

NOTA TÉCNICA

EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA AL ESTRÉS DE FÓSFORO EN CAUPÍ (*Vigna unguiculata* L. Walp) EN CUBA. I. CULTIVO EN SOLUCIÓN NUTRITIVA¹

Luis A. Gómez², Vincent Vadez³, Germán Hernández², Támara Sánchez²,
Vidalina Toscano², Mercedes Sánchez²

RESUMEN

Evaluación de la tolerancia al estrés de fósforo en caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) en Cuba. I. cultivo en solución nutritiva. La deficiencia de P es uno de los principales limitantes para la fijación simbiótica del nitrógeno y la producción de grano de las leguminosas en el trópico. Ocho genotipos de caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) de amplio uso agrícola en Cuba fueron cultivados en solución nutritiva con cantidades de P que variaron entre 50 y 500 μM por planta/ semana y dependieron, únicamente, de un modo de nutrición de N, fijación simbiótica del N_2 en el suministro de 4 μM de nitratos por planta/semana. Los resultados mostraron que el crecimiento foliar en las plantas de caupí fue severamente afectado por la deficiencia de P tanto para las plantas que fijaron N_2 como para las que dependieron del NO_3^- , mientras que el crecimiento radical fue incrementado. Para las plantas inoculadas con *Rhizobium*, la nodulación fue también afectada por el estrés de P, aumentando la actividad nodular específica. El crecimiento foliar de las plantas inoculadas fue mayor que el de las que se alimentaron con NO_3^- , debido a la mayor eficiencia en el uso del P y reveló el alto potencial de la especie para fijar N_2 .

ABSTRACT

Evaluation of tolerance to phosphorus shortage in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) in Cuba. I. nutritive solution culture. Phosphorus deficiency is a major limiting factor for symbiotic nitrogen fixation and grain yield of legume crops in the tropics. Eight cowpea genotypes of wide use in Cuba, were grown in hydroponics solutions; supplying from 50 to 500 μM of P/plant/week. Nitrogen nutrition was dependent upon symbiotic N_2 -fixation on adding of 4 mmol NO_3^- /plant/week. Shoot growth was severely limited by P deficiency, while dry weight of roots increased in both groups of plants. Nodule formation was severely decreased by P deficiency, while specific nodule activity was increased in the atmospheric N_2 fixing plants. Growth response of N_2 plants was higher than that of NO_3^- fed plants due to P use efficiency, and revealed a the great large N_2 -fixation potential of the specie.



INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es uno de los principales factores limitantes de la fijación simbiótica del nitrógeno en las leguminosas de grano, especialmente en los agrosistemas tropicales (Andrew y Robins 1969). Como en la mayoría de las áreas tropicales, casi el 50% de los suelos cubanos dedicados al cultivo de granos, vegetales y plátano son consideradas deficientes en fósforo (Beltran *et al.* 1992). Esta limitación en P ejerce un efecto especial sobre las leguminosas de granos que dependen de la fijación simbiótica del N_2 para su crecimiento, de-

bido a que cuando se nutren de nitrógeno por esta vía requieren más altas dosis de fertilizantes fosfóricos que cuando reciben N en forma mineral (Israel 1987). El efecto beneficioso de la fertilización fosfórica sobre las leguminosas en simbiosis con *Rhizobium* esta relacionado a tres aspectos fundamentales: a) estimulación del crecimiento de la planta hospedera; b) incremento de la producción de nódulos y c) incremento de la cantidad total de N fijado del aire, sin que se haya aclarado totalmente el efecto del P sobre el funcionamiento del nódulo (Ribet y Drevon 1995, Vadez *et al.* 1997, Al Niemi *et al.* 1998).

¹ Recibido para publicación el 24 de enero del 2002.

² Estación Experimental "La Renée". Instituto de Suelos. Quivicán. Provincia Habana. E mail: larenee@ceniai.inf.cu.

³ INRA. Montpellier. Francia.

