

MÉTODO RÁPIDO Y CONFIABLE PARA MEDIR LOS CAMBIOS DE pH DE LA RIZOSFERA DE GENOTIPOS DE FRIJOL Fe-EFICIENTES Y Fe-INEFICIENTES

A FAST AND RELIABLE METHOD FOR MEASURING pH CHANGES AT THE RHIZOSPHERE OF Fe-EFFICIENT AND Fe-INEFFICIENT BEAN GENOTYPES

José Luis Lara Mireles¹ y Emilio Olivares Sáenz²

RESUMEN

La presente investigación se llevó a cabo con el objetivo de evaluar la capacidad para bajar el pH de la rizósfera de cinco genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) Fe-eficientes y Fe-ineficientes sometidos a deficiencia de hierro (Fe). Para su desarrollo, se germinó semillas en tubos de ensaye con solución nutriente (pH de 6.8), agar y un indicador de pH (bromocresol púrpura). Se acomodaron de acuerdo con un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones. Las plántulas de frijol mostraron variabilidad en su capacidad de disminuir el pH de la rizósfera; las variedades de frijol AN-22 y Pinto Mexicano 80 fueron capaces de acidificar la rizósfera hasta valores de 3.0. Las variedades Durango 222 y Lagunero 87 no bajaron el pH de la rizósfera a pH menores de 6.0. La metodología utilizada para detectar los cambios del pH de la rizósfera es adecuada y confiable, por la sensibilidad que mostró el indicador para detectar la acidificación por la actividad de las raíces.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Phaseolus vulgaris L., deficiencia de hierro, acidificación del medio.

SUMMARY

The present research was conducted in order to evaluate five common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes Fe-efficient and Fe-inefficient on their capacity to decrease the pH of the rhizosphere when subjected to Fe-stress. Seeds were germinated in glass test tubes with nutrient solution (pH of 6.8), agar and a pH indicator (bromocresol purple). A completely random design with six replications was utilized. Bean genotypes showed variation in their capacity to decrease the pH of the rhizosphere, AN-22 and Pinto Mexicano 80 were capable of decreasing the rhizosphere pH as low as 3.0; while Durango 222 and Lagunero 87 did not decrease the rhizosphere pH below 6.0. The methodology used to measure rhizosphere pH was suitable to detect differences among bean genotypes in their capacity to decrease rhizosphere pH.

ADDITIONAL INDEX WORDS

Phaseolus vulgaris L., iron deficiency, medium acidification.

INTRODUCCIÓN

Los desordenes nutricionales de los cultivos asociados con los microelementos, han adquirido importancia a la par con el desarrollo y difusión de nuevas variedades de alto rendimiento. De las deficiencias por micronutrientes, la clorosis por la deficiencia de hierro (Fe), ha sido reconocida y aceptada desde 1844, y sigue siendo la deficiencia nutrimental más investigada en plantas; en la actualidad se ha reconocido que es la deficiencia más difícil de comprender y corregir (Loué, 1988).

¹ Facultad de Agronomía. UASLP. Carretera San Luis potosí-Matehuala, km. 14.5, San Luis Potosí, S.L.P. Tel. y Fax: 01(48) 31-2045.

² Facultad de Agronomía UANL. Carretera Zuazua-Marín km. 17.5, Marín, N.L. Tel. y Fax: 01(824) 8-0101

Prácticamente todos los suelos del mundo tienen cantidades suficientes de hierro, aunque no todas las formas del ion son asimilables. En general la clorosis férrica se produce por insuficiencia en la absorción del Fe, aunque a veces pueda ser debida a la inactivación del Fe dentro de la planta. Chaney (1988) indicó que el pH elevado del suelo, aparte del carácter genético de la planta, es uno de los factores determinantes en la insuficiencia de la absorción del Fe por las dicotiledóneas. En gramíneas, uno de los factores más importantes en la inducción de clorosis férrica es el fosfato. El efecto podría deberse a que el fosfato probablemente limita la accesibilidad de los fitosideróforos al Fe del suelo, al adsorberse en la superficie de los óxidos de Fe (Awad *et al.*, 1988). La mayoría de los investigadores conceden al fosfato un papel más importante como inactivador del Fe en el interior de la planta que como inhibidor de su absorción (Romera y Díaz de la G., 1991).

