



**LORENA DEL CARMEN HERNÁNDEZ NATAREN**

**EFEECTO DE LA FERTILIZACIÓN CON ZINC EN LA  
FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO EN  
LEGUMINOSAS**

**LAVRAS-MG**

**2019**

**LORENA DEL CARMEN HERNÁNDEZ NATAREN**

**EFFECTO DE LA FERTILIZACIÓN CON ZINC EN LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE  
NITRÓGENO POR LEGUMINOSAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas para a obtenção do título de Doutora.

**Orientadora**

Prof. Dra. Maria Ligia de Souza Silva

Orientadora

Prof. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

Co-orientadora

**LAVRAS-MG**

**2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Nataren, Lorena del Carmen Hernández.

Efecto de la fertilización con Zinc en la fijación biológica de  
nitrógeno por leguminosas / Lorena del Carmen Hernández

Nataren. - 2019.

112 p. : il.

Orientador(a): Maria Ligia de Souza Silva.

Coorientador(a): Fátima Maria de Souza Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Nitrógeno. 2. Phaseolus vulgaris. 3. Glycine max. I. Silva,  
Maria Ligia de Souza. II. Moreira, Fátima Maria de Souza. III.  
Título.

O conteúdo desta obra é de responsabilidade do(a) autor(a) e de seu  
orientador(a).

**LORENA DEL CARMEN HERNÁNDEZ NATAREN**

**EFEECTO DE LA FERTILIZACIÓN CON ZINC EN LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE  
NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas para a obtenção do título de Doutora.

Aprovada em 9 de agosto de 2019.

Dra. Fátima Maria de Souza Moreira	UFLA
Dr. Marco Aurélio Carbone Carneiro	UFLA
Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa	UFLA
Dr. José Lavres Junior	USP
Dr. Hélder Barbosa Paulino	UFTM

Prof. Dra. Maria Ligia de Souza Silva

Orientadora

Prof. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

Co-orientadora

**Lavras-MG  
2019**

*A mis padres por el ejemplo de vida*

*A mis hermanos por el cariño, apoyo y ejemplo de fortaleza*

*Mis sobrinos por las risas y los te quiero que me brindan, por la continuidad*

*A mis amigos que estuvieron presentes en esta etapa de la vida*

*Dedico*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Federal de Lavras (UFLA), especialmente al Departamento de Ciencias del Suelo DCS-UFLA por el apoyo institucional y a la Organización de los Estados Americanos (OEA-COIMBRA), por la concesión de la beca.

A los profesores del Programa de Posgrado, en Ciencias del Suelo por las enseñanzas ofrecidas.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”. Y las agencias que financian el laboratorio de nutrición de plantas, las instituciones de fomento CAPES, FAPEMIG y al CNPq.

A la profesora Maria Ligia por la orientación, apoyo, disposición para ayudar, por compartir sus conocimientos y sobre todo por su paciencia.

A la profesora Fátima Moreira por su orientación y aportaciones para la realización de este trabajo.

Al laboratorio de Bioquímica y fisiología molecular de plantas del departamento de Fisiología Vegetal, por el apoyo brindado.

A la banca de defensa por su contribución para mejorar el trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de nutrición de plantas: Marcio, Franklin, Arnon, Patrick, Fabrício, Gabriel, Anderson, Aline; sin su apoyo habría sido más difícil culminar con éxito.

A mi familia de extranjeros (México, Ecuador, Perú, Colombia, Nicaragua, Guatemala, Costa Rica, Cuba, Honduras) que el destino quiso juntarnos en esta etapa y marcaran la diferencia.

A mi estrella que iluminó parte de este camino y siempre me acompañará.

A mis padres que han sido motivación para siempre crecer, hermanos y hermanas que me dan la fuerza en momentos de flaqueza, mis amigos que siempre me animan y creen en mí.

A todos aquellos que directa o indirectamente contribuyeron para la realización de este trabajo.

**AGRADEZCO**

## RESUMEN

Los problemas de desnutrición por deficiencias de micronutrientes como el Zn en más de la mitad de la población mundial, así como la deficiencia de este nutriente en la mayor parte de los suelos del mundo, ha permitido el desarrollo de métodos para subsanar este problema, como lo es la biofortificación agronómica, que permite la obtención de productos vegetales comestibles con mayores contenidos del elemento en cuestión. Sin embargo, poco es sabido del papel específico del Zn en la fijación biológica de nitrógeno (FBN) que es promovida por el suministro adecuado de Zn y participa en las funciones fisiológicas de las plantas y como cofactor de una gran variedad de metaloenzimas. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de dosis altas de Zn en la fijación biológica de nitrógeno en los cultivos de frijol y soya en dos tipos de suelos. La investigación fue desarrollada en un experimento en invernadero en el Departamento de Ciencias del Suelo (DCS)/Universidad Federal de Lavras, utilizando un suelo Latossolo con textura diferente (Latossolo Vermelho distroférico y Latossolo Amarelo) y las cepas *Rhizobium tropici* (Ciat 899) y *Bradyrhizobium elkanii* (Br 29) asociado al cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y soya (*Glycine max*) respectivamente; aprobadas como inoculantes por el ministerio de agricultura pecuaria y abastecimiento. Cada uno de los cultivos fue llevado hasta inicios de floración en el cual se evaluaron variables asociadas con la FBN como son la nodulación, masa seca de nódulos, masa seca de la raíz y parte aérea, clorofila, ureidos, y la acumulación de nitrógeno por la planta, así como variables nutrimentales asociadas a la fertilización con Zn, como las concentraciones de N, P, Ca, Mg, Cu y Zn en el tejido vegetal y la actividad de la enzima fosfatasa ácida. Independientemente de las dosis que buscan biofortificar el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) usadas, la aplicación de Zn presentó efectos positivos en el incremento de la masa seca de la parte aérea y los nódulos, así como en la clorofila, concentración y contenido de nitrógeno. Las concentraciones nutrimentales de N, P, Ca, Mg, Cu y Zn no presentaron deficiencias en el tejido vegetal por el incremento de Zn en la planta debido a la fertilización. En el cultivo de soya se encontró que la mejor respuesta de la planta asociada con *Bradyrhizobium* se presenta cuando se aplican 20 y 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn en ambos suelos con incrementos en las variables asociadas con la fijación biológica de nitrógeno destacando que el suelo de textura media pese a ser suelo con baja fertilidad, presentó las mejores condiciones para el desarrollo del cultivo asociado a las bacterias nodulíferas fijadoras de N. Estos resultados mostraron que las dosis entre 10 y 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn en suelo consideradas como biofortificadoras para los cultivos de frijol y soya asociados a bacterias nodulíferas fijadoras de nitrógeno, benefician variables asociadas a la FBN sin afectar negativamente las concentraciones nutrimentales de las plantas y presentando beneficios para la salud humana, económicos y ambientales al favorecer la FBN.

**Palabras claves:** Biofortificación. Nitrógeno. *Phaseolus vulgaris*. *Glycine max*. Latossolo.

## RESUMO

Os problemas de desnutrição devido a deficiências em micronutrientes como Zn em mais de metade da população do mundo, assim como a deficiência deste nutriente na maioria dos solos do mundo, permitiu o desenvolvimento de métodos para superar esse problema, como é a biofortificação agrônômica, que permite obter produtos vegetais comestíveis com maiores teores do elemento em questão. No entanto, pouco se sabe sobre o papel específico do zinco na fixação biológica de nitrogênio (FBN), que é promovida por um fornecimento adequado de Zn e participa nas funções fisiológicas das plantas sendo cofator de muitas metaloenzimas. Portanto, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de doses altas de Zn na fixação biológica de nitrogênio nas culturas de feijão e soja em dois tipos de solos. A pesquisa foi realizada em uma casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo (DCS)/Universidade Federal de Lavras, utilizando um solo Latossolo com textura diferente (Latossolo Vermelho distroférico e Latossolo amarelo) e as estirpes de *Rhizobium tropici* (CIAT 899) e *Bradyrhizobium* (Br 29) associadas ao cultivo de feijão (*Phaseolus vulgaris*) e soja (*Glycine max*), respectivamente. A colheita foi realizada no começo da floração de cada cultura e avaliaram-se variáveis relacionadas com a FBN como são a nodulação, massa seca dos nódulos, massa seca da raiz e parte aérea, clorofila, ureídeos e o nitrogênio acumulado, assim como as variáveis nutricionais associadas à adubação com zinco, como as concentrações de N, P, Ca, Mg, Cu e Zn no tecido vegetal e a atividade da enzima fosfatase ácida. Independentemente das doses que visam a biofortificação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) utilizadas, a aplicação de Zn apresentou efeitos positivos no aumento da massa seca da parte aérea e dos nódulos, na clorofila, assim como na concentração e conteúdo de nitrogênio. As concentrações nutricionais de N, P, Ca, Mg, Cu e Zn não apresentaram deficiências no tecido vegetal devido ao aumento de Zn na planta pela adubação. No cultivo de soja, verificou-se que a melhor resposta de planta associada ao *Bradyrhizobium* ocorre quando 20 e 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn são aplicados em ambos solos com aumentos nas variáveis associadas à fixação biológica de nitrogênio, destacando que o solo de textura média, apesar de ser solo com baixa fertilidade, apresentou as melhores condições para o desenvolvimento da cultura associada à bactéria nodulífera fixadora de N. Esses resultados mostraram que doses entre 10 e 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn consideradas como biofortificantes para o feijão e soja associados à bactéria nodulífera fixadora de nitrogênio, beneficiaram variáveis associadas à FBN sem afetar negativamente as concentrações dos nutrientes nas plantas e apresentar benefícios à saúde humana, econômica e ambiental, promovendo a FBN.

**Palabras chaves:** Biofortificação. Nitrogênio. *Phaseolus vulgaris*. *Glycine max*. Latossolo.



## RESUMEN

<b>PRIMEIRA PARTE .....</b>	<b>10</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>10</b>
<b>2 MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1 Zinc: características y funciones.....</b>	<b>11</b>
<b>2.2 Formas de absorción y transporte del Zn por las plantas.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3 Efectos fisiológicos del Zn en leguminosas.....</b>	<b>14</b>
<b>2.3.1 Efectos de deficiencias de Zn en leguminosas.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.2 La toxicidad del Zinc en leguminosas .....</b>	<b>21</b>
<b>2.3.3 Efecto del Zn en Nódulo .....</b>	<b>22</b>
<b>2.4 El Zn en el metabolismo del nitrógeno.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.1 Transporte de Nitrógeno fijado simbióticamente .....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.2 Leguminosas Ureídicas .....</b>	<b>27</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>29</b>
<b>SEGUNDA PARTE ARTICULOS.....</b>	<b>44</b>
<b>ARTÍCULO 1: EL ZN EN LA SIMBIOSIS DE <i>RHIZOBIUM TROPICI</i> CON PLANTAS DE FRIJOL.....</b>	<b>44</b>
<b>ARTÍCULO 2: EL ZN EN LA SIMBIOSIS DE <i>BRADYRHIZOBIUM ELKANII</i> CON PLANTAS DE SOYA .....</b>	<b>80</b>

## PRIMEIRA PARTE

### 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

Se sabe que más de la mitad de la población mundial presenta problemas de desnutrición por deficiencia de micronutrientes considerado uno de los desafíos mundiales más graves para la humanidad, aunado a las deficiencias de este elemento en la mayor parte de los suelos del mundo, por lo cual; se han desarrollado técnicas que permitan el enriquecimiento de los cultivos en las partes comestibles, como lo es la biofortificación agronómica que permite la obtención de nutrientes en cultivos alimentarios, mejorando las cualidades nutricionales de los cultivos proporcionando un medio rentable y sostenible a largo plazo para suministrar más micronutrientes.

Las semillas enriquecidas con zinc son importantes no solo para el consumo humano, sino que también mejoran el rendimiento de los cultivos en suelos deficientes de Zn, al proporcionar un mejor crecimiento de las plántulas, tolerancia al estrés abiótico y resistencia a patógenos. Siendo que el Zn es uno de los micronutriente más deficiente en los suelos a nivel mundial, disminuyendo los rendimientos y calidad nutricional, debido al hecho de que este elemento desempeña un papel como constituyente estructural o cofactor de diferentes enzimas y proteínas, relacionadas con el metabolismo de los carbohidratos, tanto en la fotosíntesis como en la conversión de azúcares a almidón, metabolismo de proteínas, metabolismo de la auxina (regulador del crecimiento), formación de polen, mantenimiento de la integridad de membranas biológicas y resistencia a la infección por ciertos patógenos, y el metabolismo del nitrógeno.

Las leguminosas como el frijol y la soya, además de proporcionar una fuente de alimento rica en proteínas para humanos y animales, es utilizado para enriquecer las reservas de nitrógeno del suelo, lo que permite el crecimiento de otras especies de cultivos con la ventaja adicional de disminuir impactos ambientales por contaminación comparado con el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos y posterior reducción de los costos asociados con la producción de cultivos; logrando la fijación del  $N_2$  debido a su capacidad de establecer endosimbiosis con bacterias del suelo.

Actualmente es poca la información disponible sobre el papel específico de Zn en la Fijación Simbiótica de N (FSN), la cual es promovida mediante un suministro adecuado de Zn. Incrementado el número y tamaño de los nódulos, contenido de leghemoglobina y la cantidad

de N<sub>2</sub> fijado, probablemente porque el Zn está involucrado en la biosíntesis de leghemoglobina y la síntesis de sacarosa. Por lo anterior el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de dosis altas de Zn en la fijación biológica de nitrógeno en los cultivo de frijol y soya en dos tipos de suelos.

## **2 MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Zinc: características y funciones**

El Zn es uno de los micronutrientes esenciales que participa en las funciones fisiológicas de las plantas con efectos benéficos en el crecimiento, funciones celulares en todos los organismos vivos, siendo un cofactor esencial para muchos factores de transcripción, dominios de interacción de proteínas y enzimas en las plantas (VALLE y AULD 1990; LEÓN-MEDIAVILLA et al., 2018). Su presencia activa una serie de enzimas vitales para el crecimiento, síntesis de proteínas y producción de hormonas promotoras de crecimiento como las auxinas en las plantas (PREET y SIDHU, 2016) y participa en actividades metabólicas (BONNET et al., 2000).

En las plantas, el papel del Zn es funcional, estructural, cofactor y regulador en una gran variedad de metaloenzimas (BROWN et al., 1993; KABIR et al., 2014) en las cuales se une a los sustratos correspondientes, mientras que en otras situaciones, forma complejos tetraédricos con radicales polares que contienen N, oxígeno (O<sub>2</sub>) y ligandos de azufre (S); con una variedad de compuestos orgánicos (WILLIAMS, 1989; KIRKBY y RÖMHELD, 2007), reduce el estrés por calor (PECK y McDONALD, 2010) o por salinidad (TAVALLALI et al., 2010). Disante et al. (2011) mencionan que el Zn afecta la capacidad de absorción de agua y su translocación a varias partes de la planta. Desempeña un papel vital durante la fotosíntesis, ya que actúa como un cofactor de la enzima anhidrasa carbónica requerida por la planta durante la fotosíntesis (PREET y SIDHU, 2016), participa en la transducción de señales a través de la proteína quinasa (HANSCH y MENDEL, 2009), en la fijación de nitrógeno aunque la función específica no está clara debido a la multitud de proteínas de la célula en las cuales puede actuar a diferentes niveles (LEÓN-MEDIAVILLA et al., 2018).

El suministro inadecuado de Zn a las plantas afecta diferentes aspectos de la reproducción que van desde el desarrollo floral, la antesis, gametogénesis, fertilización y el conjunto de semillas. La deficiencia crítica de Zn es considerada cuando la concentración de este se encuentra entre 15 y 20  $\mu\text{g g}^{-1}$  de peso seco (PANDEY, 2010).

## 2.2 Formas de absorción y transporte del Zn por las plantas

En la solución del suelo, el contenido de Zn es muy bajo, desde  $4 \times 10^{-10}$  a  $4 \times 10^{-6}$  M, y altamente dependiente del pH del suelo (BARBER, 1995). El Zn es suministrado para el metabolismo de la planta mediante un flujo de masa en menor medida y por difusión en mayor medida (MALAVOLTA, 2006; MARSCHNER, 2012) siendo poco móvil en plantas el cual varía entre las especies (PEASLEE et al., 1981; WELCH, 1995). En la rizosfera, después de la solubilización,  $\text{Zn}^{+2}$  es activamente absorbido por las raíces con el gasto de energía. En las raíces, alrededor del 90% de este nutriente están en sitios de intercambio o adsorbidos en las paredes celulares del parénquima cortical (MOREIRA et al., 2018). Después del contacto de las raíces con los nutrientes, necesita alcanzar el xilema para ser transportado a los brotes mediante la corriente de transpiración (BROADLEY et al., 2007).

Así mismo, el citoplasma de las células de la raíz absorbe el Zn de la solución el suelo y posteriormente es transportado, vía xilema, hacia las partes de crecimiento y las semillas (ALLOWAY, 2008), mediante varias familias de proteínas (BOUAIN et al., 2014). Durante este proceso, tales proteínas juegan un papel importante para permitir que la planta no solo absorba y distribuya Zn, sino; que también elimine el exceso de Zn a través de su compartimentación en la vacuola, promoviendo la homeostasis de Zn (SINCLAIR y KRÄMER, 2012; DEINLEIN, 2012).

El transporte de Zn vía floema, permite la acumulación en las semillas y las frutas (WU et al., 2010), de forma más fácil. Dado que los nutrientes se disuelven, su movimiento a través de la planta sigue las mismas vías, predominantemente a través del simplasto y en menor medida a través del apoplasto (WHITE et al., 2002). Durante la captación, inicialmente en la vía apoplástica, para alcanzar el xilema necesita atravesar la endodermis e ingresar al citoplasma. Esto sucede porque la tira de Casparian es una barrera apoplástica importante (ROSOLEM et al., 2005). Según Wang (2003) el zinc después de ser absorbido por las raíces

puede acumularse en los compartimentos del apoplasto y del simplasto en tres fracciones distintas: (1) de forma intercambiable, en el apoplasto, adsorbido a la matriz de pectina cargada negativamente de la pared celular; (2) forma lábil, asociada con un nutriente localizado en el citoplasma; y (3) forma no flexible, en el nutriente depositado en la vacuola y no desplazado en la planta.

Las proteínas de transporte no solo promueven el transporte de Zn a varios tejidos de la planta, sino que también permiten su movimiento en la célula, ya que los procesos dependientes de Zn tienen lugar dentro de varios organelos como las mitocondrias, los cloroplastos y el núcleo, lo que exige el transporte a través de las membranas respectivas (PILON et al., 2009). El Zn se puede mover de forma celular de una célula a otra y se libera de las células endodérmicas hacia el xilema, a través de Zn<sup>2+</sup>-ATPasas (HUSSAIN et al., 2004). Dentro de las células, Zn se transporta a los órganos mediante MTP o Zn<sup>2+</sup>-ATPasas, ya sea para ser almacenado cuando está en exceso, o para ser usado en el ensamble de proteínas (BLAUDEZ et al., 2003; DESBROSSES-FONROUGE et al., 2005; MOREL et al., 2009). En general, estos procesos están regulados por un conjunto de factores de transcripción que organizan la homeostasis de Zn (ASSUNÇÃO et al., 2010). Stephens et al. (2010) mencionan que la concentración de Zn debe ser mantenida por los transportadores de Zn que son responsables de la captación, el flujo de salida y la compartimentación dentro de la planta.

El transporte del Zn en plantas de soya se da de los tallos a las hojas conforme se incrementa la edad de las plantas acercándose a la etapa de madurez (R8). La concentración de Zn en el tallo, hojas y vaina presentan concentraciones de 11.38, 1.60 y 1.72 mg kg<sup>-1</sup> de Zn, respectivamente, cuando se aplican 40 kg ha<sup>-1</sup> de Zn, observándose que al final de la etapa de crecimiento del cultivo y el aumento de la edad de la soya el destino de los nutrientes son las semillas (KOBRAEE y SHASMSI, 2011).

El transporte de Zn en los nódulos implica el suministro desde la raíz, a través de la vasculatura, la liberación en el apoplasto y la absorción en las células del nódulo. Una vez en el citosol, el Zn puede ser usado directamente por proteínas citosólicas o administrarse en orgánulos, incluidos los simbiosomas de células infectadas, por transportadores de eflujo de Zn (LEÓN-MEDIAVILLA et al., 2018).

### 2.3 Efectos fisiológicos del Zn en leguminosas

Los metales pesados en concentraciones bajas son necesarios para diversas actividades metabólicas de microbios, incluyendo rizobios y cultivos de leguminosas (AHMAD et al., 2012).

La planta utiliza Zn de manera más eficiente si se aplica antes y durante la etapa de crecimiento de la hoja y antes de la aparición de inflorescencias (BROHI et al., 2000). Manzeke et al. (2017) realizaron un trabajo de investigación con caupí (*Vigna Unguiculata*) en suelo arenoso y encontraron que la aplicación de Zn aumentó la biomasa y los rendimientos del cultivo comparado con tratamientos que recibieron fertilizantes minerales y orgánicos. Por otra parte, Prasad et al. (2012) en estudio con cultivo de maní (*Arachis hypogaea* L.) aplicaron diferentes concentraciones de zinc en forma de nanopartículas encontrando que con concentraciones de  $1000 \text{ mg kg}^{-1}$  se promueve la germinación de las semillas y el vigor de las plántulas promoviendo el aumento del crecimiento del tallo y las raíces, así como el inicio de la floración temprana además del aumento en los contenidos de clorofila en las hojas.

El suministro suficiente de zinc a las plantas deficientes, incluso en la etapa de floración, mejora parcialmente el rendimiento económico de las plantas, tal como indican Khurana y Tterjee, 2002. Así mismo, la aplicación foliar de Zn en dosis apropiadas durante el desarrollo reproductivo mejora cuantitativa y cualitativamente el rendimiento de semilla en guisantes (*Pisum sativum* L) al complementar los requisitos óptimos/críticos de Zn para el desarrollo reproductivo (PANDEY et al., 2013b). Con aplicaciones de 0.1 M de  $\text{ZnSO}_4$ , se produce aumento significativo en los parámetros de rendimiento, número y tamaño de vainas, número de flores, y número de semillas, aumenta el número de flores por planta al estimular probablemente la formación de órganos reproductivos (óvulos y embriones) masculinos (tejido esporógeno) y femenino como consecuencia de la regulación adecuada y el mantenimiento de la síntesis de proteínas (WILLING et al., 1988).

En cultivo de soya, Helfenstein et al. (2015) encontraron que el tratamiento óptimo de  $2 \mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$  produce la mayor cantidad de biomasa, mientras que administrando concentraciones inferiores o superiores a dicha concentración no muestran diferencias estadísticas significativas, y que el aumento de las concentraciones de Zn en la hoja da como resultado mayores concentraciones de N, K, S y B en las hojas y disminución de P, Mg y Fe.

En el cultivo de frijol mungo (*Vigna radiata*), Samreen et al. (2017) aplicaron dosis de 1 y 2  $\mu\text{M}$  de Zn para evaluar el efecto en el crecimiento, clorofila, proteína y contenidos minerales en condiciones de hidroponía, analizando las muestras dos meses después del trasplante, observaron que con la aplicación de la dosis de Zn más alta, los efectos en las variables evaluadas fueron mayores, con una disminución de los contenidos de P comparado con el control lo que significa que se forman complejos de Zn/P en las raíces impidiendo el movimiento del P. Los contenidos de Cu y Mg en la planta aumentaron, mientras que el Fe muestra un comportamiento competitivo con el Zinc, los contenidos de K, Na y Mn no fueron significativamente depresivos con el aumento de Zn desde el control hasta 2  $\mu\text{M}$ .

No se presenta efecto en la clorofila, los contenidos de proteína cruda se correlacionan positivamente con las dosis de Zn aplicadas, debido a que el zinc es requerido como componente estructural y catalítico de proteínas y enzimas para el crecimiento y desarrollo (BROADLEY et al., 2007).

De acuerdo con Pandey et al. (2013a) el suministro de Zn vía foliar en la etapa previa a la floración minimiza la gravedad de la deficiencia en el desarrollo de la estructura reproductiva y mejora el estado nutricional de las semillas, los carbohidratos de las semillas (contenido de azúcar y almidón) y las proteínas de almacenamiento (albúminas, globulinas, gluteninas y prolaminas). El alto contenido de Zn en semillas es importante para llevar a cabo funciones fisiológicas durante la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas. Las semillas de plantas cultivadas con un suministro adecuado de Zn muestran un crecimiento mejorado de las plántulas y sirven como fertilizante de inicio en suelos deficientes en Zn.

Por otra parte, la fertilización vía foliar aumenta las características en el frijol y reduce la tasa de fertilizante de N sin reducir las características de la planta. Los resultados pueden utilizarse en agronomía mejorando las características cuantitativas y cualitativas para lograr la agricultura sostenible (NASRI et al., 2011). Por ejemplo, Yasari y Vahedi (2012) demostraron que las semillas de soya con fertilización foliar con Zn aumenta un 25.03% los contenidos de aceite; así como Rafique et al. (2015) con aplicación de Zn, incrementaron los rendimientos de semillas de tres cultivares (Green party, Climax y Meteor) de guisantes (*Pisum sativum* L.) y determinaron el rango crítico de la concentración de Zn para el rendimiento máximo del 95% (requerimiento interno de Zn) siendo de 42-53  $\text{mg kg}^{-1}$  en las hojas y 45-60  $\text{mg kg}^{-1}$  en las semillas en los tres cultivares.

Por su parte, Maharnor et al. (2018) informaron que la aplicación de 30 kg ha<sup>-1</sup> de ZnSO<sub>4</sub> junto con la dosis de fertilizante recomendada registró la longitud máxima de la raíz en el cultivo de maní (*Arachis hypogea* L.). El aumento significativo en la longitud de la raíz se debe a la síntesis de zinc facilitada de más auxina y un mayor crecimiento a través del proceso de elongación celular.

Por otro lado, Seifi et al. (2011) indicaron que la aplicación foliar de ZnSO<sub>4</sub> en la floración y el conjunto de semillas aumentaron notablemente los componentes del rendimiento de la soya. Berglund, (2002) observó que la aplicación foliar de Zn, en la etapa de crecimiento vegetativo, incrementa el rendimiento de la semilla de soya. Bozoglu et al. (2007) afirmaron que la aplicación foliar de micronutrientes podría implementarse para obtener un mayor rendimiento y calidad. Estos autores, a su vez, informaron que la escasez de Zn y Mo disminuye el rendimiento en el garbanzo (*Cicer arietinum*) La aplicación foliar de zinc en soya mejora rendimiento al influir en el número de semillas por planta y en el peso de las semillas (KOBRAEE et al., 2011). Zeidan et al. (2006) informaron que los componentes de rendimiento en la lenteja (*Lens culinaris*) se mejoran mediante la aplicación foliar de micronutrientes incluyendo el Zn.