En investigaciones llevadas a cabo en soya (Ribet y Drevon 1995) se ha demostrado que las plantas en simbiosis con *Rhizobium* y sometidas a estrés de P, cambian su distribución de volumen en diferentes partes, nodulan favoreciendo el crecimiento radical y reduciendo el crecimiento foliar y nodular, siendo este último el más perjudicado; a pesar de esta disminución en la producción de nódulos las plantas mantuvieron la actividad nodular específica a niveles similares que las plantas control.

Dentro de las leguminosas de granos, el caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) es quizás la especie menos estudiada en relación con este fenómeno, pues se considera con mayor tolerancia al estrés de P que otras especies de esta familia como la soya (Cassman *et al.*, 1981).

En Cuba el cultivo del caupí tiene gran popularidad debido a que constituye una alternativa para la producción de granos de consumo animal y humano en época de primavera - verano, así como para el empleo de su follaje como abono verde (Chailloux *et al.* 1996). Por lo general la mayor parte de la áreas que se cultiva se realiza empleando la inoculación con *Rhizobium* alternativa que permite un elevado ahorro en fertilizante nitrogenado (Hernández *et al.* 1994), sin que se haya realizado un estudio para definir el efecto de bajo suministro de P sobre el proceso de fijación simbiótica del N₂ en genotipos de uso agrícola en el país. Por ello el presente trabajo fue llevado a cabo para definir: a) mecanismos de tolerancia al estrés de P y b) Potencial de Fijación simbiótica en la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo 1 (S1)

Plántulas de caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) con 5 días de edad germinadas en arena estéril correspondiente a los genotipos Habana 82; Inifat '93 e Inifat '94 fueron cultivadas en frascos de suero de 750 ml de capacidad con solución nutritiva intensamente aireada (400 ml de aire/l solución/min.) similar a lo recomendado por Drevon *et al.* (1988), excepto que el fósforo fue añadido a partir de soluciones madres de KH₂PO₄ para alcanzar concentraciones de 50; 150; 250 y 500 µM/pl. Cuatro de las ocho plantas transplantada por cada genotipo a cada nivel de P fueron inoculados con 1

ml de un inoculante mixto (descrito posteriormente) y siendo reemplazada cada semana, excepto los primeros 15 días, con el fin de favorecer la nodulación. Para solucionar el déficit de N durante este tiempo a todas las plantas se le añadió 1 µM de nitrógeno en forma de urea, a partir del primer cambio de solución las plantas que no habían sido inoculadas con *Rhizobium* recibieron cada semana 4 µM de N en forma de KNO₃ mientras que las inoculadas con solución nutritiva libre de nitrógeno. El esquema experimental quedó conformado por un factorial de 3 (Genotipos) x 2 (Modos de N) x 4 (Niveles de P) organizados en bloques al azar con cuatro repeticiones.

Ensayo 2 (S2)

En este ensayo se estudiaron los genotipos de caupí siguientes: 1) Habana 82; 2) Viñales 144 A; 3) Caupí Empresa de Semillas; 4) P 903; 5) Cancarro Holguín; 6) Inifat 93 y 7) Inifat 94 con origen en el Instituto de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical (INIFAT) de Cuba y 8) California Blackeyes V de Estados Unidos., los genotipos 1, 2, 3 y 5 son indeterminados, 6, 7 y 8 determinados y 4 semideterminado. Las plantas se cultivaron en condiciones similares a las inoculadas con *Rhizobium* del ensayo S1, excepto que a las mismas se les suministró solo dos niveles de P, 50 y 250 µM por semana, considerados subóptimo y óptimo respectivamente a partir de los resultados del ensayo anterior, el diseño experimental quedó conformado por factorial de 8 (genotipos) x 2 (Niveles de P) se organizó de acuerdo a un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones.

Preparación del inoculante mixto

A partir del cultivo de *Rhizobium* sp. crecido en cubas de agar-levadura-Manitol (Vincent, 1970) correspondientes a las cepas RH1, RV1, RI1 y RI2 se inocularon frascos de suero con 200 ml del propio medio líquido y se hicieron crecer en zaranda rotatoria a 285 rpm durante 24 horas. El número total de células ml⁻¹ fue calculado empleando el método de dilución seriada y siembra en placa con el medio agarizado antes mencionado lo que permitió comprobar que los frascos tenían una concentración superior a 10⁹ bacterias ml⁻¹. Para confeccionar el inoculante mixto 100 ml de cada cepa se añadió a un erlenmeyer de 1L de capacidad formando una mezcla la cual fue agitada durante 3 horas quedando listo el inoculante para ser empleado.