Se ha demostrado que las raíces pueden modificar el pH del suelo que se encuentra en la zona cercana a la superficie de la raíz (Landsberg, 1981; Jolley y Brown, 1985 y Bienfait *et al.*, 1989). La acidificación de la rizósfera puede ser debida a diferentes causas, tales como la expulsión de iones H^+ por las raíces, la presencia del CO_2 producido en la respiración y por la secreción de ácidos orgánicos. La acidificación de la rizósfera también puede incrementarse por condiciones de la deficiencia del hierro, según lo mencionaron Romera y Díaz de la G. (1991).

Se ha utilizado diferentes métodos para medir el pH de la rizósfera (Olivares, 1987), entre los que se encuentra: 1) recolectar el suelo alrededor de las raíces y después medir el pH; 2) desarrollar las plántulas en hidroponía con solución nutritiva y medir el pH de la solución; 3) transferir plantas a macetas con agua deionizada y medir en intervalos de tiempo el pH del agua; 4) medir el pH cercano a las raíces utilizando un microelectrodo colocado con un microcon-

ductor hidráulico; 5) usar el suelo como medio de crecimiento y saturar el medio con agar y un indicador de pH, con la ventaja de poder medir el pH en vivo y dar una resolución espacial a lo largo y ancho de las raíces. Estas técnicas tienen algunas desventajas, por lo que el propósito de esta investigación fue utilizar un método alternativo para medir el pH de la rizósfera en plantas *in vivo* de cinco genotipos de frijol Fe-eficientes y Fe-ineficientes sometidos a condiciones de deficiencia de hierro. Para ello se formuló la siguiente hipótesis: las dicotiledóneas poseen mecanismos para incrementar la disponibilidad de los nutrientes por medio de acidificación de la rizósfera; por lo tanto, las plantas de frijol Fe-eficientes en condiciones de deficiencia de Fe pueden acidificar la rizósfera y solubilizar el Fe no disponible para la planta.

REVISIÓN DE LITERATURA

Mecanismos de absorción de hierro

En la actualidad se considera dos estrategias distintas para incrementar la absorción de hierro, asociadas con diferentes tipos de plantas (Romheld, 1987): la estrategia I, utilizada por las dicotiledóneas (frijol, soya, girasol, pepino), monocotiledóneas no gramíneas (ajo y cebolla), gimnospermas, helechos y algas, se caracterizan por disminuir el pH en la rizósfera por excreción de iones H^+ , la solubilización de iones férricos y quelatos férricos, la activación del sistema reductor en el plasmalema de las células de la epidermis de la raíz y la liberación de fenoles. La estrategia II, asociada con las gramíneas (como pastos, trigo, cebada, maíz y sorgo), hongos y bacterias, se basa en la liberación de fitosideróforos por las raíces (gramíneas) y sideróforos (hongos y bacterias) que pueden solubilizar iones férricos con los que forman quelatos.

Romheld y Marschner (1986) mencionaron que los mecanismos específicos (respuestas a la

deficiencia de Fe), sólo se ponen en marcha cuando la planta detecta falta del Fe. Entre estos mecanismos están los siguientes: a) acidificación del sustrato de cultivo, b) incremento de la capacidad reductora, c) liberación de fenoles (ácido cafeico, ácido fenólico, ácido clorogénico), d) incremento de la síntesis de ácidos orgánicos (ácido cítrico y málico), e) cambios morfológicos en la raíz (inhibición en el alargamiento de las raíces, acompañada por el desarrollo de raíces laterales, en las zonas subapicales se originan engrosamientos de tonalidad amarillenta, donde proliferan los pelos radicales y las células transferentes).

La capacidad para disminuir el pH de la rizósfera es diferente entre especies y entre variedades de la misma especie. Marschner y Barber (1975) demostraron que el pH de la solución nutriente disminuyó en el cultivo del girasol (*Helianthus annuus*) bajo condiciones de deficiencia de Fe. Sin embargo, en plantas provistas con Fe-EDTA, el pH se incrementó; también demostraron que los microorganismos no fueron responsables de la disminución del pH. Brown *et al.* (1961) estudiaron genotipos de soya Fe-eficientes y Fe-ineficientes. Los genotipos Fe-eficientes primero redujeron el pH del medio de crecimiento y después liberaron sustancias reductoras. Concluyeron que la diferencia en el uso del Fe por las distintas variedades se relacionó con la capacidad de las raíces para reducir el Fe^{+++} a Fe^{++} .