### **2.3.1 Efectos de deficiencias de Zn en leguminosas**

Los principales síntomas de deficiencia de este micronutriente en las plantas son la clorosis en hojas más nuevas, reducción del crecimiento radicular, que limita la absorción de nutrientes; necesarias para su desarrollo y que influye directamente en la productividad y calidad del fruto cosechado (CAKMAK, 2000). La deficiencia de Zn en las plantas retrasa importantes procesos fisiológicos y metabólicos como el metabolismo del nitrógeno, la fotosíntesis, la reducción del desarrollo de flores y frutos, la prolongación de los períodos de crecimiento, disminuye el rendimiento y la calidad de los frutos (GAGAN PREET y SINGH SIDHU, 2016).

En plantas con deficiencia de Zn, se sintetiza menos ácido indolacético (AIA) y las moléculas ya producidas son más propensas a la degradación oxidativa (MOREIRA et al., 2018). Cakmak, Marschner y Bangerth, (1989) demostraron que las plantas de frijol con deficiencias de Zn muestran inhibición del crecimiento en los brotes, así como la disminución



de proteína, clorofila, AIA y un aumento en las concentraciones de aminoácidos. Mismos autores confirmaron el papel del Zn en la síntesis de proteínas y demostraron que la disminución de los niveles de AIA en las plantas deficientes no se debe a la síntesis de triptófano sino que es debido al transporte basípeto o degradación del AIA. Azarpour et al. (2011), con aplicaciones de 1 g/L de Zn de forma pulverizada, lograron incrementar rendimientos de semillas en 1990 kg/ha, el peso de 100 semillas (43.3 g), el número de vainas por planta y la altura de la planta, resultados similares fueron reportados por Salehin y Shahedur (2012) en iguales condiciones de trabajo.

Por otra parte, Pandey et al. (2006), aplicando concentraciones deficientes de Zn (0.1 mmol/L) en solución nutritiva, encontraron que las plantas de lentejas (*Lens culinaris* Medik cv DPL 15) presentan reducción de las anteras, la producción de polen así como el tamaño y la viabilidad de los granos de polen y engrosamiento de las exinas. La actividad de la fosfatasa ácida y la peroxidasa en los granos de polen es incrementada; la estructura, función del polen y establecimiento de semillas presentan deterioro incluso en plantas que se suprimió la fertilización de Zn en la etapa de floración. El aumento del suministro de Zn de deficiente a suficiente al inicio de la floración disminuye la gravedad de los efectos de la deficiencia de Zn en la morfología del polen y el estigma, en la fertilidad del polen y el rendimiento de las semillas.

Estudios realizados por Brennan y Bolland (2014) evidencian que el cultivo de lupinos de diferentes variedades (*Lupinus luteus* L. cv. 'Teo' and 'Motiv') y (*L. angustifolius* L. cv. 'Gungurru'), cultivado en suelos con deficiencia de Zn presenta síntomas visuales de deficiencia a los 20 días después de la emergencia, síntomas que empeoran conforme la maduración de las plantas y hay disminución del crecimiento; en presencia de 3.2 mg de Zn en 6.6 kg de suelo las plantas no presentan problemas de nodulación lo que promueve que no haya deficiencia de N durante el crecimiento. Los valores críticos de Zn en lupinos de la variedad amarillo es <24 mg/kg en ocho hojas y cuando las concentraciones de Zn en el grano es <25 mg/kg, para la variedad de hoja estrecha son <19 mg/kg para los brotes y <20 mg/kg para el grano.

Por su parte, Khurana y Tterjee (2002) encontraron que en concentraciones deficientes de Zn (0.0065 mg/L Zn) el cultivo de guisantes (*Pisum sativum*) presenta clorosis intervenal y hojas atrofiadas debido al acortamiento de los entrenudos, lo que podría ser una expresión del deterioro del metabolismo de las auxinas, ya que el zinc juega un papel importante en la

biosíntesis de las auxinas (MARSCHNER, 2012). Hay reducción de la producción de biomasa, el tamaño de los granos de polen y los ovarios, el rendimiento de las vainas, las semillas, la actividad de la anhidrasa carbónica en las hojas y el contenido de proteínas en las semillas. La disminución de la biomasa en los guisantes deficiente en zinc podría deberse a la alteración de los metabolismos de los carbohidratos y las proteínas y a la reducción de la tasa de fotosíntesis, lo que se traduce en un suministro reducido de asimilados para ser utilizados en el crecimiento vegetativo en condiciones de bajo contenido de zinc (OHKI, 1978).

La deficiencia de zinc reduce el rendimiento de la vaina y la semilla más que el rendimiento vegetativo, por lo tanto; la disminución en el rendimiento reproductivo podría deberse a una floración tardía y abortiva y al escaso desarrollo del órgano reproductivo. El bajo contenido de zinc en guisante causa un mal ajuste de las semillas, lo que demuestra un papel importante del zinc en el desarrollo de las anteras y la viabilidad del polen, como se ha observado en el maíz (*Zea mays* L.). Estos resultados podrían indicar que el requerimiento de zinc es bastante alto en la fase reproductiva que para el crecimiento vegetativo y establece la participación de una alta concentración de zinc en el desarrollo de semillas y vainas (KHURANA y TTERJEE, 2002).

Por otro lado, Pandey et al. (2013b), en el cultivo de guisantes, encontraron que el Zn juega un papel importante en el desarrollo reproductivo de las plantas y el efecto de la deficiencia es mayor en el rendimiento reproductivo que en la producción de biomasa vegetativa. Las plantas deficientes de zinc muestran una marcada depresión en el crecimiento vegetativo, floración tardía junto con un número reducido de flores por planta y el desprendimiento prematuro de órganos florales. Así mismo, se presentan deficiencias en la capacidad de producción de polen (CPP) y granos de polen no viables en plantas de guisantes deficientes en Zn. La deficiencia probablemente suprime la TAZ 1 (Tapetum Development Zinc Finger Protein 1, por sus siglas en inglés) que desempeña un papel esencial en el desarrollo post meiótico. A este respecto, Kapoor et al. (2002) mencionan que la supresión de TAZ 1 causa la degeneración del tapetum y el desarrollo de polen aberrante y/o el aborto prematuro de microesporas; la aplicación foliar de Zn probablemente transporta una concentración adecuada de Zn para estimular la producción de tejido esporógeno, lo que lleva a un aumento en el número de granos formados de polen viables.

Pandey et al. (2013a) en cultivo de *Vigna mungo* cv DPU-88-31 en condiciones de deficiencia encontraron que el rendimiento de masa seca disminuye, la floración es tardía, se

presenta abscisión prematura de las yemas, reducción del número de flores y del tamaño de las anteras, así como de la capacidad de producción de polen y viabilidad del polen, y receptividad del estigma, lo que resulta en una formación deficiente de las vainas y en el rendimiento de las semillas, una marcada reducción en el crecimiento vegetativo, decrecimiento de los entrenudos, supresión de la ramificación y reducción en el tamaño de la hoja, hay disminución de los azúcares reductores, no reductores y totales, y la concentración de almidón en las semillas, mientras que la aplicación foliar de Zn, aumenta los azúcares totales. Las hojas también desarrollaron síntomas visibles, como la clorosis marginal, que se recupera parcialmente por la aplicación foliar de Zn.

En condiciones deficientes de Zn *Vigna mungo* (L.) Hepper cv. UIP 94 al inicio de la floración presenta disminución en la producción de masa seca especialmente en el rendimiento de las semillas, mostrando una disminución en el tamaño de las anteras y cabezas estigmáticas y en la capacidad de producción de polen; por tanto, causa alteraciones estructurales en la exina y retraso en la germinación de los granos de polen y el crecimiento del tubo polínico, los extractos de polen y los exudados estigmáticos muestran un aumento de la actividad de las isoformas de la fosfatasa ácida y la inhibición de las isoformas de la esterasa, presentando disminución en el número de vainas, semillas por vaina y masa de semillas, alterando la testa de la semilla y reducción de la germinabilidad de las semillas. El bajo rendimiento de semillas en condiciones deficientes de Zn se atribuye a un papel del Zn en la función del polen, como también en la interacción polen-pistilo conducente a la fertilización y el desarrollo de semillas (PANDEY et al., 2009).

La deficiencia de Zn también puede inhibir las actividades de enzimas antioxidantes que requieren Zn y pueden causar síntomas necróticos debidos a la reducción de la eliminación de las especies activas de radicales libres de oxígeno. En trabajos de investigación con frijol mungo (*Vigna mungo*), se sugiere que las actividades de Cu/Zn super oxido dismutasa (SOD) y anhidrasa carbónica (CA) se correlacionan positivamente con el suministro de Zn y podrían utilizarse como indicadores de la deficiencia de Zn (PANDEY et al., 2002).

Varias enzimas dependientes de Zn juegan un papel fundamental en el metabolismo de los carbohidratos y, principalmente, en las hojas. La actividad de la CA disminuye notablemente en la presencia de deficiencia aguda de Zn (EPSTEIN Y BLOOM, 2005; MALAVOLTA, 2006). Plantas de *Vigna mungo* L. cv. IPU 94, con niveles por abajo del óptimo de Zn disminuyen la actividad enzimática de la Frutuosa, 1, 6 bifosfato aldolasa (FBPAsa), la

anhidraza carbonica y la super oxido dismutasa e incrementa la actividad de la fosfatase ácida (APase) y la ribonucleasa. La Zn-CA y Zn-SOD se correlacionan altamente con el suministro de Zn y son adecuadas como indicadores del estado de Zn en los nutrientes de las plantas (PANDEY et al., 2002).

En guisantes (*Pisum sativum* L.), la actividad de las enzimas asociadas con la interacción polen-estigma se ve afectada por el Zn, lo que indudablemente influye en el comportamiento de la penetración del tubo del polen y el pistilo, propicio para la germinación y la formación de semillas (PANDEY et al., 2013).

La presencia de zinc en el suelo ayuda al desarrollo de la plúmula y la radícula, según Rout y Das (2003); sin embargo, una mayor exposición a Zn retrasa significativamente e impide la germinación de las semillas en garbanzo (*Cicer arietinum*) de acuerdo con Atici et al. (2005). Por otra parte, el valor nutricional de las semillas de guisantes (*Pisum sativum*) se deteriora en suelos con bajo contenido de zinc, como lo observado por Marschner, (1995), esto debido a la disminución de la proporción de zinc/fitato que puede mejorarse en las semillas mediante la aplicación de fertilizantes con zinc (PECK et al., 1980); esto a su vez podría aumentar el contenido total de fósforo y proteínas de las semillas como se ha obtenido en el guisante.

Leguminosas cultivadas en suelos deficientes en Zn presentan pérdida de la función del polen, deterioro de la fertilización y escaso desarrollo de la semilla lo que se refleja en bajos rendimientos, esto puede compensarse en parte mediante la fertilización con Zn de los cultivos al inicio de la fase reproductiva (PANDEY et al., 2009).

La fertilización edáfica y foliar permiten el aumento en altura del tallo, número de vainas y el aumento de semillas en frijol (*Phaseolus vulgaris* L. cv Khomein) (NADERGOLI et al., 2011). Tal como han sido reportados en diferentes investigaciones, Kulhare et al. (2014) reportan que la aplicación de 5 kg de Zn, aumenta la absorción de Zn ( $103.6 \text{ g ha}^{-1}$ ) en grano y ( $63.6 \text{ g ha}^{-1}$ ) en paja. Por su parte Choudhary, Jhajharia y Kumar (2014) demostraron que la fertilización con 5 mg/kg de Zn en el cultivo de soya, aumenta la altura de la planta, incrementa el número de ramas plantas, el número de vainas, granos vainas y el peso de 100 granos y en trabajos anteriores marcan la evidencia de que la aplicación de Zn influye en el rendimiento.

Así mismo, Kanase et al. (2006) de manera concluyente indican que “la aplicación de Zn incrementa el número de ramas planta, vaina planta, granos vaina y peso de 100 granos”. Sin embargo, el valor más alto para la mayoría de los componentes de rendimiento se obtuvo cuando se fertilizó con 40 mg/kg de S en combinación con 5 mg/kg de Zn; mientras que

Inocêncio et al. (2012) mencionan que la fertilización con Zn aumenta la productividad en el cultivo de soya incluso en suelos con contenidos de micronutrientes por encima del nivel crítico, pero dicho aumento está en función de las estrategias de fertilización.

### 2.3.2 La toxicidad del Zinc en leguminosas

El exceso de Zn induce daño visible en la hoja en forma de clorosis y necrosis en hojas más viejas, lo que indica la acumulación de Zn a lo largo del tiempo (ANDREJIC et al., 2018). El Zn produce un efecto inhibitorio en las leguminosas así como afectaciones en los procesos fisiológicos, limitando el crecimiento, desarrollo de las plantas y reduciendo la producción de biomasa y granos (SARGADOY et al., 2010).

Preet y Sindu, 2016 encontraron que el nivel elevado de Zn afecta la reducción de la biomasa y la fotosíntesis en las plantas. Tal disminución de la actividad fotosintética es debido a la alteración de la estructura del cloroplasto, la síntesis impedida de los pigmentos de clorofila, los carotenoides, la interferencia en las actividades de las enzimas relacionadas con el ciclo de Calvin, impedimento del transporte de electrones y el cierre de los estomas al restringir la fijación de CO<sub>2</sub>.

Por otra parte, Menegatti et al. (2017) en estudio realizado en plantas de café y frijol, menciona que concentraciones superiores a 2 µM de Zn influyen negativamente en el desarrollo de plantas de frijol, por lo que la planta aumenta los índices de clorofila y flavonoides como una estrategia de la especie para minimizar el efecto de las altas concentraciones de Zn. Así mismo, Wani et al. (2007) indican, en estudio con frijol mungo (*Vigna radiata*) inoculado con *Bradyrhizobium* RM8 cultivado en suelo con 4890 mg/kg de Zn, que la presencia del inoculante, aumenta significativamente la leghemoglobina en un 100%, el N de la raíz y del tallo en un 47 y 42% respectivamente en comparación con las plantas cultivadas en el suelo sin inoculante.

En otro estudio, Michael y Krishnaswamy, (2011) concluyeron que la exposición de plantas de frijoles a Zn promueve la acumulación de ácido ascórbico (AsA) y, por lo tanto, confirman que las plantas de frijol tienen la capacidad de tolerar y soportar la toxicidad de Zn. En *P. vulgaris*, la concentración de Zn a 100 µM estimuló las actividades de APX y GPX en un 44% en las hojas y en un 90% en el tallo, pero la actividad de la catalasa (CAT) disminuyó tanto en las raíces como en las hojas induciendo al estrés oxidativo en todos los órganos de las

plantas (CHAOUÏ et al., 1997). Por otro lado, Cuypers et al. (2001) demostraron que la ruta del ascorbato-glutatione en las raíces y hojas de las semillas de frijoles se ve afectada por el Zn.

Mientras que en guisantes (*Pisum sativum* L.) fertilizados con nanopartículas de ZnO (NP ZnO), Mukherjee et al. (2014) demostraron que cuando son cultivados en suelo enriquecido con materia orgánica tratada con NP ZnO, la acumulación de Zn en las raíces es dependiente de la concentración; donde las NP de ZnO aumentan la elongación de la raíz, y las plantas son capaces de transportar el Zn de las raíces a las otras partes de la planta, la alta acumulación de Zn, principalmente en las hojas, induce una acumulación significativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con una reducción en la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APOX). A los 25 días hay disminución de clorofila y aumento de la peroxidación lipídica. Por su parte Matsuda et al. (2002) encontraron que considerando la concentración máxima tolerante las cepas UFLA-01-457 y UFLA-01-473, pertenecientes al género *Bradhizobium* son tolerantes a Zn, Cu y Cd. Simbioses de *Leucaena leucocephala* con *Mesorhizobium* (UFLA 01-765) presentan tolerancia y simbiosis eficiente en suelos contaminados con metales pesados, presentando disminución de enzimas antioxidantes en los brotes de plantas (Rangel et al., 2017).

En estudio de la tolerancia de *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* aislados de suelo con presencia de altas concentraciones de metales pesados, se presentó inhibición del crecimiento vegetativo, producción de masa seca y nodulación, siendo más tolerante a la contaminación la simbiosis *Bradyrhizobium* (Br-4406) con *Enterolobium contortisiliquum* (TRANNNIN et al., 2001).

### 2.3.3 Efecto del Zn en Nódulo

El Zn participa en la biosíntesis de la Leghemoglobina dado que estudios realizados por Demeterio et al. (1972) en soya; Marsh y Waters, (1985) en frijol caupí y Das et al. (2012) en garbanzo mencionan que el número y tamaño de los nódulos, el contenido de Leghemoglobina y la cantidad de N<sub>2</sub> fijado dependen de la disponibilidad de Zn. Por su parte, Ahlawat et al. (2005) observaron que la fertilización con Zn aumentó el crecimiento de la raíz, la nodulación y el peso seco de los nódulos.

A pesar de la falta de investigación realizada sobre este tema, es posible que, desde la perspectiva de la planta, la cantidad de procesos esenciales requeridos para el establecimiento y la función de la fijación simbiótica de nitrógeno pueda ser dependiente de Zn. Una de esas

etapas es la morfogénesis temprana de los nódulos radiculares, que está controlada por la auxina (FERGUSON y MATHESIUS, 2014) y se basa en el correcto funcionamiento del meristema apical del nódulo (ŁOTOCKA et al., 2012; FRANSSEN et al., 2015). Otra etapa, aparentemente dependiente de Zn (posiblemente afectada a través de la transcripción y la traducción), ocurre durante la ampliación de las células nodulares infectadas con rhizobios (KRYVORUCHKO, 2017).

Chaudri et al. (2000) encontraron que en suelo con  $273 \text{ mg kg}^{-1}$  de Zn hay desarrollo de nódulos en guisantes y trébol blanco, pero por encima de esta concentración estaban ausentes los nódulos y el % de N de los brotes era significativamente más bajo que el control. Se ha propuesto que en el modelo de leguminosas *Medicago truncatula*, el zinc se administra de manera similar al hierro; es decir, por la vasculatura de la raíz en el nódulo y se libera en la zona de infección/diferenciación. Allí, los transportadores de zinc deben introducir este elemento en las células infectadas con rhizobios para metalatar las apoproteínas que utilizan el zinc como cofactor. MtZIP6 (Medtr4g083570) es un Permease Zinc-Iron (ZIP) de *M. truncatula* que se expresa solo en las raíces y nódulos, con los niveles más altos de expresión en la zona de infección/diferenciación. (ABREU et al., 2017).

Por otro lado, Singh et al. (2017) encontraron que la aplicación de  $30 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4$  alcanza un máximo de 36.2 nodulos por planta de soya. Por tanto, el aumento en el nódulo de la raíz puede deberse a que el zinc actúa como un estimulador de la hormona del crecimiento y la actividad enzimática, mientras que el aumento del área foliar de las hojas podría deberse a que el Zn es necesario para el metabolismo de las proteínas y está involucrado en la formación de clorofila, estimulando tanto la hormona del crecimiento, como la actividad enzimática y los procesos reproductivos.

Malewar et al. (1992) informaron que la nodulación en el cacahuate (*Arachis hypogaea* L) tiene una relación significativa con la adición de Zn, incrementando el número de nódulos en fertilización con  $20 \text{ kg ha}^{-1}$  de Zn. Por su parte, Maharnor et al. (2018) informaron que con la aplicación de  $30 \text{ kg ha}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4$  junto con la dosis de fertilizante recomendada el mani (*Arachis hypogea* L.) produce 79.07 nódulos a los 45 DDS (días después de la siembra) tal aumento en el número de nódulos puede deberse a la síntesis de más auxina y un mayor crecimiento a través del proceso de elongación celular debido a la aplicación de sulfato de zinc. Por su parte Da Silva et al. (2018) reportaron disminución en el número y tamaño de nódulos en *Canavalia ensiformis* (L) en suelos con  $526 \text{ mg kg}^{-1}$  de Zn.

## 2.4 El Zn en el metabolismo del nitrógeno.

El estado nutricional del nitrógeno es compatible con diversos mecanismos fisiológicos y moleculares en las plantas, que también son esenciales para una biofortificación efectiva de las plantas con Fe y Zn para aumentar el estado nutricional en las plantas (CAKMAK et al., 2010).

Las deficiencias de nutrientes minerales limitan la fijación de nitrógeno por la simbiosis rizobio -leguminosa, lo que resulta en bajos rendimientos de leguminosas. El suministro adecuado de nutrientes, incluidos los micronutrientes, también es esencial para la proliferación y supervivencia de rizobio en el suelo y el establecimiento de asociaciones efectivas (DAS et al., 2012).

El exceso de Zn en los medios o una mayor exposición a Zn en las plantas puede afectar las diversas actividades fisiológicas y metabólicas, como el metabolismo del nitrógeno que es considerado un parámetro crucial para su respuesta a la toxicidad de metales pesados. El estrés ejercido por el exceso de Zn provoca la desorganización de los cloroplastos debido a un menor suministro de nitrato en el sitio de la síntesis de enzimas y, por lo tanto, dificulta la actividad de la nitrato reductasa (MICHAEL y KRISHNASWAMY 2011). Además, el estrés por Zn en las plantas ayuda a la movilización del nitrógeno promoviendo la senescencia y alterando el flujo de nitrógeno a través de los aminoácidos (SCHALLER, 2004).

La pérdida de la función del transportador MtMTP2 resultó en un desarrollo alterado de los nódulos, defectos en la diferenciación del bacteroide y una reducción severa de la actividad de la nitrogenasa. Los resultados presentados aquí apoyan el papel de MtMTP2 en la compartimentación intracelular de Zn, que se requiere para la fijación efectiva de nitrógeno simbiótico en *M. truncatula*. (LEÓN-MEDIAVILLA et al., 2018).

### 2.4.1 Transporte de Nitrógeno fijado simbióticamente

Todos los organismos requieren nitrógeno para sobrevivir, los cuales la mayoría usa el N complejo con otros átomos que forman iones como el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Después de la absorción del  $\text{NO}_3^-$  las plantas lo reducen a  $\text{NH}_4^+$  (GILLER, 2001) y lo asimilan en compuestos orgánicos como amidas. Cuando el  $\text{NH}_4^+$  es generado por cualquiera de los procesos metabólicos en las células, se requieren mecanismos para el movimiento de iones entre



órgano; es decir, entre el citosol y la vacuola para el almacenamiento temporal, entre las mitocondrias y los cloroplastos durante la fotorrespiración, y entre las células de apoplasto y floema o las células del parénquima para el transporte a larga distancia (YAMAYA y OAKS, 2004) Los estudios fisiológicos sobre la absorción de  $\text{NH}_4^+$  en las raíces de las plantas proporcionan evidencia de la existencia de dos sistemas de transporte para  $\text{NH}_4^+$ , uno de alta afinidad (HATS) y otro de baja afinidad (LATS) (MÄCK y TISCHNER, 1994).

La asimilación del amoníaco es realizado primero por la enzima glutamina sintetasa (GS) en una reacción dependiente del adenosin trifosfato (ATP) con glutamato para formar glutamina (UNNO et al., 2006; LEA y MIFLIN, 2011) el resto de la glutamina es utilizada como donante para sintetizar una serie de metabolitos esenciales como los aminoácidos, ácidos nucleicos y azúcares (SAKAKIBARA et al., 1996, YAMAYA y OAKS, 2004). La segunda enzima que participa es la glutamino-2-oxoglutarato-amido-transferasa (glutamato sintasa o GOGAT) que participa en la reacción de la transferencia de glutamina (LEA y MIFLIN, 2011, XU et al., 2012) para aminorar una molécula de ácido 2-oxoglutarico para así formar dos moléculas de glutamato (GILLER, 2001). Ambas formas de glutamato sintasa están localizadas en plastos (LEA y MIFLIN, 2003) y una de estas moléculas de glutamato se recicla como una molécula aceptadora de amonio, mientras que la otra puede usarse como un donante de amino en el metabolismo adicional. Esta ruta a menudo se conoce como la ruta GS/GOGAT o el ciclo de la glutamato sintasa (LEA et al., 1990; YAMAYA y OAKS, 2004).

En la simbiosis rhizobio-leguminosa, en los nódulos el metabolismo del N está determinado por varios procesos que involucran la adquisición, asimilación, exportación y reciclaje de N en diversas formas (VALENTINE et al., 2017), en el cual; la actividad en el nódulo de la GS es reprimida (BROWN y DILWORT, 1975) y el amoníaco es exportado al citoplasma para ser asimilado.

El amoníaco es el producto principal de la fijación de  $\text{N}_2$  que se incorpora a la GS siendo liberado del bacteroide y se transporta a través de la membrana peribacteroide (PBM) a la planta donde se produce la asimilación inicial en los aminoácidos (AAs) (WHITE et al., 2007; 2009). Otros informes demostraron que la alanina (ALA) es el producto de N primario del bacteroide fijador de  $\text{N}_2$  en plantas de soya (POOLE et al., 2000; PRELL y POOLE, 2006). Este argumento ha sido probado y se ha llegado a la conclusión de que el  $\text{NH}_4^+$  aún debe considerarse el producto primario de la fijación por los bacteroides de los nódulos de la raíz de soya (LI et al., 2002). Se cree que la asimilación primaria de  $\text{NH}_4^+$  en los nódulos se produce mediante la

acción de cuatro enzimas clave: glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), denominadas colectivamente como la vía GS-GOGAT, en conjunto con aspartato aminotransferasa (AAT) y asparagina sintetasa (AS).

Dependiendo de la naturaleza de las especies de plantas, es la forma en que exportan el N fijado; las cuales pueden ser amídicas o ureídicas (SPRENT, 2009); la mayoría de las leguminosas de las regiones templadas exportan predominantemente en las formas de amidas, especialmente asparagina y glutamina (STREETER, 1991). Las leguminosas de regiones tropicales transportan vía ureidos (basado en la síntesis y catabolismo de las purinas) principalmente en la forma de alantoína y ácido alántico (ATKINS y SMITH, 2000; TODD et al., 2006; SPRENT y JAMES, 2007).