Análisis de las plantas, cálculo de los diferentes parámetros y procesamientos estadísticos.

Las plantas se cortaron en la etapa desarrollo R7 y se separaron en parte aérea, raíz y nódulos y cada parte fue secada inmediatamente a 70 °C durante 72 h para determinar Masa Seca Aérea (MSA), Masa Seca Nodular (MSN) y Masa Seca Radical (MSR), posteriormente estas fueron molinadas y analizadas químicamente para hallar % de N y P empleando método de Kjeldhal, y Murphy y Riley, (1962).

El N₂ fijado por cada planta fue calculado empleando la fórmula siguiente: N₂ fijado = N total acumulado - (28 mg de N añadido + N en semilla) (Ribet y Drevon 1995). La actividad nodular específica fue calculada a partir de la relación entre el N₂ total fijado y MSN expresados en mg de N₂ fijado g de MSN⁻¹ día⁻¹, considerando que los nódulos no estuvieron aptos para fijar N del aire hasta pasado los primeros 15 días de edad de las plantas. La Eficiencia en el Uso del P en parte foliar (EUPF) se halló empleando la siguiente fórmula: (MSA)² / (% de P en el órgano) (Vadez *et al.* 1999).

Los datos fueron procesados para análisis de varianza empleando el software MSTATC versión 1.42.

RESULTADOS

El incremento en los suministros de fósforo semanales provocó un aumento significativo ($p \leq 0,001$) en el crecimiento foliar de las plantas de los tres genotipos de caupí estudiados independientemente del modo de nutrición con N (Figura 1); aunque la respuesta se diferencia con el genotipo y el modo de nutrición de N estudiado. El modelo de respuesta observado en cada

caso para crecimiento foliar fue similar al hallado para el parámetro acumulación de nitrógeno en el órgano y por tal razón no se incluyeron estos datos en el presente artículo.

De singular importancia fue el poder constatar que las plantas nutridas con N por la vía de la fijación simbiótica mostraron mayor o igual crecimiento foliar que las plantas nutridas con nitratos (Figura 1), mostrando el alto potencial de fijación simbiótica de los tres genotipos estudiados.

Debido a que los niveles de 50 y 250 μM de suministro de fósforo aparecieron como niveles deficientes y suficientes respectivamente para las plantas simbióticas de los tres genotipos se hace referencias a los datos evaluados a estos dos niveles de suministro de P, pues son los resultados más relevantes.

Las diferencias en crecimiento foliar observadas entre las plantas inoculadas con *Rhizobium* y las nutridas con nitratos se debieron a diferencias en el consumo de P para producir una unidad de follaje aéreo (Cuadro 1), parámetro que se registro como eficiencia de uso al P. Un análisis más detallado de los resultados permitió comprobar que a bajo suministro de P a las plantas (50 μM), los genotipos de Habana 82 e Inifat 93 nutridas por la vía simbiótica fueron entre 5 y 10 veces más eficiente en el uso del nutriente fósforo para producir una unidad de MSA que las plantas cultivadas a expensas de N mineral (Cuadro 1); mientras que en Inifat 94 no se observaron diferencias relacionadas a modo de nutrición nitrogenada.

Por otra parte, la producción de unidades de raíces no se afectó (plantas nutridas con nitrato) o incrementó significativamente (plantas nutridas por vía simbiótica)