Cuando las plantas absorben más cationes que aniones, las raíces liberan iones H^+ y el pH decrece alrededor de las raíces. Riley y Barber (1971) estudiaron la relación entre el cambio de pH en la interface suelo-raíz y la absorción de P en el cultivo de la soya, utilizando diferentes fuentes de N (NH_4^+ y NO_3^-) para inducir cambios de pH en la rizósfera. El pH del medio nutritivo disminuyó cuando se fertilizó con NH_4^+ , absorbiendo estas plantas más P que las plantas fertilizadas con NO_3^- debido a que la

absorción de NH_4^+ induce una excreción de iones H^+ .

Los cambios producidos en el pH de la rizósfera por el CO_2 de la respiración de las raíces no son significativos. Nye (1981) demostró que el CO_2 producido en la respiración de las raíces se escapa por el sistema poroso del suelo, y la presión parcial de CO_2 no se incrementa lo suficiente como para tener un efecto significativo sobre el cambio de pH en la rizósfera.

Métodos para medir el pH de la rizósfera

Se ha utilizado diferentes métodos para medir el pH de la rizósfera. El método más común es recolectar el suelo de alrededor de las raíces y después medir el pH (Olivares, 1987). Esta técnica tiene la desventaja de que los cambios de pH inducidos por las raíces pueden ser afectados por la capacidad amortiguadora del suelo; otro de los problemas de esta técnica es que el pH sólo puede medirse al final del experimento. Por lo tanto, los cambios en el pH no pueden ser observados cuando las plantas están en crecimiento.

El efecto de las plantas sobre el pH del medio de cultivo también ha sido estudiado utilizando soluciones nutrientes (Peña, 1989). Al final del período de crecimiento es cuando se mide el pH de la solución nutriente. El problema con este método es que los iones H^+ excretados por las raíces son diluidos en toda la solución nutriente; por lo tanto, si la solución nutriente tiene una capacidad amortiguadora alta, podría ser difícil observar los cambios de pH inducidos por las raíces.

Un método diferente para medir el pH alrededor de las raíces fue utilizado por Mengel y Schubert (1985). Estos autores estudiaron los mecanismos fisiológicos de la excreción de iones H^+ colocando plántulas de maíz en una solución con todos los nutrientes; cuando la

planta tenía de seis a siete hojas; las raíces fueron lavadas y las plantas transferidas a macetas con agua deionizada. El pH del agua deionizada se midió cada 1.5 h durante 24 h. Este método tiene la ventaja que el agua deionizada tiene poca capacidad amortiguadora. Sin embargo, cuando las plantas están liberando iones H^+ dentro del medio, no pueden a la vez absorber iones; esto interfiere con el mecanismo del intercambio iónico. Otra desventaja de este método es que no se puede medir la variabilidad espacial en los cambios de pH a lo largo de las raíces y con respecto a la superficie de la raíz.

Otro de los métodos para medir el pH de la rizósfera es la técnica publicada por Blanchar y Lipton (1986). El método consiste en desarrollar plantas en cajas de vidrio, midiendo el pH cercano a las raíces mediante un microelectrodo conectado con un microconductor hidráulico. Este método tiene la ventaja que el pH puede ser medido en diferentes lugares cercanos a las raíces sin destruir el medio ni las raíces; sin embargo, este método es caro y los resultados pueden ser variables debido al contacto entre el electrodo y la rizósfera del suelo.

