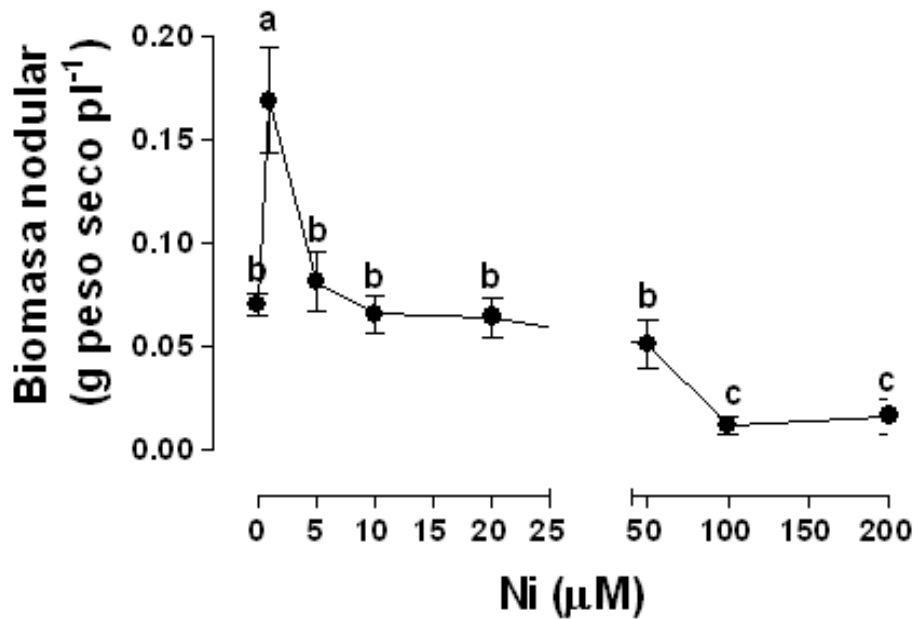


Figura 19. Biomasa nodular de la vainita china (*Vigna unguiculata ssp sesquipedalis*) en condiciones crecientes de NiCl<sub>2</sub>. Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a p≤0.05

La concentración de ureídos en hojas (Fig. 20) fue máxima en plantas crecidas en 100 μM Ni. La concentración de ureídos en hojas no presento cambios significativos con las concentraciones iniciales, utilizadas en este trabajo (1; 5; 10; 20 μM NiCl<sub>2</sub>)

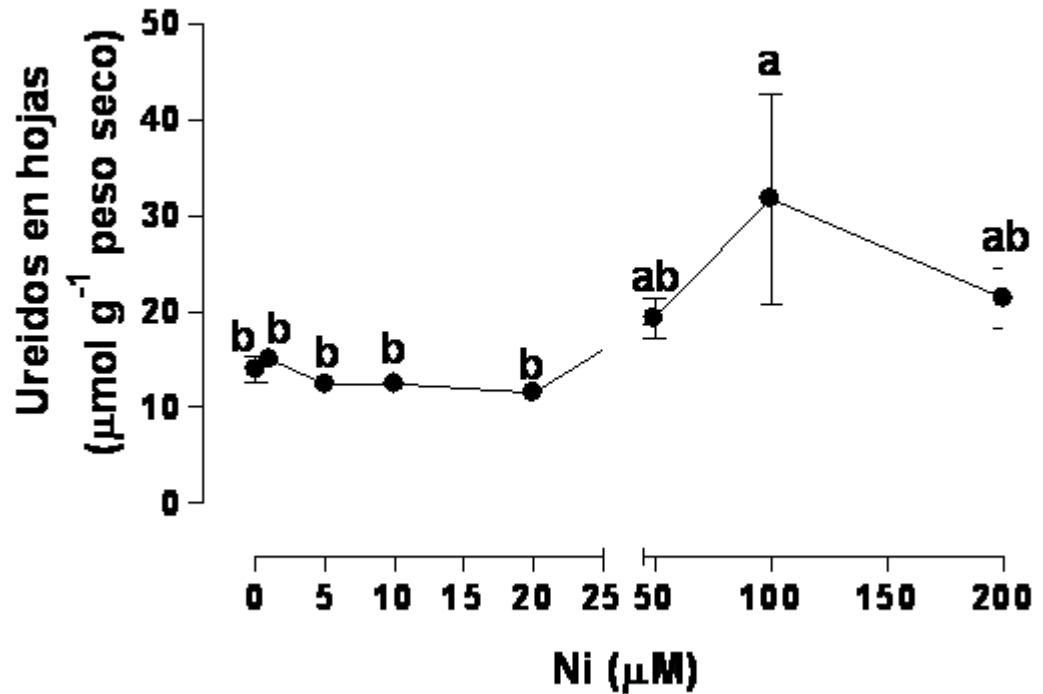


Figura 20. Concentración de ureídos en hojas de vainita china (*Vigna unguiculata ssp sesquipedalis*) en condiciones crecientes de NiCl<sub>2</sub>. Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$

Esta especie al desarrollarse en concentraciones crecientes de Si, mostró inicialmente un incremento de la biomasa aérea (Fig. 21). Alcanzando un incremento de 1,2 veces el valor del control con 1 µM del micronutriente. Aumentando progresivamente con 3 µM Si, hasta alcanzar un tamaño de 1,3 veces el valor del control con 5 µM Si. Sin embargo los mismos no fueron estadísticamente significativos.

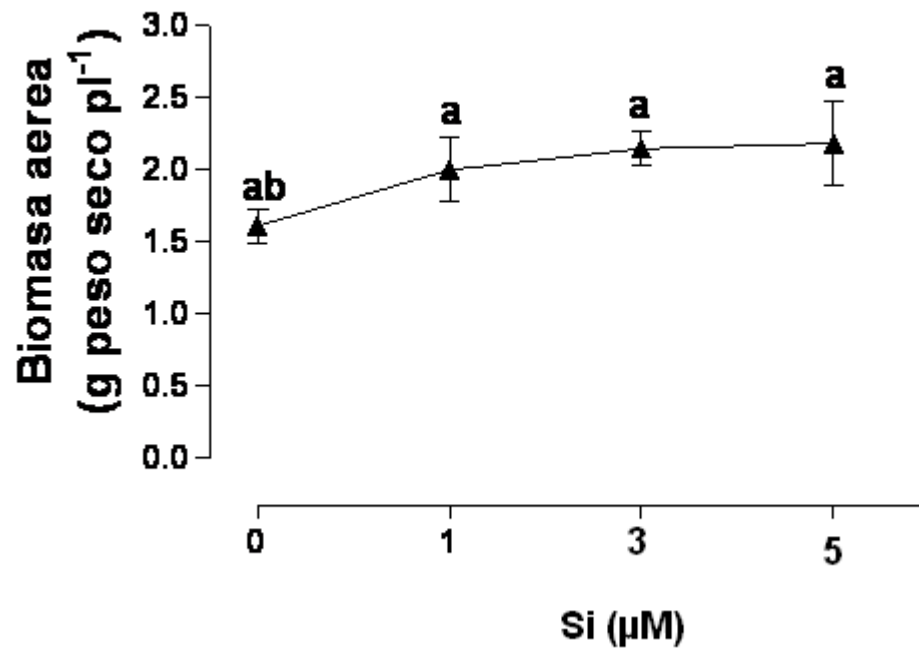


Figura 21. Biomasa aérea de la vainita china (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) a concentraciones crecientes de  $H_2SiO_3$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .

En cuanto a la biomasa nodular (Fig. 22) se observó un aumento de aproximadamente 1,6 veces el valor del control con concentraciones de 1  $\mu M$  así como a concentraciones de 3 y 5  $\mu M$ ; seguida de una reducción hasta alcanzar el valor del control

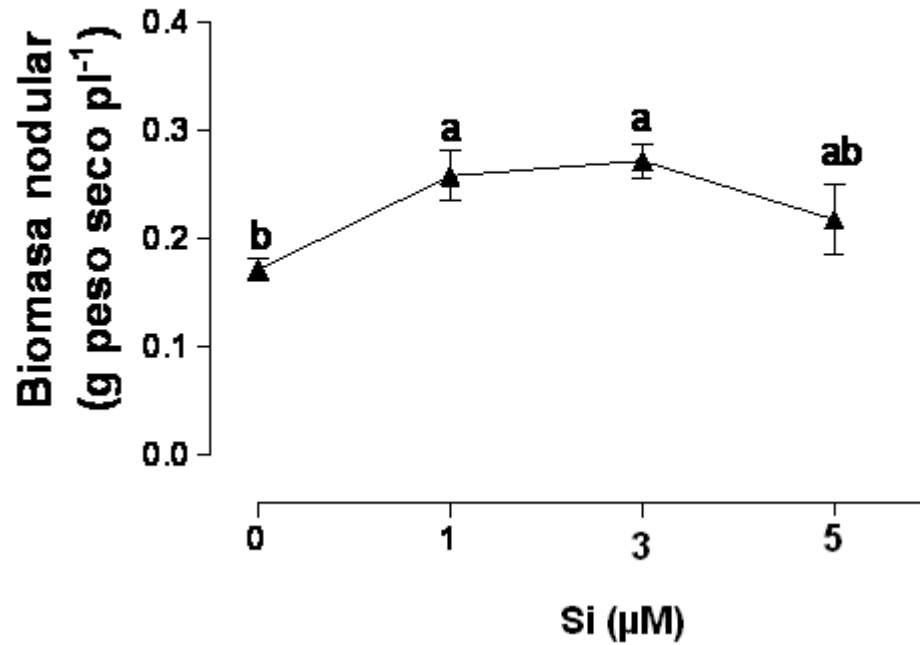


Figura 22. Biomasa nodular de la vainita china (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) bajo concentraciones crecientes de  $H_2SiO_3$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$

La concentración de ureídos en hojas en presencia de Si, aumentó 1,3 veces el valor del control en la concentración inicial de 1  $\mu M$  Si (Fig. 23). Sin embargo, los valores disminuyeron a concentraciones mayores de Si.

