



Nitrato de zinc más quitosano favorece la asimilación de carbono y el rendimiento en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)*

Application of zinc nitrate plus chitosan favors carbon assimilation and bean (*Phaseolus vulgaris* L.) yield

Bryan S. Valencia-Vázquez¹, Alejandro Palacio-Márquez¹, Carlos A. Ramírez-Estrada², Sandra Perez-Alvarez¹, Bertha A. Rivas-Lucero¹, Esteban Sánchez²

* Recepción: 1 de marzo, 2024. Aceptación: 9 de mayo, 2024. Este trabajo formó parte de la tesis del primer autor, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

¹ Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales, Delicias, Chihuahua, México. a329191@uach.mx (<https://orcid.org/0009-0006-5176-7166>); apalaciom@uach.mx (<https://orcid.org/0000-0001-8844-3890>); spalvarez@uach.mx (<https://orcid.org/0000-0002-9211-0797>); brivas@uach.mx (<https://orcid.org/0000-0001-5304-9340>).

² Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C., Delicias, Chihuahua, México. carlosramirez0021@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0001-5651-9264>); esteban@ciad.mx (autor para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0002-6845-4290>).

Resumen

Introducción. Una alternativa novedosa para el incremento de la productividad y aprovechamiento de nutrientes es el uso de bioestimulantes como el quitosano, el cual es un producto proveniente del exoesqueleto de crustáceos y tiene propiedades que promueven el crecimiento y la nutrición en los cultivos. **Objetivo.** Evaluar la aplicación de nitrato de zinc (NZN) más quitosano sobre la biomasa, rendimiento, actividad fotosintética y pigmentos fotosintéticos en plantas de frijol ejotero (*Phaseolus vulgaris* L.) para consumo de la vaina fresca. **Materiales y métodos.** El experimento se realizó en una casa sombra ubicada en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), ubicado en Delicias, Chihuahua, México; durante los meses de agosto a octubre de 2021. Se utilizó un diseño completamente al azar con ocho tratamientos y cuatro repeticiones, donde se aplicó nitrato de zinc vía foliar a dosis de 0, 25, 50 y 100 ppm con y sin quitosano a dosis de 50 ppm. Se evaluó la acumulación de biomasa, el rendimiento, actividad de la enzima nitrato reductasa *in vivo*, actividad fotosintética utilizando un equipo Licor 6400, el contenido de pigmentos fotosintéticos y la concentración de zinc foliar y en fruto. **Resultados.** Los resultados obtenidos indican incrementos para la variable de biomasa al aplicar dosis de 50 ppm de NZN y de 25 y 50 ppm de NZN más quitosano de 37,76 %, 42,39 % y 40,61 % respectivamente en relación con el control sin aplicación, mientras que para el rendimiento se obtuvo un incremento de 45,22 % cuando se aplicó NZN más quitosano a dosis de 25 ppm. La aplicación de quitosano de forma individual no presentó diferencias estadísticas. **Conclusiones.** La aplicación de nitrato de zinc más quitosano obtuvo incrementos para las variables de producción de biomasa total, rendimiento y contenido de Zn en fruto. Además, favoreció la actividad fotosintética y los parámetros relacionados con los pigmentos fotosintéticos.

Palabras clave: actividad fotosintética, bioestimulantes, clorofila, *Phaseolus vulgaris*.