También se ha utilizado indicadores químicos para medir los cambios de pH en la rizósfera. Marschner y Romheld (1983) colocaron varias especies de plantas en cajas de plexividrio utilizando suelo como medio de crecimiento. A los 10 días de desarrollo, el suelo fue saturado con una solución de $CaSO_4$, agar y un indicador de pH (bromocresol púrpura). Después, durante un período entre 15 min y 2 h, se observó un cambio de color a lo largo de las raíces indicando un decremento del pH de la rizósfera. Este método tiene la ventaja de estar midiendo el pH en vivo y da una resolución espacial incluyendo lo largo y ancho de las raíces. Sin embargo, el cambio del pH en la rizósfera no puede ser observado cuando las plantas están en crecimiento, y la distribución del agar con el indicador de pH podría no ser uniforme. Por lo tanto, a un

pH similar podría ser observada alguna variabilidad en el color.

MATERIALES Y MÉTODOS

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía de la U.A.N.L., localizada en el Km 17.5 de la carretera Zuazua-Marín en el municipio de Marín, N.L.

Desarrollo experimental

La técnica descrita por Olivares (1987) fue modificada para identificar plantas Fe-eficientes que induzcan un decremento del pH de la rizósfera. Para su desarrollo, se sembró en tubos de ensaye con solución nutritiva Hoagland modificada por Johnson *et al.* y descrita por Epstein (1972), a un pH de 6.8, agar e indicador de pH (bromocresol púrpura). Para afinar la técnica se probaron previamente diferentes proporciones de agar-solución nutriente, cajas de vidrio, condiciones ambientales y procedimientos de germinación.

Con el propósito de aportar los elementos esenciales para las plantas se utilizó una solución nutriente, sin Fe (Cuadro 1). El agar fue utilizado para obtener un gel en el cual las plantas pudieran crecer y desarrollarse, y el indicador de pH fue utilizado para observar algún cambio del pH en el medio nutritivo: un color amarillo indica un decremento del pH (acidificación), y un color púrpura indica constancia en el pH de la rizósfera.

Preparación del medio nutritivo

Se disolvieron 5 g de agar-gel en un litro de solución nutriente. La solución nutriente contenía todos los micronutrientes excepto el hierro (Cuadros 1 y 2). El pH de la solución nutriente se ajustó a 6.8 utilizando NaOH 0.1 N. Después de que el agar fue disuelto, se agregaron 0.075g

de indicador de pH (bromocresol púrpura). La solución se enfrió a 45 °C y después se vaciaron 90 cm³ de solución dentro de cada tubo de ensaye (32 mm de diámetro y 20 cm de longitud). Para prevenir el crecimiento de microorganismos, los tubos de ensaye y el medio nutritivo se esterilizaron por medio de autoclaveado a 15 lb de presión durante 15 min.

Siembra

Cuando la solución con agar estuvo completamente solidificada en los tubos de ensaye, se colocaron las semillas de frijol sobre la superficie del agar; la siembra se realizó el 25 de abril de 1998. La semilla se desinfectó previamente con alcohol al 15 % durante 10 segundos y una solución con cloro al 4.8 % durante 5 minutos.

Los tubos se colocaron para su desarrollo en un cuarto de crecimiento con un fotoperíodo de 16h luz a una temperatura constante de 25 °C.

Descripción y aplicación de los tratamientos

Genotipos de frijol

Se utilizó cinco genotipos de frijol. Éstos fueron seleccionados de acuerdo con su tolerancia a clorosis férrica en un suelo calcáreo en un ciclo de selección (Lara y Vázquez, 1997) (Cuadro 3).

Cuadro 1. Componentes químicos y cantidades utilizadas en la solución nutritive Hoagland modificada por Johnson *et al.* desprovista de hierro (Tomado de Epstein, 1972).

Macronutrientes				
Compuestos químicos	Peso molecular	Solución patrón (Moles)	Solución patrón (g/l)	Volumen de la solución patrón para un litro de solución nutritive (ml)
KNO ₃	101.10	1.0	101.10	6.0
Ca(NO ₃) ₂ ·4 H ₂ O	236.16	1.0	236.16	4.0
NH ₄ H ₂ PO ₄	115.08	1.0	115.08	2.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.49	1.0	246.49	1.0
Micronutrientes				
KCl	74.55	50	3.728	1.0
H ₃ BO ₃	61.84	25	1.546	
MnSO ₄ ·H ₂ O	169.01	2.0	0.338	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.55	2.0	0.575	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.71	0.5	0.125	
H ₂ MoO ₄ (85% MoO ₃)	161.97	0.5	0.081	

Cuadro 2. Concentración de los elementos nutrientes en la solución Hoagland modificada por Johnson, sin hierro.