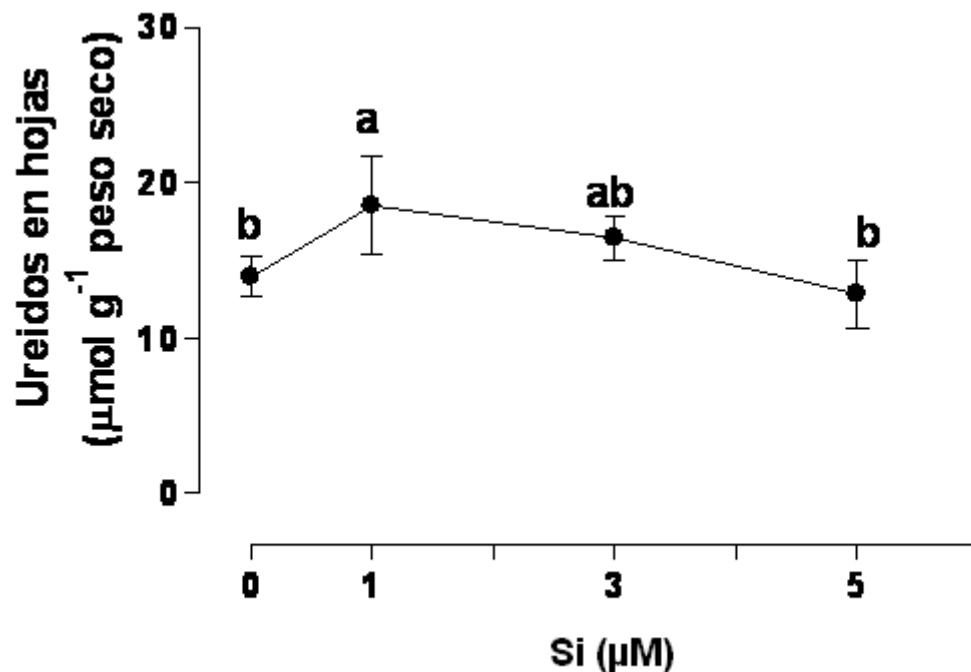


Figura 23. Concentración de ureidos en hojas de vainita china (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) en condiciones crecientes de  $H_2SiO_3$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .

### 6.3. Efecto de concentraciones crecientes de P, Ni y Si sobre el crecimiento y la nodulación de *Vigna radiata*, nombre común: frijol chino

El máximo desarrollo de las plantas ocurrió a concentraciones de  $P \geq 60 \mu M$  P, sin cambios significativos a concentraciones de  $P \leq 5 \mu M$  (Fig 24). En cuanto al contenido de P en hojas se registró que para la menor concentración utilizada ( $15 \mu M$ ) el aumento fue de 1,5 veces el valor del control; con  $30 \mu M$  el doble hasta alcanzar 6 veces el valor del control con  $60 \mu M$ . La concentración de P en hojas no sufrió cambios significativos con los diferentes tratamientos (Fig. 25)

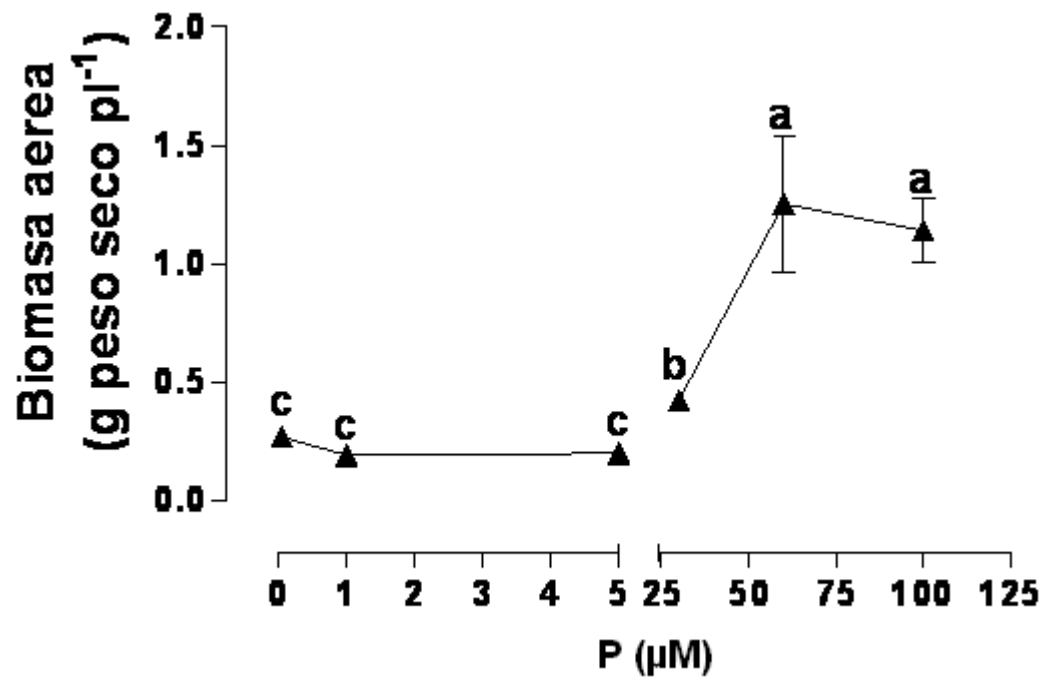


Figura 24. Biomasa aérea del frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Dato(s) en el gráfico seguido(s) de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .



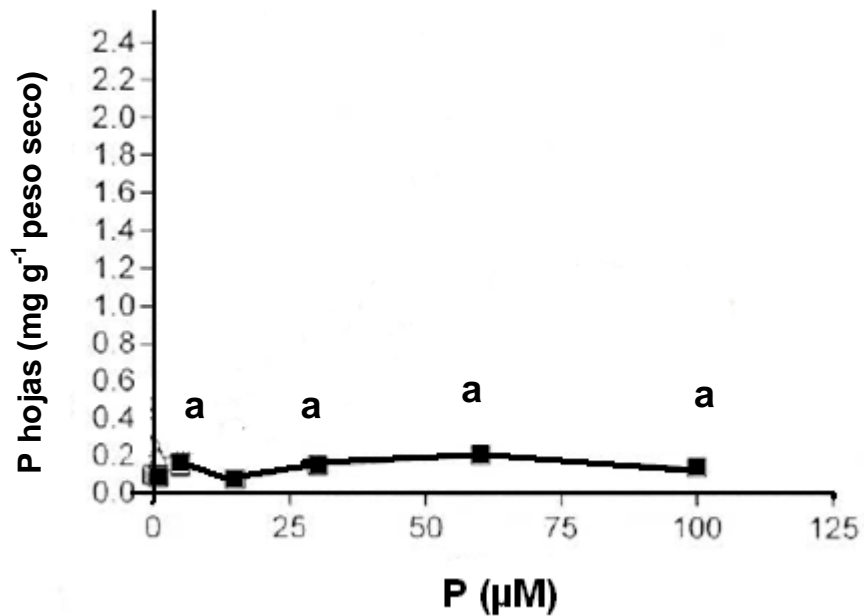


Figura 25. Concentración de fósforo en hojas de frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Dato(s) en el gráfico seguido(s) de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$

Concentraciones de  $\text{Ni} \leq 10 \mu\text{M}$  no afectaron significativamente la biomasa aérea de las plantas (Fig. 26). En la solución de  $10 \mu\text{M}$  la reducción estimada fue de 18,8%, mientras que para concentraciones de  $20 \mu\text{M}$  se redujo a la mitad, pasando por un 75% de reducción con  $50 \mu\text{M}$  hasta un 94% en presencia de  $200 \mu\text{M}$ .