El N<sub>2</sub> fijado se distribuye a través de la savia del xilema a otros órganos de la planta, donde se incorpora a macromoléculas esenciales, como los aminoácidos (AA) y las proteínas, que participan el crecimiento y desarrollo de la planta (FOTELLI et al., 2011; OKUMOTO y PILOT, 2011).

El intercambio de nutrientes fue propuesto por Kahn et al. (1985) actualmente se ha propuesto un modelo donde se confirma un sistema de ciclo de amino ácidos entre el citosol y el simbiosoma/bacteriodes en plantas de *Pisum sativum* (LODWIG et al., 2003; PRELL y POOLE, 2006; WHITE et al., 2007; 2009), en tal modelo la planta hospedante proporciona glutamina (GLU) al bacteriodes que se transamina posteriormente a aspartato (ASP) y luego se transporta a la célula de la planta y se usa para la síntesis de asparagina (ASN). Este proceso permite a los bacteriodes regular a la baja la asimilación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y proporcionar una fuente de N a las bacterias simbióticas (PRELL y POOLE, 2006; WHITE et al., 2007; VALVERDE y HUSS-DANEL, 2008). La ASN se sintetiza principalmente en las células infectadas y es transportada por diferentes vías para la síntesis en las células de diversos órganos de plantas (GAUFICHON et al., 2010).

En los nódulos de la raíz, la vía precisa por la cual el NH<sub>3</sub><sup>+</sup> se incorpora a la ASN sigue siendo un tema de debate (PRELL y POOLE, 2006), pero en general, se ha aceptado que la ASN se sintetiza principalmente en una reacción dependiente de ATP por la asparagina sintetasa (AS) que transfiere NH<sub>3</sub><sup>+</sup> a ácido aspártico (ASP) dando como resultado la formación de glutamina (GLU) y ASN al hidrolizar ATP a AMP y PPi. Otro informe ha demostrado que AS también puede usar NH<sub>3</sub><sup>+</sup> directamente como sustrato en ciertas condiciones, particularmente si la concentración es relativamente alta (GAUFICHON et al., 2010).

### 2.4.2 Leguminosas Ureídicas

En las leguminosas con nódulos de tipo determinado el  $\text{NH}_3^+$  recién sintetizado es convertido en ureidos a través de vías complejas con la participación de al menos 20 enzimas diferentes y transportados vía xilema del nódulo a los órganos aéreos (BARAL et al., 2016).

El proceso de fijación de  $\text{N}_2$  comienza en nódulos infectados por el bacteroide y se reduce a  $\text{NH}_3^+$  por la enzima nitrogenasa (COLLIER y TAGEDER, 2012; SWAIN y ABHIJITA, 2013). El amoníaco se difunde a través de la membrana bacteroide hacia el espacio peribacteroidal donde se protona a  $\text{NH}_4^+$  para ser exportado al citosol de la célula infectada por nódulos a través de la membrana del simbiosoma (UDVARDI y POOLE, 2013).

Una vez en el citosol de las células nodulares infectadas, el  $\text{NH}_4^+$  se convierte enzimáticamente en glutamina (Gln). La Gln; a su vez, se transforma enzimáticamente en Xantina a lo largo de la vía de síntesis de novo purina (WERNER y WITTE, 2011). La Xantina se oxida en el citosol a ácido úrico (DATTA et al., 1991), que luego se convierte en los peroxisomas a través de los intermediarios 5-hidroxiisourato y 2-oxo-4-hidroxi-4-carboxi-5-ureidoimidazolina en alantoína (TODD et al., 2006; WERNER y WITTE, 2011). El ácido alantoico se produce en el retículo endoplásmico a partir de la alantoína (WERNER et al., 2008).

Una vez que los ureidos comienzan a acumularse en las células no infectadas del nódulo, se cargan en el sistema vascular del xilema del nódulo y se transportan principalmente a hojas maduras y bien expandidas (BARAL et al., 2012, 2014). Sin estar aún claras las vías moleculares que subyacen a este proceso (COLLIER y TEGEDER, 2012).

Para alcanzar el sistema vascular principal de una leguminosa que transporta ureidos, estos deben moverse intercelularmente a lo largo de la corteza interna, la endodermis y el periciclo de parénquima de raíces noduladas (TEGEDER, 2014). Este movimiento parece ser simplástico en lugar de apoplástico debido a la compleja anatomía de la endodermis de la raíz, un límite que separa el tejido vascular interno de la corteza externa y funciona como una barrera apoplástica para la absorción selectiva de nutrientes (MIYASHIMA y NAKAJIMA, 2011).

Una vez descargados en el xilema, los ureidos se desplazan por el flujo de transpiración (WERNER y WITTE, 2011) principalmente a los órganos aéreos y hojas completamente desarrolladas.

En hojas maduras, la hidrólisis de los ureidos tiene lugar en el retículo endoplásmico (RE) a través de cuatro pasos enzimáticos que inician con la conversión de alantoato, por la enzima alantoato amidohidrolasa (AAH) codificada por los genes *ylbA* y *PvAAH*, en ureidoglicina y ácido carbámico (SERVENTI et al., 2010; DÍAZ-LEAL et al., 2014). A su vez, el ácido carbámico generado sufre una rápida descomposición a  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3^+$ , mientras que la (S) -ureidoglicina se hidroliza a (S) -ureidoglycolate. Finalmente, el (S) -ureidoglicolato se somete a una conversión de dos etapas en glioxilato por el ureidoglicolato de ureidoglicolato estereoespecífico (UAH; EC 3.5.3.19) (MUÑOZ et al., 2001; SHIN et al., 2014), con la liberación total de cuatro moléculas de  $\text{NH}_3^+$  y dos moléculas de  $\text{CO}_2$  (DURAN y TODD, 2012).

## REFERENCIAS

ABREU, I. et al. *Medicago truncatula* Zinc-Iron Permease6 provides zinc to rhizobia infected nodule cells. **Plant Cells & Environment**, v.40, p. 2706–2719, 2017.

AHLAWAT, I.P.S.; GANGAIAH, B.; SINGH, O. Effect of fertilizer and stover management on productivity and soil fertility in chickpea (*Cicer arietinum*) – maize (*Zea mays*) cropping system. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 75, p. 400–403, 2005.

AHMAD, E. et al. Heavy Metal Toxicity to Symbiotic Nitrogen-Fixing Microorganism and Host Legumes: In: ZAIDE A.; WANI, P.A.; KHAN, M.S. **Toxicity of heavy metals to legumes and bioremediation**, India, Springer-Verlag Wien, cap 2, p. 29-44, 2012.

ALLOWAY, B. J. **Zinc in soils and crop nutrition**. 2 ed. Brussels Belgium/Paris, France: Ed. International Zinc Association/International Fertilizer Industry Association. 139p. 2008.

ANDREJIĆ, G. et al. Zinc accumulation, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll *a* fluorescence in Zn-stressed *Miscanthus × giganteus* plants. **Photosynthetica**, v56 (4): p. 1249-1258. 2018.

ASSUNÇÃO, A.G.L. et al. *Arabidopsis thaliana* transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107 (22), p 10296-10301, 2010.

ATICI, O.; AĞAR, G.; BATTAL, P. Changes in phytohormone contents in chickpea seeds germinating under lead or zinc stress. **Biologia Plantarum**, v. 49(2), p. 215-222, 2005.

ATKINS, C.A.; SMITH, P. Ureide synthesis in legume nodules. In: Triplett, E.W. (ed.) **Prokaryotic Nitrogen Fixation**. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp. 559–587. 2000.

AZARPOUR, E. et al. Effects of nitrogen fertilizer under foliar spraying of humic acid on yield and yield components of cowpea (*Vigna unguiculata*). **World Applied Science Journal**, v. 13, p 1445-1449, 2011.

BARAL, B.; TEIXEIRA DA SILVA, J.A.; GUPTA, V.N. Xylem-mediated channeling of nitrogen in broad bean (*Vicia faba*). **Environmental and Experimental Biology**, v. 12, p. 187–197, 2014.

BARAL, B. et al. Biogenesis and cycling of ureides in broad bean (*Vicia faba* L.). **Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 6, p. 88–97, 2012.

BARAL, B. et al. Early signaling, synthesis, transport and metabolism of ureides. **Journal of Plant Physiology**, v.193, p. 97-109, 2016.

BARBER, S.A. **Soil Nutrient Bioavailability**, 2, ed. New York, ED.Wiley, 1995.

BERGLUND, D.R. Soybean Production Field Guide for North Dakota and Northwestern Minnesota. **Published in cooperative and with support from the North Dakota Soybean Council**, p. 136, 2002.

BLAUDEZ, D.; KOHLER, A.; MARTIN, F.; SANDERS, D.; AND CHALOT, M. Poplar metal tolerance protein 1 confers zinc tolerance and is an oligomeric vacuolar zinc transporter with an essential leucine zipper motif. **Plants Cells**, v. 15, p. 2911–2928, 2003.

BONNET, M.; CAMARES, O.; VEISSEIRE, P. Effects of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). **Journal of Experimental Botany**, v. 51(346), p. 945–953, 2000.

BOUAIN, N. et al. Phosphate and zinc transport and signalling in plants: Toward a better understanding of their homeostasis interaction. **Journal of Experimental Botany**, v. 65(20), p. 5725–5741. 2014.

BOZOGLU, H.; OZCELIK, H.; MUT, Z.; PESKEN, E. Response of chickpea (*Cicer arietinum L.*) to Zinc and molybdenum fertilization. **Bangladesh Journal of Botany**, v. 36(2), p. 145-149, 2007.

BRENNAN, R.F.; BOLLAND, M.D.A. Application of Increasing Levels of Zinc to Soil Reduced Accumulation of Cadmium in Lupin Grain. **Journal of Plant Nutrition**, v. 37, p. 147–160, 2014.

BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **The New Phytologist**, v. 173, p. 677–702, 2007.

BROHI, A.R. et al. Topraktan ve yapraktan çinko uygulamasının ekmeklik buğday bitkisinin verim ve bazı besin maddesi alınımına etkisi. (Effect of soil and foliage zinc sulphate application on yield and on some plant nutrient uptake of Bread Wheat crop grown on zinc deficient soils). **Journal of Faculty of Agriculture**, Turkey, v. 17, p. 123–128, 2000.

BROWN, P.H.; ÇAKMAK, I.; ZHANG, Q. Form and function of zinc in plants. In: Robson, A.D. (Ed.), **Zinc in Soil and Plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 93–106, 1993.

BROWN, C.M.; DILWORTH, M.J. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacterioids. **Journal of General Microbiology**, v. 86, p. 39–48, 1975.

ÇAKMAK, I.; MARSCHNER, H.; BANGERTH, F. Effect of Zinc Nutritional Status on Growth, Protein Metabolism and Levels of Indole-3-acetic Acid and other Phytohormones in Bean (*Phaseolus vulgaris L.*). **Journal of Experimental Botany**, v. 40(212), p. 405-412, 1989.

ÇAKMAK, I. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. **The New Phytologist**, v. 146, p.185–205. 2000.

ÇAKMAK, I.; PFEIFFER, W.H.; MCCLAFFERTY, B. Review: Biofortification of durum wheat with Zinc and Iron. **Cereal Chemistry**, v. 87, p. 10-20, 2010.

- CHAOUI, A. et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, v. 127, p. 139-147, 1997.
- CHAUDRI, A.M. et al. A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long term field experiment. **Plant Soil**, v. 22, p. 167–179, 2000.
- CHOUDHARY, P.; JHAJHARIA, A.; KUMAR, R. Influence of sulphur and zinc fertilization on yield, yield components and quality traits of soybean (*Glycine max* L.). **The Bioscan**, v. 9(1), p. 137-142, 2014.
- COLLIER, T.; TAGEDER, M. Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. **The Plant Journal**, v. 72, p. 355-367, 2012.
- CUYPERS, A.; VANGRONVELD, J.; CLIJSTERS, H. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 657-664, 2001.
- DAS S. et al. Effectiveness of micronutrient application and *Rhizobium* inoculation on growth and yield of chickpea. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, v. 5, p. 445-452, 2012.
- DATTA, D.B., TRIPLETT, E.W. and NEWCOMB, E.H. Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules: implications for the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 88, p. 4700–4702, 1991.
- DEINLEIN, U. et al. Elevated nicotianamine levels in *Arabidopsis halleri* roots play a key role in Zn hyperaccumulation. **The Plant Cell**, v. 24, p. 708–723, 2012.
- DEMETERIO, J.L.; ELLIS, R.; PAULSEN, G.M. Nodulation and nitrogen fixation by two soybean varieties as affected by phosphorus and zinc nutrition. **Journal of Agronomy**, v. 64, p. 566-568, 1972.



DESBROSSES-FONROUGE, A. G. et al. Arabidopsis thaliana MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. **FEBS Letters**, v. 579, p. 4165–4174, 2005.

DÍAZ-LEAL, J.L. et al. Molecular and functional characterization of allantoate amidohydrolase from *Phaseolus vulgaris*. **Physiology of Plant**, v. 152, p. 43–58, 2014.

DISANTE, K. B.; FUENTES, D.; CORTINA, J. Response to drought of Zn-stressed *Quercus suber* L. seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 70, p. 96–103, 2011.

DURAN, V.A.; TODD, C.D. Four allantoinase genes are expressed in nitrogen-fixing soybean. **Plant Physiology and Biochemistry**, v 54, p. 149–155, 2012.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Mineral Nutrition of Plants: Principles and Applications**. Ed. Sinauer Associates, Sunderland, 2005.

FERGUSON, B.J.; MATHESIUS, U. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. **Journal of Chemical Ecology**, v. 40: p. 770-790, 2014.

FOTELLI, M.N. et al. Nodulation enhances dark CO<sub>2</sub> fixation and recycling in the model legume *Lotus japonicus*. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 2959–2971, 2011.

FRANSSSEN, H.J. et al. Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem. **Development** v. 142, p. 2941-2950, 2015.

GAUFICHON L. et al. Biological functions of asparagine synthetase in plants. **Plant Science**, v. 179, p. 141–153, 2010.

GILLER, K. E. **Nitrogen fixation in tropical cropping systems**, 2 ed. CABI Publishing. UK. p. 409. 2001.

HANSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 259–266, 2009.

HELFENSTEIN, J. et al. Zinc deficiency alters soybean susceptibility to pathogens and pests. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 178, p. 896–903, 2015.

HUSSAIN, D. et al. P-Type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in Arabidopsis. **Plant Cell**, v. 16, p. 1327–1339, 2004.

INOCÊNCIO, F. M. et al. Resposta da soya à adubação com zinco em solo com teores acima do nível crítico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.47(10), p. 1550-1554, 2012.

KABIR, A. H.; SWARAZ, A. M.; STANGOULIS, J. Zinc-deficiency resistance and biofortification in plants. **Journal of Plant Nutrition in Soil Science**, v. 177, p. 311–319, 2014.

KANSE, N. et al. Response of soybean to application of zinc in inceptisol. **Annals of Plant Physiology** (20), p. 135-136, 2006.

KAPOOR, S.; KOBAYASHI, A.; TAKATSUJI, H. Silencing of the Tapetum-specific zinc finger gene TAZ1 causes premature degeneration of tapetum and pollen abortion in petunia. **Journal the Plant Cell**, v. 14, p. 2353–2367, 2002.

KAHN, M. L.; KRAUS, J.; SOMERVILLE, J. E. 1985. A model of nutrient exchange in the *Rhizobium*-legume symbiosis. In: Evans HJ, Bottomley PJ, Newton WE, eds. **Nitrogen Fixation Research Progress**. Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff, 193–199.

KHURANA, N.; TTERJEE, C. C. Effect of zinc on reproductive physiology of pea (*Pisum sativum*). **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 72(1), p. 57-9, 2002.

KIRKBY, E.A.; RÖMHELD, V. 2007. Micronutrients in plant physiology: functions, uptake, and mobility (Micronutrientes na fisiologia de plantas: funções, absorção e mobilidade) (in portuguese). **Informações Agronômicas**. 118, p. 12–15, 2007.

KOBRAEE, S.; SHAMSI, K. Measurement of zinc, iron and manganese ratios in different parts of soybean plant. **Research on Crops** 12(3), p. 761-765, 2011.

KOBRAEE, S. et al. Influence of micronutrient fertilizer on soybean nutrient composition. **Indian Journal Science and Technology**, v. 4(7), p. 763-69, 2011.

KRYVORUCHKO, I. Zn-use efficiency for optimization of symbiotic nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Turkish Journal of Botany**, v. 41: p. 423-441, 2017.

KULHARE, P. S. et al. Effect of zinc levels and incubation with cow dung yield, Zn content, uptake of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] -Wheat (*Triticum aestivum* L.) in a Vertisol. **Indian Journal of Agronomy**, v.58 (3), p. 437-439, 2014.

LEA, P. L.; MIFLIN, B. J. Nitrogen assimilation and its relevance to crop improvement. In: Ed. FOYER, C. H.; ZHAN, H. Nitrogen Metabolism in Plants in the Post-genomic Era, **Annual Plant Reviews** Vol. 42. P. 1-28. 2011.

LEA, P. J.; MIFLIN, B. J. Glutamate synthase and the synthesis of glutamate in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 555–564, 2003.

LEA, P. J.; ROBINSON, S. A.; STEWART, G. R. The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine. In: Miflin BJ, Lea PJ (eds) **The biochemistry of plants**, vol. 16 Intermediary nitrogen metabolism. Academic Press, New York, p. 147-152, 1990.

LEÓN-MEDIAVILLA J. et al. MtMTP2-Facilitated Zinc Transport Into Intracellular Compartments Is Essential for Nodule Development in *Medicago truncatula*. **Frontiers in plant science**, v.9, 2018.

LI, Y. et al. Reassessment of major products of N<sub>2</sub> fixation by bacteroids from soybean root nodules. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, p. 1959–1966, 2002.

LODWIG, E.M. et al. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. **Nature**, v. 422, p. 722–726, 2003.

ŁOTOCKA, B.; KOPCIŃSKA, J.; SKALNIAK, M. Review article: The meristem in indeterminate root nodules of Faboideae. **Symbiosis**, v. 58, p. 63-72, 2012.

MÄCK, G.; TISCHNER, R. Constitutive and inducible net  $\text{NH}_4^+$  uptake of barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. **Journal of Plant Physiology**, v. 144, p. 351-357, 1994.

MAHARNOR, R. Y. et al. Effect of Different levels of Zinc on yield and quality of Groundnut (*Arachis hypogea* L.) in Inceptisol. **International Journal Current Microbiology Applied Science**, v. 6, p. 2843-2848, 2018.

MALAVOLTA, E., **Manual of Mineral Nutrition of Plants (Manual de Nutrição Mineral de Plantas)**. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres, (in Portuguese), 2006.

MALEWAR G. U.; INDULKAR B. S.; MALEWAR, V. Involment of zinc in nodulation and N fixing indices in peanut. **Annual Plant Physiology**, v. 6(2), p. 232-237, 1992.

MANZEKE, M. G. et al. Zinc fertilization increases productivity and grain nutritional quality of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under integrated soil fertility management. **Field Crops Research**, v. 13, p. 231-244, 2017.

MARSH, D. B.; WATERS, L. J. Nodulation and nitrogen fixation in cowpea as influenced by zinc nutrition. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.10, p. 9-11, 1985.

MARSCHNER H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, ed 3, New York Ed Academic Press, p 347-367, 1995.

MARSCHNER, P. **Plant Nutrition of Higher Plants**. Academic Press, London. 2012.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37(3), p. 343-355, 2002.

MENEGATTI, R.D. et al. S. Diferentes concentrações de zinco no desenvolvimento de plantas de *Phaseolus vulgaris* L. **Evidência, Joaçaba** v. 17(1), p. 23-32, 2017.

MICHAEL, P.I.; KRISHNASWAMY, M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. **Environmental and Experiment Botany**, v. 74, p. 171-177, 2011.

MIYASHIMA, S.; NAKAJIMA, K. The root endodermis: a hub of developmental signals and nutrient flow. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, p. 1954–1958, 2011.

MOREL, M. et al. AtHMA3, a P1B-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 149, p. 894–904. 2009.

MOREIRA, A.; MORAES, L. A. C. M.; REIS, A. R. DOS. The molecular Genetics of zinc Uptake and utilization Efficiency in crop Plants. In: Ed. HOSSAIN, P. M. A.; KAMIYA, T.; BURRITT, D. J.; TRAN LAM-SON P.; FUJIWARA, T. **Plant Micronutrient Use Efficiency: Molecular and Genomic Perspectives in Crop Plants**. ELSEVIER. p 87-103, 2018.

MUKHERJEE, A. et al. Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. **Metallomics**, v 6, p. 132-138, 2014.

MUÑOZ, A. et al. Urea is a product of ureidoglycolate degradation in chickpea: purification and characterization of the ureidoglycolate urea-lyase. **Plant Physiology**, v. 125, p. 828–834, 2001.

NASRI, M.; KHALATBARI, M.; FARAHANI, H. A. Zn-foliar application influence on quality and quantity features in *Phaseolus vulgaris* under different levels of N and K fertilizer. **Advances in Environmental Biology**, v. 5(5), p. 839-846, 2011.

OHKI, K. Zinc concentration in soybean as related to growth, photosynthesis and carbonic anhydrase activity. **Crop Science**, v. 18, p. 79-82, 1978.

OKUMOTO, S.; PILOT, G. Amino acid export in plants: a missing link in nitrogen cycling. **Molecular Plant**, v, 4, p. 453–463, 2011.

PANDEY, N. et al. Enzymic changes in response to zinc nutrition. **Journal Plant Physiology**, v. 159, p. 1151-1153, 2002.

PANDEY, N.; PATHAK, G. C.; SHARMA, C. P. Zinc is critically required for pollen function and fertilization in lentil. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 20, p. 89–96, 2006.

PANDEY, N.; PATHAK, G.C.; SHARMA, C.P. Impairment in reproductive development is a major factor limiting yield of black gram under zinc deficiency. **Biologia Plantarum**, v. 53(4), p. 723-727, 2009.

PANDEY, N. Role of Micronutrients in Reproductive Physiology of Plants. **Plant Stress 4** (Special Issue 2), p. 1-13, 2010.

PANDEY, N.; GUPTA, B.; PATHAK, G. C. Foliar application of Zn at flowering stage improves plant's performance, yield and yield attributes of black gram. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, p. 548-555, 2013a.

PANDEY, N.; GUPTA, B.; PATHAK, G. C. Enhanced yield and nutritional enrichment of seeds of *Pisum sativum* L. through foliar application of zinc. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 474–483, 2013b.

PEASLEE, D. E.; ISARANGKURA, R.; LEGGET, J. E. Accumulation and translocation of zinc by two corn cultivars. **Journal of Agronomy**, v. 73, p. 729–732, 1981.

PECK N. H. et al. Nutritional quality of vegetable crops as affected by phosphorus and zinc fertilizer. **Agronomy Journal**, v. 72, p. 528-34, 1980.

PECK, A. W.; MCDONALD, G. K. Adequate zinc nutrition alleviates the adverse effects of heat stress in bread wheat. **Plant and Soil**, v. 337, p. 355–374, 2010.

PILON, M. et al. Essential transition metal homeostasis in plants. **Current Opinion Plant Biology**, v. 12, p. 347–357, 2009.

POOLE, P. S. et al. 2000. Ammonium and alanine are the primary nitrogen secretion products of pea bacteroids. In: Pedrosa F.O.; Hungria, M, Yates, M. G. Newton WE, eds. **Nitrogen Fixation: from Molecules to Crop Productivity**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, 371–372.

PRASAD, T. N. V. K. V. et al. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. **Journal of Plant Nutrition**, v. 35, p. 905–927, 2012.

PREET G.; SIDHU S. Physiological, biochemical and molecular mechanisms of zinc uptake, toxicity and tolerance in plants. **Journal of Global Biosciences**. V. 5(9), p. 4603-4633, 2016.

PRELL, J.; POOLE P. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. **Trends in Microbiology**, v. 14, p.161–168, 2006.

RANGEL, W. M. et al. Native rhizobia from Zn mining soil promote the growth of *Leucaena leucocephala* on contaminated soil. **International Journal of Phytoremediation**, v.19 (2), p. 142-156, 2017.

RAFIQUE, E. et al. Zinc Application Affects Tissue Zinc Concentration and Seed Yield of Pea (*Pisum sativum* L.). **Pedosphere**, v, 25(2), p. 275-281, 2015.

ROSOLEM, C. A.; SACRAMENTO, L. V. S.; OLIVEIRA, D. M. T. Kinetics of zinc uptake and anatomy of roots and leaves of coffee trees as affected by zinc nutrition. **Journal of Plant Nutrition**, v. 28, p. 2101–2112, 2005.

ROUT, G.; DAS, P. Effect of metal toxicity on plant growth and metabolism: I. Zinc. **Agronomie, EDP Science**, v. 23(1), p 3-11, 2003.

SAGARDOY, R. et al. Stomatal and mesophyll conductances to CO<sub>2</sub> are the main limitations to photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. **New Phytologist**, v. 187, p. 145–158, 2010.

SAKAKIBARA, H. et al. Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 29561–29568, 1996.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases, **Planta**, v. 220, p. 183-197, 2004.

SALEHIN, F.; RAHMAN, S. Effects of zinc and nitrogen fertilizer and their application method on yield and yield components of *Phaseolus vulgaris* L. **Agricultural Sciences**, v. 3(1), p. 9-13, 2012.

SAMREEN, T. et al. Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mungbeans plant (*Vigna radiata*). **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. 1802–1807, 2017.

SEIFI, N. M.; YARNIA M.; KHOEI, F. R. E. Effect of Zinc and Manganese and their application method on yield and yield components of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L. CV. Khomein). **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8(5), p. 859-865, 2011.

SERVENTI, F. et al. Chemical basis of nitrogen recovery through the ureide pathway: formation and hydrolysis of S-ureidoglycine in plants and bacteria. **ACS Chemical Biology**, v. 5, p. 203–214, 2010.

SHIN, I.; HAN, K.; RHEE, S. Structural insights into the substrate specificity of (S)-ureidoglycolate amidohydrolase and its comparison with allantoate amidohydrolase. **Journal of Molecular Biology** v. 426, p. 3028–3040, 2014.

SIDHU, G. P. S. Physiological, biochemical and molecular mechanisms of zinc uptake, toxicity and tolerance in plants, **Journal of Global Biosciences**, v. 5(9), p. 4603-4633, 2016.

SILVA, M.; ANDRADE, L. S. A.; CAMPOS, A. B. Phytoremediation potential of Jack Bean plant for multi-element contaminated soils from Ribeira Valley, Brazil, **Clean Soil, Air, Water**, v. 46, 2018.