Elemento	Concentración (ppm)
Nitrógeno (N)	224.000
Potasio (K)	235.000
Calcio (Ca)	160.000
Fósforo (P)	62.000
Azufre (S)	32.000
Magnesio (Mg)	24.000
Cloro (Cl)	1.770
Boro (B)	0.270
Manganeso (Mn)	0.110
Zinc (Zn)	0.131
Cobre (Cu)	0.032
Molibdeno (Mo)	0.050

Cuadro 3. Características agronómicas de cinco genotipos de frijol y su tolerancia a clorosis férrica.

Genotipo de frijol	Color de testa	Hábito de crecimiento	Tolerancia a clorosis férrica ¹
AN 22	Pinto	Indeterminado (Tipo II)	Tolerante
Pinto mex. 80	Pinto	Indeterminado (Tipo III)	Tolerante
Durango 222	Bayo bco.	Indeterminado (Tipo III)	Tolerante
Lagunero 87	Pinto	Indeterminado (Tipo II)	Semitolerante
Canario 101	Amarillo crema	Determinado (Tipo I)	Susceptible

¹Fuente: Lara y Vázquez (1997).

Medición del pH de la rizósfera

Los cambios de pH de la rizósfera (cambio de color) se determinaron a los 25 días después de la siembra de la semilla. Un color amarillo indicó el decremento del pH (acidificación) y un color púrpura indicó que no hubo cambios en el pH. Se prepararon soluciones nutritivas estándar con diferentes pH para identificar el color del indicador en cada una de ellas, el pH se ajustó con NaOH 0.1 N (alcalino) y con HCl 0.1 N (ácido). Posteriormente, el valor del pH de la rizósfera se determinó comparando el co-

lor de los tratamientos con el color de las soluciones estándar. Los colores obtenidos fueron de un púrpura intenso (pH de 7) a un color amarillo intenso (pH de 3.0).

Diseño experimental

Los cinco genotipos de frijol (tratamientos) fueron distribuidos en un diseño experimental completamente al azar con seis repeticiones. Con una plántula por unidad experimental. La comparación de medias de los tratamientos se realizó por medio de la prueba de Tukey.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las plántulas de frijol mostraron variabilidad significativa ($P < 0.01$) en su capacidad de bajar el pH de la rizósfera. El indicador de pH mostró que algunos genotipos fueron capaces de disminuir el pH de la rizósfera a valores tan bajos como 3.0 (Figura 1). En cambio, otros genotipos no bajaron el pH de la rizósfera a menos de 6.0 (Figura 2). El decremento del pH se observó en toda la raíz y el medio. Es importante considerar que la acidificación de la rizósfera por las plantas, en condiciones de campo, depende de la capacidad amortiguadora del suelo (Schaller, 1986), por lo que es difícil que la planta en el suelo llegue a disminuir el pH de la rizósfera a valores tan bajos como 3.0.

Para conocer si los valores obtenidos de pH mostraban diferencia entre los genotipos, se realizó el análisis de varianza por medio del diseño completamente al azar. Se encontró diferencia altamente significativa entre los tratamientos, con un coeficiente de variación de 10.4 por ciento.

La comparación de las medias de los tratamientos separó los genotipos de frijol AN 22 y Pinto Mexicano 80 por su mayor capacidad de

acidificar el medio; los genotipos que no mostraron cambios fueron Durango 222 y Lagunero 87. El Canario 101 provocó una acidificación intermedia (Cuadro 4).

Los genotipos AN 22 y Pinto Mexicano 80 mostraron una reducción notable del pH, sin mostrar cambios morfológicos como el engrosamiento de la raíz con gran proliferación de pelos radicales, típico de plantas con deficiencia de hierro. Teóricamente estos genotipos podrían ser capaces de absorber Fe en suelos calcáreos, en los cuales el Fe se encuentra en forma férrica no disponible para la planta (Loué, 1988), pues al acidificarse el medio el Fe se reduce y pasa a la forma ferrosa que es accesible para la planta, además de que se podrían activar las enzimas tipo reductasas en el plasmalema de las células de la epidermis de la raíz (Olsen y Brown, 1980).

