

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE UREIDOS EN TRES LEGUMINOSAS FIJADORAS DE NITROGENO: SOYA, FRIJOL Y MANI¹

Leida Castro *
Oscar Acuña *

ABSTRACT

Determination of the ureide concentration in three nitrogen-fixing legumes: soybean, bean and peanuts. The methodology for determination of ureides was evaluated as a technique which permits the estimation of biological fixation of nitrogen as well as the fixation potential of different legume genotypes. For this purpose, the variation of ureide concentration and percentage of total nitrogen, in stems and leaves, was determined for soybean (*Glycine max*), bean (*Phaseolus vulgaris*) and peanuts (*Arachis hypogea*) inoculated with strains CR-506 (Tal 377), CR-409 (CIAT 166) and CR-700 (Tal 169), respectively. The plants were evaluated at the following growth stadia: V6, R2 and R4 for soybean and V4, R6 and R7 for bean. For peanuts, the first evaluation was performed when the fifth leaf was completely developed, the second at the beginning of flowering, when the tenth leaf was fully developed. In soybean and bean, the percentage of total nitrogen was significantly higher in the leaves than in stems. In both cases, the percentages were lower as the plants became older. In contrast, the concentration of ureides (allantoin and allantoic acid) in these crops was higher in the stems compared with the leaves. Additionally, the concentration of ureides increased significantly in stems with the age of the plant, while in the leaves the concentration appeared to decline. In the case of peanut, similar results were obtained for the percentage of total nitrogen in leaves and stems; however, no significant differences or tendencies were found in the concentration of ureides in leaves and stems. There were no variations in concentration as the plants aged.

INTRODUCCION

La importancia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas en la agricultura tropical, en la producción de granos, forrajes y el crecimiento de otras leguminosas es ampliamente conocida.

Debido a la importancia del proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) y a la

necesidad de identificar genotipos superiores para esta característica, se han evaluado varios métodos para determinar la contribución de esta simbiosis en la nutrición nitrogenada de las leguminosas en los sistemas agrícolas. Frecuentemente la FBN se ha cuantificado mediante los cambios en el contenido de N total de las plantas, medido por el método de Kjeldahl, la técnica de reducción del acetileno y el método de dilución del isótopo ¹⁵N. Sin embargo, estos métodos dan valores indirectos de la fijación (Kjeldahl), o son muy costosos (¹⁵N), e imprecisos (reducción del acetileno) (Bergensen, 1980; Turner y Gibson, 1980; Havelka *et al.*, 1982).

1/ Recibido para publicación el 2 de octubre de 1991.
* Laboratorio de Microbiología de Suelos, Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José Costa Rica.

En los últimos años la determinación de la concentración de ureídos encontrados en las leguminosas noduladas ha despertado un gran interés, como método para estimar la FBN. Dicho planteamiento asume que el porcentaje de ureídos en el xilema es una medida de la FBN, puesto que otras fuentes del mismo en el suelo son transportados en la planta en otros tipos de compuestos.

Las leguminosas que presentan nódulos y fijan N activamente pueden ser clasificadas en 2 grandes grupos respecto a la forma en que asimilan el N fijado. En las leguminosas de clima templado tales como alfalfa y lupín, el N fijado se transporta principalmente como amidas, (asparagina y glutamina); en las leguminosas de origen tropical, el N fijado es asimilado como ureídos, (alantoína y ácido alantoico) (Sprent 1980).

Herridge *et al.* (1978) y Matsumoto *et al.* (1977) demostraron a través del análisis del espectro de los solutos nitrogenados de plantas de soya (*Glycine max*) y rabiza (*Vigna unguiculata*) y en experimentos con ^{15}N y ^{14}C , que los ureídos son los productos de la FBN responsables de transportar aproximadamente el 90% del N fijado en los nódulos de plantas completamente dependientes de la simbiosis, y estos están presentes sólo en pequeñas cantidades en plantas dependientes del N mineral. Estas observaciones sugieren que la abundancia de los ureídos puede reflejar la dependencia simbiótica de las plantas y proveer una medida de la fijación de N (McClure y Israel, 1980; Patterson y La Rue, 1983).