SINCLAIR, S. A.; KRÄMER, U. The zinc homeostasis network of land plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1823, p. 1553–1567, 2012.



SINGH, S.; SINGTH V.; LAYEK, S. Influence of sulphur zinc on levels on growth, yield and quality of soybean (*Glycine max* L.) **International Journal of Plant and Soil Science**, v. 18(2), p. 1-7, 2017.

SPRENT, J. I.; JAMES, E. K. Legume evolution: where do nodules and mycorrhizas fit in? **Plant Physiology**, v. 144, p. 575–581, 2007.

STEPHENS, B.W. et al. Characterization of zinc transport by divalent metal transporters of the ZIP family from the model legume *Medicago truncatula*. **Biometals** v. 24, p. 51–58, 2010.

STREETER, J. G. Carbohydrate: organic acid and amino acid composition of bacteroids and cytosol from soybean nodules. **Advances in Botanical Research**, v. 18, p. 129–187, 1991.

SWAIN, H.; ABHIJITA, S. Nitrogen fixation and its improvement through genetic engineering. **Journal of Global Biosciences**, v.2, p. 98–112, 2013.

TAVALLALI, V. et al. Zinc alleviates salt stress and increases antioxidant enzyme activity in the leaves of pistachio (*Pistacia vera* L. ‘Badami’) seedlings. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 34, p. 349–359, 2010.

TEGEDER, M. Transporters involved in source to sink partitioning of aminoacids and ureides: opportunities for crop improvement. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, p. 1865–1878, 2014.

TODD, C. D. et al. Update on ureide degradation in legumes. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 5–12, 2006.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e nodulação de *Acacia Mangium*, *Enterolobium Contortisiliquum* e *Sesbania Virgata* em solo contaminado com metais pesados. **Revista Brasileira da Ciência do Solo**, 25:743-753, 2001.

UDVARDI, M.; POOLE, P. S. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. **Annual Review of Plant Biology**, v.64, p. 781–805, 2013.

UNNO, H. et al. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 29287–29296, 2006.

VALENTINE, A. J.; KLEINERT, A.; BENEDITO, V. A. Adaptive strategies for nitrogen metabolism in phosphate deficient legume nodules. **Plant of science**, v. 256, p. 46-52, 2017.

VALLEE, B. L; AULD, D. S. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. **Biochemistry**, v. 29, p. 5647–5659, 1990.

VALVERDE, C.; HUSS-DANEL, K. Carbon and nitrogen metabolism in actinorhizal nodules. In: PAWLOWSKI, K. Newton WE, eds. **Nitrogen fixing Actinorhizal Symbioses**. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 167–198, 2008.

WANG, J. J. Kinetics of manganese uptake by excised roots of sensitive and tolerant tobacco genotypes. **Journal of Plant Nutrition**, v. 26, p. 1439–1450, 2003.

WANI, P. A.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Effect of metal tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) on growth, symbiosis, seed yield and metal uptake by green gram plants. **Chemosphere**, v. 70, p. 36–45, 2007.

WELCH, R. M. Micronutrients nutrition of plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 14, p. 49–82, 1995.

WERNER, A. K.; SPARKES, I. A.; ROMEIS, T.; WITTE, C. P. Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoin amidohydrolases from Arabidopsis and soybean. **Plant Physiology**, v. 146, p. 418–430, 2008.

WERNER, A. K.; WITTE, C. P. The biochemistry of nitrogen mobilization: purinering catabolism. **Trends in Plant Science**, v. 16, p. 381–387, 2011.

WHITE, J.P. et al. Characterization of a  $\gamma$ -aminobutyric acid transport system of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. **Journal of Bacteriology**, v. 191, p. 1547–1555, 2009.

WHITE, J. et al. Nutrient sharing between symbionts. **Plant Physiology**, v. 144, p. 604–614, 2007.

WHITE, P. J. et al. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*?, **New Phytologist**, v. 153, p. 201–207, 2002.

WILLIAMS, R. J. P. An introduction to the biochemistry of zinc. In: Mills, C.F. (Ed.), **Zinc in Human Biology**. Ed. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York, pp. 15–31. 1989.

WILLING, R. P.; BASHE, D.; MSCARENHAS, J. P. An analysis of the quantity and diversity of messenger RNAs from pollen and shoots of *Zea mays*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 75, p. 751–753, 1988.

WU, C. Y. et al. Uptake, translocation, and remobilization of zinc absorbed at different growth stages by rice genotypes of different Zn densities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6761–6773, 2010.

XU, G.; FAN, X.; MILLER, A.J. Plant Nitrogen assimilation and use efficiency. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 153-182, 2012.

YAMAYA, T.; OAKS, A. Metabolic regulation of ammonium uptake and assimilation. In: AMÂNCIO, S.; STULEN, I (eds). **Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plant**. Ed. Springer. Netherlands. 35-63p. 2004.

YASARI, E; VAHEDI, A. Micronutrients impact on Soybean (*Glycine max* (Merrill)) Qualitative and Quantitative Traits. **International Journal of Biology**, v. 4(2), p. 112-118, 2012.

ZEIDAN, M.S.; HOZAYN, M.; EL-SALAM, A. Yield and quality of lentil as affected by micronutrient deficiencies in sandy soils. **Journal of Applied Science Research**, v. 2(12), p. 1342-1345, 2006.

## SEGUNDA PARTE ARTICULOS

**Artículo 1: El Zn en la simbiosis de *Rhizobium tropici* con plantas de frijol**

**Artículo enviado para su publicación en la: Revista de Biología Tropical /  
International Journal of Tropical Biology and Conservation**

## El Zn en la simbiosis de *Rhizobium tropici* con plantas de frijol

Lorena del Carmen Hernandez-Nataren<sup>1</sup>, Fatima Maria de Souza Moreira<sup>1</sup>, Maria Ligia de Souza Silva<sup>1†</sup>

Universidade Federal de Lavras. Câmpus Universitário, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000, Lavras/MG; [marialigia.ufla@gmail.com](mailto:marialigia.ufla@gmail.com)

†Autor de Correspondencia

**Summary. Introduction:** The low natural fertility of the soils and the high nutritional demand of crops, has led to agronomic biofortification practices of nutrients such as Zn, which can affect or benefit processes that some plants do naturally as is the biological fixation of Nitrogen, which plays an important role in agricultural production. **Objective** of this investigation was to evaluate the effect of doses of Zn that pretend the biofortification of the bean crop in the biological fixation of nitrogen. **Methodology:** An experiment was carried out in greenhouse conditions with Zn doses aiming at biofortification in two Oxisols with different texture (clay-textured and medium texture) in the bean crop (*Phaseolus vulgaris*) associated with *R. tropici*, from September to November 2018. The variables related to nitrogen were evaluated, such as the number of nodules, dry matter of nodules, dry matter of the aerial part, accumulation of nitrogen, chlorophyll, as well as the concentrations of P, Ca, Mg, Cu and Zn, and the activity of acid phosphatase in plant tissue at the beginning of flowering. **Results:** The application of Zn doses via soil in LVdf promotes the highest production of dry matter in the aerial part and nitrogen accumulate. Increase the nodular mass and SPAD; were observed with the application of 10 and 20 mg dm<sup>-3</sup> of Zn the best response by plants to fertilization is presented. The concentrations of P, Ca, Mg and Cu in the plants cultivated in both soils decreased with the application of the different doses of Zn, but maintained their concentrations in the ranges

established as suitable for the crop; on the other hand, the absorption of Zn by the plants was favored as the increase of the applied doses increased the Zn concentrations in the plant according to the fertilization. **Conclusion:** Zn fertilization has an effect on the biological fixation of nitrogen in the bean crop in both types of soils. Stressing that in general the best dose of Zn is 20 mg dm<sup>-3</sup> of Zn in both soils. In the same way it is concluded that with the increase of the doses there is a decrease in the nutritional concentration of N, P, Ca, Mg and Cu in the plant tissue.

**Keywords:** biofortification; biological fixation of nitrogen; Oxisol; Soils;

Total de palabras: 8385

### **Introducción.**

El cultivo de las leguminosas, además de proporcionar una fuente de alimento rica en proteínas para humanos y animal

es, es utilizado para enriquecer las reservas de nitrógeno del suelo, lo que permite el crecimiento de otras especies de cultivos (Oldroyd, Murray, Poole, & Downie, 2011); con la ventaja adicional de la disminución de los impactos ambientales comparado con el uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos y posterior reducción de los costos asociados con la producción de cultivos (Udvardi & Poole, 2013), la capacidad de las leguminosas en establecer simbiosis con bacterias del suelo les permite la fijación del N<sub>2</sub>, siendo las principales fuentes de nitrógeno para las leguminosas en simbiosis con rizobio las procedentes del suelo y la generada durante la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) (Pliego, Ocaña, & Lluch, 2003).

La FBN es de los procesos más importantes realizados por asociaciones simbióticas entre microorganismos y plantas, adicionando aproximadamente 40 millones de toneladas de

nitrógeno a los sistemas agrícolas cada año (Herridge, Peoples, & Boddy, 2008). Entre las leguminosas fijadoras de nitrógeno destaca el frijol común (*Phaseolous vulgaris* L.) (Akter, Pageni, Lupwayi, & Balasubramanian, 2014), que en Brasil es cultivado en pequeñas propiedades rurales con bajo nivel tecnológico y representa un 70% de la producción (Instituto Brasileiro de Geografía e Estatística, IBGE 2006). Se estima que en el ciclo agrícola 2018/19 se tuvo una productividad de 1 017 kg ha<sup>-1</sup> en un área de 3 014 100 hectáreas, alcanzando una producción de 3 064 600 toneladas (Companhia Nacional de Abastecimento, CONAB 2019).

El establecimiento, desarrollo y desempeño de la simbiosis mutualista entre el frijol y el rhizobio se ve afectado por diversos factores biológicos, químicos y físicos del suelo, variando de acuerdo con sus características genotípicas, así como en relación con la eficiencia simbiótica dentro de cada especie (Moreira & Siqueira, 2006). La disponibilidad de micronutrientes como el Zinc puede limitar el crecimiento y desarrollo de las plantas (Kryvoruchko, 2017), a nivel mundial un tercio de los suelos cultivados presentan deficiencia de Zn (Cakmak, McLaughlin, & White, 2017) afectando la formación y transporte de sacarosa, así como a la fotosíntesis y sus reacciones debido a que son clave en las enzimas como la RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa) y anhidrasa carbónica (en plantas C4) (Broadley, White, Hammond, Zelko, & Lux, 2007; Alloway, 2008).

Es poca la información disponible sobre el papel específico de Zn en la Fijación Simbiótica de N<sub>2</sub> (FSN) (Kryvoruchko, 2017), la cual es promovida mediante un suministro adecuado de este micronutriente (O'Hara, 2001). El número y tamaño de los nódulos, el contenido de leghemoglobina y la cantidad de N<sub>2</sub> fijado dependen de la disponibilidad de Zn, probablemente porque el Zn está involucrado en la biosíntesis de leghemoglobina y la síntesis de sacarosa. Pese a la poca información por la falta de investigación, es posible que los procesos

esenciales requeridos para el establecimiento y la función de la FSN puedan ser dependientes de Zn (Kryvoruchko, 2017).

Entre las etapas dependientes del Zn, está la morfogénesis temprana de los nódulos radiculares controlada por las auxinas (Ferguson & Mathesius, 2014) basado en el correcto funcionamiento del meristemo apical del nódulo (Łotocka, Kopcińska, & Skalniak, 2012). Otra etapa aparentemente dependiente de Zn ocurre durante el agrandamiento de las células nodulares infectadas con rhizobios (hasta 80 veces). El Zn también es un componente de metaloenzimas que están involucradas en la síntesis de ADN, ARN, síntesis de proteínas y el metabolismo de plantas, cofactor de varias enzimas como la anhidrasa carbónica, deshidrogenasa, las oxidasas y peroxidasas, que desempeña un papel importante en la regulación del metabolismo del nitrógeno, la multiplicación celular, la fotosíntesis y la síntesis de auxinas en plantas (Prasad, 2007).

Por otra parte, participa en la homeostasis fisiológica y nutricional de la planta, necesario en la producción de triptófano que está involucrado en el metabolismo del nitrógeno y es necesario para el mantenimiento de la integridad de las biomembranas (Malavolta, 2006).

La baja fertilidad natural, acidez y deficiencia de micronutrientes de los suelos, es una de las principales limitaciones de los cultivos (Hungria, Campo, & Mendes, 2003; Fageria & Stone 2004), y que resulta en alimentos con bajas concentraciones de Zn reflejándose en la deficiencia de Zn en los seres humanos (Alloway, 2004) constituyendo un problema de salud pública (Welch & Graham, 2004).

Para aumentar la disponibilidad del Zn en alimentos destinados para los seres humanos, se han implementado estrategias que permiten aumentar los contenidos de este en órganos comestibles de los alimentos básicos (Praharaj, Singh, Singh, & Kumar, 2016). En este sentido la biofortificación agronómica define el proceso de incrementar la concentración de un



elemento esencial en partes comestibles de las plantas vía fertilización (Sida-Arreola et al., 2017) foliar o edáfica con altas dosis del elemento en cuestión (Guillén-Molina et al., 2016), mejorando la calidad nutricional de la planta sin modificarla genéticamente (Storksdieck & Hurrell, 2009). Con esto la fertilización con altas dosis de Zn pueden tener efectos en la fijación biológica de nitrógeno y contenidos nutrimentales de las plantas. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de dosis altas de Zn en la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de frijol en dos tipos de suelos.

## MATERIALES Y METODOS

Se realizó un experimento en condiciones de invernadero en la Universidad Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, durante los meses de septiembre hasta noviembre de 2018, comprendiendo el período de siembra hasta inicio de la floración, totalizando 32 días. La unidad experimental fue constituida por macetas de plástico de tres litros llenadas con suelo Latossolo Vermelho Distroférico (LVdf) y Latossolo Amarelo (LA) de textura arcillosa y textura media respectivamente (Cuadro 1), de acuerdo con el Sistema Brasileño de Clasificación de Suelos, provenientes de los municipios de Lavras e Itumirim, Minas Gerais colectados a una profundidad de 0-20 cm a los cuales se les realizó la corrección de la acidez del suelo previo a la siembra, buscando elevar la saturación de bases a 70% con la aplicación de  $\text{CaCO}_3$  marca Synth y  $\text{MgCO}_3$  marca nuclear grado analítico. Manteniéndolo a humedad contralada del 60% del volumen total de poros (VTP durante 10 días).

**Fertilización y siembra:** Posterior a la incubación se llevó a cabo la fertilización básica con la aplicación de  $200 \text{ mg dm}^{-3}$  de P en la forma de súper fosfato triple y  $45 \text{ mg dm}^{-3}$  de S en la forma de yeso en el momento de la siembra, así como  $300 \text{ mg dm}^{-3}$  de N en los controles

(Control + N mineral) y  $150 \text{ mg dm}^{-3}$  de K divididas en tres aplicaciones. Además fueron colocados los micronutrientes en concentraciones de 0.1; 0.2; 5;  $0.5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Co, Mo, Mn, y Cu respectivamente conforme las recomendaciones de Malavolta, Vitti, & Oliveira, (1997). En cada unidad experimental se colocaron cinco semillas de frijol de la variedad TAAGol caracterizado por ser una variedad ciclo corto y de crecimiento determinado e inoculado con la cepa *Rhizobium tropici* CIAT 899 aprobado por el ministerio de agricultura pecuaria y abastecimiento (MAPA).

**Diseño experimental:** El experimento se estableció en un diseño experimental de bloques completamente al azar; con cinco tratamientos más el uso de dos controles, con tres repeticiones totalizando 42 unidades experimentales, usando como factor de bloqueo el tipo de suelo. Conformadas por macetas de tres litros llenadas con cada uno de los suelos y dosis de (0, 5, 10, 20 y  $40 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn). El diseños de los tratamientos fue T1 (control), T2 (control +  $300 \text{ mg dm}^{-3}$  de N mineral), T3 (inoculante), T4 (inoculante +  $5 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn), T5 (inoculante +  $10 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn), T6 (inoculante +  $20 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn) y T7 (inoculante +  $40 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn).

Durante el desarrollo del experimento fueron realizados los tratamientos fitosanitarios requeridos por el cultivo así como la adición de agua destilada para controlar la humedad demandada por las plantas.

**Muestreo del material vegetal:** En la etapa R6 (32 días después de la germinación) cuando el 50% de las plantas presentaron por lo menos una flor, se realizó la medición de la clorofila (índice SPAD) en el tercer trifolio desarrollado, y el muestreo de toda la planta que se dividió en parte aérea y raíces. Cada una de las partes fue lavada con agua destilada y secadas a  $65^\circ\text{C}$  por 72 horas en una estufa de circulación forzada de aire, marca FANEM modelo 320-SE. Se analizó el contenido de la masa seca de la raíz (MSR), masa seca de la parte aérea

(MSPA), abundancia relativa de ureidos (ARU) establecido por Young & Conway, (1942); la actividad de la fosfatasa ácida (AFA) *in vivo* según los procedimientos descritos por Besford (1978) e Elliot & Lauchi (1986); concentración (N) y nitrógeno acumulado (Nac) por la planta con el método Kjeldahl (Malavolta et al., 1977) así como el número de nódulos (NN) los cuales fueron secados en una estufa marca FANEM modelo 315 SE a 45°C, durante 72 horas para estimar la masa seca de nódulos (MSN).

También se realizó el análisis nutrimental de las plantas para lo cual se determinaron las concentraciones de P, Ca, Mg, Cu, Zn mediante digestión con mezcla nítrico-perclórica y espectrofotometría de absorción atómica con un equipo marca Perkin Elmer modelo AAnalyst 400 (Malavolta et al., 1997).

**Cuadro 1.** *Propiedades físicas y químicas de las muestras de suelo (0.00-0.20 m de profundidad), clase textural y clasificación de suelos.*

Propiedad		Sitio	
		UFLA	Itumirim
pH (H <sub>2</sub> O)		5.00	4.90
K	(Mehlich 1)	16.11	26.00
P	mg/dm <sup>3</sup>	0.61	0.28
Ca <sup>2+</sup>		0.31	0.30
Mg <sup>2+</sup>		0.10	0.10
Al <sup>3+</sup>		0.04	0.30
H + Al	(cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	1.84	2.08
SB		0.45	0.47
t		0.49	0.77
T		2.29	2.55
m		8.16	38.96
V	%	19.71	18.30
MO	dag/kg	0.65	0.54
P-rem	mg/L	5.58	17.36
Zn		0.62	1.37
Fe		30.54	12.03
Mn		5.38	1.26
Cu	mg/dm <sup>3</sup>	0.86	0.61
B		0.01	0.24
S		2.49	7.03
Arcilla		62	32
Limo	dag/kg	7	2
Arena		31	66
Clasificación textural		Arcilloso	Textura media
Clasificación de suelo		LVdf	LA

**Análisis estadístico:** Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para cada variable usada, con el paquete estadístico SAS ® *University Edition*. En caso de efecto significativo al 10% de probabilidad, se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Scott-Knott, así como modelos de regresión, desconsiderando los controles con el programa SISVAR.

## RESULTADOS

Los resultados del análisis de varianza permite observar que el factor tratamiento dentro de cada tipo de suelo presentó diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.1$ ) para las variables MSN, MSPA, Nac, SPAD, N y las nutrimentales (P, Ca, Mg, Zn y Cu) en el suelo arcilloso, ya para el suelo LA se observó que el Zn afectó el NN, MSN, MSPA, Nac, SPAD, N, P, Ca, Mg, Cu, Zn así como la AFA en la planta, al presentar diferencias estadísticas significativas (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** ANOVA del efecto de la fertilización con Zn en la FBN en el cultivo de frijol.

LVdf														
FV	NN	MSR	MSN	MSPA	ARU	Nac	Clorofila	N	P	Ca	Mg	Zn	Cu	AFA
Trat.	NS	NS	†	††	NS	†	†	††	†	††	†	††	†	NS
CV	32.4	12.5	14.9	9.2	26.9	9.4	4.0	2.2	8.9	2.3	4.3	27.8	9.1	6.2
LA														
Trat.	†	NS	†	††	NS	††	†	†	††	††	††	††	††	†
CV	4.1	18.7	11.6	4.6	35.6	6.1	4.2	4.1	28	9.1	11.7	42.3	22.3	5.5

†† Altamente significativo ( $p \leq 0.05$ ); † significativo ( $p \leq 0.1$ ); NS no significativo, LVdf (Latossolo Vermelho distroférrico), LA (Latossolo amarelo); FV (fuente de variación); CV (coeficiente de variación); NN (Número de nódulos); MSN (masa seca de nódulos); MSR (masa seca de la raíz); MSPA (masa seca de la parte aérea); Nac (Nitrógeno acumulado); ARU (abundancia relativa de ureidos); SPAD (Clorofila); AFA (actividad de la fosfatasa ácida).

En el Cuadro 3, se muestra la prueba de medias (Scott-Knott  $p \leq 0.1$ ) así como las medias de los tratamientos controles (que no fueron tomados en cuenta para el análisis estadístico pero se usan como referencia en este trabajo). En el mismo cuadro se observa que la masa seca de los nódulos fue influenciada positivamente por las dosis de Zn aplicadas, observándose una producción de 0.31 g/maceta en el tratamiento solo inoculado, incrementándose conforme el aumento de las dosis de Zn aplicadas, destacando que los tratamientos con 10 y 20 mg  $\text{dm}^{-3}$  de Zn presentaron la mayor producción de MSN (0.43 y 0.47 g/maceta respectivamente)

representado un incremento del 37.3 y 51.1% respectivamente con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn.

En el mismo cuadro se puede observar que las dosis de Zn aplicadas en el suelo LVdf afectaron la concentración del Ca mostrando un efecto de disminución con la aplicación de Zn, en un rango de 17.6 – 16.3 g kg<sup>-1</sup>, siendo en la dosis de 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn la que se presentó la menor concentración representando una disminución de 7.2 % con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn. Caso similar ocurrió con las concentraciones de Mg en el tejido vegetal, siendo que a partir de 10 mg dm<sup>-3</sup> de Zn fueron disminuidas, siendo el tratamiento con 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn el que presentó la menor concentración (1.84 g kg<sup>-1</sup>) que representa una disminución de 15.2 % con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn.

Caso contrario acontece con las concentraciones de Zn las cuales se vieron incrementadas conforme se aumentaron las dosis de Zn (Cuadro 3) en un rango de 8.73 – 72.89 mg kg<sup>-1</sup> siendo mayor la concentración en el tratamiento con 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn con un incremento de 735 %.

**Cuadro 3.** Comparación de medias  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ) de los efectos de la fertilización con Zn en cultivo frijol en un suelo LVdf

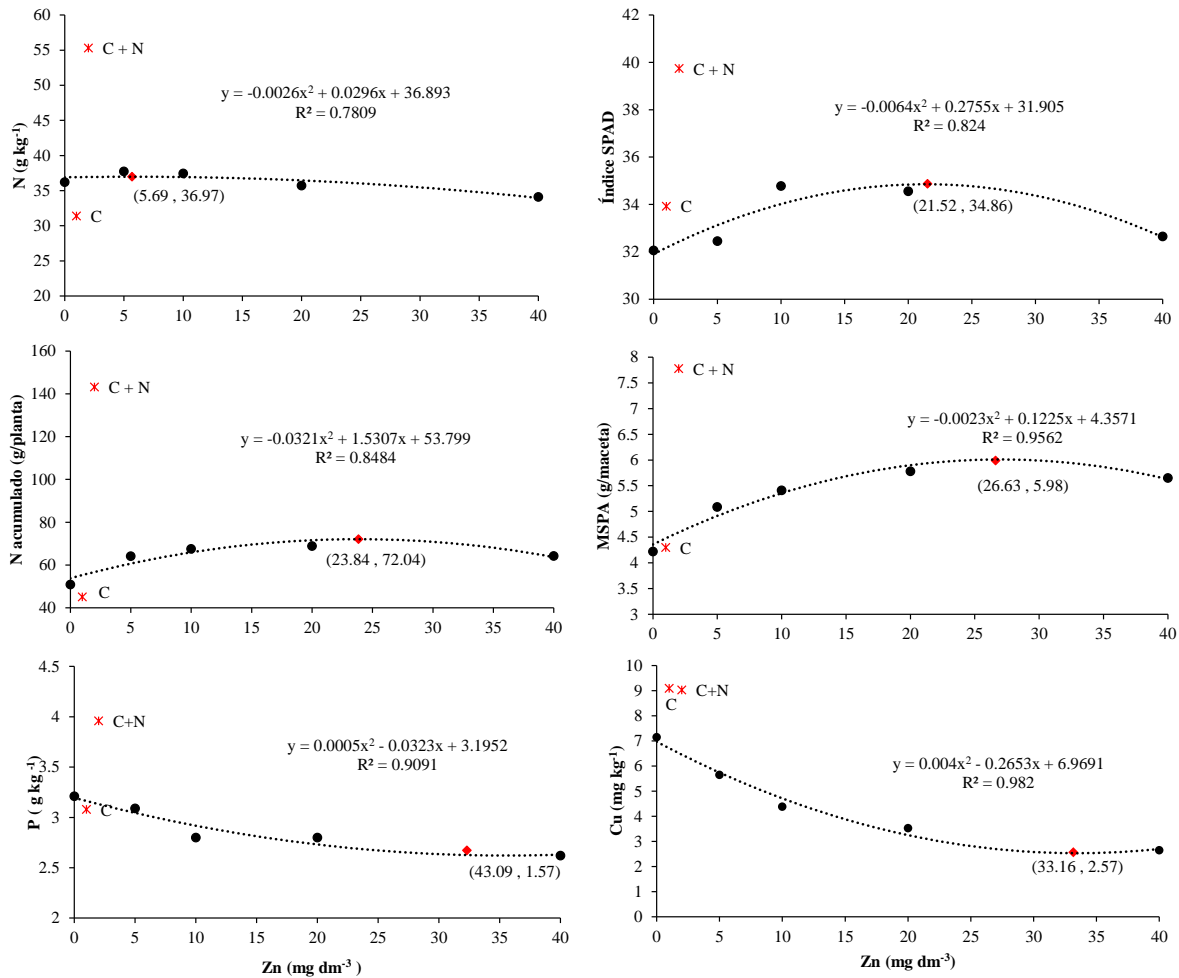
Trat.	NN	MSR	MSN	ARU	Ca	Mg	Zn	AFA
	#/maceta	g/maceta		%	g kg <sup>-1</sup>		mg kg <sup>-1</sup>	$\mu\text{M pNPNP}$ min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> MF
Control	608	1.48	0.43	14.27	18.7	2.27	10.61	43.49
Control + N	26	1.98	0.41	27.44	21.2	2.71	13	43.89
Inoculante	734 $\pm$ 176.2 a	1.32 $\pm$ 0.05 a	0.31 $\pm$ 0.07 b	20.09 $\pm$ 7.32 a	17.60 $\pm$ 0.27 a	2.17 $\pm$ 0.15 a	8.73 $\pm$ 1.53 c	44.84 $\pm$ 1.56 a
Inoc.+5 mg dm- 3 Zn	663 $\pm$ 267.1 a	1.54 $\pm$ 0.37 a	0.33 $\pm$ 0.06 b	28.27 $\pm$ 10.50 a	17.33 $\pm$ 0.15 a	2.29 $\pm$ 0.07 a	35.01 $\pm$ 6.88 b	45.22 $\pm$ 1.00 a
Inoc.+10 mg dm-3 Zn	623 $\pm$ 313.8 a	1.45 $\pm$ 0.07 a	0.43 $\pm$ 0.07 a	26.98 $\pm$ 5.24 a	16.60 $\pm$ 0.53 b	1.89 $\pm$ 0.02 b	44.27 $\pm$ 4.44 b	47.75 $\pm$ 1.81 a
Inoc.+20 mg dm-3 Zn	806 $\pm$ 225.1 a	1.55 $\pm$ 0.03 a	0.47 $\pm$ 0.05 a	21.70 $\pm$ 1.42 a	16.53 $\pm$ 0.65 b	1.84 $\pm$ 0.08 b	49.23 $\pm$ 9.76 b	48.03 $\pm$ 1.64 a
Inoc.+40 mg dm-3 Zn	783 $\pm$ 149.0 a	1.44 $\pm$ 0.16 a	0.43 $\pm$ 0.04 a	25.38 $\pm$ 4.90 a	16.33 $\pm$ 0.20 b	1.94 $\pm$ 0.05 b	72.89 $\pm$ 22.75 a	44.84 $\pm$ 5.71 a

Letras iguales en la columna no presentan diferencias estadísticas significativas, Scott-Knott ( $p \leq 0.1$ ), LVdf (Latosolo Vermelho distroferico); NN (Número de nódulos); MSR (masa seca de la raíz); MSN (Masa seca de nódulos); ARU (abundancia relativa de ureidos); Calcio, Magnesio, Zinc y AFA (actividad de la fosfatasa ácida).