El genotipo susceptible a clorosis férrica (Canario 101) disminuyó el pH hasta 4.5; esto indica que tiene cierta capacidad de acidificar la rizósfera, pero no con la capacidad que tienen los cultivares Fe eficientes AN 22 y Pinto Mexicano 80.

Cuadro 4. Valores de pH obtenido de la rizósfera de los cinco genotipos de frijol sembrados en tubos de ensaye con solución nutritiva desprovista de hierro.

Genotipo de frijol	pH del medio (rizósfera)	pH ponderado del medio nutritivo
AN 22	3.00 c ¹	3.46 d
Pinto mexicano 80	3.25 c	4.18 c d
Durango 222	6.00 a	5.95 a
Lagunero 87	6.00 a	5.41 a b
Canario 101	4.42 b	4.77 b c

¹ Prueba de Tukey ($P = 0.05$)

* Medias con la misma letra son iguales al 0.05 de significancia.

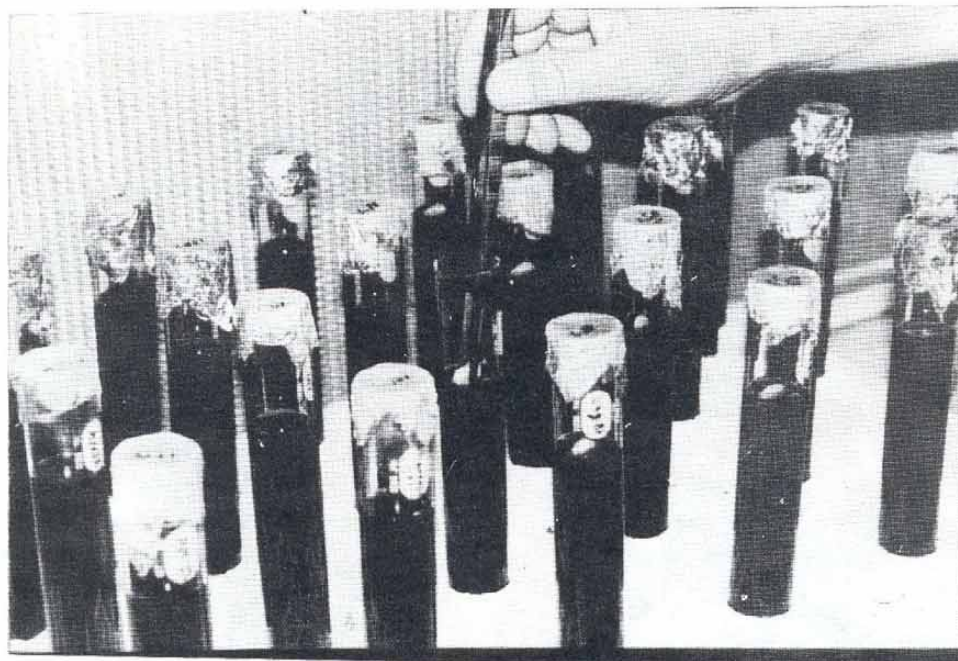


Figura 1. Las variedades AN 22 (a) y el Pinto Mexicano 80 (b) acidifican el medio hasta un pH de 3. El color púrpura indica un pH alcalino (negro en las figuras) y el color amarillo indica un pH ácido (blanco en las figuras).