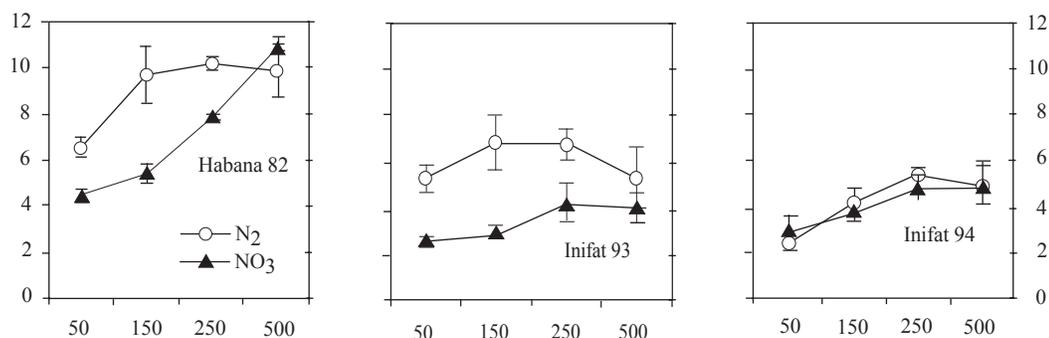


Figura 1. Influencia de la concentración de fósforo (expresados en μM planta⁻¹ semana⁻¹) sobre la producción de masa seca aérea (g planta⁻¹) de plantas de tres de genotipos de caupí cultivadas en solución nutritiva bajo dos modos de nutrición nitrogenada fijación simbiótica (N₂) y asimilación de 4mM de N en forma de nitratos (NO₃⁻). Los datos corresponden al Ensayo S1. Las barras representan la desviación estándar de los valores medios. Cuba.

Cuadro 1. Eficiencia de Uso al P para producción de masa seca área (MSA/%P) de tres genotipos de Caupí cultivados en Solución Nutritiva a dos Niveles de P y bajo dos Modos de Nutrición de N (Fijación Simbiótica y Asimilación de Nitratos). Ensayo S1. Cuba.

Genotipo	Modo de Nutrición de N	Eficiencia de Uso al P	
		50	250
Habana 82	Fijación Simbiótica	487 ± 50	435 ± 39
Habana 82	Asimilación de Nitratos	92 ± 26	162 ± 13
Inifat 93	Fijación Simbiótica	282 ± 15	199 ± 22
Inifat 93	Asimilación de Nitratos	29 ± 8	67 ± 11
Inifat 94	Fijación Simbiótica	68 ± 12	114 ± 11
Inifat 94	Asimilación de Nitratos	73 ± 9	96 ± 17

Nota: $S_x = 12,5$ ($p < 0,05$), para la interacción Modo de Nutrición de N x Genotipos x Niveles de P.

cuando se cultivaron las plantas con niveles de P deficientes para máximo crecimiento (Cuadro 2). Sin embargo el similar crecimiento radical de las plantas nutridas con nitratos ó el incremento en las plantas que fijaron N_2 para su crecimiento cultivadas en un subóptimo suministro de P solo pudo ser posible gracias al cambio en la distribución de masa entre los diferentes órganos de las plantas, pues a $50 \mu M$ de P las plantas produjeron más unidades de raíces por unidad de MSA (decrecimiento de la relación MSA/MSR) que las plantas cultivadas a $250 \mu M$ de P tanto para las fijadoras de N_2 del aire como las asimiladoras de nitratos (Cuadro 3).

Al ampliar el rango de estudio a ocho genotipos en el ensayo S2, se observó que cuando las plantas fueron cultivadas con deficiente suministro de P, la disminución significativa ($p < 0,001$) en la cantidad total de N_2 fijado (Figura 2 A), se debió solo al decrecimiento en la producción de nódulos por plantas (Figura 2 B) y no en la actividad nodular específica que lejos de disminuir

Cuadro 2. Producción de raíz ($g \text{ planta}^{-1}$) en plantas de tres genotipos de caupí cultivadas en solución nutritiva a dos niveles de P diferentes (50 y $250 \mu M \text{ planta}^{-1}$ semana⁻¹ y bajo dos modos de nutrición de N, fijación simbiótica (N_2) y asimilación de nitratos (NO_3^-). Los datos corresponden al ensayo S1. Cuba.