En la figura 1 se observa que conforme aumenta la dosis de Zn aplicada en el suelo LVdf, la concentración de N en el tejido vegetal de la parte aérea de la planta se ve disminuida; destacando que la mayor concentración de N se presentó en los tratamientos con 5 y 10 mg dm<sup>-3</sup> de Zn representado un incremento del 4.2 y 3.3 % con respecto al tratamiento inoculado, y los tratamientos con las dosis de 20 y 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn influyeron negativamente en las concentraciones de N presentando una disminución de 1.3 y 5.8 % con respecto al tratamiento inoculado. En la misma figura se observa que el mayor contenido de clorofila determinada por el índice SPAD, se presentó en el tratamiento con 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, con un aumento de 7.8 % con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn disminuyendo conforme aumentó la dosis de Zn aplicada.

La acumulación de nitrógeno por las plantas inoculadas con *R. tropici*, en el tratamiento sin presencia de Zn presentó un acumulo de 50.91 g planta y el mayor nitrógeno acumulado fue de 68.84 g planta, representando un incremento máximo del 35.2 % en el tratamiento fertilizado con 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, ya para la dosis máxima de Zn aplicada el acumulo fue de 64.23 g planta representado un incremento tan solo del 26.1% (*Figura 1*). La producción de MSPA se presentó de forma cuadrática por la presencia de Zn, en un rango de 4.22-5.78 g/maceta, observándose que el tratamiento con 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn presentó la mayor producción de MSPA representada por un incremento del 36.9% con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn (*Figura 1*)





**Figura 1.** Efecto de la aplicación de Zn en las concentració de N, clorofila, nitrógeno acumulado MSPA P y Cu en plantas cultivadas en el suelo LVdf.

En el Cuadro 4 se puede observar que en el suelo de textura media la masa seca de nódulos se presentó en rangos de 0.33 a 0.47 g/maceta favorecida por la presencia de Zn, representando un incremento de 41.6 % en el tratamiento con 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, donde se dio la mayor producción de MSN, con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn, ya para el tratamiento con la máxima dosis de Zn aplicada la MSN fue de 0.40 g/maceta representando un incremento tan solo del 23%.

En el mismo cuadro se observa que la fertilización con Zn afectó negativamente las concentraciones foliares de Ca y Mg, las cuales se vieron disminuidas por los incrementos de

Zn en el suelo. La menor concentración de Ca ( $11.76 \text{ g kg}^{-1}$ ) se presentó en el tratamiento con  $40 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn representando un incremento del 44.3 % con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn. Caso similar aconteció con las concentraciones de Mg estando en un rango de  $3.13\text{-}2.23 \text{ g kg}^{-1}$  siendo el tratamiento con la máxima dosis de Zn aplicada el que presentó la menor concentración representando una disminución de 28.8 %.

La absorción de Zn por la planta (*Cuadro 4*) se presentó de forma lineal positiva conforme el aumento de la fertilización con Zn, incrementándose la concentración en el tejido vegetal en un rango de  $13.12\text{-}116.5 \text{ mg kg}^{-1}$  que representa un incremento del 788 % con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn. La actividad de la fosfatasa ácida fue mayor con la presencia 20 y  $40 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn ( $45.86\text{-}46.95 \text{ }\mu\text{M pNNP min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ ) respectivamente.

**Cuadro 4** Comparación de medias  $\pm$  desviación estándar ( $n=3$ ) de los efectos de la fertilización con Zn en cultivo frijol en un suelo LA.

Trat.	NN	MSR	MSN	ARU	Ca	Mg	Zn	AFA
	#/maceta	g/maceta		%		g kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	$\mu\text{M pNPP min}^{-1}\text{mg}^{-1}\text{MF}$
Control	868	1.25	0.17	16.66	26.10	3.9	12.4	42.90
Control + N	0	1.85	0	29.62	20.20	3.2	15.8	40.60
Inoculante	941 $\pm$ 153.4 a	1.31 $\pm$ 0.09 a	0.33 $\pm$ 0.05 b	26.55 $\pm$ 2.83 a	21.10 $\pm$ 0.87 a	3.13 $\pm$ 0.25 a	13.12 $\pm$ 1.43 b	41.07 $\pm$ 3.16 b
Inoc.+ 5 mg dm <sup>-3</sup> Zn	932 $\pm$ 244.0 a	1.32 $\pm$ 0.40 a	0.33 $\pm$ 0.01 b	32.87 $\pm$ 9.78 a	20.03 $\pm$ 0.47 a	3.03 $\pm$ 0.18 a	28.46 $\pm$ 17.15 b	41.76 $\pm$ 2.30 b
Inoc.+10 mg dm <sup>-3</sup> Zn	981 $\pm$ 237.9 a	1.52 $\pm$ 0.32 a	0.41 $\pm$ 0.06 a	27.17 $\pm$ 14.17 a	18.70 $\pm$ 0.11 b	2.83 $\pm$ 0.06 b	30.54 $\pm$ 7.118 b	43.89 $\pm$ 0.90 b
Inoc.+20 mg dm <sup>-3</sup> Zn	1261 $\pm$ 294.3 a	1.28 $\pm$ 0.14 a	0.47 $\pm$ 0.03 a	35.52 $\pm$ 13.69 a	17.16 $\pm$ 2.60 b	2.50 $\pm$ 0.39 c	54.43 $\pm$ 13.76 b	45.86 $\pm$ 2.76 a
Inoc.+40 mg dm <sup>-3</sup> Zn	961 $\pm$ 224.9 a	1.62 $\pm$ 0.12 a	0.40 $\pm$ 0.05 a	28.46 $\pm$ 9.14 a	11.76 $\pm$ 2.34 c	2.23 $\pm$ 0.56 c	116.5 $\pm$ 21.52a	46.95 $\pm$ 2.42 a

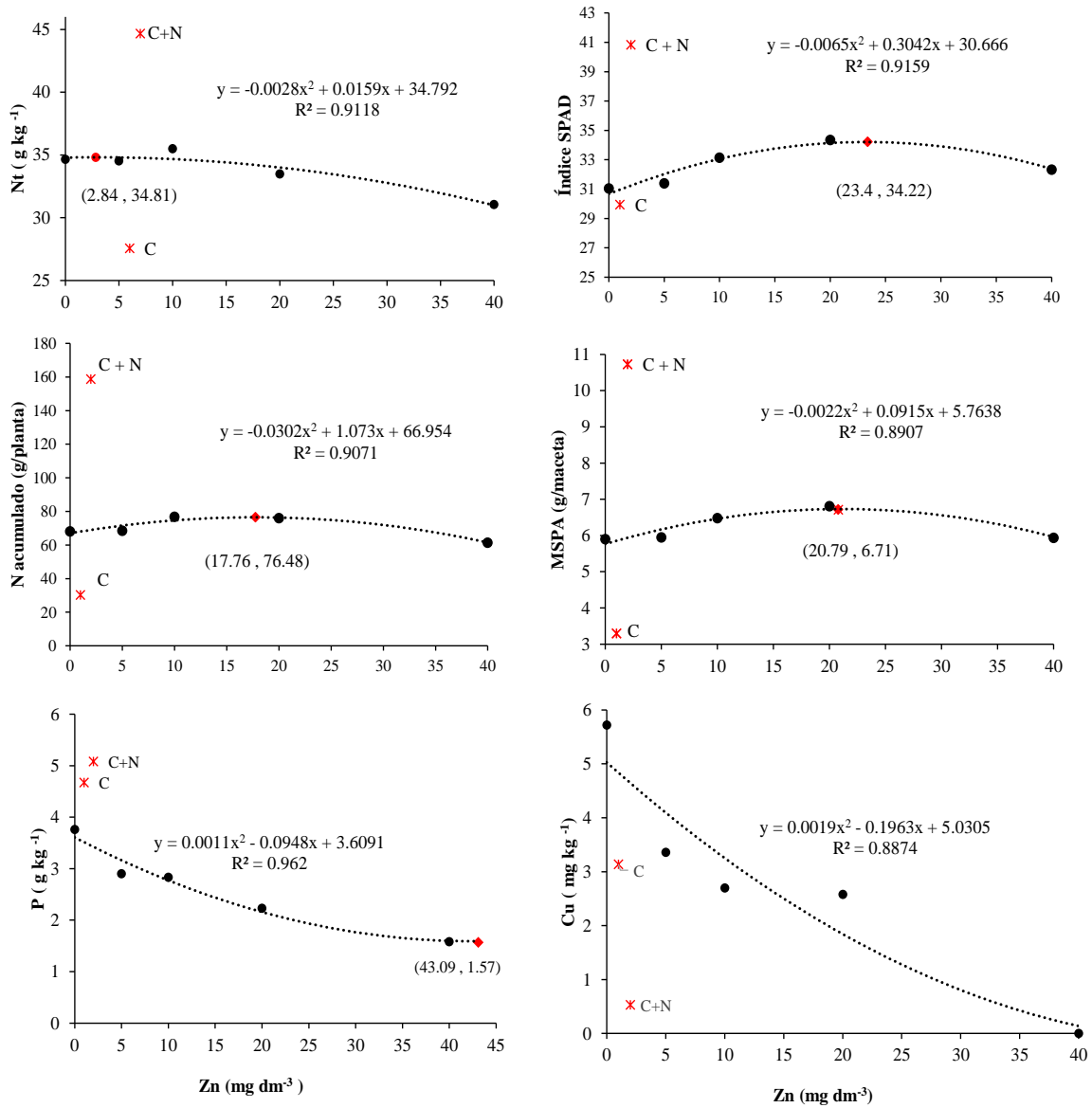
Letras iguales en la columna no presentan diferencias estadísticas significativas, Scott-Knott ( $p \leq 0.1$ ). LA (Latossolo amarelo); NN (Número de nódulos); MSR (masa seca de la raíz); MSN (Masa seca de nódulos); ARU (abundancia relativa de ureidos); Calcio, Magnesio, Zinc y AFA (actividad de la fosfatasa ácida).

La capacidad del cultivo en acumular nitrógeno (*Figura 2*) se presentó en valores de 61.48 a 76.80 g/planta destacando los tratamientos con 10 y 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn con la mayor acumulación de N en los cuales el acumulo de N representan un incremento del 12.75 y 11.61 % respectivamente con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn, ya para el tratamiento con la mayor dosis de Zn aplicada (40 mg dm<sup>-3</sup>) se observa la menor acumulación de N. Presentando un incremento cuadrático y que cuando se apliquen aproximadamente 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn se dará la mayor acumulación de N.

En cuanto a la producción de la MSPA se presentaron incrementos cuadráticos entre los tratamientos con presencia de *R. tropici* y Zn, obteniéndose producción de 5.90-6.81 g/maceta, siendo los tratamientos con 10 y 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn los que presentaron la mayor producción teniendo un incremento del 9.83 y 15.42 % respectivamente, con relación al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn, siendo que en el tratamiento con la mayor dosis de Zn aplicada (40 mg dm<sup>-3</sup>) se presentó la menor acumulación.

En la misma figura se observa que la fertilización con Zn afectó negativamente las concentraciones foliares de P y Cu, las cuales se vieron disminuidas por los incrementos de Zn en el suelo siendo el tratamiento con 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn el que presentó la menor concentración.

Las concentraciones de N en la parte aérea de la planta, presentó un efecto cuadrático negativo observándose que los tratamientos con 20 y 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn presentaron las menores concentraciones siendo de 33.50 y 31.06 g kg<sup>-1</sup> representando una disminución del 3.35 y 10.39 % respectivamente con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn (*Figura 2*). En la misma figura se observa que el índice SPAD presentó un efecto cuadrático siendo que en los tratamiento con 10 y 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn se presentan los mayores índices SPAD siendo de 33.14 y 34.35, representando un aumento del 6.73 y 10.63 % con respecto al tratamiento solo inoculado, disminuyendo conforme aumente la dosis de Zn aplicada.



**Figura 2.-** Efecto de la aplicación de Zn en la concentración foliares de N, clorofila, n acumulado, masa seca de la parte aérea, P y Cu suelo LA.

## DISCUSIÓN

La nodulación de las plantas en los tratamientos inoculados presentaron los mayores valores, oscilando entre 623 - 806 y 932-1261 nódulos/maceta (Cuadros 3 y 4, respectivamente) resultados que constatan este hecho fueron reportados por autores como Bertoldo, Pelisser, Silva, Favreto & Oliveira, 2015 con las cepas SEMIA 4077, SEMIA 4080 y SEMIA 4088, y Soares et al., 2016 con la cepa CIAT 899 inoculadas en el cultivo de frijol.

La ausencia de nódulos que se muestra en los controles con presencia de N mineral, puede ser asociado a un efecto negativo por la presencia de N suplido a la planta, el cual como lo mencionado por Moreira (2006) la alta disponibilidad de este elemento inhibe la nodulación disminuyendo del mismo modo la fijación de nitrógeno mientras que el agotamiento estimula esta función. Allos & Bartholomew (1959) menciona que a medida que aumentan los niveles de nitrógeno disponible en el suelo, la dependencia de las plantas de los rhizobios para el nitrógeno disminuye, y las plantas reducen la intensidad de la asociación. Resultados similares fueron reportados por Akter et al. (2014) y Soares et al. (2016) en estudios con frijol común y rhizobio, así como lo reportado en la literatura por diversos autores (Mostasso, Mostasso, Dias, Vargas, & Hungria, 2002; Soares et al., 2006; Ferreira et al., 2009, Nanjareddy et al., 2014).

Por otra parte, el tratamiento control (sin inoculación y sin fertilización nitrogenada) presentó buena nodulación; sin embargo, estos fueron menores que en las plantas inoculadas y con menor tamaño, por su parte autores como Ferreira et al. (2009), Figueredo et al. (2016), Mercante, Otsubo, & Brito, (2017) encontraron nodulación por rhizobios nativos en cultivo de frijol.

La presencia de Zn incrementó la masa seca de nódulos entre un 4.1 y 51.1% con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn en el suelo LVdf y entre 0.9 y 41.6 %

en el suelo LA, tales incrementos se deben a que el Zn es esencial en la morfogénesis temprana de los nódulos que es controlada por las auxinas (Ferguson & Mathesius, 2014) basada en el correcto funcionamiento apical del nódulo (Łotocka et al., 2012). Otra etapa, aparentemente dependiente de Zn (posiblemente afectada a través de la transcripción y la traducción), ocurre durante la ampliación de las células nodulares infectadas con rhizobios (Kryvoruchko, 2017). En estudios similares con cultivos de (*Cicer arietinum* L.) Das, Pareek, Raverkar, Chandra, Kaustav, (2012) reportan incrementos en la masa nodular por efecto del Zn.

La producción de MSPA presentó un incremento cuadrático con la fertilización con Zn (*Figura 1*); en ambos suelos la mayor producción se presentó con la presencia de 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn con incrementos del 36.9 y 15.42 % con respecto a su tratamiento 1 (inoculado y sin Zn). Malavolta et al. (1997), mencionan que la deficiencia de Zn se ve reflejada en el crecimiento de las plantas de frijol en cuanto a la altura debido al efecto de este nutriente debido a su participación en la síntesis de las auxinas que estimula el desarrollo de las partes jóvenes y en plantas con deficiencia de Zn se sintetiza menos ácido indolacético (AIA) y las moléculas ya producidas son más propensas a la degradación oxidativa (Moreira, Moraes, & Reis, 2018).

Fageria (2000) menciona que la fertilización con Zn tiene efecto en la producción de MSPA en frijol siendo el nivel adecuado de Zn de 0.7 mg kg<sup>-1</sup> y la tóxica de 57 mg kg<sup>-1</sup> de suelo. En estudios con frijol caupí (*Vigna Unguiculata* [L] Walp.) Manzeke et al. (2017) observaron que el aumento de las dosis de Zn incrementa la productividad de la biomasa de los brotes comparado con el tratamiento sin aplicación de Zn; del mismo modo.

Por otro lado, concentraciones por encima de los niveles de tolerancia de los cultivos inducen efecto inhibitorio en las leguminosas, afectaciones en los procesos fisiológicos que limitan el crecimiento, desarrollo y reducen la producción de biomasa (Sagardoy et al., 2010), lo que pudo haber sucedido ambos suelo (Cuadro 4) ya que a partir del 20 mg dm<sup>-3</sup> de la

producción de MSPA se vio disminuida. Preet & Sindu, (2016) encontraron que el nivel elevado de Zn reduce la producción de biomasa y la fotosíntesis en las plantas.

Los contenidos y concentración de N en la planta, fueron mayores en el control con N mineral (C+N) hecho que coincide con lo reportado por Rufini et al. (2016), y que era de esperarse debido al hecho de la aplicación de N-mineral. Autores como Arf, Rodrigues, Sá, Buzetti, Nascimento, (2004) afirman que hay una relación en la respuesta de la concentración de N en la parte aérea con diferentes factores del suelo como son los contenidos de N disponible, la temperatura, y el cultivar usado, entre otros.

El mayor contenido de N acumulado fue incrementado por la presencia de Zn en ambos suelos (*Figura 1*) siendo mayor en los tratamientos con  $20 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn, debido a la mayor producción de MSPA que presentó el mismo comportamiento en esos tratamientos; destacando que en el suelo LA se presentó la mayor acumulación de N por las plantas con aproximadamente 76 g maceta.

En este trabajo el índice SPAD obtenido fue mayor en la presencia de  $20 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn en ambos suelo con incrementos de 7.8 % en el suelo LVdf y 10.6 % en el suelo LA con respecto a los tratamientos inoculados y sin fertilización con Zn respectivamente, por su parte Medina-Velo et al. (2017) reportan que dosis mayores a  $60 \text{ mg kg}^{-1}$  de ZnO no presentaron efecto en los contenidos relativos de clorofila (SPAD).

Las concentraciones de N en la parte aérea de la planta presentaron disminución a partir de la aplicación de  $20 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn en ambos suelos, con una reducción del 1.29 y 3.35 % en relación a sus respectivos tratamientos inoculados y sin fertilización con Zn en el suelo LVdf y LA respectivamente, lo que indica que posiblemente dosis por encima de esta afecte actividades fisiológicas y metabólicas, debido al estrés ejercido por el exceso de Zn que provoca la desorganización de los cloroplastos causado por un menor suministro de nitrato en el sitio de la



síntesis de enzimas y, por lo tanto, dificulta la actividad de la nitrato reductasa (Michael & Krishnaswamy 2011); además, el estrés por Zn en las plantas ayuda a la movilización del nitrógeno promoviendo la senescencia y alterando el flujo de nitrógeno a través de los aminoácidos (Schaller 2004). Cabe destacar que las concentraciones encontradas en este trabajo se encuentran en los valores considerados adecuados en la etapa de floración de frijol 30-50 g kg<sup>-1</sup> y 3% de N (Ambrosano, Wutke, Bulisani, & Cantarella, 1996; Malavolta, et al., 1997, respectivamente). Lo que indica que la inoculación y el tratamiento con Zn fueron suficientes para atender la demanda de la planta por el nitrógeno durante el ciclo.

Sin embargo se muestra un comportamiento de que en la dosis de 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn la planta presenta su mayor producción de materia seca pero no la concentración de N suficiente para su desarrollo, lo que indica que en esta dosis la planta estaría en el límite del consumo de lujo próximo al nivel crítico de toxicidad de Zn. Ya que para en el tratamiento con 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn se ven disminuidos la clorofila, el N acumulado y la MSPA.

En las concentraciones nutrimentales de las plantas se observa el efecto de antagonismo que presenta el Zn con P, Ca, Mg y Cu debido a sus mecanismos de absorción (Kabata-Pendias, 2011), la disminución de la concentración de P en el tejido vegetal fueron dadas en los dos suelos, observándose que las concentraciones se encuentran en los rangos considerados adecuados (2.5 a 4.0 g kg<sup>-1</sup>) establecidos por Raij, Andrade, Cantarella, Quaggio & Furlani, (1996). Malavolta (1997; 2004), menciona que el exceso de Zn disminuye la absorción de P.

Las concentraciones de Ca y Mg encontradas se vieron disminuidas por la dosis de Zn aplicadas; sin embargo, las dosis aplicadas fueron suficientes para que las concentraciones de Ca no se vieran reducidas por abajo de lo establecido como adecuado para el cultivo (10-25 y 15-20 g kg<sup>-1</sup>) según lo establecido por Raij et al. (1996) y Malavolta et al. (1997) respectivamente, mientras que el Mg presentó concentraciones deficientes en el suelo LVdf

(2.5-5.0 y 4-7 g kg<sup>-1</sup>). Autores como Medina-Velo et al. (2017, 2017a) reportan disminución de Ca por fertilización en forma de ZnO y ZnCl<sub>2</sub> respectivamente y de las concentraciones de Mg debido a que este elemento está mediado por el transportador AtCNGC10 que también participa en el transporte de Ca.

Las concentraciones de Cu en la planta se vieron disminuidas por la aplicación de Zn, esto debido a la inhibición competitiva que presentan estos elementos al compartir los mismos transportadores (Alloway, 2008; Kabata-Pendias 2011; Ortega & Malavolta, 2012). Por su parte Medina-Velo et al., (2017) reporta disminución de Cu por la adición de nanomateriales recubiertos con ZnO.

El incremento de las concentraciones de Zn en la planta se dieron conforme el aumento de las dosis aplicadas, encontrándose en rangos entre 8.7 a 72.8 y 13.1 a 116.5 mg de Zn kg<sup>-1</sup> en ambos suelos; concentraciones que están dentro de los rangos considerados adecuados sugeridos Malavolta et al. (1997) siendo de 20-100 mg kg<sup>-1</sup>, a excepción de la aplicación de 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn en el suelo LA que presentó concentración superior a la establecida como adecuada. Por su parte, diversos autores reportan aumento en las concentraciones de Zn en la planta en función de la fertilización con Zn (Leal & Prado, 2008, Teixeira, Borém, Silva, & Kikuti, 2008, Raziq et al. 2016), Sida-Arreola et al. (2017) mencionan que la biofortificación con Zn aumenta la acumulación de Zn en semillas de frijol, siendo que concentraciones de 25 µM en forma de DTPA-Zn presenta el mayor aumento de Zn en semillas.

La actividad de la fosfatasa ácida presenta relación con las concentraciones de Zn y P en la planta, debido al efecto antagónico del Zn con el P (Ortega & Malavolta, 2012) siendo mayor en los tratamientos con las dosis más altas de Zn, en el suelo LA. Plantas que crecen en condiciones deficientes de P, producen enzimas intra y extracelulares para la adquisición del nutriente (Tran, Hurley, & Plaxton, 2010). Watkins-Brandt et al. (2011) mencionan que las

leguminosas noduladoras presentan actividad alta de fosfatasa ácida (FA) por la demanda de P para el crecimiento y funcionamiento simbiótico. Nuestros resultados concuerdan con reportados en la literatura en cultivos de frijol y soya (Bargaz, Ghoulam, & Drevon, 2013; Olivera, Tejera, Iribarne, Ocaña, & Lluch, 2004). Veterink, (2011) menciona que reduciendo el P o aumentando el N, se estimula la actividad de la fosfatasa, por su parte Png et al. (2017) reportan que las leguminosas presentan mayor actividad de fosfomonoesterasas por la disminución de P.

## CONCLUSION

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir que la fertilización con Zn tiene efecto en la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de frijol en los dos tipos de suelos. Destacando que de manera general la mejor dosis de Zn es de 20 mg dm<sup>-3</sup> en ambos suelos.

De igual manera se concluye que con el aumento de las dosis se tiene una disminución en la concentración nutrimental de N, P, Ca, Mg y Cu en el tejido vegetal.

*Agradecimientos.* Al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por el financiamiento y la beca de estudio de posgrado.