Van Berkum *et al.* (1985) evaluaron la relación entre la presencia de ureídos y la fijación de N bajo condiciones de invernadero en soya y frijol lima (*Phaseolus lunatus*) y encontraron que la acumulación de N en la planta a partir de la fijación biológica se correlacionó positivamente con la presencia de ureídos. La concentración de ureídos para 4 genotipos de soya, varió dependiendo de la etapa de crecimiento, del genotipo y de las diferentes cepas de *Bradyrhizobium japonicum* con que se inoculó. Los mismos autores afirman que estos datos demuestran que la determinación de la concentración de ureídos puede ser utilizada en estudios de la fisiología del N fijado biológicamente, y también en la evaluación de la efectividad de diferentes cepas de *Rhizobium* para fijar el N atmosférico.

El presente trabajo tuvo como objetivo probar y afinar la técnica de determinación de la concentración de ureídos, compararla con el método

tradicional de determinación de N total y determinar para los 3 cultivos evaluados, la etapa de crecimiento y la parte de la planta adecuada para realizar el muestreo y su respectivo análisis de ureídos.

MATERIALES Y METODOS

Localización y material experimental

El experimento se realizó en los invernaderos y los laboratorios del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica.

Se utilizaron plantas de soya variedad Júpiter, frijol variedad Negro Huasteco, y maní variedad Tainung, y las siguientes cepas de *Rhizobium*: CR-506 (TAL 377) para soya, CR-409 (CIAT 166) para frijol y CR-700 (TAL 169) para maní, que fueron seleccionadas por su eficiencia en el proceso de fijación de nitrógeno.

Tratamientos y diseño experimental

Para cada leguminosa se evaluaron 12 tratamientos correspondientes a 2 metodologías (Kjeldahl y ureídos), 2 partes de la planta (hojas y tallos) y 3 etapas de crecimiento (etapa vegetativa, inicio de floración y 50% de floración). Se determinó además, en soya y frijol la concentración de ureídos en las flores.

Cada leguminosa se manejó como un experimento independiente. En el invernadero se utilizó un diseño irrestricto al azar con 3 repeticiones y un arreglo factorial 2x2x3. La unidad experimental estuvo constituida por una maceta de 2 kg de capacidad con 3 plantas.

Metodología

Se utilizó un suelo previamente tratado con calor a 160°C por 4 h, las semillas se inocularon previamente con la cepa de *Rhizobium* específica para cada cultivo. Al suelo se le aplicó una fertilización básica a la siembra, con P, Mg, Mn, Zn, Ca, y B de acuerdo al análisis de suelo (Bertsch, 1987). En el Cuadro 1 se especifica la etapa de desarrollo en que se efectuó cada muestreo.

Las muestras fueron secadas a 60°C y molidas para el posterior análisis.

VARIABLES EVALUADAS

Se determinó el % de N total por medio del método de Kjeldahl (Turner y Gibson, 1980) y el

Cuadro 1. Etapas de muestreo para el análisis.

Cultivo	Etapas de muestreo	Cita
Soya	V6 Hoja 6 desarrollada	Fehr y Cavinese, 1977
	R2 Floración	
	R4 Formación de vainas	
Frijol	V4 Hoja 3 desarrollada	CIAT, 1982
	R6 Floración	
	R7 Formación de vainas	
Maíz	Hoja 5 desarrollada	
	Inicio de la floración	
	Hoja 10 desarrollada	

contenido de ureídos por la técnica propuesta por Vogeles *et al.* (1970) que consiste en la conversión de la alantoína y el ácido alantoico a glioxilato por una hidrólisis alcalina y ácida, el glioxilato es luego convertido a una fenilhidrazona, que es después fuertemente oxidada con ácido y ferricianida para producir un formazán intensamente coloreado. Este compuesto coloreado se determina en un espectrofotómetro a los 15 min exactos (Figura 1) a una longitud de onda de 530 nm, para interpolar en una curva patrón (Figura 2). A continuación se detalla la metodología.