Genotipo	Modo de Nutrición de N	MSR ($g \text{ planta}^{-1}$)	
		50	250
Habana 82	Fijación Simbiótica	3,41 ± 0,57	2,01 ± 0,36
Habana 82	Asimilación de Nitratos	2,11 ± 0,10	1,99 ± 0,09
Inifat 93	Fijación Simbiótica	1,79 ± 0,27	1,38 ± 0,31
Inifat 93	Asimilación de Nitratos	1,34 ± 0,18	1,39 ± 0,35
Inifat 94	Fijación Simbiótica	1,76 ± 0,59	1,04 ± 0,20
Inifat 94	Asimilación de Nitratos	1,31 ± 0,09	1,38 ± 0,19

Nota: $S_x = 0,14$ ($p < 0,001$), para la interacción Modo de Nutrición de N x Genotipos x Niveles de P.

aumento significativamente ($p \leq 0,001$) por este fenómeno (Figura 2 C), como mecanismo para contrarrestar el efecto depresivo ejercido por la deficiencia de P sobre la nodulación.

Cuadro 3. Relación entre unidades de MSA y MSR (MSA/MSR) en plantas de tres genotipos de caupí cultivadas en solución nutritiva a dos niveles de P diferentes (50 y $250 \mu M \text{ planta}^{-1}$ semana⁻¹ y bajo dos modos de nutrición de N, fijación simbiótica (N_2) y asimilación de nitratos (NO_3^-). Cuba.

Genotipo	Modo de Nutrición de N	MSA/MSR	
		50	250
Habana 82	Fijación Simbiótica	1,98 ± 0,37	5,20 ± 0,97
Habana 82	Asimilación de Nitratos	2,13 ± 0,18	3,94 ± 0,12
Inifat 93	Fijación Simbiótica	3,03 ± 0,66	5,11 ± 0,47
Inifat 93	Asimilación de Nitratos	1,91 ± 0,10	3,08 ± 0,12
Inifat 94	Fijación Simbiótica	1,66 ± 0,70	5,41 ± 0,94
Inifat 94	Asimilación de Nitratos	2,46 ± 0,59	3,71 ± 0,39

Nota: $S_x = 0,43$ ($p < 0,05$), para la interacción Modo de Nutrición de N x Genotipos x Niveles de P.

DISCUSIÓN

Por lo general para leguminosa de grano se considera que: a) las plantas nutridas de N por fijación simbiótica producen menos follaje aéreo y tienen más alto requerimiento de P que las plantas que asimilan nitratos (Salsac *et al.* 1984, Israel 1987) y b) la disminución en la fijación de N_2 por estrés de P en plantas simbiótica es consecuencia tanto de la disminución en la producción de nódulos por plantas, como de la actividad nodular específica (Jacobsen 1985, Israel 1987, 1993, Sa e Israel 1991) lo que contradice los resultados expuestos en este trabajo.

Sin embargo varios estudios (Summerfield *et al.* 1977, Atkins *et al.* 1980, Khan y Khan 1981, Graham y Scott 1984, Atkins 1984, Cassman *et al.* 1981) llevados a cabo en caupí muestran que el potencial de fijación de N_2 de la especie permite que el crecimiento de estas plantas sea comparable con las fertilizadas con nitrógeno mineral, lo que esta en correspondencia con lo aquí mostrado; además no siempre los requerimientos de P de las primeras superan los de las segundas (Vadez, 1996).

Las diferencias en el comportamiento de la actividad de los nódulos frente al estrés de P entre la presente investigación y los reportes anteriores pueden deberse a: 1) diferencial respuesta de plantas de diferentes