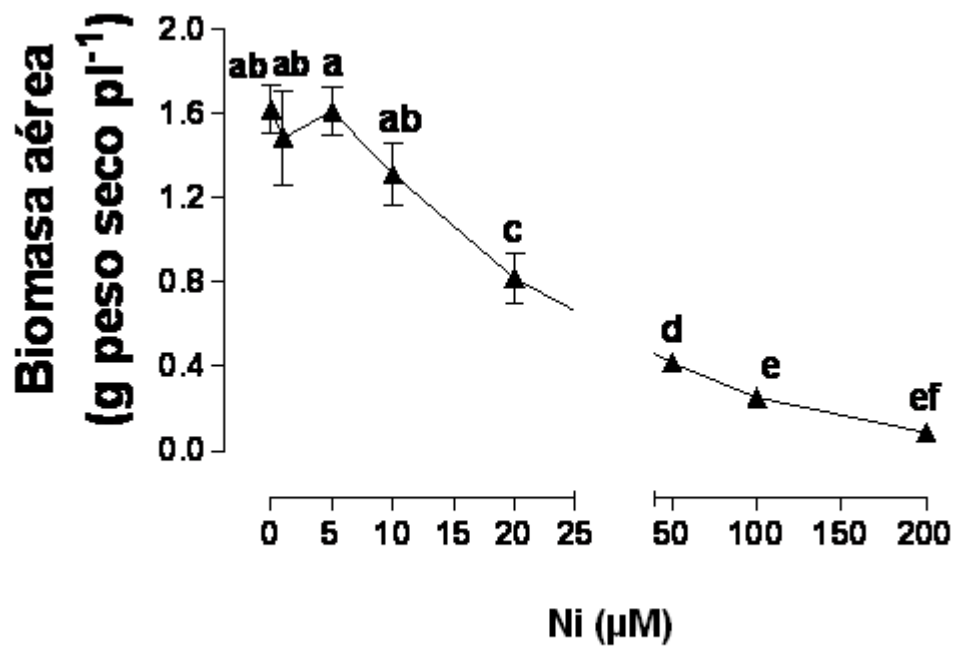


Figura 26. Biomasa aérea del frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de NiCl<sub>2</sub>. Dato(s) en el gráfico seguido(s) de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$

Este comportamiento se mantuvo para la biomasa nodular (Fig. 27), donde a bajas concentraciones 1 μM y 5 μM Ni, no se observó un cambio significativo con respecto al control; sin embargo se estimó la tendencia a disminuir a medida que aumentaron las concentraciones. Con 10 μM Ni se estimó un 29% de disminución, para 20 μM el porcentaje de disminución fue de 49%, en el caso de 50 μM alcanzó un 72% de disminución hasta llegar finalmente a un porcentaje de reducción del 95% a la mayor concentración evaluada (200 μM).

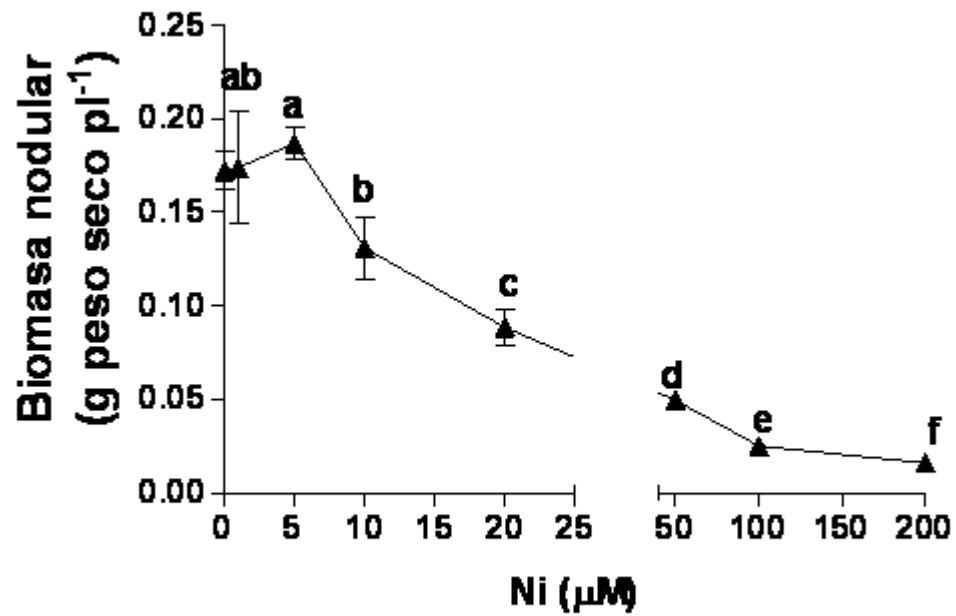


Figura 27. Biomasa nodular del frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de  $\text{NiCl}_2$ . Dato(s) en el gráfico seguido(s) de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$

El contenido de ureidos en hojas (Fig. 28) se mantuvo constante en los diferentes tratamientos hasta una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , seguido por una drástica disminución a 200  $\mu\text{M}$  Ni.

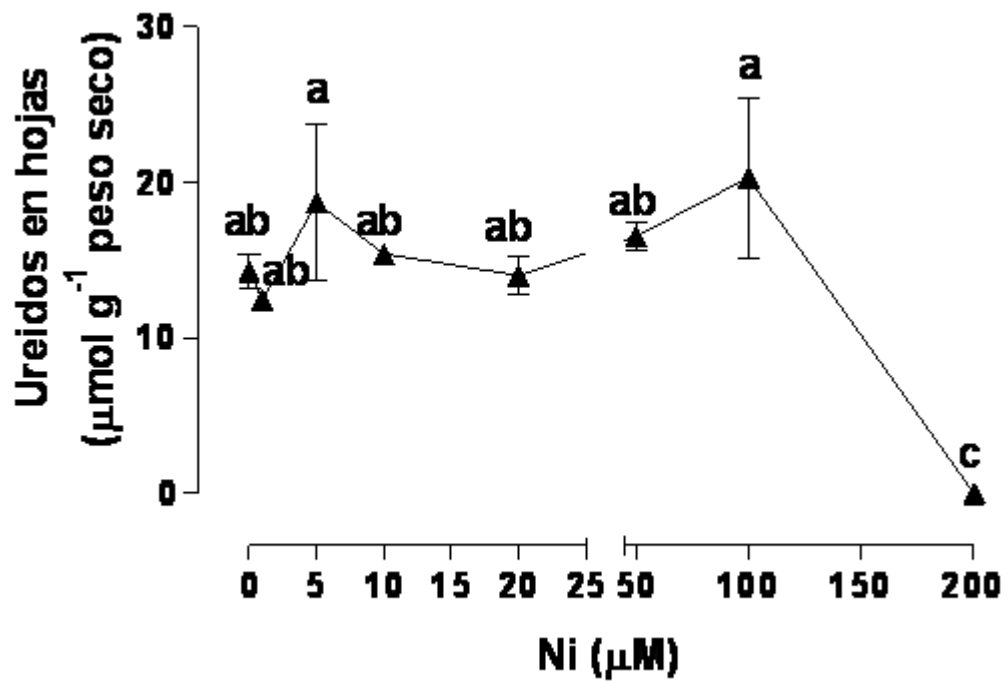


Figura 28. Concentración de ureidos en hojas de frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de  $\text{NiCl}_2$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$

En cuanto a los cambios observados en presencia de Si, se observó que con la adición de  $1 \mu\text{M}$  Si a la solución nutritiva; la biomasa aérea aumento 1,7 veces sobre valor del control (Fig 29). Mientras que la biomasa nodular aumento 1,6 veces el valor del control a la misma concentración (Fig. 30)

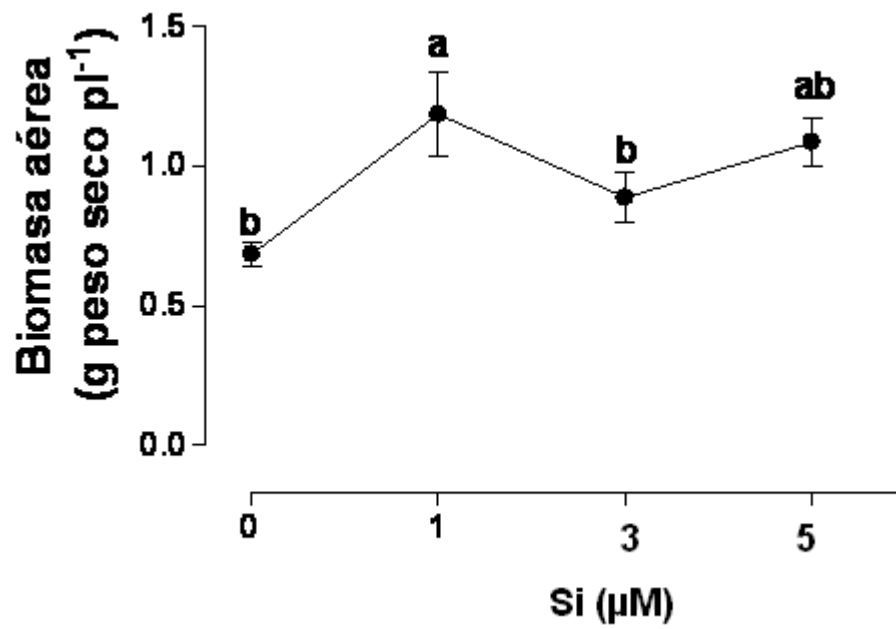


Figura 29. Biomasa aérea del frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de  $H_2 SiO_3$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$