Se pesa 0,150 g del material vegetal previamente secado a 60°C, y se le agrega 10 ml de H₂O destilada, se hierve por 20 min y se filtra con papel de filtro Whatman #40. Del filtrado se toman 0,5 ml, se colocan en un tubo de ensayo, se le agrega 1 ml de H₂O destilada y 0,5 ml de NaOH 0,5 N; se calienta por 8 min a 100°C, se deja enfriar y se mantiene por 15 a 20 min a temperatura ambiente, después se adiciona 0,5 ml de HCl 0,65 N, se agita y se calienta por 4 min a 100°C. Se agrega 0,5 de un Buffer sodio-fosfato (se mezcla 100 ml de una solución 0,4 M de Na₂HPO₄ con 100 de una solución 0,4 M de KH₂PO₄ y se lleva a un litro) y 0,5 de fenilhidrazina. HCl 0,33%, se agita y se mantiene a temperatura ambiente por 5 min. Después los tubos de ensayo con las muestras se enfrían en baño de hielo a 0°C por 3 min. Se agrega 0,5 de HCl concentrado y 0,5 de ferricianida de potasio 1,67% a intervalos de 1 minuto, se saca del baño de hielo y se agita. A los 15 min exactos, las muestras se leen en el espectrofotómetro.

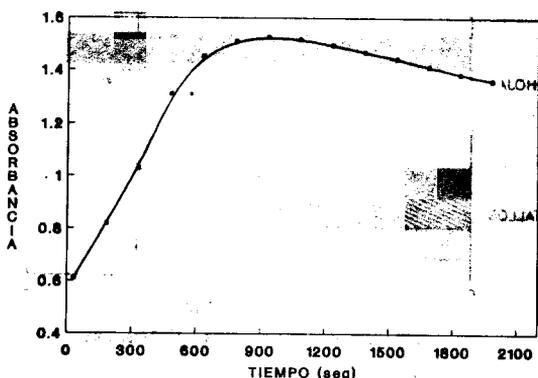


Fig. 1. Comportamiento en el tiempo de la curva de absorbancia de una muestra de alantoína.

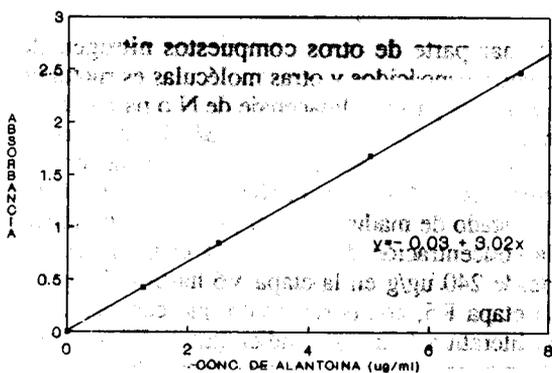


Fig. 2. Curva patrón de alantoína.

RESULTADOS Y DISCUSION

Concentración de ureídos y % de N total en soya

Para el cultivo de la soya se encontró diferentes tendencias en cuanto a la concentración de ureídos y el % de N total (Figura 3). Existe mayor % de N en las hojas que en los tallos, comportamiento esperado si se considera que las hojas son el principal órgano de almacenaje de N; no obstante, se puede observar que el % de N disminuye con la madurez de la planta debido a que el N se moviliza hacia las flores y las vainas en formación.