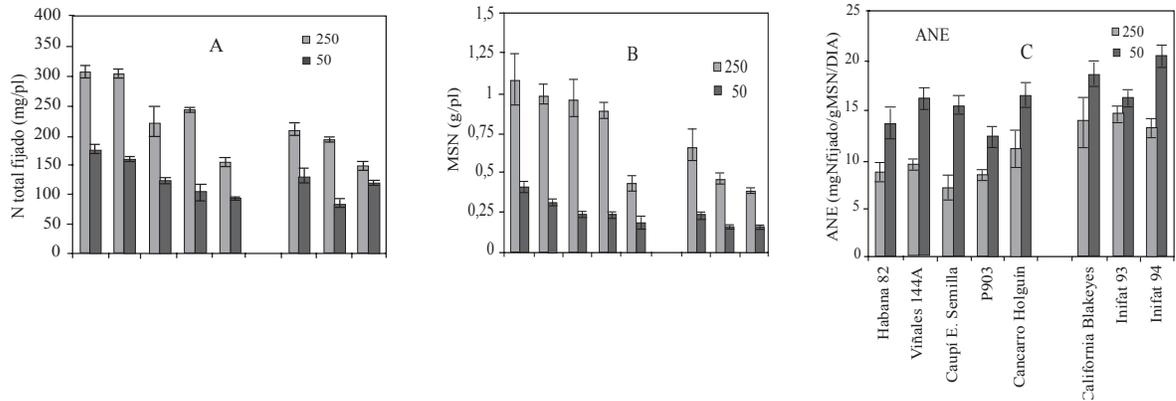


Figura 2. (A) N_2 total fijado ($mg\ planta^{-1}$), (B) masa seca nodula ($g\ planta^{-1}$), (C) actividad nodular específica ($mg\ de\ N\ fijado\ g\ MSN^{-1}\ día^{-1}$), en plantas de ocho genotipos de caupí cultivados en solución nutritiva a dos niveles de P (50 y 250) $\mu M\ planta^{-1}\ semana^{-1}$. Ensayo S2. Las barras indican la desviación estándar de los valores medios. Cuba.

especies ante el mismo fenómeno y 2) a que en la mayor parte de las investigaciones anteriores la fijación de N_2 fue registrada como actividad reductora del acetileno de raíces noduladas separadas de la parte aérea y cerradas en frascos herméticos lo cual ahora se sabe que es una metodología errónea para este tipo de investigación (Ribet y Drevon 1995).

El caupí es considerado una especie con gran habilidad para incorporar el P del suelo debido a que posee un sistema radical extenso, lo cual facilita una alta adsorción de nutrientes (Summerfield 1974, Fist *et al.* 1987, Marsh 1990). Sin embargo en este trabajo se muestra que plantas de la especie sometidas a estrés de P son capaces de incrementar la producción de unidades de raíces (Cuadro 2) a costa de cambio en la distribución de masa entre los distintos órganos de las plantas (Cuadro 3) como mecanismo para incrementar la eficiencia en la incorporación del nutriente fósforo como fue demostrado con anterioridad por Föhse *et al.* 1988 en otras especies de plantas; pero que en esta especie se hace más eficiente en plantas que se nutren de N por vía de la fijación simbiótica.

Cuando se comparó el comportamiento medio frente al estrés de P de plantas de caupí con plantas de frijol común en simbiosis con *Rhizobium* se pudo comprobar que el caupí fijó del aire un 30% más de nitrógeno que las plantas de frijol común con un 30% menos de P suministrado porque mostraron una mayor actividad nodular específica, un uso más eficiente del fósforo almacenado para acumular cada unidad de N fijado y distribuyeron el P extraído entre los diferentes órganos de la planta de manera diferente a las plantas de frijol común (Cuadro 4) lo cual reafirma resultados anteriores (Cassman *et al.* 1981) de que el caupí es una

especie dentro de las leguminosas de grano con alta tolerancia a la deficiencia del nutriente fósforo.

Este comportamiento de las plantas de caupí ante la deficiencia de fósforo puede explicar porque esta especie es más tolerante al estrés del nutriente que otras leguminosas de grano, siendo de gran importancia para definir que parámetros fisiológicos se deben mejorar en su capacidad para fijar N_2 del aire sin elevar la dosis de P fertilizadas cuando se cultivan en suelos con bajos contenidos de P disponibles.

Cuadro 4. Comparación entre varios parámetros fisiológicos relacionados con la fijación simbiótica del N_2 en caupí y frijol común bajo deficiencia de P. Cuba.