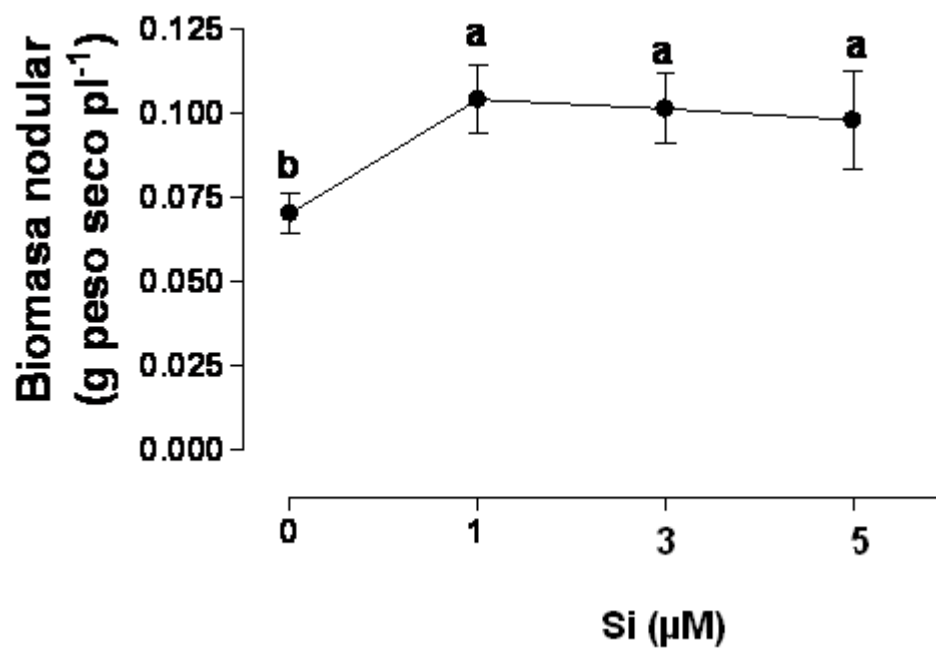


Figura 30. Biomasa nodular del frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de  $H_2SiO_3$ . Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a  $p \leq 0.05$ .

La concentración de ureidos en hojas aumento progresivamente 1,4 veces el valor del control a  $Si=3 \mu M$ , seguido de una disminución hasta alcanzar valores similares al control (Fig. 31).

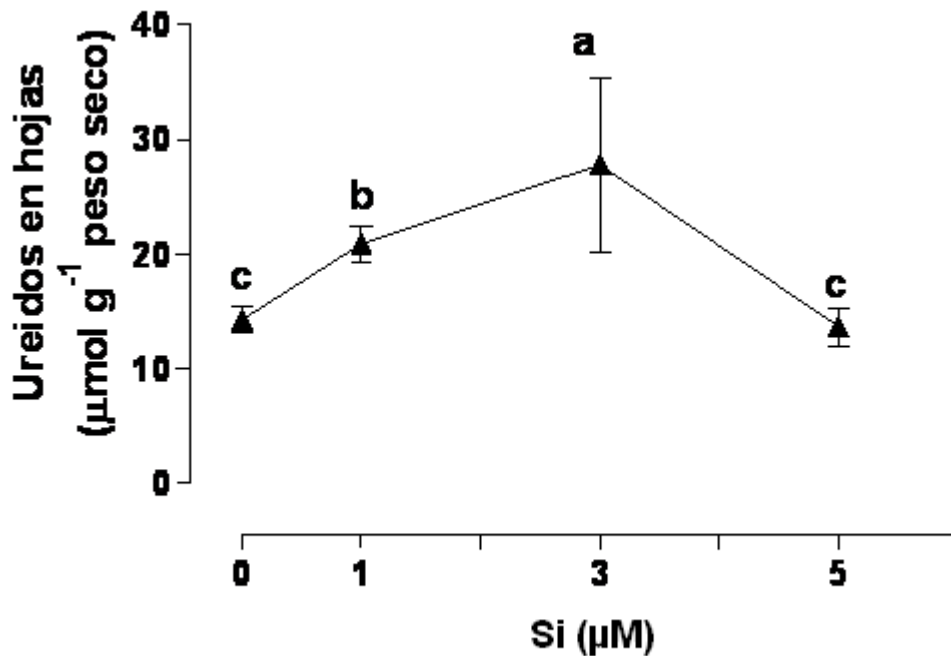


Figura 31. Concentración de ureídos en hojas de frijol chino (*Vigna radiata*) en condiciones crecientes de H<sub>2</sub> SiO<sub>3</sub>. Datos en el gráfico seguidos de la misma(s) letra(s) son estadísticamente similares a p≤0.05.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 7.1. Efecto de concentraciones crecientes de P sobre el crecimiento y la nodulación de *Vigna unguiculata*, *Vigna unguiculata ssp sesquipedalis* y *Vigna radiata*.

Las especies consideradas para este estudio mostraron en general un incremento de la biomasa aérea a bajas concentraciones de P, presentando variaciones específicas para cada especie. Estudios anteriores han señalado, la respuesta positiva de diversas leguminosas ante la aplicación de P, indicando que el peso seco de las plantas y la FSN incrementan en respuesta a la aplicación de P (Olivera y col, 2004). Debido a que la FSN es un proceso que tiene altos requerimientos de energía, adiciones de P favorecen dicho proceso. Estas observaciones han generado un gran interés por parte de científicos y

agricultores, quienes se han avocado a intentar determinar, las concentraciones óptimas de P a emplear, bajo diversas condiciones; para garantizar la sobrevivencia y mayor productividad de las leguminosas. Así por ejemplo, para leguminosas como la caraota (*Phaseolus vulgaris*) se ha reportado que el requerimiento óptimo de P, en condiciones de invernadero, varía desde 250  $\mu\text{M}$  (Kouas y col. 2009) hasta 27 mM (Lynch, 1991). Valores entre 0,5 mM y 2 mM han sido reportados para la soya (Rotaru y col. 2009); mientras que para trigo y garbanzo la concentración óptima pareciese estar alrededor de los 60  $\mu\text{M}$  (Li y col. 2004). En Venezuela, los estudios al respecto, para variedades locales de frijoles son escasos.

En este trabajo se encontró que el frijol común (*Vigna unguiculata* (L) Walp) aumento la biomasa aérea a partir de 30  $\mu\text{M}$  alcanzando un máximo con 60  $\mu\text{M}$ . Por su parte la vainita china (*Vigna unguiculata ssp sesquipedalis*) registró un aumento de crecimiento a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  y el frijol chino (*Vigna radiata*) presento un comportamiento variable; sin embargo la biomasa aérea aumento con 100  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . En general, se puede decir que al utilizar menores concentraciones de P la biomasa aérea registrada, para todas las especies, fue menor. De acuerdo a Raghothama y col. (2005) los niveles de P regulan la expresión de un gran número de genes, incluidos aquellos que participan en la fotosíntesis y el metabolismo del carbono. Si no existe un adecuado nivel de P, estos dos procesos se ven restringidos, con una consiguiente disminución en la producción de biomasa. Por otra parte, la deficiencia de P también conlleva a una inducción o represión de más de 1.000 genes implicados en la absorción de P, la movilización de P orgánico, la conversión de los intermediarios fosforilados glucolíticos a carbohidratos y ácidos orgánicos y la sustitución del P que contienen los fosfolípidos y los galactolípidos (Morcuende y col., 2007). De allí el interés de investigadores y agricultores en conocer la interacción del macronutriente con diversas especies; así como la interacción con microorganismos presentes en el suelo. El resultado de los múltiples estudios realizados con diferentes leguminosas, bajo diferentes condiciones, parecen indicar los altos requerimientos de P por parte de las leguminosas, además de los requerimientos variables y específicos para cada especie.

Así mismo también hubo un aumento progresivo del contenido total de P en las hojas a medida que se incrementó la concentración de P en la solución nutritiva. Este



resultado está en concordancia con Lee y col. (1990), quienes indicaron que un aumento de la concentración externa de P produce un incremento de las concentraciones de P en la planta. Ahora bien, tanto el frijol común como la vainita china sufrieron una disminución de la biomasa aérea a mayores concentraciones de P; específicamente con 250 y 600  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Las variaciones en la absorción de P, así como su concentración en el interior de la planta, se han relacionado con diferencias genotípicas en *Phaseolus vulgaris* (Henry y col., 2010). También se ha encontrado que niveles elevados de P en el medio pueden interferir con la absorción de Fe o Zn (Marschner, 1995) y en consecuencia pueden alterar la producción de biomasa.

A su vez las deficiencias de Zn o de Fe son más frecuentes cuando existen altas concentraciones de P en el medio (Adams, 2004). La fisiología de la toxicidad del P no es conocida totalmente. Por otra parte, las interacciones del P con el Zn o el Fe pueden causar síntomas que reflejen carencias de micronutrientes (Robson, 1983; Marschner, 1995; Lambers y col., 2002), aunque realmente su origen podría estar en una toxicidad debido a los altos niveles de P. De este modo, es probable que estudios que han descrito deficiencias de micronutrientes hayan sido, de hecho, un reflejo de síntomas de toxicidad debido a altos niveles de P (Shane y col., 2003).

En cuanto a la biomasa nodular, se ha encontrado que el número de nódulos, así como la actividad específica de la nitrogenasa, incrementa con adiciones de P; lo que implica una mayor eficiencia en la FSN (Israel, 1987). Para el presente estudio no se consideró la relación entre la biomasa nodular y las concentraciones de fósforo, sin embargo se recomienda la medición de este parámetro para futuros estudios dado que la respuesta positiva en la FSN, al aumentar las concentraciones de P, ha sido documentada para otras leguminosas. Por ejemplo en estudios con caraota se ha encontrado que el número de nódulos, así como la actividad específica de la nitrogenasa, incrementan con la adición de P, esto implica una mayor eficiencia en la tasa de fijación (Olivera, 2004).