Por el contrario la concentración de ureídos (Figura 1) fue mayor en los tallos que en las hojas ya que luego de que estos son formados en los nódulos, se transportan hacia la parte superior de la planta a través del xilema. Sin embargo, al llegar a las hojas se estimula su metabolismo para

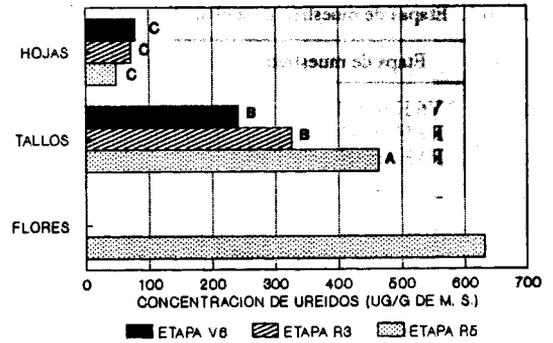
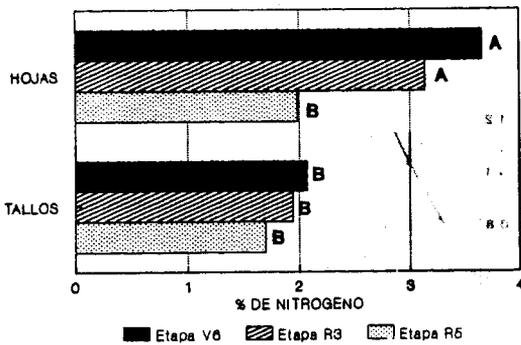


Fig. 3. Porcentaje de N total y concentración de ureídos en hojas y tallos de soja (*Glycine max*) en tres etapas de desarrollo. Condiciones de invernadero, San Pedro, Costa Rica.

formar parte de otros compuestos nitrogenados como aminoácidos y otras moléculas estructurales utilizados para el almacenaje de N o para el crecimiento de la planta (Atkins *et al.*, 1982; Herridge *et al.*, 1978). Además, el contenido de ureídos aumenta en los tallos conforme la planta alcanza su estado de madurez; en el presente experimento la concentración de ureídos en el tallo aumentó desde 240 ug/g en la etapa V6 hasta 462 ug/g en la etapa R5, comportamiento que concuerda con la literatura (cita) que indica que la FBN alcanza su mayor expresión en las etapas de floración, cuando los nódulos han alcanzado su mayor tamaño y eficiencia. En las hojas, sin embargo, existió una tendencia (aunque no es estadísticamente significativa) a disminuir la concentración de ureídos; posiblemente este hecho sea debido a que los productos de la FBN (en este caso ureídos) se mueven, en las etapas finales del crecimiento de la planta, desde los nódulos hasta las flores directamente, sin pasar por las hojas, además de que existe un movimiento del N almacenado en las hojas hacia estos puntos. Esta translocación de ureídos desde los nódulos, tallos y posiblemente desde las hojas, hacia las flores, queda confirmada en la Figura 1 en la que se puede observar que la mayor concentración de ureídos se encuentran en las flores (632 ug/g). Es sabido que en las semillas se almacena una gran cantidad de N para nutrir las plantas en los primeros estadios de desarrollo (etapas V0, V1, V2); en este sentido la literatura informa que las concentraciones de ureídos en estas etapas de crecimiento son generalmente altas ya que el N almacenado en los cotiledones es metabolizado rápidamente a ureídos para ser

transportados al resto de la planta (Peoples *et al.*, 1985; Rainbird *et al.*, 1984).

Concentración de ureídos y % de N total en frijol

En este cultivo la concentración de ureídos y el porcentaje de N total para las diferentes etapas de crecimiento y las diferentes partes de planta muestreadas, siguieron la misma tendencia que en el cultivo de la soja (Figura 4), sin embargo, es importante anotar que en la primera evaluación (etapa V4) el contenido de ureídos en los tallos fue relativamente bajo. Posiblemente en esta etapa de crecimiento (posterior a la época de dependencia de los cotiledones), la FBN (Herridge, 1982) fue bastante reducida ya que los nódulos están en las etapas de formación, por lo que su eficiencia para fijar N es muy baja y por lo tanto, la planta toma casi todo el N que necesita de las fuentes inorgánicas presentes en los suelos o adicionadas en forma de fertilizantes. La concentración sin embargo aumento considerablemente en las etapas R6 y R7, y la mayor concentración se obtuvo igual que en soja, en las flores.