Abstract

Introduction. A novel alternative to increase productivity and nutrient utilization is the use of biostimulants such as chitosan, which is a product derived from the exoskeleton of crustaceans and has properties that promote growth and nutrition in crops. **Objective.** To evaluate the application of zinc nitrate (NZN) plus chitosan on biomass, yield, photosynthetic activity and photosynthetic pigments in green bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) for consumption of the fresh pod. **Materials and methods.** The experiment was conducted in a shade house located at the Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), located in Delicias, Chihuahua, Mexico; during the months of August to October 2021. A completely randomized design with eight treatments and four replications was used, where zinc nitrate was applied via foliar at doses of 0, 25, 50 and 100 ppm with and without chitosan at a dose of 50 ppm. Biomass accumulation, yield, in vivo nitrate reductase enzyme activity, photosynthetic activity using Licor 6400 equipment, photosynthetic pigment content, and foliar and fruit zinc concentration were evaluated. **Results.** The results obtained indicate increases for the biomass variable when applying doses of 50 ppm NZN and 25 and 50 ppm NZN plus chitosan of 37.76 %, 42.39 % and 40.61 % respectively in relation to the control without application, while for yield an increase of 45.22 % was obtained when NZN plus chitosan was applied at a dose of 25 ppm. The application of chitosan individually did not show statistical differences. **Conclusions.** The application of zinc nitrate plus chitosan increased total biomass production, yield and Zn content in fruit. It also favored photosynthetic activity and parameters related to photosynthetic pigments.

Keywords: photosynthetic activity, biostimulants, chlorophyll, *Phaseolus vulgaris*.

Introducción

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las leguminosas más importantes para el consumo directo a nivel mundial y se encuentra dentro del grupo que posee más semillas comestibles particularmente en México, es la leguminosa de mayor consumo humano y representa el 36 % de la ingesta diaria de proteínas (Morales-Rivera et al., 2015). Después del maíz, el cultivo de frijol es el más importante en México, con una superficie sembrada promedio anual de 1,4 millones de hectáreas (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2024). Además, existen otros factores que hacen que tenga un lugar preferencial como su composición nutricional; ya que, es una fuente rica de proteínas y minerales, como el zinc y el hierro (De Ron et al., 2015).

Uno de los principales problemas para la agricultura es la selección del método adecuado para la aplicación de fertilizantes, lo cual limita la disponibilidad de nutrientes en las plantas y así promueve deficiencias, especialmente micronutrientes, lo que trae como consecuencia la baja productividad de los cultivos (Ugalde-Acosta et al., 2011). Una herramienta importante para solventar las deficiencias de micronutrientes en los cultivos es la fertilización foliar, la cual ha demostrado que puede mejorar el rendimiento y la calidad de los cultivos (Fernández et al., 2015).

La aplicación de zinc de manera foliar ayuda a la planta a tener una mayor productividad y crecimiento ya que juega un papel importante dentro de las plantas al ser un elemento necesario para producir clorofila, síntesis de proteínas y es clave en la producción de biomasa, de igual forma, el zinc es importante como cofactor en las enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo de las plantas (Palacio-Márquez et al., 2021). Sin embargo, las técnicas actuales de fertilización, tanto edáfica como foliar, son insostenibles debido al alto grado de contaminación y degradación que provocan en los ecosistemas, por lo que se deben buscar alternativas sustentables para mantener la productividad agrícola, una alternativa novedosa para el incremento de la productividad y aprovechamiento de nutrientes es el uso de bioestimulantes como el quitosano, el cual tiene propiedades que promueven el crecimiento

y la nutrición en los cultivos (Rivas-García et al., 2021). El quitosano es un bioestimulante que ha demostrado su actividad sobre la regulación del crecimiento, promoción de la germinación y el vigor de las plantas, además influye en el incremento del rendimiento agrícola (Singh et al., 2021).

En la actualidad, el quitosano puede representar una alternativa favorable para aumentar los rendimientos y reducir la contaminación ambiental debido al uso excesivo de fertilizantes y plaguicidas (Rivas-García et al., 2021). La aplicación combinada de diversas fuentes de zinc más quitosano tiene resultados favorables en la acumulación de biomasa, producción de frutos, concentración de Zn en hoja y fruto y la eficiencia de uso del agua en plantas de frijol ejotero cv. Strike, las cuales le permitieron una mejor adaptación y tolerancia al estrés hídrico (Mirbolook et al., 2020; Hernández-Figueroa et al., 2022).