En estudios con soya, se ha encontrado una correlación lineal entre la concentración de N, la concentración de P y la biomasa nodular (Rotaru y col., 2009). Sorprendentemente, también se encontró que la FSN, estimada por la concentración de ureídos en nódulos, pareciese ser independiente de la masa nodular, y estar

correlacionada negativamente, con el aumento en las concentraciones de P y Fe (Rotaru y col., 2009). En paralelo, se considera que P es requerido en altas concentraciones en los nódulos, para lograr altas tasas de FSN. P, es un factor nutricional limitante en la nodulación y en la FSN (Remans y col., 2007). Esta reducción en la FSN en plantas deficientes de P parece ser debido a la reducción de suministro de carbohidratos a los nódulos requerido para la actividad de la nitrogenasa (Graham, 1979; Pereira, 1987; Al-Niemi y col., 1997; Valdez y col., 1999; Kouas y col. 2005; Schulze y col., 2006). Sin embargo se considera necesario realizar otras mediciones, como por ejemplo, la concentración de ureídos o la reducción de acetileno en nódulos; en conjunto con la concentración de ureídos en hojas; a fin de verificar si tal correlación se da forma positiva o no.

Así mismo se determinó que las concentraciones de P en hojas aumentaron al aumentar las concentraciones de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . La absorción de P puede representar un problema para las plantas en condiciones de campo, ya que generalmente su contenido en el suelo es bajo, pero los requerimientos de las plantas por este nutriente son altos (Schachtman y col.1998), para ello la planta establece diferentes mecanismos de transporte de P, desde el suelo hasta la raíz, a través de las membranas y entre los compartimentos celulares. La traslocación también juega un papel importante en la redistribución de este nutriente en la planta. Cuando la disponibilidad de P en el suelo es limitada, aumenta el tamaño de la raíz, e incrementa la tasa de absorción de P disponible en el suelo. Se desplaza el P desde las hojas más viejas y se utiliza el almacenado en la vacuola (Schachtman y col.1998), Esto explicaría el porque a menores concentraciones de P en las soluciones estudiadas, la concentración de P en las hojas fue menor. A la inversa cuando las plantas tienen un adecuado suministro de P y absorben a tasas que exceden la demanda, diferentes mecanismos se activan para prevenir la acumulación de P a niveles tóxicos. Estos procesos incluyen la conversión de P en compuestos orgánicos de almacenamiento, una reducción en la tasa de absorción de P (Lee y col., 1990), pérdida en el flujo de salida, el cual puede variar desde 8% y 70% (Bielecki, 1983). Esto explica porque a concentraciones mayores el contenido de P aéreo disminuye, en el caso del frijol común, y alcanzo un plateau en el caso de la vainita china y el frijol chino.

Aún cuando cada variedad de frijol tuvo un comportamiento distinto antes las condiciones de P, se evidenció un rendimiento óptimo (mayor biomasa aérea) a 100  $\mu\text{M}$ , esta concentración se utilizó en las soluciones nutritivas base para los posteriores ensayos de Ni y Si.

## 7.2. Efecto de concentraciones crecientes de Ni sobre el crecimiento y la nodulación de *Vigna unguiculata*, *Vigna unguiculata ssp sesquipedalis* y *Vigna radiata*

En este estudio se encontró que las diferentes especies presentan una respuesta positiva ante la adición de pequeñas concentraciones de Ni como se resume en la tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones de Ni para el crecimiento aéreo y nodular y contenido de ureidos máximo

Variedad de frijol (nombre común)	Concentración de Ni óptima para máx. biomasa aérea y nodular ( $\mu\text{M}$ )	Concentración Ni óptima para máx. contenido de ureidos ( $\mu\text{M}$ )
Frijol común	10	50
Frijol chino	1	100
Vainita china	5	100

La estimulación del crecimiento de la biomasa aérea, en presencia de cantidades moderadas de Ni y urea ha sido documentado (Shimado, 1980; Krogmeier y col, 1991; Gerendas, 1997). La importancia de medir la concentración de ureidos en hojas, para este estudio radicó en que es la ureasa quien cataliza la hidrólisis de la urea dando como productos amonio y dióxido de carbono.

La ureasa es una metaloenzima ubicua que contiene Ni (Dixon y col. 1975) y su deficiencia perturba el metabolismo de los ureidos, aminoácidos y ácidos orgánicos en cuyo caso se acumulan ácidos oxálico y láctico (Bai y col., 2006). Es por esto que se ha atribuido mayores rendimientos en las siembras en presencia de Ni. Ya en 1946, Roach y Barclay realizaron experimentos de campo en Inglaterra con cebada, papas y habas y obtuvieron incrementos en rendimiento gracias a la aplicación foliar de Ni. Al igual que en el presente trabajo se encontró, que las variedades locales de frijoles mostraron un aumento de la biomasa aérea y nodular. Sin embargo, esta respuesta ocurrió a bajas concentraciones de Ni (tabla 2). Los bajos requerimientos de Ni por las plantas en general y por las leguminosas en particular; ya han sido reportados. Fue este comportamiento, el que por mucho tiempo impidió que el Ni, fuese considerado un microelemento esencial e incluso fuese considerado tóxico. Eskew y col. (1983) y Brown y col. (1987) colocaron el Ni en la lista de micronutrientes. De la revisión de los diferentes estudio acerca de los niveles tóxicos de Ni, se destaca que la toxicidad por metales pesados puede depender de su unión a diversos ligandos, como los iones carboxilato, las amidas, los grupos sulfidrilos y los compuestos aromáticos, principalmente (Seregin, 2006)

En estudios realizados en plantas de frijol, sometidas a concentraciones de Ni pero en presencia de N; se encontró una mayor acumulación de urea en los órganos vegetativos. Bajo estas condiciones, los investigadores establecieron que la concentración optima era de 3,3  $\mu\text{M}$  Ni (Walker, 1985). Por su parte Brown (1987) realizó un experimento con cebada (*Hordeum vulgare* L) utilizando dos concentraciones de  $\text{NiSO}_4$ , (0,6 y 1  $\mu\text{M}$ ), y encontró que el porcentaje de germinación y el peso seco de hojas, aumento y fue mayor con concentraciones de 1  $\mu\text{M}$ ; estos resultados sugieren que las concentraciones establecidas como optimas, se refieren aquellas a las cuales la biomasa aérea es mayor y que el Ni tiene varias funciones importantes en el metabolismo de las plantas superiores, aun cuando no se conoce exactamente como funciona su metabolismo. En este trabajo se encontró que las concentraciones de Ni para las cuales el crecimiento fue mayor no son las mismas que para la concentración de ureídos (tabla 2). Por el contrario, las tres especies evaluadas presentaron una menor concentración de ureídos cuando la masa nodular fue mayor; es decir a menores concentraciones de Ni. Esto coincide con los resultados obtenidos en otras investigaciones en las que se ha

encontrado que bajos niveles de Ni en suelos agrícolas limitan la fijación simbiótica al limitar la actividad de la hidrogenasa simbiótica del *Rhizobium*. Es posible que aún cuando hay una mayor cantidad de nódulos, la actividad de la hidrogenasa se encuentre inhibida por los bajos niveles de Ni (Klucas y col.1983). Por otra parte, una menor concentración de ureídos ante una mayor biomasa aérea podría suponer la utilización de los compuestos nitrogenados en las diferentes funciones metabólicas de crecimiento en las plantas, como la producción de biomasa aérea y nodular. Por su parte, una mayor concentración de ureídos a mayores concentraciones de Ni, sugiere que los ureídos contenidos en las hojas no provenían únicamente de las rutas de asimilación del amonio simbiótico, sino también del catabolismo de las bases purínicas que normalmente ocurre en tejidos vegetales. En estudios con soya, se ha demostrado que la acumulación de ureídos en hojas inhibe la FSN, debido a la reducción de su catabolismo. King y Purcell (2005) han sugerido que la inhibición de la enzima nitrogenasa está relacionada con un mecanismo de retroalimentación negativa, donde elevados niveles de ureídos en hojas o en nódulos constituyen los efectores fundamentales. También se evidenció en este trabajo que al utilizar 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{NiCl}_2$  la biomasa nodular y aérea; así como también el contenido de ureídos disminuye, para las tres variedades. Esto sugiere que esta concentración resulta tóxica para estas tres especies de leguminosas coincidiendo con resultados publicados anteriormente (Piccini y col, 1992, Mishra y Kar, 1974 Seregin, 2006).