**Resumen. Introducción:** La baja fertilidad natural de los suelos y la alta demanda nutricional de cultivos, ha conllevado a prácticas de biofortificación agronómica de nutrientes como el Zn, las cuales pueden afectar o beneficiar procesos que algunas plantas hacen de forma

natural como lo es la fijación biológica de Nitrógeno, que juega un papel importante en la producción agrícola. **Objetivo** de esta investigación fue evaluar el efecto de dosis altas de Zn en la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de frijol en dos tipos de suelos. **Metodología:** Se desarrolló un experimento en condiciones de invernadero con dosis de Zn visando biofortificación en suelos de textura arcillosa (Latosolo Vermelho distroférico [LVdf]) y textura media (Latosolo Amarelo [LA]) en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) asociado con *R. tropici*, de septiembre a noviembre de 2018. Se evaluaron las variables relacionadas con el nitrógeno como son el número de nódulos, masa seca de nódulos, masa seca de la parte aérea, acumulo de nitrógeno, clorofila, así como las concentraciones de nutrimentales de P, Ca, Mg, Cu y Zn, y la actividad de la fosfatasa ácida en tejido vegetal al inicio de la floración. **Resultados:** La aplicación de dosis de Zn vía suelo promueve la mayor producción de masa seca en la parte aérea, incrementando la masa nodular y aumentando la acumulación de nitrógeno; con la aplicación de 10 y 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn se presenta la mejor respuesta por las plantas a la fertilización. Las concentraciones de P, Ca, Mg y Cu en las plantas cultivadas en ambos suelos disminuyeron con la aplicación de las diferentes dosis de Zn, pero mantuvieron sus concentraciones en los rangos establecidos como adecuados para el cultivo; por su parte la absorción de Zn por las plantas se vió favorecida conforme el aumento de las dosis aplicadas incrementándose las concentraciones de Zn en la planta conforme la fertilización. **Conclusión:** La fertilización con Zn tiene efecto en la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de frijol en los dos tipos de suelos. Destacando que de manera general la mejor dosis de Zn es de 20 mg dm<sup>-3</sup> en ambos suelos. De igual manera se concluye que con el aumento de las dosis se tiene una disminución en la concentración nutrimental de N, P, Ca, Mg y Cu en el tejido vegetal.

**Palabras claves:** suelo, Latosol, biofortificación, fijación biológica de nitrógeno

## REFERENCIAS

- Akter, Z., Pageni, B. B., Lupwayi, N. Z., & Balasubramanian, P. M. (2014). Biological nitrogen fixation and nifH gene expression in dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Canadian Journal of Plant Science* 94, 203-212 doi:10.4141/CJPS2013-200.
- Allos, H. F., & Bartholomew, W. V. (1959). Replacement of symbiotic fixation by available nitrogen. *Soil Science* 87, 61–66.
- Alloway, B. J. (2004). *Zinc in soils and crop nutrition*. IZA Publications. Brussels, International Zinc Association.
- Alloway, B. J. (2008). *Zinc in Soils and Crop Nutrition*. (segunda edición). Brussels, Belgium and Paris, France: IZA and IFA.
- Ambrosano, E. J., Wutke, E. B., Bulisani, E., Cantarella, H. Feijão. In B. van Raij, H. Cantarella, J. A. Quaggio, A. M. C Furlani. (eds). *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*. (Segunda edición) Campinas: IAC, 1996. p.194-195. (Boletim Técnico 100).
- Arf, O., Rodrigues, R. A. F., Sá, M. E., Buzetti, A., & Nascimento, V. (2004), Manejo do solo, água e nitrogênio no cultivo de feijão. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 39(2), 131-138.

Bargaz, A., Ghoulam, C., & Drevon, J-J. (2013). Specific expression and activity of acid phosphatases in common bean nodules. *Plant Signal & Behavior* 8(8), e25022-1 - e25022-6. doi.org/10.4161/psb.25022

Bertoldo, J. G., Pelisser, A., Silva, R. P., Favreto, R., & Oliveira, L. A. D. (2015). Alternativas na fertilização de feijão visando a reduzir a aplicação de N-ureia. *Pesquisa Agropecuaria Tropical* 45(3): 348-355.

Besford, R. T. (1978). Effect of phosphorus supply on acid phosphatase activity in the leaves of tomato plants. *Journal of Science and Food Agriculture* 30, 275-280.

Broadley, M. R., White, P. J., Hammond, J. P., Zelko, I., & Lux, A. (2007). Zinc in plants. *New Phytologist* 173, 677-702.

Cakmak, I., McLaughlin, M. J., & White, P. (2017). Zinc for better crop production and human health. *Plant and Soil* 411, 1-4.

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Acompanhamento da safra brasileira. Grãos, v. 6 Safra 2018/19 - Quarto levantamento, Brasília, p. 1-125 fevereiro 2019. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos>. Acesso em 4/marzo/2019

Das, S., Pareek, N., Raverkar, K. P., Chandra, R., & Kaustav, A. (2012). Effectiveness of micronutrient application and *Rhizobium* inoculation on growth and yield of chickpea. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology* 5, 445-452.

Elliot, G. C., & Lauchli A. (1986). Evaluation of an acid phosphatase assay for detection of phosphorus deficiency in leaves of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Nutrition* 9, 1469-1477.

Fageria, N. K. (2000). Níveis adequados e tóxicos de zinco na produção de arroz, feijão, milho, soya e trigo em solo de cerrado. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 4(3), 390-395.

Fageria, N. K., & Stone, L. F. (2004). Produtividade de feijão no sistema plantio direto com aplicação de calcário e Zinco. *Pesquisa agropecuaria brasileira* 39(1), 73-78.

Ferguson, B. J., & Mathesius, U. (2014). Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. *Journal of Chemical Ecology* 40, 770-790.

Ferreira, P. A. A., Silva, M. A. P., Cassetari, A., Rufini, M., Moreira, F. M. S., & Andrade, M. J. B. (2009). Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro, *Ciência Rural, Santa Maria*, 39(7), 2210-2212.

Figueiredo, M. A., Oliveira, D. P., Soares B. L., Morais, R., Moreira, F. M. S., & Andrade, M. J. B. (2016). Nitrogen and molybdenum fertilization and inoculation of common bean with *Rhizobium* spp. in two Oxisols. *Acta Scientiarum Agronomy, Maringá*, 38(1), 85-92.

Herridge, D. F., Peoples, M. B., & Boddy, R. M. (2008). Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant and Soil* 311, 1–18. doi: 10.1007/s11104-008-9668-3

Hungria, M., Campo, R. J., & Mendes, C. I. (2003). Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils* 39, 88–93 doi 10.1007/s00374-003-0682-6

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Censo Agropecuário. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?c=263&z=p&o=2&i=P>.

Kabata-Pendias, A. (2011). Trace elements in soils and plants. (Cuarta edición). USA, Taylor & Francis Group .....doi.org/10.1201/b10158-25.

Kryvoruchko, I. S. (2017). Zn-use efficiency for optimization of symbiotic nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Turkish Journal of Botany*. 41, 423-441.

Leal R. R., & Prado, R. M. (2008). Desordens nutricionais no feijoeiro por deficiência de macronutrientes, Boro e Zinco. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 3(4), 301-306.

Łotocka, B., Kopcińska, J., & Skalniak, M. (2012). Review article: The meristem in indeterminate root nodules of Faboideae. *Symbiosis* 58, 63-72.

Malavolta, E., Vitti, G. C., & Oliveira, S. (1997). Avaliação do estado nutricional das plantas. (Segunda edición). Piracicaba: POTAFÓS.

Malavolta, E. (2004): O fósforo na planta e interações com outros elementos. In: Yamada, T., & Abdalla, S. R. S. (eds) *Fósforo na agricultura brasileira*. Piracicaba: POTAFOS.



Malavolta, E. (2006). *Manual de nutrição de plantas*. São Paulo, Agronômica Ceres.

Manzeke, M. G., Mtambanengwe, F., Nezomba, H., Watts, M. J., Broadley, M. R., São Paulo Mapfumo, P. (2017). Zinc fertilization increases productivity and grain nutritional quality of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under integrated soil fertility management. *Field Crops Research*, 13, 231–244.

Medina-Velo, I. A., Dominguez, O. E., Ochoa, L., Barrios, A. A., Hernández-Vezcas, J. A., White, J. C., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2017a). Nutritional quality of bean seeds harvested from plants grown in different soils amended with coated and uncoated zinc oxide nanomaterials. *Environmental Science: Nanotechnology* 4, 2336–2347 doi: 10.1039/c7en00495h

Medina-Velo, I. A., Barrios, A. C., Zuverza-Mena, N., Hernández-Viezcas, A., Chang, Ch. H., Ji, Z., Zink, J. I., Peralta-Videa, J. R., & Gardea-Torresdey, J. L. (2017b). Comparison of the effects of commercial coated and uncoated ZnO nanomaterials and Zn compounds in kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Journal of Hazardous Materials* 332, 214–222.

Mercante, F. M, Otsubo, A. A., & Brito, O. R. (2017). New native rhizobia strains for inoculation of common bean in the Brazilian Savanna. *Revista Brasileira da Ciência do Solo*. 41, e0150120. doi.org/10.1590/18069657rbcs20150120

Michael, P. I., & Krishnaswamy, M. (2011). The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 74, 171– 177 doi:10.1016/j.envexpbot.2011.05.016

Moreira, F. M. S. (2006): Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In F. M. S. Moreira, J. O. Siqueira, L. Brussaard, (eds). *Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems*. (tercera edición). Wallingford: CAB International.

Moreira, F. M. S., & Siqueira, J. O. (2006). *Microbiologia e bioquímica do solo*. (2 ed.) UFPA. Lavras, Brazil.

Moreira, A., Moraes, L. A. C., & Reis, A. R. (2018). The molecular Genetics of zinc Uptake and utilization Efficiency in crop Plants. In M. A. Hossain, T. Kamiya, D. J. Burritt, L. S. P. Tran, T. Fujiwara. (eds), *Plant Micronutrient use efficiency: Molecular and Genomic Perspectives in Crop Plants*. India, ELSEVIER.

Mostasso, L., Mostasso, F. L., Dias, B. G., Vargas, M. A. T., & Hungria, M. (2002). Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Reserach*.73, 121-132. doi:10.1016/S0378-4290(01)00186-1

Nanjareddy, K., Blanco, L., Arthikala, M., Affantrange, X. A., Sánchez, F. & Lara, M. (2014). Nitrate regulates rhizobial and mycorrhizal symbiosis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal Integrative Plant Biology*. 56, 281-298.

O'Hara, G. W. (2001). Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 41, 417-433.

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of Engagement in the legume–rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* 45, 119–44. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132549.

Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocaña, A., & Lluch, C. (2004). Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum* 121, 498-505. doi: 10.1111/j.1399-3054.2004.00355.x

Ortega, A. E. & Malavolta, E. (2012). *Los más recientes micronutrientes vegetales*. Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica, *Georgia*, 7(1), 16-25.

Pliego, L., Ocaña, A., & Lluch, C. (2003). Crecimiento, fijación de nitrógeno, acumulación y asimilación de nitratos con dosis de nitrógeno en frijol. *Terra Latinoamericana*, 21(2), 213-223.

Png, G. K., Turner, B. L., Albornoz, F. E., Hayes, P. E., Lambers, H., & Laliberté, H. (2017). Greater root phosphatase activity in nitrogen-fixing rhizobial but not actinorhizal plants with declining phosphorus availability. *Journal of Ecology* 105, 1246–1255 doi: 10.1111/1365-2745.12758

Praharaj, C. S., Singh, U., Singh, S. S., & Kumar, N. (2016). Improving protein density in food legumes through agronomic interventions. In U. Singh, S. C. Praharaj, S. Singh, & P. N Singh, (Eds.) *Biofortification of food crops*. Springer. New Delhi. India.

Prasad, A. S. (2007): Zinc: Mechanisms of host defense. *The Journal of Nutrition* 137, 1345–1349.

Preet G., & Sidhu, S. (2016). Physiological, biochemical and molecular mechanisms of zinc uptake, toxicity and tolerance in plants. *Journal of Global Biosciences* 5(9), 4603-4633.

Raij, B. van., Andrade, J. C., Cantarella, H., Quaggio, J. A., & Furlani, A. M. C. (1996). *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*, (Segunda edição). Campinas: Instituto Agrônômico e Fundação IAC.

Raziq, A., Gurmani, A. R., Khan, S. U., Malik, A. A., Rubab, T., Khan, S. M., & Shah I. H. (2016). Influence of zinc and humic acid on yield, nutritional quality, uptakes and economic returns of french bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (Paulista) under field conditions. *Science International (Lahore)* 2, 1237-1242.

Rufini, M., Ferreira, P. A. A., Soares, B. L., Oliveira, D. P., Andrade, M. J. B., & Moreira, F. M. S. (2011). Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. *Pesquisa agropecuária brasileira* 46(1), 81-88.

Sagardoy, R., Vázquez, S., Florez-Sarasa, I. D., Albacete, A., Ribas-Carbó, M., Flexas, J., Abadía, J., & Morales, F. (2010). Stomatal and mesophyll conductance to CO<sub>2</sub> are the main limitations to photosynthesis in sugar beet plants treated with Zn excess. *New Phytologist* 187(1), 145-158.

Schaller, A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220, 183–197. doi 10.1007/s00425-004-1407-2

SAS® UNIVERSITY EDITION - Statistical Analyses System - SAS/University Edition, © SAS Institute Inc.

Sida-Arreola, J. P., Sánchez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Ávila-Quezada, G. D., Flores-Cordova, M. A., Márquez-Quiroz, C., & Preciado-Rangel P. (2017). Can biofortification of zinc improve the antioxidant capacity and nutritional quality of beans?. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29(3), 237-241.

Soares, A. L. L., Pereira, J. P. A. R., Ferreira, P. A. A., Vale, H. M. M., Lima, A. S., Andrade, M. J. B., & Moreira, F. M. S. (2006). Agronomic efficiency of selected rhizobia strains and diversity of native nodulating populations in Perdões (MG – Brazil). II – Beans. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 30, 803-11. doi:10.1590/S0100-06832006000500006

Soares, B. L., Ferreira, P. A. A., Rufini, M., Martins, F. A. D., Oliveira, D. P., Reis, R. P., Andrade, J. B., & Moreira, F. M. S. (2016). Agronomic and Economic Efficiency of Common-

Bean Inoculation with Rhizobia and Mineral Nitrogen Fertilization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. 40, e0150235.

Storksdieck, S., & Hurrell, R. F. (2009). The impacts of trace elements from plants on human nutrition: A case for biofortification. In G. S. Buñuelos, & Z. Q. Lin (Editores), *Biofortified Agricultural Products*, Florida, CRC Press, Boca Raton.

Teixeira, I. R.; Borém, A.; Silva, A. G. da; & Kikuti, H. (2008). Fontes e doses de zinco no feijoeiro cultivado em diferentes épocas de semeadura. *Acta Scientiarum Agronomy. Maringá*, 30(2), 255-259.

Tran, H. T., Hurley, B. A., & Plaxton, W. C. (2010). Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Science* 179, 14–27. doi:10.1016/j.plantsci.2010.04.005

Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*. 64, 781–805. doi:10.1146/annurev-arplant-050312-120235

Veterink, H. O. (2011). Legumes have a higher root phosphatase activity than other forbs, particularly under low inorganic P and N supply. *Plant Soil* 347, 137–146 doi: 10.1007/s11104-011-0834-7

Watkins-Brandt, K. S., Letelier, R. M., Spitz, Y. H., Church, M. J., Böttjer, D., & White A. E. (2011). Addition of inorganic or organic phosphorus enhances nitrogen and carbon fixation in

the oligotrophic North Pacific. *Marine Ecology Progress Series* 432, 17–29. doi: 10.3354/meps09147

Welch, R. M., & Graham, R. D. (2004). Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* 55, 353-364.

Young, E. G., & Conway, C. F. (1942). On the estimation of allantoin by the rimini-schryver reaction. *The Journal of Biological Chemistry* 142, 839-853.

**Artículo 2: El Zn en la simbiosis de *Bradyrhizobium elkanii* con plantas de soya**

**Artículo con las normas de publicación de la revista: Emirates Journal of Food and Agriculture**



## **El Zn en la simbiosis de *Bradyrhizobium elkanii* con plantas de soya**

Lorena del Carmen Hernández-Nataren, Maria Ligia de Souza Silva<sup>†</sup>, Fatima Maria de Souza Moreira.

Departamento de Ciências del Suelo, Universidad Federal de Lavras.

### **RESUMEN**

La necesidad de abastecer la demanda de alimentos que cubran la seguridad alimentaria aunado a la baja fertilidad de los suelos conlleva a prácticas de biofortificación agrónomica de nutrientes como el Zn, las cuales pueden tener un efecto positivo o negativo en los procesos fisiológicos de las plantas; y más en aquellas que hacen simbiosis con bacterias fijadoras de N<sub>2</sub> que juegan un papel importante en la producción agrícola. Se desarrolló un experimento en condiciones de invernadero con dosis altas de Zn en dos suelos; sendo uno de textura arcillosa (Latosolo Vermelho distroférrico [LVdf]) y otro de textura media (Latosolo Amarelo [LA]) en el cultivo de soya [*Glycine max* (L)] asociado con *Bradyrhizobium elkanii*, de septiembre a noviembre de 2018. La aplicación de Zn promueve el mejor desarrollo del cultivo y con aplicación de 20 mg de Zn dm<sup>-3</sup> en el suelo arcilloso, se promueve la mayor producción de masa seca en la parte aérea, incrementando la masa radicular, la concentración y acumulación de nitrógeno, y en el suelo de textura media la asociación *B. elkanii*-leguminosa respondió mejor a las dosis de 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, las concentraciones de Ca, Mg, P, disminuyeron conforme el incremento de las dosis de Zn promovida por la interacción antagónica, pero manteniendo sus concentraciones en los rangos adecuados para el cultivo.

**Palabras claves.** *Fijación biológica de Nitrógeno, Latosolo, suelo*

## INTRODUCCION

La deficiencia de Zn es uno de los principales problemas de salud en niños y mujeres de los países subdesarrollados. Por lo que se han desarrollado diferentes métodos para superar la desnutrición, y aumentar la disponibilidad del Zn en alimentos destinados para los seres humanos siendo la biofortificación la técnica más impactante, conveniente, sostenible y aceptable (Maqbool y Beshir, 2018). La biofortificación agronómica es el proceso de incrementar la concentración de un elemento esencial en partes comestibles de plantas, vía fertilización (Sida-Arreola et al., 2017) foliar o edáfica (Guillén-Molina et al., 2016), mejorando la calidad nutricional de la planta sin modificarla genéticamente (Storksdieck y Hurrell, 2009).

Algunas leguminosas además de ser usadas en las prácticas de biofortificación agronómica (Zou et al. 2014), proporcionan beneficios como el enriquecimiento de las reservas de nitrógeno del suelo (Oldroyd et al., 2011). La soya [*Glycine max* (L.) Merr.] es uno de los cultivos más cultivados en todo el mundo con más de 123 millones de hectáreas con producción superior a 352 millones de toneladas en 2017. Siendo los países de Estados Unidos, Brasil, Argentina, China e India los países con mayor producción (FAO 2019). A medida que aumenta la producción de soya, existe una creciente preocupación acerca de cómo la nutrición del suelo afecta el rendimiento (Alloway, 2008), siendo que en muchas partes del mundo, los suelos deficientes o tóxicos en nutrientes pueden producir con menos rendimientos de los cultivos que lo esperado y dar como resultado productos alimenticios que afectan la nutrición humana (Cakmak 2017).

Entre una de las principales limitantes de los cultivos se encuentran la baja fertilidad, deficiencias de micronutrientes, así como la acidez natural de los suelos (Hungria, 2003, Fageria y Stone 2004) por lo que los cultivos con fines alimenticios presentan concentraciones insuficientes para satisfacer la ingesta humana, reflejándose en la deficiencia de Zn en los seres humanos (Alloway, 2004) constituyendo un problema de salud pública (Welch y Graham,

2004). En Brasil una de las limitantes en la producción de soya es la baja fertilidad natural de los suelos, asociada a las prácticas de encalado, para aumentar el pH del suelo, que implica la reducción de la disponibilidad de micronutrientes en la solución del suelo (Lacerda et al., 2017). Entre los macronutrientes limitantes para el crecimiento de las plantas se encuentra el nitrógeno (N) y sus deficiencias conducen a graves efectos negativos en el metabolismo y el desarrollo de las plantas. El éxito del manejo de nutrientes es maximizar la productividad del cultivo mientras se minimizan los impactos ambientales. Las prácticas de manejo de nutrientes balanceadas y reguladas en el tiempo contribuyen a un crecimiento sostenido del rendimiento y la calidad, influenciando en la salud de las plantas y reduciendo los riesgos ambientales (Hellal, et al. 2013).

Entre las leguminosas fijadoras de nitrógeno destacan la soya que fija un 60% del promedio de la absorción total del nitrógeno (Santachiara et al., 2018). En Brasil, esta planta fabácea es cada vez más económicamente viable debido a la inoculación con cepas de *Bradyrhizobium* y la coinoculación con *Azospirillum* (Hungria, Nogueira y Araujo, 2013). Siendo indispensable el uso de bacterias fijadoras de nitrógeno para el cultivo de soya en los campos brasileños (Hungria y Mendes, 2015) lo que ha permitido altos rendimientos de grano, dispensando el uso de nitrógeno mineral (Alves, Bodey y Urquiaga, 2003). El número y tamaño de los nódulos, contenido de leghemoglobina y la cantidad de N fijado dependen de la disponibilidad de Zn (Demeterio et al., 1972), probablemente porque el Zn está involucrado en la biosíntesis de leghemoglobina y la síntesis de sacarosa. Actualmente sigue siendo poca la información disponible sobre el papel específico de Zn en la Fijación Simbiótica de N<sub>2</sub> (FSN) (Kryvoruchko 2017), la cual es promovida mediante un suministro adecuado de este micronutriente (O'Hara, 2001), siendo que la fertilización con altas dosis de Zn pueden tener efectos en la fijación biológica de nitrógeno y contenidos nutrimentales de las plantas, ya que el Zn participa en la homeostasis fisiológica y nutricional de la planta, necesario para la

producción de triptófano que está involucrado en el metabolismo del nitrógeno (Malavolta, 2006). Por lo tanto, el objetivo de esta investigación evaluar el efecto de dosis altas de Zn en la fijación biológica de nitrógeno en el cultivo de soya en dos tipos de suelos,

### **Materiales y métodos.**

Se realizó un experimento en condiciones de invernadero en la Universidad Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil, durante los meses de septiembre hasta noviembre de 2018 comprendiendo el período de siembra hasta inicio de la floración, totalizando 38 días. La unidad experimental fue constituida por macetas de plástico de tres litros llenadas con suelo Latossolo Vermelho Distroférico (LVdf) y Latossolo Amarelo (LA) de textura arcillosa y textura media respectivamente (Cuadro 1), de acuerdo con el Sistema Brasileño de Clasificación de Suelos, provenientes de los municipios de Lavras e Itumirim, Minas Gerais colectados a una profundidad de 0-20 cm, a los cuales se les realizó la corrección de la acidez del suelo previo a la siembra, buscando elevar la saturación de bases a 70% con la aplicación de  $\text{CaCO}_3$  marca Synth y  $\text{MgCO}_3$  marca nuclear grado analítico. Manteniéndolo a humedad controlada del 60% del volumen total de poros (VTP durante 10 días).

Posterior a la incubación se llevó a cabo la fertilización básica con la aplicación de 200  $\text{mg dm}^{-3}$  de P en la forma de súper fosfato triple y 45  $\text{mg dm}^{-3}$  de S en la forma de yeso en el momento de la siembra, así como 300  $\text{mg dm}^{-3}$  de N en el tratamiento control + N mineral y 150  $\text{mg dm}^{-3}$  de K en todos los tratamientos divididas en tres aplicaciones. Además fueron colocados los micronutrientes en concentraciones de 0.1; 0.2; 5; 0.5  $\text{mg dm}^{-3}$  de Co, Mo, Mn, y Cu respectivamente conforme las recomendaciones de Malavolta et al. (1997). En cada unidad experimental se colocaron cinco semillas de soya de la variedad 5917 e inoculado con *Bradyrhizobium elkanii* cepa Br 29, aprobada por el ministerio de agricultura pecuaria y abastecimiento (MAPA).

El experimento se estableció en un diseño experimental de bloques completamente al azar; con cinco tratamientos más el uso de dos controles, con tres repeticiones totalizando 42 unidades experimentales, usando como factor de bloqueo el tipo de suelo. El diseño de los tratamientos fue T1 (control), T2 (Control + 300 mg dm<sup>-3</sup> de N mineral), T3 (inoculante), T4 (inoculante + 5 mg dm<sup>-3</sup> de Zn) T5 (inoculante + 10 mg dm<sup>-3</sup> de Zn), T6 (inoculante + 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn) y T7 (inoculante + 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn).

Durante el desarrollo del experimento fueron realizados los tratamientos fitosanitarios requeridos por el cultivo así como la adición de agua destilada para controlar la humedad demandada por las plantas.

#### Muestreo del material vegetal

En la etapa R1 (38 días después de la germinación) cuando el 50% de las plantas presentaron por lo menos una flor, se realizó la medición de la clorofila (índice SPAD) en el tercer trifolio desarrollado, y el muestreo de toda la planta que se dividió en parte aérea y raíces. Cada una de las partes fue lavada con agua destilada y secadas a 65°C por 72 horas en una estufa de circulación forzada de aire, marca FANEM modelo 320-SE. Se analizó el contenido de la masa seca de la raíz (MSR), masa seca de la parte aérea (MSPA), abundancia relativa de ureidos (ARU) establecido por Young & Conway, (1942); la actividad de la fosfatasa ácida (AFA) *in vivo* según los procedimientos descritos por Besford (1980) e Elliot & Lauchi (1986); concentración (N) y nitrógeno acumulado (Nac) por la planta con el método Kjeldahl, así como el número de nódulos (NN) los cuales fueron secados en una estufa marca FANEM modelo 315 SE a 45°C, durante 72 horas para estimar la masa seca de nódulos (MSN). También se realizó el análisis nutrimental de las plantas para lo cual se determinaron las concentraciones de P, Ca, Mg, Zn mediante digestión con mezcla nítrico-perclórica y espectrofotometría de absorción atómica con un equipo marca Perkin Elmer modelo AAnalyst 400 (Malavolta, 1997).