Estos estudios posicionan al quitosano como uno de los compuestos más prometedores para utilizar en combinación con micronutrientes como lo es el Zn, debido a su amplia gama de características que incluyen biocompatibilidad y relación costo-beneficio (Mirbolook et al., 2020; Palacio-Márquez et al., 2022). Sin embargo, aún existen dudas sobre este compuesto como producto comercial aceptado, debido a la gran cantidad de productos en el mercado de diversas características y, que a su vez, causa resultados variables por lo que es necesario un mayor número de estudios para determinar sus efectos positivos sobre las plantas (Palacio-Márquez et al., 2022). Con base a lo anterior, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la eficiencia de la aplicación de nitrato de zinc más quitosano sobre la biomasa, rendimiento, actividad fotosintética y pigmentos fotosintéticos en plantas de frijol ejotero.

Materiales y métodos

Manejo del cultivo

El experimento se llevó a cabo bajo malla sombra con dimensiones 9 m² ubicada en las instalaciones del CIAD en Delicias, Chihuahua, México, con coordenadas: 28°10'21,6" Latitud N, 105°27'16,5" Longitud O. Con una altitud promedio de 1280 m s. n. m., temperatura media de 22,2 ± 7,8 °C y una humedad relativa promedio de 22,38 %. Se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), cv. Strike (consumo en ejote o vaina fresca de frijol), obtenidas de comercializadora Hydroenvironment S.A. de C.V. localizada en Tlanepantla, Estado de México, México. Las semillas se sembraron en charolas de poliestireno para su germinación y 10 días después de la siembra, cuando las plantas tenían una altura aproximada de 15 cm, se trasladaron en macetas de plástico con un diámetro de 30,5 cm y volumen de 13,4 L, se llenaron con un sustrato compuesto por vermiculita y perlita agrícola en una proporción 2:1 (v/v). Se colocaron dos plantas por maceta y se regaron con 500 mL de la siguiente solución nutritiva Hoagland modificada (Sánchez et al., 2006): 6 mM NH₄NO₃, 1,6 mM K₂HPO₄, 0,3 mM K₂SO₄, 4 mM CaCl₂, 1,4 mM MgSO₄, 5 μM Fe-EDDHA, 2 μM MnSO₄, 0,25 μM CuSO₄, 0,3 μM Na₂MoO₄ y 0,5 μM H₃BO₃; la cual se aplicó cada tres días durante los primeros 30 días después del trasplante (DDT) y diariamente los siguientes 30 días.

Diseño experimental

Se empleó un diseño experimental completamente al azar con ocho tratamientos. Estos consistieron en la aplicación de nitrato de zinc de la marca GoZinc[®] obtenido de la casa comercial Gowan-México, a dosis de 0, 25, 50 y 100 ppm, de manera individual y en combinación con quitosano a dosis de 50 ppm (Cuadro 1), el quitosano utilizado fue de la marca comercial Quitofyt[®] de la casa comercial Tecno-Orgánica. Cada tratamiento con cuatro

repeticiones, cada repetición consistió en una maceta con dos plantas. Los tratamientos se aplicaron vía foliar cada 10 días a partir de la aparición de las primeras hojas verdaderas a los 15 DDT, para un total de cuatro aplicaciones durante el experimento

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos aplicados vía foliar sobre plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, durante el periodo de septiembre-octubre de 2021 en Delicias, Chihuahua, México.

Table 1. Description of the treatments applied foliarly on bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, during the period of September-October 2021 on Delicias, Chihuahua, Mexico.

Tratamiento	Dosis de nitrato de zinc (ppm)	Quitosano	Clave
Control	0	No	Control
Control	0	Si	Control+Q
Nitrato de zinc	25	No	NZN25
Nitrato de zinc	50	No	NZN50
Nitrato de zinc	100	No	NZN100
Nitrato de zinc	25	Si	NZN25+Q
Nitrato de zinc	50	Si	NZN50+Q
Nitrato de zinc	100	Si	NZN100+Q

Muestreo vegetal

60 DDT, se cosecharon las plantas y se efectuaron dos lavados. El primer lavado se realizó con agua destilada y el segundo con agua tridestilada; posterior a los lavados, las plantas se dividieron en cuatro órganos: raíz, tallo, hoja, y fruto.