Uno de los mecanismos que describe la probable disminución, en la absorción de macro y micronutrientes, es la competencia por los sitios de unión de cationes como:  $\text{Mg}^{+2}$ ;  $\text{Fe}^{+2}$ ; y  $\text{Zn}^{+2}$ ; debido a su radio iónico comparable al del  $\text{Ni}^{+2}$  (Seregin y Kozhevnikova, 2006) Así mismo, el mencionado autor describe que la absorción de macronutrientes puede disminuir debido a cambios en la estructura y en la permeabilidad de la membrana plasmática y a la actividad enzimática de las células de la membrana; ya que el  $\text{Ni}^{+2}$  afecta la composición de los fosfolípidos de la membrana y simultáneamente altera la actividad de la ATPasa. Estos cambios podrían influenciar la toma de P, entre otros macronutrientes. En este trabajo se encontró que a mayores concentraciones de Ni, la biomasa aérea y radicular disminuyo, mientras que el verdor en las hojas se mantuvo. Estos síntomas han sido asociados comúnmente a la deficiencia de P. Los resultados sugieren que los cambios observados al aumentar la concentración de Ni pudo deberse a

su influencia en absorción de otros nutrientes. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes, por lo que se sugiere realizar nuevas investigaciones en este sentido.

### 7.3 Efecto de concentraciones crecientes de Si sobre el crecimiento y la nodulación de *Vigna unguiculata*, *Vigna unguiculata ssp sesquipedalis* y *Vigna radiata*.

En este estudio se encontró que, en general, las diferentes variedades presentan una respuesta positiva ante la adición de pequeñas concentraciones de  $H_2SiO_3$  (tabla 3)

Tabla 3. Concentraciones de Si para el crecimiento aéreo y nodular y contenido de ureidos máximo

Variedad de frijol (nombre común)	Concentración de Si óptima para máx. biomasa aérea ( $\mu M$ )	Concentración de Si óptima para máx. biomasa nodular ( $\mu M$ )	Concentración Si optima para máx. contenido de ureidos ( $\mu M$ )
Frijol bayo	3	1	5
Frijol chino	1	1	1
Vainita china	3	2	3

Newalmondo y Dakora (1999) reportaron que el Si promueve la formación de los nódulos y ejercen una función en la simbiosis de frijoles. La aplicación de Si, en este estudio, también incremento la concentración de ureidos en hojas. Sin embargo la biomasa nodular disminuyo a mayores concentraciones del micronutriente. Se ha reportado que el Si incrementa la biomasa total, promueve la elongación de la raíz y la biomasa radicular (Miyake y Takahashi, 1985). Muchos estudios sugieren que el Si ejerce un efecto en ciertos procesos metabólicos de las plantas. Cuando pequeñas concentraciones fueron aplicadas en estudios con *Vigna unguiculata*, no solo aumentó la

biomasa nodular, si no que también aumentó la biomasa aérea. El incremento de la longitud de la raíz y de la biomasa radicular con pequeñas dosis de Si, promueve el aumento de los potenciales sitios de infección para los rizobios; que a su vez incrementa la nodulación y la concentración de N. En este trabajo no se considero la biomasa y longitud radicular, sin embargo se midió la concentración de ureídos en hojas, como indicativo de la eficiencia en la fijación simbiótica, se encontró que las concentraciones incrementan con bajas dosis de Si. A mayores concentraciones de Si disminuyo la biomasa nodular, en los tres casos; esto pudo deberse a la disminución de la permeabilidad en la membrana como consecuencia del engrosamiento de la pared celular (Aery y Jagetiya, 2000).

El aumento de la biomasa aérea en conjunto con el aumento de la biomasa nodular refleja el efecto positivo de pequeñas adiciones de Si en la nodulación y aparentemente, en FSN. Miyake y Takahashi (1985) reportaron que el contenido de N en hojas, tallos y raíces de soya fue consistentemente alto en plantas noduladas en comparación con las plantas no noduladas cuando el Si fue incorporado.

Simultáneamente se ha demostrado también una notable correlación Si-P. El aporte al suelo de fertilizantes silícicos solubles incrementa la asimilación de P por la planta, posiblemente debido a un intercambio de los fosfatos absorbidos a los hidróxidos por silicatos (Caicedo y col., 2007); esto supone el uso promisorio de este microelemento en suelos ácidos en los que el P tiene poca movilidad; ya que cuando el P está fijado en el suelo en forma de fosfato de calcio, al adicionar Si se produce una reacción química que libera silicato de calcio, agua y ácido fosfórico, que es la forma asimilable para la planta y responsable del crecimiento radicular.

Aún cuando la longitud radicular no fue considerada para este estudio, se observó el aumento de la misma para las diferentes concentraciones de Si evaluadas, por lo que se sugiere en futuros estudios realizar estas mediciones.

## 8. CONCLUSIONES

- Las variedades de frijoles, mostraron mayor biomasa aérea y nodular con concentraciones de 100  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; por lo que se establece esta concentración como óptima (desde el punto de vista agrícola) bajo estas condiciones de estudio.
- Las variedades de frijoles, mostraron menor biomasa aérea y nodular con 600  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y a su vez una menor concentración de P en hojas; por lo que se establece esta concentración como tóxica bajo estas condiciones de estudio.
- Cada especie tuvo un comportamiento diferente con concentraciones crecientes de P, Ni y Si, lo que ratifica la importancia del genotipo como modulador de las respuestas.
- Pequeñas adiciones de Ni favorecen el crecimiento de la biomasa aérea y nodular de las tres variedades de frijol, por lo que se establece la concentración óptima entre 1-5  $\mu\text{M}$   $\text{NiCl}_2$  en invernadero.
- Pequeñas adiciones de Si favorecen el crecimiento de la biomasa aérea y nodular de las tres variedades de frijol, por lo que se establece la concentración óptima entre 1-3  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{SiO}_3$  en invernadero.
- La concentración de ureidos en hojas pareciese estar correlacionada positivamente con las adiciones de los nutrientes y ser independiente de la masa aérea y nodular.
- La urgente necesidad de proseguir con estudios sobre el impacto de la nutrición mineral en la efectividad de la simbiosis entre especies de leguminosas de interés comercial y cepas efectivas de rizobios



## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, P. 2004. Aspectos de la nutrición mineral en cultivos en relación al suelo. Tratado de Cultivo sin Suelo. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid- España 81-111.
- Aery, N., Jagetiya, B. 2000. Effect of cobalt treatments on dry matter production of wheat and DTPA extractable cobalt content in soils. Commun Soil Sci Plant Anal. 31: 1275- 1286
- Atkins,C., Smith, P. 2000. Ureide synthesis in legume nodules. In: Triplett EW, ed. Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process. Horizon Science , 559–587
- Bai, Ch., Reilly, C., Wood, B. 2006. Nickel Deficiency Disrupts Metabolism of Ureides, Amino Acids, and Organic Acids of Young Pecan Foliage. Plant Physiol. 140: 433–443
- Bielecki, R., Ferguson, I. 1983. Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. Encyclopedia of Plant Physiol., Vol 15a. Springer Verlag, Berlin, pp 422–449
- Blade, S., Shetty, S., Terao, T., Singh, B.1997. Recent developments in cowpea cropping systems research. Advances in Cowpea research. Copublicación de International IITA y JIRCAS. IITA Ibadan, Nigeria.128 P.
- Brink, M., Belay, G. 2006. Plants Resources of Tropical Africa 1. Cereals and Pulses. PROTA Foundation. Backhuys Publishers. Leiden, Países Bajos
- Brown, P., Welch, R., Cary, E., Checkai, R. 1987. Beneficial effect of nickel on plant growth. J Plant Nutr. in press
- Brown, P., Welch, R. y Cary, E. 1987. Nickel: A Micronutrient Essential for Higher Plants. Plant Physiol. 85: 801- 803
- Brown, P., Welch, R., Madinson, J. 1990. Effect of nickel deficiency on soluble anion, amino acid, and nitrogen levels in barley. Plant Soil.125:19-27
- Cataldo D., Maroon, M., Schrader, L. 1975 Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun Soil Sci Plan 1: 71-80

- Cocking, E. 2003. Endophytic colonization of plant roots by nitrogen- fixing bacteria. *Plant Soil*. 252: 169-175.
- Coe, S. 2004. *Las primeras cocinas de América*. Fondo de Cultura Económica. 373 pp
- Clarkson, D. 1980. The mineral nutrition of higher plants. *Ann Rev Plant Physiol*. 31: 239-298.
- Dakora, F. 2000. Commonality of root nodulation signals and nitrogen assimilation in tropical grain legumes belonging to the tribe Phaseoleae. *Plant Physiol* 27: 885-892.
- Dakora, F., Newalmondo, A. 2003. Silicon nutrition promotes root growth and tissue mechanical strength in symbiotic cowpea. *Fun. Plant Biol.*, 30:947- 953
- De Gouveia, M., Bolívar, A., López, M., Salih, A., Pérez, H. 2005. Participación de agricultores en la selección de materiales genéticos de frijol (*Vigna unguiculata*) evaluados en suelos ácidos de la Parroquia Espino Estado Guárico (Venezuela). *Cuadernos de Desarrollo Rural*. 54: 113-129.
- Delhaize, E., Randall, P. 1995. Characterization of a phosphate accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 107: 207–213
- Dixon, N., Gazzola, C., Blakely, R., Zerner, B. 1975. Jack-Bean urease (E.C.3.5.1.5.3.) a metalloenzyme a simple biological role for nickel. *J Am Chem Soc* 97:4131-4133
- Epstein, E. 2009. Silicon: its a manifold roles in plants. *Annals of Applied Biol*. ISSN 0003-4746.
- Eskew D., Welch, R., Cary, E. 1983. Nickel: an essential micronutrient for legumes and possibly all higher plants. *Science* 222: 621-623
- Eskew, D., Welch, R., Norvell, W. 1984. Nickel in higher plants further evidence for an essential role. *Plant Physiol*, 76: 691-693.