*Cuadro 1. Propiedades físicas y químicas de las muestras de suelo (0.00-0.20 m de profundidad), clase textural y clasificación de suelos.*

Propiedad	Sitio		
	UFLA	Itumirim	
pH (H <sub>2</sub> O)	5.00	4.90	
K	(Mehlich 1)	16.11	26.00
P	mg/dm <sup>3</sup>	0.61	0.28
Ca <sup>2+</sup>		0.31	0.30
Mg <sup>2+</sup>		0.10	0.10
Al <sup>3+</sup>		0.04	0.30
H + Al	(cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	1.84	2.08
SB		0.45	0.47
t		0.49	0.77
T		2.29	2.55
m		8.16	38.96
V	%	19.71	18.30
MO	dag/kg	0.65	0.54
P-rem	mg/L	5.58	17.36
Zn		0.62	1.37
Fe		30.54	12.03
Mn		5.38	1.26
Cu	mg/dm <sup>3</sup>	0.86	0.61
B		0.01	0.24
S		2.49	7.03
Arcilla		62	32
Limo	dag/kg	7	2
Arena		31	66
Clasificación textural		Arcilloso	Textura media
Clasificación de suelo		LVdf	LA

## Análisis estadístico

Se realizaron pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza para cada variable usada. En caso de efecto significativo al 10% de probabilidad, se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Scotto-Knott, así como modelos de regresión cuando fueran necesarios, con el programa SISVAR.

## RESULTADOS

En el cuadro 2 se observa que las variables relacionadas con la FBN, así como la nutrimentales presentan diferencias estadísticas significativas ( $P \leq 0.1$ ) con la aplicación de dosis de Zn en ambos suelos.

Cuadro 2. ANOVA del efecto de la fertilización con Zn en la FBN en el cultivo de soya.

	NN	MSN	MSPA	MSR	ARU	AFA	SPAD	Nac	N	P	Ca	Mg	Zn
	<b>LVdf</b>												
CV	NS	††	†	†	†	NS	†	††	††	†	††	†	††
(%)	13.99	10.68	4.23	5.38	30.25	12.42	8.46	6.39	5.86	15.85	0.91	3.61	14.40
	<b>LA</b>												
CV	††	†	†	††	NS	†	NS	†	NS	††	††	†	†
(%)	8.89	5.79	2.52	7	23.49	17.44	3.51	3.53	3.81	2.95	0.91	2.60	13.81

† Significativo ( $P \leq 0.1$ ), †† Significativo ( $P \leq 0.05$ ), NS: no significativo, Scott-Knott. LVdf (Latosolo vermelho distroferico); LA (Latosolo amarelo); NN (Número de nódulos), MSN (Masa seca de nódulos), MSPA (Masa seca de la parte aérea), MSR (masa de la raíz), ARU (Abundancia Relativa de Ureidos), AFA (Actividad de la fosfatasa ácida), Nac (Nitrógeno acumulado), N (Nitrógeno), P (Fósforo), Ca (Calcio), Mg (Magnesio), Zn (Zinc).

En el cuadro 3, se observa que la nodulación de las plantas en los tratamientos inoculados, superaron a los tratamientos controles (control, control + N) en ambos suelos; destacando que la fertilización con Zn presentó diferencias estadísticas, y promovió el incremento de la nodulación en el suelo LA, siendo mayor la nodulación en el tratamiento con presencia de  $20 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn con 252 nódulos/macetas que representa un incremento del

43.18 % con respecto al tratamiento 1 (inoculado) que presentó 176 nódulos/maceta; a diferencia del suelo LVdf que no presentó efecto por la presencia de Zn. La MSN se presentó en un rango de 0.422 a 0.646 g/maceta, en el suelo LVdf siendo menor en el tratamiento con 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn con una producción de 6.68 g/maceta que representa una disminución del 23.8% con respecto al tratamiento 1 (inoculado); a diferencia de este, el suelo de textura media presentó la mayor MSN que el suelo LVdf presentándose en rangos de 0.78 a 0.92 g/maceta siendo mayor la producción en los tratamientos con las dosis de Zn de 20 y 40 mg dm<sup>-3</sup>, con producción de 0.92 y 0.87 g/maceta que representa un incremento del 15 y 8.7% respectivamente.

Por su parte la producción de MSR en ambos suelos, al comparar el control + N con los demás tratamientos, este presentó la mayor la producción en ambos suelos; en el suelo arcilloso la mayor producción de MSR fue de 2.14 g/maceta en la presencia de 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn incremento del 10.3% con respecto al tratamiento 1 (Cuadro 3). Ya para el suelo de textura media la mayor producción de MSR se presentó (2.34 - 2.37 g/maceta) en los tratamientos con las dosis más altas de Zn (20 y 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn), incrementos que representan el 22.5 y 24% con respecto al tratamiento 1 (inoculado).

La producción de ureidos por las plantas, presentó diferencias estadísticas ( $P \leq 0.1$ ) en el suelo LVdf, siendo menor la ARU en el tratamiento inoculado sin la presencia de Zn, a diferencia del suelo de textura media que el aumento de ARU por la presencia de Zn no presentó diferencias estadísticas significativas (Cuadro 3). En el mismo cuadro se observa que la actividad de la enzima fosfatasa ácida, en las plantas cultivadas en el suelo arcilloso no presentó diferencias estadísticas entre tratamientos a diferencia del suelo LA que la presencia de Zn afectó la actividad enzimática en el tratamiento con 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, con una disminución del 40.6% con respecto al tratamiento 1 (inoculado) representado por la actividad de 28.19  $\mu\text{M pNNP min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{MF}$ .



En el mismo cuadro se observa que la fertilización con Zn afectó negativamente las concentraciones foliares de P, Ca y Mg, las cuales se vieron disminuidas por los incrementos de Zn en el suelo. La menor concentración de P se presentó en el tratamiento con  $40 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn ( $0.99 \text{ g kg}^{-1}$ ) en suelo arcilloso y  $2.49 \text{ g kg}^{-1}$  en el suelo LA, que representa una disminución del 39.3 y 18.9 % con respecto al tratamiento 1 (inoculado) respectivamente. Lo mismo aconteció con las concentraciones foliares de Ca y Mg presentando una disminución del 11.9 y 9.8 % para el calcio en el suelo LVdf y La respectivamente y de 10.5 y 8.1 % para el Mg en el tratamiento con  $40 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn, con respecto a su tratamiento 1 (inoculado) respectivamente en ambos suelos.

La absorción de Zn por la planta (Cuadro 3) se incrementó conforme el aumento de la dosis de Zn aplicada, presentando una concentración en el tejido vegetal en un rango de 18.14–118.22  $\text{mg kg}^{-1}$  en el suelo LVdf y de 27.31–107.48  $\text{mg kg}^{-1}$  en el suelo de textura media, que representa un incremento del 551 y 296 % con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn en cada suelo respectivamente.

Cuadro 3. Comparación de medias  $\pm$  desviación estándar (n=3) de los efectos de la fertilización con Zn en el cultivo de soja

Trat.	NN	MSN	MSR	ARU	AFA	P	Ca	Mg	Zn
	#/maceta	g/maceta		%	$\mu\text{M pNNP}$ $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{MF}$		$\text{g kg}^{-1}$		$\text{mg kg}^{-1}$
<b>LVdf</b>									
Control	41	0.42	2.23	25.91	53.20	2.14	14.01	2.6	16.97
Control + N	22	0.01	4.24	20.11	51.26	2.42	14.06	2.43	17.71
Inoculante	191 $\pm$ 2.64 a	0.55 $\pm$ 0.12 a	1.94 $\pm$ 0.02 b	25.56 $\pm$ 1.62 b	54.41 $\pm$ 4.06 a	1.63 $\pm$ 0.37 a	15.35 $\pm$ 0.09 a	2.77 $\pm$ 0.20 a	18.14 $\pm$ 0.72 e
Inoc.+5 mg dm <sup>-3</sup> Zn	211 $\pm$ 55.0 a	0.57 $\pm$ 0.01 a	1.80 $\pm$ 0.14 b	51.71 $\pm$ 22.21 a	54.15 $\pm$ 2.13 a	1.2 $\pm$ 0.16b	14.76 $\pm$ 0.06 b	2.54 $\pm$ 0.03 b	40.78 $\pm$ 5.13 d
Inoc.+10 mg dm <sup>-3</sup> Zn	192 $\pm$ 2.0 a	0.52 $\pm$ 0.02 a	1.81 $\pm$ 0.06 b	28.40 $\pm$ 2.45 b	45.15 $\pm$ 7.64 a	1.09 $\pm$ 0.06 b	14.38 $\pm$ 0.08 c	2.53 $\pm$ 0.04 b	57.88 $\pm$ 3.12 c
Inoc.+20 mg dm <sup>-3</sup> Zn	221 $\pm$ 7.81 a	0.65 $\pm$ 0.03 a	2.14 $\pm$ 0.13 a	66.65 $\pm$ 15.01 a	59.15 $\pm$ 10.70 a	1.12 $\pm$ 0.09 b	13.93 $\pm$ 0.03 d	2.52 $\pm$ 0.03 b	76.88 $\pm$ 6.64 b
Inoc.+40 mg dm <sup>-3</sup> Zn	155 $\pm$ 24.42 a	0.42 $\pm$ 0.04 b	1.84 $\pm$ 0.12 b	51.06 $\pm$ 12.40 a	61.12 $\pm$ 6.14 a	0.99 $\pm$ 0.10 b	13.52 $\pm$ 0.26 e	2.48 $\pm$ 0.02 b	118.22 $\pm$ 8.75 a
<b>LA</b>									
Control	24	0.17	2.38	37.00	35.26	3.12	13.76	2.96	19.43
Control + N	1	0.00	3.07	31.89	50.00	3.11	15.36	2.76	27.01
Inoculante	176 $\pm$ 15.01 c	0.80 $\pm$ 0.02 b	1.91 $\pm$ 0.02 b	29.52 $\pm$ 4.64 a	47.51 $\pm$ 8.40 a	3.07 $\pm$ 0.18 a	14.81 $\pm$ 0.38 a	3.09 $\pm$ 0.18 a	27.31 $\pm$ 1.90 e
Inoc.+5 mg dm <sup>-3</sup> Zn	182 $\pm$ 26.06 c	0.78 $\pm$ 0.04 b	1.79 $\pm$ 0.16 b	54.64 $\pm$ 16.78 a	58.31 $\pm$ 8.39 a	2.93 $\pm$ 0.21 a	14.62 $\pm$ 0.23 a	2.96 $\pm$ 0.02 a	42.1 $\pm$ 4.97 d
Inoc.+10 mg dm <sup>-3</sup> Zn	225 $\pm$ 22.8 b	0.82 $\pm$ 0.01 b	1.77 $\pm$ 0.09 b	44.27 $\pm$ 11.19 a	54.25 $\pm$ 8.47 a	2.72 $\pm$ 0.06 b	14.48 $\pm$ 0.39 a	2.89 $\pm$ 0.02 b	70.05 $\pm$ 3.62 c
Inoc.+20 mg dm <sup>-3</sup> Zn	252 $\pm$ 17.56 a	0.92 $\pm$ 0.01 a	2.34 $\pm$ 0.11 a	42.69 $\pm$ 2.21 a	59.03 $\pm$ 12.00 a	2.7 $\pm$ 0.05 b	14.06 $\pm$ 0.05 b	2.87 $\pm$ 0.01 b	84.92 $\pm$ 4.61 b
Inoc.+40 mg dm <sup>-3</sup> Zn	219 $\pm$ 7.37 b	0.87 $\pm$ 0.10 a	2.37 $\pm$ 0.24 a	41.55 $\pm$ 8.08 a	28.19 $\pm$ 3.93 b	2.49 $\pm$ 0.11 c	13.36 $\pm$ 0.02 c	2.84 $\pm$ 0.02 b	107.48 $\pm$ 2.65 a

Letras diferente en la columna indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos por la prueba de Scott-Knott ( $P \leq 0.1$ ). LVdf (Latossolo vermelho distroferico); LA (Latossolo amarelo); NN (Número de nódulos); MSN (masa seca de nódulos); MSR (masa seca de la raíz); ARU (abundancia relativa de ureidos); AFA (actividad de la fosfatasa ácida), P, Ca, Mg y Zn.

Por su parte en la figura 1 se observa que conforme aumenta la dosis de Zn aplicada vía fertilización en el suelo de textura media, la concentración de N en el tejido vegetal de la parte aérea de la planta presenta un efecto cuadrático, aumentando conforme aumenta la fertilización, siendo mayor tal concentración en el tratamiento con  $20 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn que representa un incremento del 24% con respecto al tratamiento 1 (inoculado). En la misma figura se observa que contenido de clorofila determinada por el índice SPAD, se ve afectado negativamente conforme el aumento de las dosis de Zn aplicadas, observándose que el tratamiento con  $40 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn presentó el menor índice SPAD siendo de 24.46 que representa una disminución del 16.4% con respecto al tratamiento 1 (inoculado).

La acumulación de nitrógeno por las plantas inoculadas con *B. elkanii*, presentó un efecto cuadrático, siendo de  $69.57 \text{ g/planta}$  en el tratamiento con  $20 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn con un incremento del 36.73% con respecto al tratamiento 1 (inoculado), ya para la dosis máxima de Zn aplicada el acumulo fue de  $57.43 \text{ g/planta}$  representado un incremento tan solo del 12.87 % (Figura 1). La producción de MSPA se presentó de forma cuadrática por la presencia de Zn, en un rango de  $6.41\text{-}7.28 \text{ g/maceta}$ , observándose que el tratamiento con  $20 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn presentó la mayor producción de MSPA representada por un incremento del 9.97 % con respecto al tratamiento inoculado sin fertilización con Zn (Figura 1)

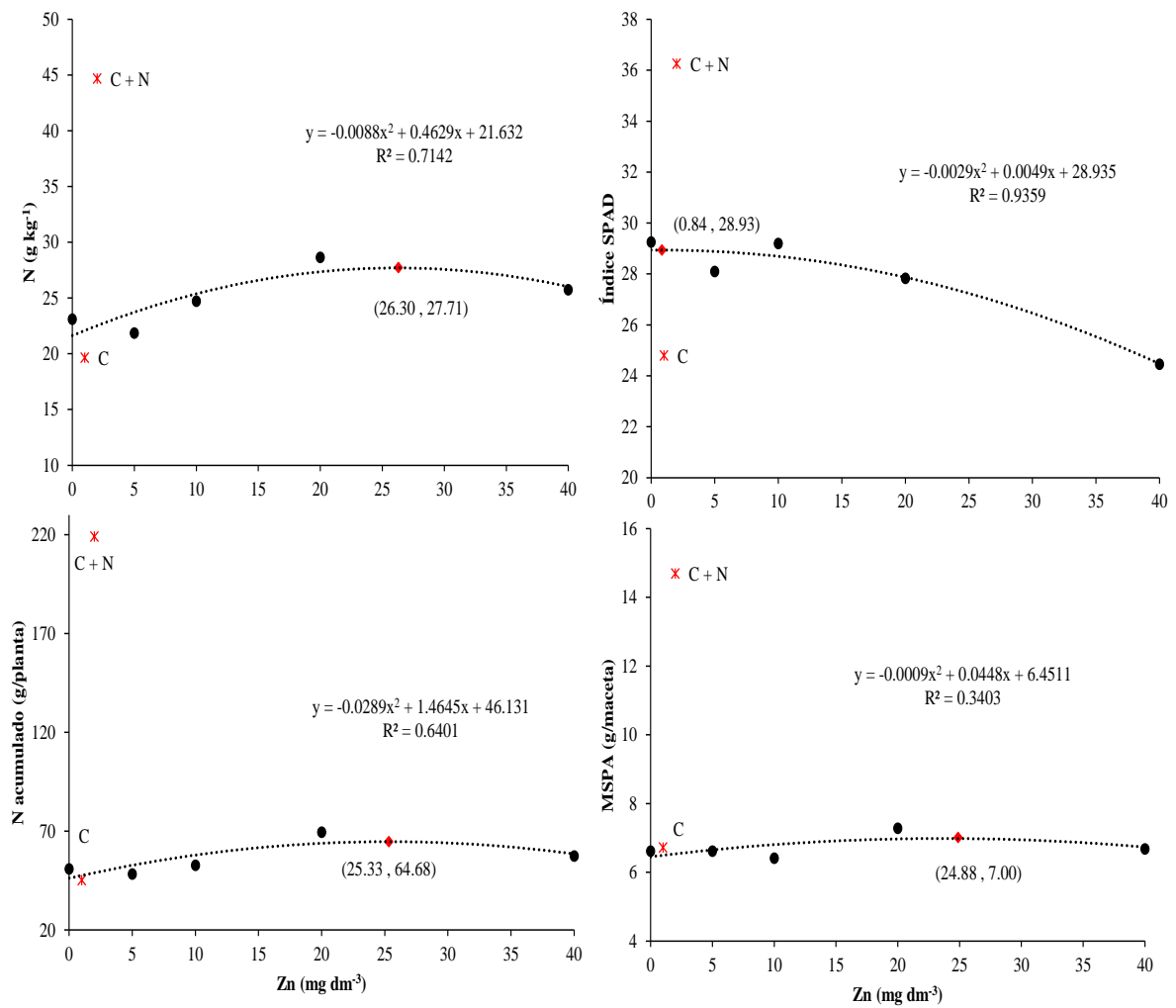


Figura 1. Efecto de la aplicación de Zn en la concentración de N, clorofila, nitrógeno acumulado y masa seca de la parte aérea en plantas cultivadas en el suelo LVdf.

El efecto de la fertilización con Zn en las concentraciones de N en la parte aérea de las plantas cultivadas en el suelo LA, presentó un efecto cuadrático observándose que conforme el aumento de las dosis de Zn aplicadas, las concentraciones de N también son incrementadas, siendo que con la aplicación de 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn se presentó la mayor concentración siendo de 29.06 g kg<sup>-1</sup>. En la figura 2 se observa que el índice SPAD presentó un efecto cuadrático siendo que en el tratamiento con 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn se presentó el mayor índice SPAD siendo de 31.36, disminuyendo en la mayor dosis de Zn aplicada.

La acumulación de nitrógeno por las plantas inoculadas con *B. elkanii* Br 29 y la presencia de Zn, presentó un efecto lineal, aumentando el N acumulado conforme las dosis aplicadas, presentando la mayor acumulación en el tratamiento con 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn siendo de 96.96 g/planta representando un aumento del 15.76 % con respecto al tratamiento 1 (inoculado). La producción de MSPA presentó un efecto cuadrático positivo, incrementándose conforme las dosis de Zn aplicadas, siendo mayor en el tratamiento con 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn con una producción de 10.31 g/maceta (Figura 2) que representa un incremento del 11.1 % con respecto al tratamiento 1 (inoculado)

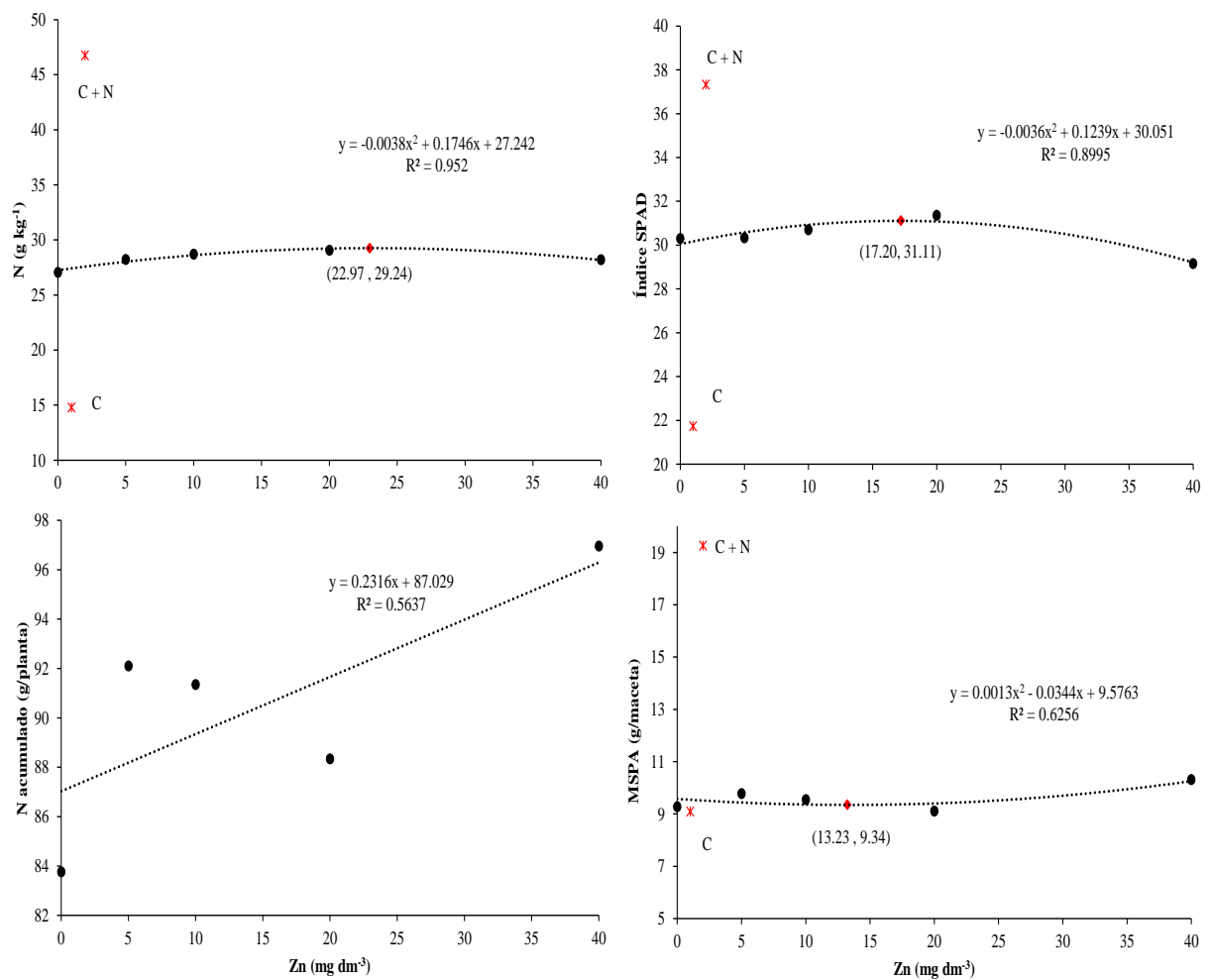


Figura 2.- Efecto de la aplicación de Zn en la concentración de N, clorofila, nitrógeno acumulado y masa seca de la parte aérea en plantas cultivadas en el suelo LA

## DISCUSION

La nodulación por parte del cultivo en el suelo de textura media se vio favorecida por la inoculación de *Bradyrhizobium elkanii* Br 29 así como por la fertilización con Zn, oscilando en rangos de 176 – 252 nódulos maceta (Cuadro 3), siendo mayor en el tratamiento con 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn con un incremento del 43.2 % con respecto al tratamiento 1 (inoculado). Por su parte Singh et al. (2017) reportan incrementos en el número de nódulos en soya con aplicación de 30 kg ha<sup>-1</sup> de Zn dosis menor a la encontrada en este trabajo (20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn equivalente a 40 kg Zn ha<sup>-1</sup>). Estudios como los de Dashti et al. (2000), Viera-Neto et al. (2008), Pedrozo et al. (2018) con *Bradyrhizobium* reportan incremento en la nodulación de plantas de soya (*Glycine max* L. Merr.). Tal aumento en la nodulación en los tratamiento con presencia de Zn, puede deberse a que se ha reportado que diferentes cepas de *Bradyrhizobium* han presentado tolerancia a concentraciones de 600 mg L<sup>-1</sup> de Zn (Matsuda et al., 2002).

La ausencia de nódulos en los tratamientos controles con presencia de N mineral, está asociado al efecto negativo por la presencia de N suplido a la planta, al hecho de que el N mineral (nitrato y amonio) es un potente inhibidor de la formación de nódulos y la fijación de N<sub>2</sub> (Ayisis et al., 2000, Mbahi et al., 2017).

La presencia de Zn favoreció el incremento de la masa nodular en ambos tipos de suelo, observándose (Cuadro 3) que con la aplicación de 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn en el suelo LVdf se disminuye en un 23.8% la MSN (0.42 g/maceta), caso contrario en el suelo de textura media en el cual, la mayor nodulación y MSN se presentó en el tratamiento con 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn aplicado. Tal incremento de la MSN representa un aumento del 15% con respecto al tratamiento 1 (inoculado), debido a que el Zn es esencial en la morfogénesis temprana de los nódulos controlada por las auxinas (Ferguson y Mathesius, 2014) y basada en el correcto funcionamiento apical del nódulo (Łotocka et al., 2012; Franssen et al., 2015). Demeterio et al. (1972) reportan que la deficiencia de Zn en los nódulos, afecta la masa nodular y FBN. Autores

como Viera-Neto et al. (2008), Pedrozo et al. (2018) reportan incrementos en la masa nodular con el uso de inoculante con *Bradyrhizobium* en soya. Seyed (2016) recomienda la inoculación de rizobacterias promotoras de crecimiento + la aplicación de ZnO para la producción de soya.

En cuanto a la producción de MSPA, la fertilización con Zn permitió incrementos cuadráticos en el suelo LVdf del 9.9 % en la producción, siendo mayor en la presencia de 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, llegando a producir 7.28 g planta; a diferencia del suelo LA que la mayor producción se presentó en el tratamiento con 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn con una producción de 10.33 g/maceta que representa un incremento del 11.1%. Tal producción de biomasa puede estar relacionada con el efecto benéfico del Zn en la síntesis de auxinas y del triptófano precursor del ácido indolacético (AIA); compuesto que regula la tasa de crecimiento y desarrollo de las plantas (Ahmad et al., 2013). Autores como Fageria (2000) reporta incrementos de la MSPA con aplicación de 10 mg dm<sup>-3</sup> Zn. Nuestros resultados encontrados en el suelo LVdf, concuerdan con lo reportado por Moreira et al. (2016). Por su parte autores como Ghasemian et al. (2010) y Sing et al. (2017) reportan incrementos en la biomasa aérea con aplicación de 40 kg ha<sup>-1</sup> de Zn.

La producción de biomasa de la raíz, osciló entre 1.80–2.14 y 1.77–2.37 g/maceta en los suelos LVdf y LA respectivamente, observándose que la presencia de 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn en el suelo LVdf incrementa en un 10.3% (2.14 g/maceta) y en de textura media la mayor producción de raíz fue de 2.37 g/maceta que representa un incremento del 24.1%. Autores como Ghasemian et al. (2010), Noulas et al. (2018) mencionan que la deficiencia de Zinc afecta significativamente al sistema radicular, incluido el desarrollo de las raíces.