Concentración de ureídos y % de N total en maní

En este cultivo el porcentaje de N total mostró un comportamiento similar a la soja y el frijol (Figura 5), sin embargo, en cuanto a la concentración de ureídos no hubo diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tratamientos, el coeficiente de variación fue alto y las concentraciones, aunque variables, fueron en promedio muy bajas (38 ug/g de materia seca).

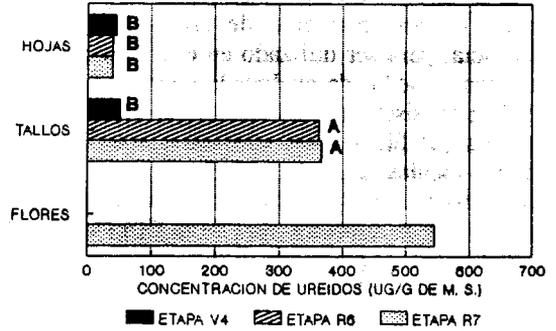
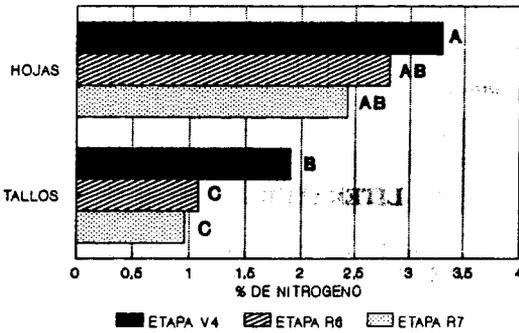


Fig. 4. Porcentaje de N total y concentración de ureídos en hojas y tallos de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en tres etapas de desarrollo. Condiciones de invernadero, San Pedro, Costa Rica.

Schubert (1986) indica que a pesar de que el maní es de origen tropical presenta la particularidad de exportar como principal producto de la FBN un compuesto llamado 4-metileno glutamina y no ureídos como es usual en las leguminosas de origen tropical.

Se debe considerar, para soya y frijol, que aunque las tendencias observadas concuerdan con la literatura existente (Herridge, 1982), las concentraciones encontradas fueron relativamente bajas debido posiblemente a que se utilizó un suelo con un alto contenido de materia orgánica (7,4%). Esto podría implicar la presencia de una cantidad de N nativo disponible suficiente para reducir el proceso de FBN, ya que si existe el N disponible en el suelo, la planta "opta" por tomarlo de ahí, antes que invertir la gran cantidad de energía que le demanda el proceso de fijación de N atmosférico. En este sentido Noel *et al.* (1982) informaron que cuando se suple nitrato a legumi-

nosas inoculadas con *Rhizobium*, se inhibe (dependiendo de la cantidad de nitrato adicionado), la infección de las raíces, el desarrollo de los nódulos, la fijación de N y la síntesis de proteína en los bacteroides (incluyendo la enzima nitrogenasa). En soya según Herridge (1982) y McClure y Israel, (1980), la concentración de ureídos en el los tallos declina en forma inversamente proporcional a la cantidad de nitrato adicionado al medio.

Con la información obtenida en la presente investigación se puede concluir que la parte de la planta más adecuada para realizar la determinación de la concentración de ureídos son los tallos, ya que aunque las flores presentan las mayores concentraciones, los tallos son más fáciles de muestrear; además, la etapa más adecuada son las etapas posteriores a la floración, cuando la concentración de ureídos es mayor. Se puede también concluir que el comportamiento del % de N total y la concentración de ureídos presentan tendencias diferentes (Figuras 1, 2 y 3) y aunque sería necesario contar con la información de número o peso de nódulos para relacionarlos con la concentración de ureídos, la literatura existente (Matasumo *et al.*, 1979; Van Berkum *et al.*, 1985) es bastante amplia en informar que hay una correlación positiva entre estas 2 variables, por esto es importante señalar que la concentración de ureídos, puede ser una forma más directa de realizar evaluaciones comparativas de la FBN, ya que, el % de N total sólo puede dar información de la cantidad de N existente en la planta, pero no de los factores que podrían estar afectando la FBN.