Análisis vegetal

Biomasa. Se obtuvo el peso seco de hoja, tallo, raíz y fruto con la ayuda de una balanza analítica. Para lo cual, se introdujeron a una estufa de secado (Shel-Lab 1380FX, Cornelius, OR, EE.UU.) a una temperatura de 70 °C por 48 horas. Los resultados se expresaron en gramos por planta en base a peso seco.

Producción. Se determinó el peso del total de frutos por planta con base a materia fresca con la ayuda de una balanza analítica y se expresó en gramos por planta.

Actividad nitrato reductasa "in vivo" (NR) (EC 1.6.6.1). Se determinó mediante el método propuesto por Sánchez et al. (2006). Las láminas foliares se cortaron en secciones de 7 mm y se colocaron en 10 mL de búfer de incubación (búfer de fosfato K 100 mM, pH 7,5 y propanol al 1 % (v/v)). Las muestras se infiltraron a una presión de 0,8 bars. Se incubaron a 30 °C en la oscuridad durante 1 h y finalmente se colocaron en un baño de agua hirviendo para detener la actividad NR. Después, se tomó 1 ml de extracto enzimático y se le adicionaron 2 mL de sulfanilamida al 1 % (p/v) en HCl 1,5 M y 2 mL al 0,02 % (p/v) N- (Diclorhidrato de 1-naftil) -etilendiamina en HCl 0,2 M. La concentración de nitrito resultante se determinó por espectrofotometría a 540 nm, frente a una curva patrón de NO₂⁻ con un rango de 0.25 a 2 µg.ml⁻¹. Los resultados se expresaron en µM de NO₂.gpf.h⁻¹

Actividad fotosintética. Se midió en hojas completamente desarrolladas sin ningún tipo de daño físico, tomadas de la parte media de la planta durante la etapa de llenado de fruto (50 DDT). Se utilizó un medidor portátil LI-COR 6400, se cuantificaron cuatro plantas por tratamiento, en cada planta se seleccionó una hoja sana de color homogéneo y libre de daños. Se utilizó una concentración de 400 $\mu\text{mol/ml}$ de CO_2 en la celda de referencia, en tanto que la celda de muestra se mantuvo en aproximadamente 380 $\mu\text{mol/ml}$ de CO_2 . El déficit de presión de vapor del aire de la cámara de muestra fue menor de 1,5 y la temperatura de bloque que alojó a la hoja fue de 25 °C. La actividad fotosintética se expresó como $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de CO_2 (Kocal et al., 2008).

Índice de clorofila. Se midió usando un lector de clorofila Minolta SPAD 502 para el cual se tomaron cinco hojas completamente expandidas (sin daños físicos y en partes libres de nervaduras) por cada planta y cuatro plantas por tratamiento. Se realizaron tres muestreos a través del desarrollo del cultivo, en la etapa de crecimiento vegetativo (lectura 1), etapa de floración (lectura 2) y etapa de amarre de fruto (lectura 3). Los resultados obtenidos se expresaron en unidades SPAD (Shrestha et al., 2012).