Los ureidos comprenden hasta el 90% del total de N transportado en el xilema de leguminosas tropicales fijadoras de N<sub>2</sub> (Tood et al 2006). En este trabajo la producción de ureidos por los tratamientos inoculados presentaron la mayor exportación de N en forma de ureidos, determinados por la nodulación dado que hay una estrecha relación entre el NN y la

producción de ureidos en los tratamientos inoculados usados en este trabajo, teniendo; que la producción de ARU presentó efecto significativo por la presencia de Zn en el suelo LVdf que osciló entre 25.5-66.65 %, destacando el tratamiento con 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn el que presentó la mayor ARU mostrando un incremento de 160.8% respecto al tratamiento 1 (inoculado). La forma de transporte del N de los nódulos hacia los brotes en las leguminosas tropicales como la soya es en forma de alantoína y ácido alantoico (Atkins y Smith, 2007; Collier y Tageder, 2012). Díaz-Leal et al. (2012) reportan aumento en la concentración de ureidos durante el desarrollo de las plantas. Por su parte Hungria et al. (1991) reportan aumento en la síntesis de ureidos a partir de los 18 días después de la siembra. McClure et al. (1980) observaron que el transporte de ureidos vía xilema en soya está relacionado con la fijación biológica de nitrógeno, así mismo Takahashi et al. (1992) encontraron valores del 74% de la proporción de N<sub>2</sub> fijado vía ureidos en el cultivo de soya.

Amarante et al. (2006) reportaron que la principal forma de transporte de N en soya, frijol caupí y frijol es vía ureidos mientras que en plantas no transportadoras de ureidos la principal forma es de aminoácidos y nitratos. Por su parte Agoyi et al. (2017) con el método de ureidos estimaron valores superiores al 71% del nitrógeno derivado de la fijación biológica, y mencionan que la efectividad de los nódulos pueden ser un buen predictor de la fijación biológica de nitrógeno.

La actividad de la fosfatasa ácida en el suelo LA, presentó una disminución del 40.7% respecto al tratamiento 1 (inoculado) en el tratamiento con 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, mismo tratamiento que presentó la menor concentración de P en tejido vegetal. La actividad de esta enzima tiene una relación con las concentraciones de P y Zn en la planta, siendo que se ha reportado efecto de antagonismo entre el Zn y el P (Malavolta, 2004) y que plantas que crecen en deficiencia de P presentan mayor actividad enzimática para la adquisición del nutriente (Tran et al. 2010).



Las fosfatasas ácidas en plantas actúan como productores de fosfato, movilizándose mayormente durante el crecimiento o bajo condiciones de estrés como sequía o carencia de fosfato (Duff et al 1994; Bozzo et al 2002), ayudando en el mantenimiento del reservorio energético requerido para los procesos metabólicos y regulando la actividad de varios metabolitos. Las fosfatasas ácidas de plantas hidrolizan fosfoésteres y proporcionan fosfato libre, teniendo así un papel crucial en la obtención y reciclaje de fosfato (Li et al., 2002; Bozzo et al., 2006) que es un componente esencial en muchas biomoléculas. También debido a la demanda de P por las plantas noduladoras para el funcionamiento simbiótico, las cuales presentan alta actividad de fosfatasa ácida (FA) (Watkins-Brandt et al. 2011). Por su parte autores como Raposo et al. (2004), Fragoso et al. (2005) reportan alta actividad enzimática en plantas de soya debido a la deficiencia de P.

Las plantas expuestas a iones Zn exhiben una disminución en la actividad fotosintética debido a la alteración de la estructura del cloroplasto, la síntesis impedida de los pigmentos de clorofila, los carotenoides, la interferencia en las actividades de las enzimas relacionadas con el ciclo de Calvin, el transporte de electrones impedido y el cierre de los estomas al restringir la fijación de CO<sub>2</sub> (Singh 2016). El índice SPAD obtenido en este trabajo fue menor en la presencia de 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn en el suelo LVdf, con un disminución del 16.4% con respecto al tratamiento 1 (inoculado) índice que puede estar asociado con las concentraciones de N.

Ghasemian et al. (2010) declara que el Zn es un elemento esencial en la función de la clorofila. Por su parte Medina-Velo et al. (2017) reportan que aplicación de concentraciones mayores a 60 mg kg<sup>-1</sup> de ZnO no presentaron efecto en los contenidos relativos de clorofila (SPAD).

La acumulación y concentración de N en la planta, fueron mayores en el control con N mineral (C+N) hecho que coincide con lo reportado por Rufini et al. (2016) en el cultivo de frijol, y que era de esperarse debido al hecho de la aplicación de N-mineral. Autores como Arf

et al. (2004) afirman que hay una relación en la respuesta de la concentración de N en la parte aérea a diferentes factores del suelo como son los contenidos de N disponible, la temperatura, y el cultivar usado, entre otros.

El contenido de N acumulado se presentó de forma cuadrática siendo mayor cuando se aplicaron 20 y 40 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, que representan incrementos del 36.7 y 15.8% en el suelo LVdf y LA respectivamente, asociado a la mayor producción de MSPA y MSN que se presentó en el mismo tratamiento en cada uno de los suelos usados, y que pueden ser indicativos de la eficiencia de *Bradyrhizobium elkanii* Br 29 en simbiosis con las plantas de soya en la FBN. Autores como Voisin et al. (2003) mencionan que existe una relación entre la fijación de N y el tamaño/biomasa de nódulos. El aumento del contenido y la absorción de N puede deberse a que el zinc juega un papel importante en la síntesis de ADN y ARN y en la movilización de carbohidratos, lípidos y proteínas (Laharia et al. 2015). En el cuadro 3 se observa que en la presencia de 20 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, se obtiene la mayor concentración de N en el suelo LVdf con un incremento del 24.1% con respecto al tratamiento 1 (inoculado). Por su parte Ibrahim y Ramadan (2015) mencionan que las concentraciones de N incrementan con la fertilización de Zn.

En las concentraciones nutrimentales de las plantas se observa el efecto de antagonismo que presenta el Zn con P, Ca y Mg debido a sus mecanismos de absorción (Kabata-Pendias, 2011). Las concentraciones de P en las plantas presentaron disminución conforme el aumento de las concentraciones de Zn en los dos suelos usados (LVdf y LA), observándose que en el suelo LVdf las concentraciones fueron de 0.99–1.63 g kg<sup>-1</sup> de masa seca, valores por debajo de los rangos de suficiencia de 2.5-5.0 g kg<sup>-1</sup> (Raij, 1996) ya para el las concentraciones en las plantas cultivadas en el suelo LA, las concentraciones fueron de 2.49-3.16 g kg<sup>-1</sup>, valores que se encuentran en los rangos considerados adecuados. Moreira et al. (2016) reportan disminución de las concentraciones de P en hojas de soya con el aumento en la fertilización de Zn. Es sabido

que altas dosis de Zn reducen las concentraciones de P en plantas (Reis y Martínez, 2002) debido a: (i) reducción en la translocación de Zn desde las raíces hasta los brotes; (ii) efecto de dilución sobre la concentración de P en los brotes debido al crecimiento de la planta promovido por el Zn; (iii) trastornos metabólicos en las células por el desequilibrio entre Zn y P (Olsen, 1972).

Las concentraciones de Ca se encontraron en un rango de 13.52-15.35 g kg<sup>-1</sup> en el suelo LVdf y de 13.36-14.81 g kg<sup>-1</sup> en el suelo LA, en ambos suelos las concentraciones se encuentran en los rangos de suficiencia de 4-20 g kg<sup>-1</sup>, (Raij, 1996). Destacando que conforme se incrementaron las concentraciones de Zn en la fertilización y por la absorción de la planta, las concentraciones de Ca disminuyeron. Disminución en las concentraciones de P y Ca en variedades de soya por la fertilización con Zn fueron reportados por Canzinella et al. (2018).

Ya para las concentraciones de Mg en la planta, se encontraron en un rango de 2.77-2.48 g kg<sup>-1</sup> en el suelo LVdf y de 3.08-2.84 g kg<sup>-1</sup> en el suelo LA, en ambos suelos se observa que las concentraciones se encuentran en los rangos de suficiencia de 4-20 g kg<sup>-1</sup>, (Raij, 1996). Por su parte Moreira et al (2017) reporta correlación negativa de las concentraciones de Ca y Mg con Zn. Das y Green (2016) afirman que el Zn interactúa de forma antagónica con los nutrientes S, Ca y Mg así como micronutrientes.

Las concentraciones foliares de Zn, en la etapa de floración de la soya en los tratamientos control y tratamiento inoculante + 5 mg dm<sup>-3</sup> de Zn, se encuadran en los rangos de suficiencia de 21-50 (Malavolta, 1997) a excepción del tratamiento con la dosis más alta de Zn en que las concentraciones exceden el límite superior de los rangos de suficiencia establecidos. En hojas de soya las concentraciones consideradas tóxicas son cerca de 140 mg kg<sup>-1</sup> para Zn (Borkert et al., 1998). Ernest (1997) y Mathys (1977) mencionan que el malato puede quelatar el Zn en las vacuolas de las plantas tolerantes, posiblemente por este motivo en este trabajo las plantas no presentaron síntomas visuales de toxicidad. Kulhare et al. (2014) observaron que la

aplicación de 5 kg de Zn aumenta la absorción de zinc ( $63.6 \text{ g ha}^{-1}$ ) en hoja, tal aumento de la absorción de zinc podría reflejarse en aumento del contenido de Zn en grano y paja y una mayor disponibilidad de zinc residual.

## CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta investigación se puede concluir que la fertilización con  $20 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn en el LVdf se tuvo la mejor respuesta de la asociación de *Bradyrhizobium elkanii* Br 29 con el cultivo de soya en la fijación biológica de nitrógeno.

En el suelo LA con la fertilización de  $40 \text{ mg dm}^{-3}$  de Zn se tuvo la mejor respuesta de la asociación de *Bradyrhizobium elkanii* Br 29 con el cultivo de soya en la fijación biológica de nitrógeno.

*Agradecimientos.* Al Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a la Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por el financiamiento y la beca de estudio de posgrado.

## REFERENCIAS

Agoyi, E. E., Afutu, E., Chadare, F. J., Tumuhahirwe, J. B., Chigeza, G., Tukamuhabwa, P. 2017. Ureide essay to assess  $\text{N}_2$ -fixation abilities of soybean (*Glycine Max*) genotypes under different *Bradyrhizobium* Strains. Journal of Crop Science and Biotechnology, 20(2): 65-72

Ahmad, I., Akhtar, Javed, A. M., Naeem, A. H., Khalid, M. 2013. Influence of *Rhizobium* Applied in Combination with Micronutrients on Mung bean. Pakistan Journal of life and Social Sciences, 11(1): 53-59.

Alloway, B. J. 2004. Zinc in soils and crop nutrition. IZA Publications. International Zinc Association, Brussels.

Alloway, B. J. 2008. Zinc in Soils and Crop Nutrition. 2nd ed. Brussels, Belgium and Paris, France: IZA and IFA.

Alves, B. J. R., Boddey, R.M. & Urquiaga, S. 2003. The success of BNF in soybean in Brazil. Plant Soil 252 (1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1023/A-1024191913296>

Amarante, L., Lima, J. D., Sodek, L. 2006. Growth and stress conditions cause similar changes in xylem amino acids for different legume species Environmental and Experimental Botany, 58:123–129.

Arf, O., Rodrigues, R. A. F., Sá, M. E., Buzetti, A., Nascimento, V. 2004. Manejo do solo, água e nitrogênio no cultivo de feijão. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 39 (2): 131-138.

Atkins, C.A. and Smith, P.M. 2007. Translocation in legumes: assimilates, nutrients, and signaling molecules. Plant Physiology, 144: 550–561.

Ayisi, K. K., Nkgapele, R. J., Dakora, F.D. 2000. Nodule formation and function in six varieties of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) grown in a nitrogen-rich field soil in South Africa. *Symbiosis (Rehovot)* 28(1):17–31

Besford, R. T. 1979. Effect of phosphorus supply on acid phosphatase activity in the leaves. *Journal of Science and Food Agriculture*, 30: 275-280.

Borkert, C.M., Cox, F. R., and Tucker, M.R. 1998. Zinc and cooper toxicity in peanut, soybean, rice and corn in soil mixtures. *Communication Soil Science and Plant Analysis*, 29:2991-3005

Bozzo, G.G., Raghothama, K.G. y Plaxton, W.C. 2002. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *European Journal of Biochemistry* 269: 6278-86

Bozzo, G.G., Dunn, E.L. y Plaxton, W.C. 2006. Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant Cell and Environment* 29: 303-13.

Cakmak, I., McLaughlin, M, J., White, P. 2017. Zinc for better crop production and human health. *Plant and Soil* 411: 1-4.

Canizella, B. T.; Sousa, J. A.; Moreira, A.; & Moraes, L. A. C. 2018. Magnesium and zinc interaction in four soybean cultivars with different nutritional requirements, *Journal of Plant Nutrition*, doi: 10.1080/01904167.2018.1485934

Collier, R., Tageder, M. 2012. Soybean ureide transporters play a critical role in nodule development, function and nitrogen export. *The Plant Journal*, 72: 355–367

Das, S., Green, A. 2016. Zinc in Crops and Human Health. *In*: Singh, U.; Praharaj, Singh, S.S.; Singh, N. P eds. *Biofortification of Food Crops* Springer ed. India. doi 10.1007/978-81-322-2716-8\_3

Dashti, N., B. Prithiviraj, R. K. Hynes, and D. L. Smith, 2000: Root and Rhizosphere colonization of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] by plant-growth-promoting Rhizobacteria at low root zone temperatures and under short-season conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 185: 15—22.

Demeterio, J. L., Ellis, R., and Paulsen, G. M. 1972. Nodulation and nitrogen fixation by two soybean varieties as affected by phosphorus and zinc nutrition. *Agronomy Journal*, 64(5): 566.

Díaz-Leal, J. D., Gálvez-Valdivieso, G., Fernández, J., Pineda, M., Alamillo, J. M. 2012. Developmental effects on ureide levels are mediated by tissue-specific regulation on allantoinase in *Phaseolus vulgaris* L, *Journal of Experimental Botany*, 63(11): 4095-4106.

Duff, S. M. G., Sarath, G. y Plaxton, W. C. 1994. The role of acidphosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiologia Plantarum* 90: 791-800

Elliot, G. C., Lauchli A. 1986. Evaluation of an acid phosphatase assay for detection of phosphorus deficiency in leaves of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Nutrition*, 9: 1469-1477.

Ernst W. H. O. 1977. Physiology of heavy metal resistance in plants, Proc. Int. Conf. Heavy Metals in Environ, 94: 121–136.

FAO.2018. FAOSTAT Production. <http://www.fao.org> consultada 27/052019

Fageria, N. K. 2000. Níveis adequados e tóxicos de zinco na produção de arroz, feijão, milho, soya e trigo em solo de cerrado. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 4 (3): 390-395.

Fageria, N. K., Stone, L. F. 2004. Produtividade de feijão no sistema plantio direto com aplicação de calcário e zinco. Pesquisa agropecuaria brasileira, 39(1): 73-78.

Ferguson, B. J., Mathesius, U. 2014. Phytohormone regulation of legume-rhizobia interactions. Journal of Chemical Ecology 40: 770-790.

Fragoso, S., Martínez-Barajas, E., Vázquez-Santana, S., Acosta, J., Coello, P. 2005. Respuesta de la soya (*Glycine max*) a la deficiencia de fósforo. Agrociencia, 39: 303-310. 2005.

Franssen, H. J., Xiao, T. T., Kulikova, O., Wan, X., Bisseling, T., Scheres, B., Heidstra, R. (2015): Root developmental programs shape the *Medicago truncatula* nodule meristem. Development, 142: 2941-2950. doi:10.1242/dev.120774

Ghasemian, V., Ghalavand, A., Soroosh, A. Z., Pirzad, A. 2010. The effect of iron, zinc and manganese on quality and quantity of soybean seed. Journal of Phytology, 2(11): 73-79



Guillen-Molina, M., Márquez, Q. C., De La Cruz, L. E., Velázquez, M. J. R., Soto, P. J. M., García, C. M., Orozco, V. J. A. 2016. Biofortificación de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) con hierro y zinc. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 17:3427-3438.

Hellal, F. A., Abdelhamid, M. T. 2013. Nutrient management practices for enhancing soybean (*Glycine max* L.) production. *Acta biológica Colombiana*, 18(2):239-250.

Hungria, M., Barrdas, C. A. A., Wallsgrove, R. M. 1991. Nitrogen fixation, assimilation and transport during the initial growth stage of *Phaseolus vulgaris* L. *Journal of Experimental Botany*, 42(240): 839-844.

Hungria, M., Campo, R. J., Mendes, C. I. 2003. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 39:88–93. doi 10.1007/s00374-003-0682-6

Hungria, M.; Nogueira, M.A. & Araujo, R.S. 2013. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and fertility of soils*, 49(7): 791-801.

Hungria, M., and Mendes, I. C. 2015. Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis? In: *Biological nitrogen fixation*. pp. 1009-1024. Frans J. de Bruijn, (Eds.). <http://dx.doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>

Ibrahim, E. A., Ramadan, W. A. 2015. Effect of zinc foliar spray alone and combined with humic acid or/and chitosan on growth, nutrient elements content and yield of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants sown at different dates. *Scientia Horticulturae*, 184: 101–105.

Kabata-Pendias, A. 2011. Trace elements in soils and plants. 4ed. Taylor & Francis Group. USA.....<http://dx.doi.org/10.1201/b10158-25>.

Kryvoruchko, I. S. 2017. Zn-use efficiency for optimization of symbiotic nitrogen fixation in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Turkish Journal of Botany*, 41: 423-441.

Kulhare, P.S., Chaudhary, M.K., Uike, Y., Sharma, G.D., Thakur, R.K., 2014. Direct and Residual Effect of Zn alone and incubated with cow dung on growth characters, Zn content, uptake and quality of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]-Wheat (*Triticum aestivum* L.) in a Vertisol. *Soybean Research*, 12(2): 16–21

Lacerda, J. J. J., Lopes L. O., Rambo, T. P., Marafon, G., Silva A. O., Lira, D. N. S., Hickmann, C., Dias, K. L. D., Botton, A. J. 2017. Soybean yield responses to micronutrient fertilizers. In: Kasai, m. Soybean: The basis of yield, biomass and productivity. Intech Open ed. doi: 10.5772/67157

Laharia, G.S., Hadole, S.S., Meena, S.M. and Aage, A.B. 2015. Interactive effect of phosphorus and zinc on nutrient uptake and nutrient use efficiency of soybean. *National Academy of Agricultural Science, (NAAS)* 33:4-6

Li, D.P., Zhu, H.F., Liu, K.F., Liu, X., Leggewie, G., Udvardi, M. y Wang, D. W. 2002. Purple acid Phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *Journal of Biological Chemistry* 277: 27772-81.

Łotocka, B., Kopcińska, J., Skalniak, M. 2012. Review article: The meristem in indeterminate root nodules of Faboideae. *Symbiosis*, 58: 63-72

McClure, P. R., Israel, D. W., Volk, R. J. 1980. Evaluation of the relative Ureide content of xylem sap as an indicator of N<sub>2</sub> fixation in soybeans. *Plant Physiology*, 66: 720-725

Malavolta, E., Vitti, G. C., Oliveira, S. 1997. Avaliação do estado nutricional das plantas. 2 ed. Piracicaba: POTAFÓS.

Malavolta, E. 2004. O fósforo na planta e interações com outros elementos. In: Yamada, T., & Abdalla, S. R. S. (eds) Fósforo na agricultura brasileira. Piracicaba: POTAFOS.

Malavolta, E. 2006. Manual de nutrição de plantas. São Paulo, Ed. Agronômica Ceres

Maqbool M.A., Beshir A. 2019. Zinc biofortification of maize (*Zea mays* L.): Status and challenges. *Plant Breed*, 138: 1–28. <https://doi.org/10.1111/pbr.12658>

Mathys W. 1977. The role of malate, oxalate, and mustard oil glucosides in the evolution of zinc resistance in herbage plants, *Physiology Plant*, 40: 130–136.

Matsuda, A., Moreira, F. M. S., Siqueira, J. O. 2002. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, 37 (3): 343-355.

Mbahi, Ch. G., Dapare, D. F. 2017. Nitrate inhibition of N<sub>2</sub> fixation and its effect on micronutrient accumulation in shoots of soybean (*Glycine max* L. Merr.), Bambara groundnut (*Vigna subterranea* L. Vedic) and Kersting's groundnut (*Macrotyloma geocarpum* Harms.). *Symbiosis*. 75:205–216. doi.org/10.1007/s13199-017-0531-2

McClure, P. R., Israel, D. W., Volk, R. J. 1980. Evaluation of the Relative Ureide Content of Xylem Sap as an Indicator of N<sub>2</sub> Fixation in Soybeans. *Plant Physiology* 66: 720-725.

Medina-Velo, I. A., Dominguez, O. E., Ochoa, L., Barrios, A. A., Hernández-Vezcas, J. A., White, J. C., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L. 2017. Nutritional quality of bean seeds harvested from plants grown in different soils amended with coated and uncoated zinc oxide nanomaterials. *Environmental Science: Nanotechnology* 4: 2336–2347. doi: 10.1039/c7en00495h

Moreira, A., Moraes, L. A. C., Furlan, T., Cerezini, P., and Bruno, I. P. 2016. Interaction of glyphosate with zinc for the yield, photosynthesis, soil fertility and nutritional status of soybean, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 47(6): 706-719, doi:10.1080/00103624.2016.1146747

Moreira, A., Moraes, L. A. C., and Navroski, D. 2017. Lime and Micronutrients Interaction in Soybean Genotypes Adapted to Tropical and Subtropical Conditions, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 48(7): 792-800. doi: 10.1080/00103624.2017.1298790

Noulas, Ch., Tziouvalekas, M., and Karyotis, T. 2018. Zinc in soils, water and food crops. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 49: 252–260.

O’Hara, G. W. 2001. Nutritional constraints on root nodule bacteria affecting symbiotic nitrogen fixation: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41: 417-433.

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., Downie, J. A. 2011. The rules of Engagement in the legume–rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* 45: 119–44. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132549.

Olsen, S. R. 1972. Micronutrient interactions. *In Micronutrients in agriculture*, eds. J. J. Mortvedt, P. M. Giordano, and W. L. Lindsay, 243–264. Madison, USA: SSSA.

Pedrozo, A., Oliverira G. N. J., Alberton O. 2018. Biological nitrogen fixation and agronomic features of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) crop under different doses of inoculant. *Acta Agronomica*, 67 (2): 297-302.

Raij, B. van., Andrade, J. C., Cantarella, H., Quaggio, J. A., Furlani, A. M. C. 1996. *Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo*, 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico e Fundação IAC.

Raposo, R. W. C., Muraoka, T., Basso, L. C., Jr, J. L., Franzini, V. I. 2004. Acid phosphatase activity and leaf phosphorus content in soybean cultivars. *Scientia Agricola*, 61(4): 439-445

Reis, Jr, R. D. A., and H. E. P. Martinez. 2002. Zn addition and Zn and P uptake, translocation and utilization by coffee cultivars. *Scientia Agricola* 59 (3):537–42. doi:10.1590/S0103-90162002000300019

Rufini, M., Ferreira, P. A. A., Soares, B. L., Oliveira, D. P., Andrade, M. J. B., Moreira, F. M. S. 2011. Simbiose de bactérias fixadoras de nitrogênio com feijoeiro-comum em diferentes valores de pH. *Pesquisa agropecuária brasileira*, 46(1): 81-88.

Santachiara, G., Salvagiotti, F., Gerde, J. A., Rotundo, J. L. 2018. Does biological nitrogen fixation modify soybean nitrogen dilution curves?. *Field Crops Research* 223: 171–178.

Seyed, S. R. 2016. Application of biofertilizers and zinc increases yield, nodulation and unsaturated fatty acids of soybean. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103 (3): 251–258 doi 10.13080/z-a.2016.103.032

Sida-Arreola, J. P., Sánchez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Ávila-Quezada, G. D., Flores-Cordova, M. A., Márquez-Quiroz, C., Preciado-Rangel P. 2017. Can biofortification of zinc improve the antioxidant capacity and nutritional quality of beans?. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29(3): 237-241.

Singh, S., Singh, V., and Layek, S. 2017. Influence of sulphur and zinc levels on growth, yield and quality of soybean (*Glycine max* L.). *International Journal of Philosophy and Social Sciences*, 18(2): 1-7.

Storksdieck, S., R. F. Hurrell. 2009. The impacts of trace elements from plants on human nutrition: A case for biofortification. *In*: Buñuelos, G. S and Z. Q. Lin (Ed.), *Biofortified Agricultural Products*, CRC Press, Boca Raton, FLorida.

Takahashi, Y., Chinushi, T., Nakano, T., Ohyama, T. 1992. Evaluation of N<sub>2</sub> fixation and N absorption activity by relative ureide method in field-grown soybean plants with deep placement of coated urea. *Soil Science and Plant Nutrition*, 38(4): 699-708.

Todd, C.D., Tipton, P.A., Blevins, D.G., Piedras, P., Pineda, M., Polacco, J.C. 2006. Update on ureide degradation in legumes. *Journal of Experimental Botany*, 57: 5–12.

Tran, H. T., Hurley, B. A., Plaxton, W. C. 2010. Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Science* (179):14–27.  
doi:10.1016/j.plantsci.2010.04.005

Vieira-Neto, S. A., Pires, F. R., Menezes, C. C. E., Menezes, J. F. S., Silva, A. G., Silva, G. P. and Assis, R. L. 2008. Formas de aplicação de inoculante e seus efeitos sobre a nodulação da soya. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32(2): 861–870. doi.org/10.1590/S0100-06832008000200040

Voisin A.-S., Salon C., Jeudy C., Warembourg F.R. 2003. Symbiotic N<sub>2</sub> fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology, *Journal of Experimental Botany*, 54: 2733–2744.

Watkins-Brandt, K. S., Letelier, R. M., Spitz, Y. H., Church, M. J., Böttjer, D., White A. E. 2011. Addition of inorganic or organic phosphorus enhances nitrogen and carbon fixation in the oligotrophic North Pacific. *Marine Ecology Progress Series* 432:17–29. doi: 10.3354/meps09147

Welch, R. M., Graham, R. D. 2004. Breeding for micronutrients in staple food crops from a human nutrition perspective. *Journal of Experimental Botany* 55: 353-364.

Wessells, K. R., & Brown, K. H. 2012. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting. *PloS one*, 7(11), e50568.

Young, E. G., Conway, C. F. 1942. On the estimation of allantoin by the rimini-schryver reaction. *The Journal of Biological Chemistry*, 142:839-853.

Zou, T., Xu, N., Hu, G., Pang, J., Xu, H. 2014. Biofortification of soybean sprouts with zinc and bioaccessibility of zinc in the sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94: 3053–3060.