- Fery, R. 2002. New opportunities on *Vigna*. Págs. 424-428 en: Janick J., Whipkey, A. (eds.) Trends in new crops and new uses. ASHS Press. Alexandria, E.U.A.
- Furihata T, Suzuki M, Sakurai H. 1992. Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. Plant Cell Physiol 33: 1151–1157
- Gerendas, J., Zhu, Z., Bendixen, R., Ratcliffe, R., Sattelmacher, B. 1997. Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. Zeit. Pflanz. und Bod. 160: 239–51.
- Gerendas, J., Polacco, J., Freyermuth, S., Sattelmacher, B. 1999. Significance of nickel for plant growth and metabolism. J plant nutr soil sc 162:241-256.
- Guo, Z., Liu, H., Tian, F., Zhang, Z, Wang, S. 2006. Effect of silicon on the morphology of shoots and roots of alfalfa (*Medicago sativa*) Aust J Exp Agric. 46: 1161- 1166.
- Halbleib, C., Ludden, P. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. J Nutr. 130:1081-1084.
- Hassett, J., Zak, D. 2005. Aspen harvest intensity decreases microbial biomass, extracellular enzyme activity and soil nitrogen cycling. Soil Sci. Soc. Am. J. 69:227–235
- Hernández, G., Valdés- López, O., Ramírez, M., Goffard, N., Weiller, G., Aparicio-Fabre, R., Fuentes, S y col. 2009. Global Changes in the Transcript and Metabolic Profiles during Symbiotic Nitrogen Fixation in Phosphorus- stressed Common Bean Plants. Plant Physiol 151: 1221- 1238
- Higuera, A., 1992. Efectividad de los modelos de Gardner- Eberhart y Griffing en la determinación de la importancia relativa de la varianza aditiva en un cruzamiento dialélico de ocho líneas de frijol (*Vigna Unguiculata* (L.) Walp. Rev. Fac. Agron (LUZ) 9: 63-75
- Infante N., Madriz P., González T. 2004. Estudio de la formación de órganos vegetativos y reproductivos de cultivares de frijol mungo (*Vigna Radiata* (L.) Wilczek). Rev. Fac. Agron (mcy) 30: 123-136.

- Infante, N., Madriz, P., González, T. 2003. Estudio de la formación de órganos vegetativos y reproductivos de cultivares de frijol mungo (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) Rev. Fac. Agron. 30: 123-136.
- Israel, D. 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. Plant Physiol. 84: 835- 840.
- Izaguirre-Mayoral, ML., Carballo, O., Flores, S., De Mallorca, M., Oropeza, T. 1992. Quantitative analysis of the symbiotic N<sub>2</sub> fixation, non-structural carbohydrates and chlorophyll content in sixteen native legume species collected in different savanna sites. Symbiosis 12: 293-312
- Izaguirre-Mayoral, ML., Carballo, O., Sicardi, M., Marys, E., Gil, F. 1994. Symbiotic nitrogen fixation and physiological performance of bean (*Phaseolus vulgaris* L. var. Tacarigua) plants as affected by *Rhizobium* inoculum position and bean rugose mosaic virus infection. J ex bot 45: 373-383
- Izaguirre-Mayoral, ML., Vivas, A., Oropeza, T. 1995. Analysis of the response of thirty-seven native legume species to artificial shade in a neotropical savanna. Symbiosis 19: 111-129
- Izaguirre-Mayoral, ML., Vivas, A. 1996. Symbiotic N<sub>2</sub>- fixation in tropical legume species growing at high geographic elevation. Symbiosis 21: 49-60
- Izaguirre-Mayoral, ML., Olivares, E. 1998. Comparison of the physiological performance of *Phaseolus vulgaris* L. and *Vigna unguiculata* L. Walp. during the early stages of nodulation. Agron Africaine 1: 315-334.
- Izaguirre-Mayoral, ML., De Mallorca, M. 2000. Efecto de factores bióticos y abióticos sobre la fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas tropicales. La fijación biológica de nitrógeno en América Latina: El aporte de las Técnicas Isotópicas. Irapuato, México, 109-116.
- Izaguirre-Mayoral, ML., Flores, S., Carballo, O. 2002. Determination of acid phosphatase and dehydrogenase activities in the rhizosphere of nodulated legume species native to two contrasting savanna sites in Venezuela. Biol fert soils 35: 470 – 472
- Izaguirre-Mayoral, ML., Sinclair, T. 2005a. Soybean genotypic differences in growth, nutrient accumulation and ultrastructure in response to manganese and iron supply in solution culture. Ann Bot 96: 149-158

- Izaguirre-Mayoral, ML., Sinclair, T. 2005b. Variation of Mn and Fe accumulation among soybean genotypes growing on hydroponic solutions at differing Mn and nitrate concentrations. *J Plant Nutr* 28: 521-535
- Izaguirre-Mayoral, ML., Olivares, E. 2006. Symbiotic and physiological performances of Bradyrhizobium-nodulated cowpea plants subjected to varying concentrations of manganese and iron. *Symbiosis* 41: 143-149.
- Jia, Y., Gray, V., Straker, C. 2004. The influence of *Rhizobium* and arbuscular mycorrhizal fungi of nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Ann Bot* 94: 251-258
- Jungk, A. 2001. Roots hairs and the acquisition of plant nutrients from soil. *J Plant nutr soil sci.* **164**: 121-129
- Kalapathy, U., Proctor, A., Shultz, J. 2002. An improved method for production of silica from rice. *Bior. technology*, 85: 285-289.
- Kamara, A., Abaidoo, R., Kwari, J., Omoigui, L. 2007. Influence of phosphorus application on growth and yield of soybean genotypes in the tropical savannas of northeast Nigeria. *P AG Soil Sci.* 53: 539- 552.
- King, C., Purcell, L. 2005. Inhibition of N<sub>2</sub> fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiol.* 137: 389-1396.
- Klucas, R., Hanus, F., Russell, S., Evans, H. 1983. Nickel: A micronutrient element for hydrogen-dependent growth of *Rhizobium japonicum* and for expression of urease activity in soybean leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2253-2257
- Krishna, K. 2010. *Agroecosystems of South India: Nutrient Dynamics, Ecology and Productivity.* BronwWalker Press. Boca Raton, E.U.A.
- Krogmeier, M., McCarty, G., Shogren, D., Bremner, J. 1991. Effect of nickel deficiency in soybeans on the phytotoxicity of foliar-applied urea. *Plant Soil* 135: 283–286.
- Lambers, H., Juniper, G., Cawthray, E., Veneklaas, E. 2002. The pattern of carboxylate exudation in *Banksia grandis* (Proteaceae) is affected by the form of phosphate added to the soil. *Plant Soil* 238: 111-122.
- Lambrides, C., Godwin, I. 2007. Mungbean. Ed. *Pulses.* Heidelberg, Alemania. 68-90.

- Larkom, J. 2008. *Oriental Vegetables: The Complete Guide for the Gardening Cook*. Kodansha America. 232 pp
- Lee, R., Ratcliffe, R., Southon, T. 1990. Measurements of the cytoplasmic and vacuolar Pi content of mature maize roots: relationships with phosphorus status and phosphate fluxes. *J Exp Bot* 41: 1063–1078
- Li, L., Tang, C., Rengel, Z., Zhang, F. 2004. Calcium, magnesium and microelement uptake as affected by phosphorus sources and interspecific root interactions between wheat and chickpea. *Plant Soil*. 261: 29-37
- López- Lara, M. 2007. *Rhizobium* y su destacada simbiosis con las leguminosas. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lux, A., Luxova, M., Abe, J., Morita, S., Inanaga, S. 2003. Silicification of bamboo (*Phyllostachys heterocycla*) root and leaf. *Plant Soil*. 255: 85-91
- Lynch, J., Beebe, S. 1995. Adaptation of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to Low Phosphorus Availability. *Hortscience* 30: 1165- 1171
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. 2004. *Biología de los Microorganismos*. 10ª edición. Pearson, Madrid. 1096 p.
- Madriz, P., Luciani, J. 2004. Caracterización agronómica de 20 cultivares de frijol mungo, *Vigna radiata* (L.) Wilczek, en tres épocas de siembra, en Maracay, estado Aragua, Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* 21: 19-35.
- Malavolta, E., Moraes, M. 2007. Nickel from toxic to essential nutrient. *Better crops With Plant Food* 91: 26-27
- Mali, M., Aery, N. 2008. Silicon effects on nodule growth, dry-matter production, and mineral nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Nutr. Soil Sci.* 171: 835-840.
- Marschner, M. 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd edn, Academic Press Limited, London, UK.