Pigmentos fotosintéticos. Se analizaron siguiendo la metodología de Wellburn (1994), para lo cual se recolectaron taleolas foliares de 7 mm de diámetro, libres de nervaduras con un peso aproximado de 0,125 g y se colocaron en tubos de ensayo. Seguidamente se adicionaron 10 mL de metanol a cada tubo de ensayo y se dejaron reposar durante 24 h en oscuridad. Pasado este tiempo se tomó a la lectura en un espectrofotómetro Genesis 10S UV-VIS a longitudes de onda de 666, 653 y 470 nm. Los resultados se expresaron en mg g^{-1} de peso fresco, para el cálculo de clorofila a se utilizó la ecuación 1, mientras que para clorofila b se utilizó la ecuación 2 y para carotenos la ecuación 3.

$$\text{Chl a} = [15,65(A666) - 7,34(A653)] \quad (1)$$

$$\text{Chl b} = [27,05(A653) - 11,21(A666)] \quad (2)$$

$$\text{Carotenos} = [(1000 * A470) - 2,86(\text{Chl a}) - 129,2(\text{Chl b})] / 221 \quad (3)$$

Concentración de zinc. Se determinó mediante el método propuesto por Wolf (1982). En el cual, se pesó un gramo de muestra seca y se agregaron 25 mL de mezcla triácida (88,9 % de HNO_3 , 8,9 % de HCl y 2,2 % de H_2SO_4) y se colocaron en un horno digestor a 300 °C. La muestra resultante se aforó a 50 mL con agua destilada (muestra principal). La lectura de zinc (Zn) se realizó mediante un espectrofotómetro de absorción atómica (Thermo Scientific™ iCE™ 3300 AAS).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de varianza, una prueba de separación de medias LSD con un intervalo de confianza de 95 %, utilizando el software SAS versión 9.

Resultados

Biomasa

En el presente estudio se encontraron diferencias estadísticas significativas para la variable de acumulación de biomasa ($p < 0,05$), destacando los tratamientos de NZN a 50 ppm y los tratamientos de NZN+Q a dosis de 25 y 50 ppm los cuales obtuvieron un incremento de 37,76 %, 42,39 % y 40,61 %, respectivamente con relación al control sin aplicación (Figura 1). Por su parte, la adición de quitosano de manera individual no presentó diferencias estadísticas respecto al tratamiento sin aplicación.

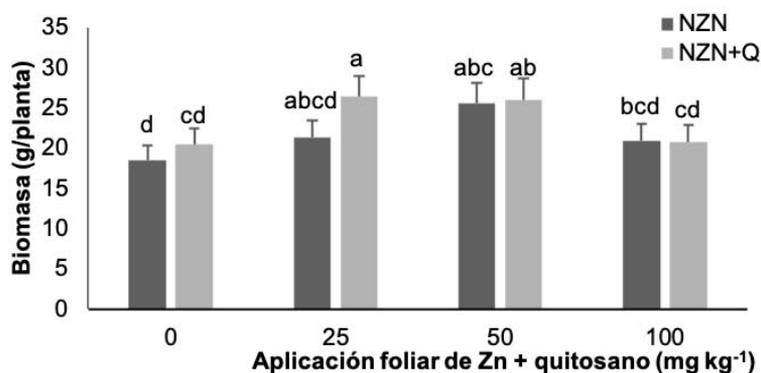


Figura 1. Efecto de la aplicación conjunta de nitrato de zinc y quitosano en la producción de biomasa (peso seco) de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, durante el periodo de septiembre-octubre de 2021 en Delicias, Chihuahua, México.

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher.

Figure 1. Effect of the joint application of zinc nitrate and chitosan on the biomass production (dry weight) of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, during the period of September-October 2021 on Delicias, Chihuahua, México.

Different letters indicate significant differences according to LSD Fisher test

Producción

Los resultados de rendimiento obtenidos en el presente estudio presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), encontrando un incremento de 45,22 % cuando se aplicó NZN+Q a dosis de 25 mg kg⁻¹, respecto al control sin aplicación y un incremento de 47,7 % en relación con el tratamiento de NZN+Q a 100 mg kg⁻¹ (Figura 2). La aplicación de quitosano no obtuvo diferencias estadísticamente significativas en comparación con la misma dosis sin aplicación de quitosano.