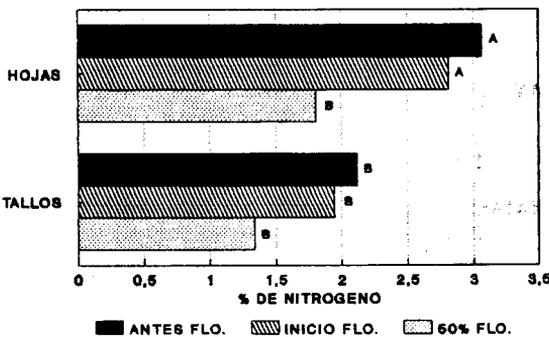


Fig. 5. Porcentaje de nitrógeno total en hojas y tallos de maní (*Arachis hypogea*) en tres etapas de crecimiento. Condiciones de invernadero, San José, Costa Rica.

De lo anterior se deduce que el método propuesto por Vogeles *et al.* (1970), Patterson y La

Rue (1983) y evaluado en este ensayo, para determinar la concentración de ureídos tiene gran potencial para ser utilizado en el análisis de rutina, como medio de evaluar la contribución de la FBN a un sistema *Rhizobium*-leguminosa; es una técnica que fácilmente se puede adaptar a condiciones locales. La concentración de ureídos más que el % de N total puede dar información importante sobre la situación real de la fijación; si está siendo afectada por algún factor ambiental (uso de agroquímicos, clima, etc), o por factores genéticos, ya sea de la planta (variedad del cultivo) o de la cepa de *Rhizobium* utilizada. Por lo tanto podría ser de gran utilidad para la selección de cepas y para evaluar, en condiciones de campo o invernadero, el efecto de algún factor sobre la FBN.

RESUMEN

Se evaluó la metodología de determinación de ureídos como una técnica indicadora de la fijación biológica de N y el potencial fijador de diferentes genotipos de leguminosas. Con este fin se determinó la variación en la concentración de ureídos y el porcentaje de nitrógeno total en los tallos y en las hojas de plantas de soya (*Glycine max*), frijol (*Phaseolus vulgaris*) y maní (*Arachis hypogea*), inoculadas con las cepas CR-506 (TAL 377), CR-409 (CIAT 166) y CR-700 (TAL 169) respectivamente, en 3 etapas de crecimiento; V6, R2 y R4 para soya; V4, R6 y R7 para frijol. Para maní se realizó la primera evaluación cuando la quinta hoja estaba completamente desarrollada, la segunda al inicio de la floración y la tercera al final de la floración, cuando la décima hoja había alcanzado su máximo desarrollo.

Se encontró que para soya y frijol el % de N total fue significativamente mayor en las hojas que en los tallos y en ambos casos los porcentajes disminuyeron con la edad de la planta. Un comportamiento contrario se observó en estos dos cultivos cuando se determinó la concentración de ureídos (alantoína y ácido alantoico); en este caso se encontró una concentración significativamente mayor en los tallos comparada con la concentración en las hojas. En los tallos la concentración de ureídos aumentó significativamente con la edad de la planta, mientras que en las hojas la concentración tendió a disminuir.

Para maní el comportamiento del % de N total fue el mismo que en soya y frijol, pero no se obtuvieron, en el presente experimento, diferen-

cias significativas, ni tendencias, en el comportamiento de la concentración de ureídos en hojas y tallos, ni en la variación de éste según la edad de la planta.