- McBride, M. 1995. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: Are US EPA regulations protective. *J Envir Qual.* 24: 5-18.
- Medina, E., Izaguirre, ML. 2004. N<sub>2</sub>- Fixation in tropical American savannas evaluated by the natural abundance of <sup>15</sup>N in plant tissues and soil organic matter. *Trop Ecol* 45: 87-95
- Mihailovic, N., Drazic, G. 2011. Incomplete alleviation of nickel toxicity in bean by nitric oxide supplementation. *Plant soil envir.* 8: 396–401.
- Miyake, Y., Takahashi, E. 1985. Effect of silicon on the growth of soybean plants in a solution cultura. *Soil Sci Plant Nutr.* 31: 625- 636.
- Mishra, D., Kar, M. 1974 Nickel in plant growth and metabolism. *Bot Rew* 40: 395-452.
- Morcuende, R., Bari, I., Gibbon, W., Zheng, B., Datt, O., Bläsing, B., Usadel, T., Czechowski, M, Udvardi, M., Stitt, W.R. 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant, Cell Envir* 30: 85-112.
- Newalmondo, A., Jaffer, M., Dakora, F. 2001. Subcellular organization of N<sub>2</sub>- fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata*) supplied with silicon. *Protoplasma.* 216: 94-100.
- Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocaña, A., Lluch, C. 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common vean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiol Plant.* 121: 498-505.
- Ospina, A., Florentino, A., Velázquez, L., Araujo, D. 2011. Respuesta de las propiedades físicas del suelo después de 1 año bajo siembra directa y rotación de cultivos en Turén, estado Portuguesa, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (UCV).* 37: 75-85.
- Paludosi, S.1997. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. IITA Ibadan, Nigeria. 1:12.
- Pascual, J., Moreno J., Hernández T, García C. 2002. Persistence of immobilized and total urease and phosphatase activities in a soil amended with organic wastes. *Bioresource Technol.* 82: 73-78.

- Pelaez, C., Olivares, E., Cuenca, G., Mayoral-Izaguirre, ML. 2010. Manganese modulates the responses of nitrogen- supplied and Rhizobium- nodulated *Phaseolus vulgaris* L. to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi . Soil Biol. Y Bioche. 42: 1924- 1933
- Phillips, R. 2013. Cowpea processing and products: dry beans and pulses, processing and nutrition. John Wiley & Sons. Iowa, E.U.A. 260 p.
- Piccini, D., Malavolta, E. 1992. Toxicidade de níquel em arroz de feijao em solos ácidos. Rev Bras de ciencia do solo 16:229-233.
- Prasad, S., Singh, A., Jain, N., Joshi, H. 2007. Ethanol production from sweet sorghum syrup for utilization as automotive fuel in India. Energ Fue. 21: 2415–2420
- Pypers, P., Loon, L., Diels., J., Abaidoo, R., Smolders, E., Merck, R. 2006. Plant-available P for maize and cowpea in P-deficient soils from the Nigerian Northern Guinea savanna- Comparison of E- and L- values. Plant and soil. 283: 251- 264.
- Raghothama, K., Karthikeyan, S. 2005. Phosphate acquisition. Plant Soil 274: 37-49.
- Robson, A., Pitman, M. 1983. Interaction between nutrients in higher plants. Encyclopedia Plant Physiol, pp. 147-180.
- Rotaru, B., Sinclair, T. 2009. Interactive influence of phosphorus and iron on nitrogen fixation by soybean. Env. and exp. Bot. 66: 94-99
- Sakamoto, K., Nohara, Y. 2009. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) shoots systemically control arbuscule formation in mycorrhizal symbiosis. Soil Sci. Plant Nutr. 55: 252- 257
- Santella, M., Madriz, P., Machado, W., González, T. 2000. Estudio del comportamiento agronómico de siete genotipos de frijol mungo (*Vigna radiata* (L.) Wilczek), en Maracay, estado Aragua. Rev. Fac. Agron. (Mcy) 26:137- 147
- Sauerbeck, D., Hein, A. 1991. The nickel uptake from different soils and its prediction by chemical extractions. Water, Air Soil Pol.57: 861-871
- Schachtman, D., Reid, R., Ayling, S. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil the cell. Plant Physiol. 116: 447-453



- Schubert, K. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport, and metabolism. *Plant Physiol.* 37: 539–574.
- Seregin, I., Kozhevnikova, A. 2006. Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. *Russ J Plant Physiol.* 53: 257-277
- Shane, M., De Vos, M., De Roock, S., Cawthray, G., Lambers, H. 2003. Effects of external phosphorus supply on internal phosphorus concentration and the initiation, growth and exudation of cluster roots in *Hakea prostrata* R.Br. *Plant Soil* 248: 209-219.
- Shimado, N., Ando, T., Tomiyama, M., Kaku, H. 1980a. Role of nickel in plant nutrition: effects of nickel on the growth of tomato and soybean. *Japan. Jour. Soil Sci. Plant Nut.* 51: 487–92.
- Shimado, N., Ando, T. 1980b. Role of nickel in plant nutrition: effect of nickel on the assimilation of urea by plants. *Nippon Dojo Hiriyogaku Zasshi* 51: 493-496
- Shelp, B., Ireland, R. 1985. Ureide metabolism in leaves of nitrogen- fixing soybean plants. *Plant Physiol.* 77: 779-783
- Shu-Dou, J., Delin, W., Thulin, M. 2010. *Vigna Savi*, *Nuovo Giorn. Lett.* 8: 113. 1824, nom. cons. *Flora china* 10: 255-259.
- Shubert, K. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport and metabolism. *Anual Rev. Plant Physiol.* 37: 539-574
- Sicardi de Mallorca, M., Izaguirre-Mayoral, ML. 1994. Seasonal dynamic, host range and symbiotic efficiency of native rhizobial populations in three soil horizons of four contrasting savanna sites. *Symbiosis* 17: 43-63
- Sicardi de Mallorca, M., Izaguirre-Mayoral, ML. 1993. A comparative evaluation of the symbiotic N<sub>2</sub>- fixation and physiological performance of thirty-six native legume species collected in a tropical savanna during the rainy and dry seasons. *Symbiosis* 16: 225-247
- Singh, Y., Singh, B., Ladha, J., Khind, C., Gupta, R., Meelu, O., Pasuquin, E. 2004. Longterm effects of organic inputs on yield and soil fertility in the rice–wheat rotation. *Soil Sci Soc Am J.* 68: 845–853
- Smith, N., Woodburn, J. 1984. Nickel and ethylene involvement i the senescence of leaves and flowers. *Naturwissenschaften.* 71: 210-211.

- Sprent, J. 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin of some Leguminosae. *Plant Cell Envir* 3: 35-43
- Sprent J. 2001. *Nodulation in Legumes*. The Cromwell Press Ltd, Gran Bretaña 146 p
- Sprent, J., Odee, D., Dakora, F. 2010. African legumes: a vital but under-utilized resource. *J Exp Bot* 61: 1265-1257.
- Tabatabai, M. 1994. Soil enzymes. *In* :R.W. Weavve, J.S. Angle and P.S. Bottomley. 1994. *Methods of Soil Analysis. Part 2 Microbiological and Biochemical Properties*. Soil Science of America. U.S.A.
- Taíz, L., Zeiger, E. 2006. *Plant physiology*. 3ra. Edición. Sinauer Associates. U.S.A. 1338 p.
- Tajima, S., Nomura, M., Kouchi, H. 2004. Ureide biosynthesis in legume nodules. *Fron. Bio* 9: 1374-1381
- Timko, M., Ehlers, J., Roberts, P. 2007. *Pulses, sugar and tu ber crops*. 2ª edición. Springer.Heidelberg, Alemania. 67 p.
- Todd, C., Tipton, P., Blevins, D., Piedras, P., Pineda, M., Polacco, J. 2006. Update on ureide degradation in legumes. *J Exp Bot*. 57: 5-12
- Vadez, V., Sinclair, T. 2001. Leaf ureide degradation and N<sub>2</sub> fixation tolerance to water deficit in soybean. *J Exp Bot*. 52:153–159.
- Vaughan, J., Geisslr, C. 2009 *The New Oxford Book of Food Plants*. Oxford University Press. 288 p
- Walker, C., Graham, R., Madison, J., Cary, E., Welch, R. 1985. Effects of nickel deficiency on some nitrogen metabolites in cowpeas (*Vigna unguiculata L. Walp.*). *Plant Physiol*. 79: 474-47
- Welch, R. 1981. The biological significance of nickel. *J Plant Nutr*. 31: 345-356
- Winkler, R., Polacco, J., Blevins, D., Randall, D. 1985. Enzymatic degradation of allantoine in developing soybeans. *Plant Physiol*. 79:787-793
- Zantua, M., Dumenil, I., Bremner, J. 1997. Relationships between soil urease activity and other soil properties. *Soil Sci Soc Am J*. 41:350-352.

## 10. ANEXOS



**ANEXO 1.** Biomasa aérea de frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp) en presencia de concentraciones crecientes de NiCl<sub>2</sub>



**ANEXO 2.** Biomasa nodular de frijol bayo (*Vigna unguiculata* (L) Walp) en presencia de concentraciones crecientes de NiCl<sub>2</sub>



**ANEXO 3.** Crecimiento de la biomasa aérea de vainita china (*Vigna unguiculata* ssp *sesquipedalis*) en presencia de concentraciones crecientes de NiCl<sub>2</sub>



**ANEXO 4.** Crecimiento de la biomasa nodular de vainita china (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*) en presencia de concentraciones crecientes de NiCl<sub>2</sub>