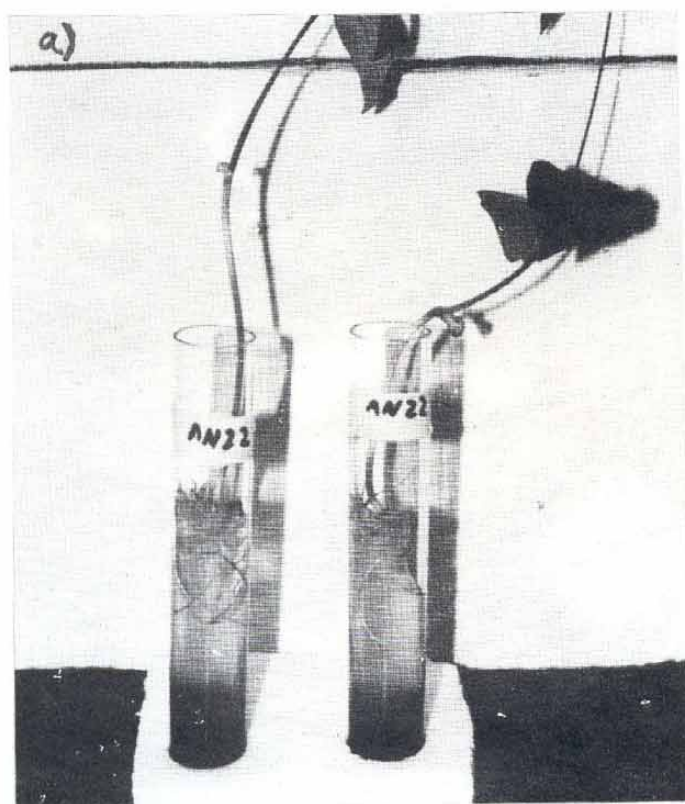


Figura 2. Las variedades Lagunero 87 y el Durango 222 no acidifican el medio. El color púrpura indica un pH alcalino (negro en la figura).

El genotipo Durango 222, considerado como Fe eficiente, no mostró acidificación de la rizósfera (Figura 2), por lo que podría tener otros mecanismos para absorber Fe eficientemente. Romera y Díaz (1991), consideran otras características fisiológicas que poseen las plantas dicotiledóneas para disponer de hierro; así, un factor importante que se tiene que considerar en condiciones de campo, es la capacidad de algunos genotipos de incrementar rápidamente el área de exploración de la raíz, lo que les permite por intercepción radical, entrar en contacto con el Fe y pasarlo de su forma férrica (oxidada) a una forma ferrosa (reducida) aprovechable, a través de enzimas reductoras. Otra posibilidad es la capacidad de algunos genotipos de modificar la actividad del Fe dentro de la planta al cambiar el pH interno (la ausencia de esta capacidad es una de las posibles causas de la clorosis férrica). Al respecto, Mengel y Geurtzen (1988) señalaron que el Fe se puede precipitar en el apoplasto como consecuencia de la alcalinización producida por efecto del HCO_3^- o por la absorción o reducción de NO_3^- . Otro mecanismo que no excluye al anterior, es que la reducción del Fe^{+3} en la hoja se vea afectada negativamente por el pH elevado.

Algunos genotipos cambiaron el pH del medio aún por debajo de la raíz, por lo tanto se procedió a ponderar el valor del pH mínimo y máximo obtenido en la zona de influencia de la raíz con el porcentaje del sustrato con cambio y sin cambio de pH. Se encontró diferencia altamente significativa entre los genotipos de frijol. Para conocer la diferencia entre los promedios de los genotipos se utilizó la prueba de Tukey, la cual separó los genotipos AN 22 y Pinto Mexicano 80 como los de mayor capacidad de acidificar la rizósfera; los genotipos que no provocaron cambios fueron el Durango 222 y el Lagunero 87 (Cuadro 4). Los grupos principales formados con el pH ponderado fueron iguales que los formados con el pH no ponderado.

Con respecto a la metodología utilizada podemos decir que el método tiene la ventaja de estar midiendo el pH en vivo y dar una resolución espacial incluyendo lo largo y ancho de las raíces. Además, el cambio del pH en la rizósfera puede ser observado cuando las plantas están en crecimiento. De acuerdo con los resultados obtenidos la técnica puede ser utilizada en forma complementaria en la identificación de progenitores y en la selección de plántulas segregantes Fe-eficientes, en programas de mejoramiento genético para variedades adaptadas a suelos alcalinos. Entre otros usos también puede ser utilizada para estudiar el efecto del amonio y el nitrato en el pH de la rizósfera.

CONCLUSIONES

La metodología utilizada para detectar los cambios del pH de la rizósfera fue adecuada para discriminar entre genotipos de frijol por su capacidad para decrecer el pH de la rizósfera.

Los cultivares de frijol Fe-eficientes AN 22 y Pinto Mexicano 80 mostraron capacidad de acidificar el pH de la rizósfera.