LITERATURA CITADA

- ATKINS, C.; RITCHIE, A.; ROWE, P.; MCCAIRNS, E.; SAUR, D. 1982. *De novo* purine synthesis in nitrogen-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) and soybean (*Glycine max*). *Plant Physiology* 70:55-60.
- BERGERSEN, F. 1980. Measurement of Nitrogen Fixation By Direct Means. In Bergersen (ED) *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Canberra, Australia. John Willey & Sons. pág 65-110.
- BERTSCH, F. 1987. Manual para interpretar la fertilidad de los suelos de Costa Rica. 2 ed. Oficina de Publicaciones de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 78 pp.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (CIAT). 1982. *Etapas de desarrollo de la planta de frijol común*. Cali, Colombia. 25 p.
- DUQUE, F.; SALLES, L.; PEREIRA, J.; DOBEREINER, J. 1981. Influence of plant. Genotype on some parameters of Nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. In *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture*. Ed. by P. Graham and S. Harris. CIAT. Colombia. 63 p.
- HAVELKA, U.; BOYLE, M.; HARDY, R. 1982. Biological Nitrogen Fixation. In Stevenson (ED), *Nitrogen in Agricultural Soils*. Madison, Wisconsin USA, Committee. pág 365-413.
- HERRIDGE, D.; ATKINS, C.; PATE, J.; RAINBIRD, R. 1978. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea. *Plant Physiology* 62:495-498.
- HERRIDGE D. 1982. Use of the Ureide Technique to Describe the Nitrogen Economy of Field-Grown Soybeans. *Plant Physiology* 70:7-11.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M.; YAMAMOTO Y. 1977. Incorporation of ^{15}N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with $^{15}\text{N}_2$. *Plant Cell Physiology* 18:459-462.
- MATASUMO, T.; YATAZAWA, M.; YAMAMOTO, Y. 1979. Distribution and change in the contents of allantoin and allantoic acid in developing nodulation and non-nodulation soybean plants. *Plant Cell Physiology* 18:353-359
- McCLURE, R.P.; ISRAEL, D.; VOLK, R. 1980. Evaluation of the relative ureide content of xylem saps an indicator of N_2 fixation in soybean. *Plant Physiology* 66:720-725.

- McCLURE, P.; ISRAEL, D. 1980. Nitrogen Fixation (C_2H_2) and ureide content of soybean: ureides as an index of fixation. *Crop Science* 23:825-831.
- NOEL, K.; CARNEOL, M.; BRILL, W. 1982. Nodule protein synthesis and nitrogenase activity of soybean exposed to fixed nitrogen. *Plant Physiology* 70:1236-41.
- PATTERSON, T.; La RUE, T. 1983. N_2 Fixation (C_2H_2) and Ureide Content of Soybeans: Environmental Effects and Source-Sink manipulations. *Crop Science* 23:September-October.
- PEOPLES, M.; ATKINS, C.; PATE, J.; MURRAT, D. 1985. Nitrogen nutrition and metabolic interconversions of nitrogenous solutes in developing cowpea fruits. *Plant Physiology* 77:382-388.
- RAINBIRD, P.; THORNE, J.; HARDY, R. 1984. The role of amides aminoacids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiology* 74:329-34.
- SCHUBERT, K. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: Synthesis, transport and metabolism. *Annual Rev. Plant Physiology* 37:539-74.
- SPRENT, J. 1980. Root nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin of some Leguminosae. *Plant Cell Environ* 3:35-43.
- TURNER, G.; GIBSON, A. 1980. Measurement of Nitrogen Fixation By Direct Means. In Bergersen (ED) *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Canberra, Australia. John Willey & Sons. pág. 111-138.
- VAN BERKUM, P.; SLOGER, C.; WEBER, D.; CREGAN, P.; KEYSER, H. 1985. Relationship between Ureide N and N_2 Fixation, Aboveground N Accumulation, Acetylene Reduction, and Nodule Mass in Greenhouse and Studies with *Glycine max* L (Merr). *Plant Physiology* 77:53-58.
- VOGELES, G.; VAN DER, D. 1970. Differential Analyses of Glyoxylate Derivatives. *Analytical Biochemistry* 33:143-157.