Días a cosecha	Frijol común	Caupí
	(media de 5 genotipos)	(media de 8 genotipos)
	50	48
P suministrado por semana	70 μM (12,6mg de P)	50 μM (9 mg de P)
N total fijado	90 mg	124 mg
Peso de los nódulos/planta	0,19 - 0,42(g)	0,19 - 0,40(g)
Actividad nodular específica	5,5 - 12,9	12,1 - 20,4
Eficiencia de uso al P	70	100
Contenido de P Foliar(%P)	0,07 - 0,10	0,10 - 0,21
Contenido de P nodular(%P)	0,40 - 0,50	0,42 - 0,47
Contenido de P en raíces(%P)	0,13 - 0,16	0,08 - 0,11
Proporción de P en los nódulos	6 - 12	8 - 19

Nota: Para el cálculo del comportamiento medio de las plantas de caupí frente al estrés de P se tomaron los resultados del ensayo S2 en el que incluyeron ocho genotipos (Habana 82; Viñales 144 A; P 903; California Blackeyes V; Inifat 93; Inifat 94 y Caupí Empresa de Semilla. En el caso del frijol común se tomaron datos de ensayos de la tesis de V. Vadez, 1996 que incluyó 5 genotipos (APN 18; Bat 271; G 2633; G 12168 y G 14665).

CONCLUSIONES

Las plantas de genotipos de caupí de uso agrícola en Cuba exhibieron un alto potencial para fijar N₂ del aire los que le permitió a las plantas inoculadas con *Rhizobium* igualar y hasta superar en crecimiento foliar a las plantas a las que se le suministró N en forma mineral, incluso con bajo suministro de P, este comportamiento se debió a que las primeras mostraron una mayor eficiencia del uso del P para acumular cada unidad de masa foliar. El bajo suministro de P a plantas de caupí en simbiosis con *Rhizobium* disminuye la producción de nódulos por planta; pero para contrarrestar este fenómeno, incrementaron la actividad nodular específica y la producción de raíz. La mayor tolerancia al estrés de P de plantas de caupí comparadas con otras leguminosas de grano como el frijol común se debe a que las mismas muestran una alta actividad nodular específica y eficiencia de uso al P y una elevada proporción de P a los nódulos y a la parte foliar órganos encargados de la fijación del N del aire y de la fotosíntesis respectivamente. Estos resultados muestran que los mecanismos fisiológicos empleado por las plantas de caupí simbióticas para contrarrestar la deficiencia de P son: elevada actividad nodular específica y eficiencia de uso al P, incremento en la producción de raíces y cambio en la distribución del P extraído.