BIBLIOGRAFÍA

- Awad, F., V. Romheld, and H. Marschner. 1988. Mobilization of ferric iron from a calcareous soil by plant-borne chelators (phytosiderophores). *J. Plant Nutr.* 11: 701-713.
- Bienfait, H.F., H.J. Lubberdinget, P. Heutink, L. Lindner, J. Visser, R. Kaptein and K. Dijkstra. 1989. Rhizosphere acidification by iron deficient bean plants: the role of trace amounts of divalent metal ions. *Plant Physiol.* 90,359-364.
- Blanchar, R. W. and D. S. Lipton. 1986. The pH in alfalfa seedling rhizosphere. *Agron. J.* 78:216-219.
- Brown, J.C., R.S. Holmes, and L.O. Tiffin. 1961. Iron chlorosis in soybean as related to the genotype of rootstalk: 3. Chlorosis susceptibility and re-

- ductive capacity at the root. *Soil Sci.* 91:127-132.
- Chaney, R.L. 1988. Recent progress and needed research in plant Fe nutrition. *J. Plant Nutr.* 11(6-11):1589-1603.
- Epstein, E. 1972. Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives. Ed. Wiley and Sons, U.S.A. pp. 36-45.
- Jolley, V.D. and J.C. Brown. 1985. Iron stress response in tomato affected by potassium and renewing nutrient solutions. *J. Plant Nutr.* 10:333-351.
- Landsberg, E.C. 1981. Organic acid synthesis and release of hydrogen ions in response to Fe deficiency stress of mono and dicotyledoneous plant species. *J. Plant Nutr.* 3:579-591.
- Lara M., J.L. y A. R. Vázquez. 1997. Efecto de la humedad en la clorosis férrica de diferentes genotipos de frijol en suelos calcáreos. XXVIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Villahermosa, Tab. pp. 167.
- Louè, A. 1988. Los Micronutrientes en la Agricultura. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. pp. 13-18.
- Marschner, H., and D.A. Barber. 1975. Iron uptake by sunflower plants under sterile and non-sterile conditions. *Plant Soil* 43:515-518.
- Marschner, H. and V. Romheld. 1983. *In vivo* measurements of root induced pH changes at the soil-root interface: Effect of plant species and nitrogen source. *Z. Pflanzenphysiol.* 111:241-251.
- Mengel, K. And G. Geurtzen. 1988. Iron chlorosis on calcareous soils. Alkaline nutritional conditions as the cause for the chlorosis. *J. Plant Nutr.* 9:161-175.
- Mengel, K. and S. Schubert. 1985. Active extrusion of protons into deionized water by roots of intact maize plants. *Plant Physiol* 79:344-348.
- Nye, P.H. 1981. Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant Soil* 61:7-26.
- Olivares S., E. 1987. Physiological differences in alfalfa populations selected for high and low P concentration. Ph. D. Thesis. New Mexico State University. Las Cruces, New Mexico. 120 p.
- Olsen, R. A. and J. C. Brown. 1980. Factors related to iron uptake by dicotyledoneous and monocotyledoneous plants. I. pH and reductant. *J. Plant Nutr.* 2:629-645.
- Peña R., R. 1989. Contribución al estudio de algunos mecanismos de adaptación de la soya a la clorosis férrica. Tesis de M.C., C.P. Centro de Edafología, Chap. Mex. 162 p.
- Riley, D. and S.A. Barber. 1971. Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root-induced pH changes at root-soil interface. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 35:301-306.
- Romera R., J. y M. Díaz de la G. 1991. La nutrición férrica de las plantas. Ed. Servicio de Publicaciones. Universidad de Córdoba. Córdoba, España. 111 p.
- Romheld, V. 1987. Existence of two different strategies for the adquisition of iron in higher plants. *In*: Iron transport in microbes, plants and animals. pp. 353-373. Eds. G. Winkelmann; Van der Helm; J. B. Neilands. VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim, F.R.G.
- Romheld, V. and H. Marschner. 1986. Mobilization of iron in the rhizosphere of different plant species. *Adv. of Plant Nutr.* 2:155-204.
- Schaller, G. 1986. pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering of soil. *Plant Soil* 97:439-444.