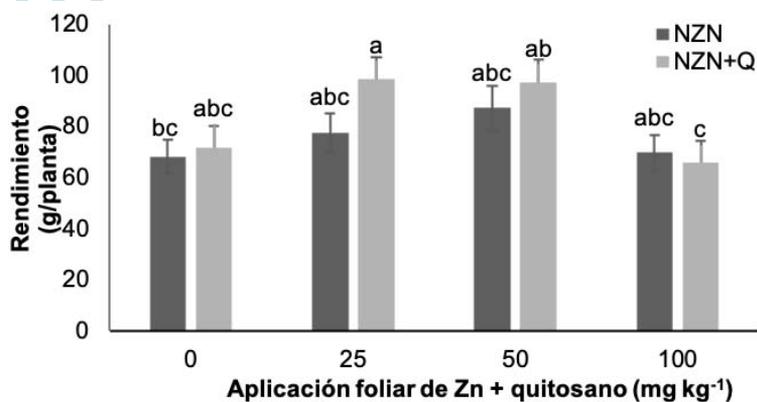


Figura 2. Efecto de la aplicación conjunta de nitrato de zinc y quitosano en el rendimiento (peso fresco) de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, durante el periodo de septiembre-octubre de 2021 en Delicias, Chihuahua, México.

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher.

Figure 2. Effect of the joint application of zinc nitrate and chitosan on the yield (fresh weight) of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, during the period of September-October 2021 on Delicias, Chihuahua, México.

Different letters indicate significant differences according to LSD Fisher test.

Actividad nitrato reductasa “in vivo”

En el presente estudio, se encontraron diferencias significativas en la actividad de la enzima NR ($p < 0,05$), encontrando que la aplicación de NZN a dosis de 50 mg kg^{-1} incrementó nueve veces su actividad respecto al control, con la aplicación de Zn no se encontraron diferencias significativas para los tratamientos de 25 y 100 mg kg^{-1} , pero se observó un incremento numérico para todos los tratamientos, mientras que la aplicación de quitosano no presentó diferencias estadísticas con el testigo sin aplicación (Figura 3).

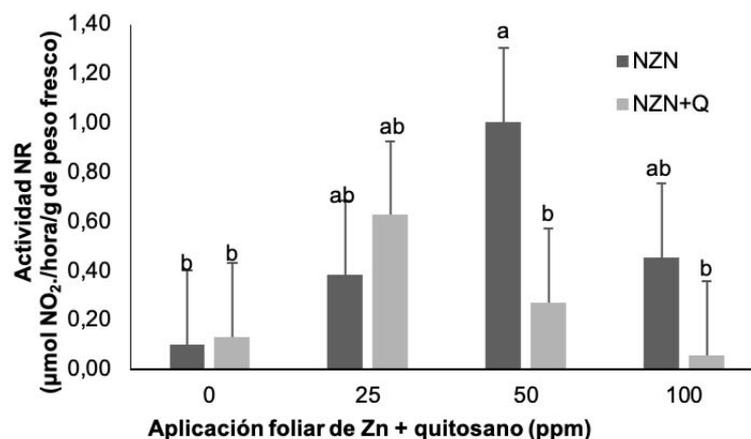


Figura 3. Efecto de la aplicación conjunta de nitrato de zinc y quitosano en la actividad NR de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, durante el periodo de septiembre-octubre de 2021 en Delicias, Chihuahua, México.

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher.

Figure 3. Effect of the joint application of zinc nitrate and chitosan on the NR activity of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, during the period of September-October 2021 on Delicias, Chihuahua, Mexico.

Different letters indicate significant differences according to LSD Fisher test.

Actividad fotosintética

En el presente estudio, la actividad fotosintética presentó diferencias significativas para el tratamiento de NZN a dosis de 25 mg.kg^{-1} ($p < 0,05$), encontrando que la aplicación de este tratamiento incrementó 48.37 % con respecto al control sin aplicación, mientras que la aplicación de quitosano no presentó diferencias estadísticas con el testigo (Figura 4).