LITERATURA CITADA

- ANDREW, C. A.; ROBINS, M. F. 1969. The effect of phosphorus on growth and chemical composition of some pasture legumes. II. Nitrogen, calcium, Potassium and sodium contents. *Aust. J. Agric. Res.* 20:275- 285.
- AL- NIEMI T.S, KAHN, M.L.; MC DERMOTT, T.R. 1998. Phosphorus uptake by bean nodules. *Plant and Soil*.198: 71 -78.
- ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; GRIFFITHS, G. J.; WHITE, S. T. 1980. Economy of carbon and nitrogen in nodulated and non nodulated (NO₃). *Plant, Phys.*66:978-983.
- ATKINS, C.A. 1984. Efficiencies and inefficiencies in the legumes/*Rhizobium* symbiosis. A Review. *Plant, Soil.* 82: 273 - 284.
- BELTRAN, R.; MUÑIZ, O; BATTLE, J.; DERONCELE, R. ; GONZÁLEZ, W. 1992. Registro de la Fertilidad de los Suelos de Cuba. Instituto de Suelo. 43 p. (mimeografía).
- CASSMAN, K.G; WHITNEY, A.S.; FOX, R.L. 1981. Phosphorus requirement of soybean and cowpea as affected by mode of nutrition . *Agron. J.* 73:17-23.
- CHAILLOUX, M; SÁNCHEZ, M.; HERNANDEZ, G.; MAESTREY, A. 1996. La producción de frijol caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp) en Cuba: Actulidad y Perspectiva . I Taller Internacional del Cultivo de la *Vigna* en el Trópico. Holguín Junio de 1996.
- DREVON, J.J; KALIA, V.C.; HECKMANN, M.O.; PEDELAHORE, P. 1988. *In situ* open-flow assay of acetylene reduction activity by soybean root-nodule : influence of acetylene and oxygen . *Plant, Physiol, Biochem.* 26 :73-78.
- FIST, A. J; SMITH, F.W.; EDWARDS, D.G. 1987. External phosphorus requirements of five tropical grain legumes growing in flowing - solution culture. *Plant, Soil.* 99: 75 - 84.
- FÖHSE, D; CLAANSEN, N; JUNK, A. 1988. Phosphorus efficiency of plant. I External and Internal P requirement and P uptake efficiency of different Plant species. *Plant and Soil*.110: 101 -109.
- GRAHAM, R.A; SCOTT, T.W. 1984. Response of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) to nitrogen and inoculation in Trinidad. *Tropical. Agriculture. (Trinidad)* 61:56-58.
- HERNÁNDEZ, G; TOSCANO, V.; VAZQUEZ, H.; GÓMEZ, L.A.; MENDEZ, N.; MOSQUERA, M. 1994. Uso y Manejo de inoculantes a base de *Rhizobium* en Vignas. IX. *In: Seminario Científico del INCA. San José. Provincia Habana. Cuba.*
- ISRAEL, D.W. 1987. Investigation of the role of phosphorus in symbiotic dinitrogen fixation. *Plant, Physiol.* 84: 835-840.
- ISRAEL, D.W. 1993. Symbiotic dinitrogen fixation and host-plant growth during development of and recovery from phosphorus deficiency. *Physiol, Plant.* 88:294-300.
- JACOBSEN, I. 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plant (*Pisum sativum*). *Physiol, Plant.* 64:190-196.
- KHAN, A.A.; KHAN, A.A. 1981. Effects on nitrate nitrogen on growth nodulation and distribution of C14 labelled photosynthates in cowpea. *Plant, Soil.* 63: 141- 145.
- MARSH, D.B.1990. Mineral Nutrition of Cowpea: Macronutrients. *In Cowpea Research A U.S. Perspective. Proceeding of the Second Southernpea (Cowpea).* Editado por Miller, J.C.; J.P. Miller y R.L., Fery.1990. Workshop pp. 32-40.
- MURPHY, J.; J.P. RILEY. 1962. A modified single solution method for determination of phosphate in natural water. *Anal, Chim,Acta .* 27:32-36.
- RIBET, J.; DREVON, J. J. 1995. Increase in permeability to oxygen and oxygen uptake of soybean nodule under li-

- miting phosphorus nutrition . *Physiol, Plant.* 94:298-304.
- SA, T.M.; ISRAEL, D.W. 1991. Energy status and functioning of phosphorus-deficient soybean nodules . *Plant, Physiol.* 97:928-935.
- SALSAC, L; DREVON, J.J.; ZENGBE, M.; CLEYET - MAREL, J.C.; OBATON, M. 1984. Energy requirement of symbiotic nitrogen Fixation. *Physiologie Vegetale.* 22:509 - 521.
- SUMMERFIELD, R.J; DART, P.J.; HULEY, P.A ; EAGLESHAM, A.R.J.; MICHIN, F.R.; DAY, J.M. 1977. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp). I. Effect of applied nitrogen and simbiotic nitrogen fixation on growth and seed yield : *Exp, Agric.* 13: 129 - 142.
- VADEZ, V. 1996. Variabilité génétique de la fixation d'azote sous carence en phosphore chez le haricot relations avec l'efficacité d'utilisation du P et la perméabilité nodulaire à l'oxygène. Ph D. Thesis Montpellier , France, 150 pp.
- VADEZ, V; BECK, D.P.; LASSO, J.H.; DREVON, J.J. 1997. Utilization of the acetylene reduction assay to screen for tolerance of symbiotic N₂ fixation to limiting P nutrition in common Bean . *Physiol, Plant* . 99:227-232.
- VADEZ, V; BECK, D.P.; LASSO, J.H.; DREVON, J.J. 1999. Variability of N₂ fixation in common Bean (*Phaseolus vulgaris*, L.) under deficiency in related to P use efficiency. *Euph.* 106: 231- 242.
- VINCENT, J.M.1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. IBP Handbook 15. Blackwell Scientific Publications, Ltd; Oxford.