Índice de clorofila

En el presente estudio de investigación las mediciones SPAD presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$). La aplicación de nitrato de Zn más quitosano obtuvo incrementos en relación con el control sin aplicación para todas las mediciones, además, dentro de las tres mediciones, la tercera presentó un descenso en los índices de clorofila, en comparación con las lecturas previas para los tratamientos de NZN, sin embargo, en los tratamientos donde se aplicó quitosano el descenso fue menor o se presentaron incrementos (Cuadro 2).

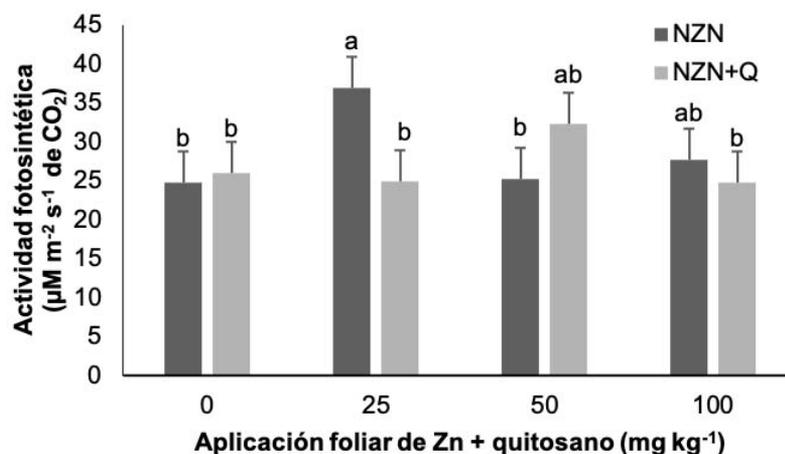


Figura 4. Efecto de la aplicación conjunta de nitrato de zinc y quitosano en la actividad fotosintética de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, durante el periodo de septiembre-octubre de 2021 en Delicias, Chihuahua, México.

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher.

Figure 4. Effect of the joint application of zinc nitrate and chitosan on the photosynthetic activity of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, during the period of September-October 2021 on Delicias, Chihuahua, México.

Different letters indicate significant differences according to LSD Fisher test.

Cuadro 2. Efecto de la aplicación conjunta de nitrato de zinc y quitosano en el índice de clorofila de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, durante el periodo de septiembre-octubre de 2021 en Delicias, Chihuahua, México.

Table 2. Effect of the joint application of zinc nitrate and chitosan on the chlorophyll index of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, during the period of September-October 2021 on Delicias, Chihuahua, México.

Tratamientos	Desarrollo	Floración	Amarre del fruto
	(Unidades SPAD)		
Control	37,00 cd	37,89 bc	36,61 c
Control+Q	34,64 d	37,76 c	36,98 bc
NZN25	40,44 ab	39,75 abc	37,72 bc
NZN+Q25	41,79 a	42,02 a	40,27 ab
NZN50	38,75 bc	38,13 bc	39,48 abc
NZN+Q50	40,22 ab	40,34 ab	41,34 a
NZN100	40,41 ab	39,66 abc	39,62 abc
NZN+Q100	41,15 ab	41,31 a	41,36 a

Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher. / Different letters indicate significant differences according to LSD Fisher test.

Pigmentos fotosintéticos

En el presente estudio, se encontraron diferencias significativas para los parámetros de clorofila total y carotenoides ($p < 0,05$), la aplicación de NZN + quitosano incrementó en promedio 34,99 % el contenido de clorofila total en relación con el control sin aplicación, mientras que la aplicación de NZN solo incremento 4,7 %. En cuanto al contenido de carotenoides se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$). Siendo la aplicación de NZN + quitosano la que mostró un incremento en promedio de 63,16 % el contenido de relación con el control sin aplicación, mientras que la aplicación de NZN presentó un decremento de 5,26 % (Figura 5).

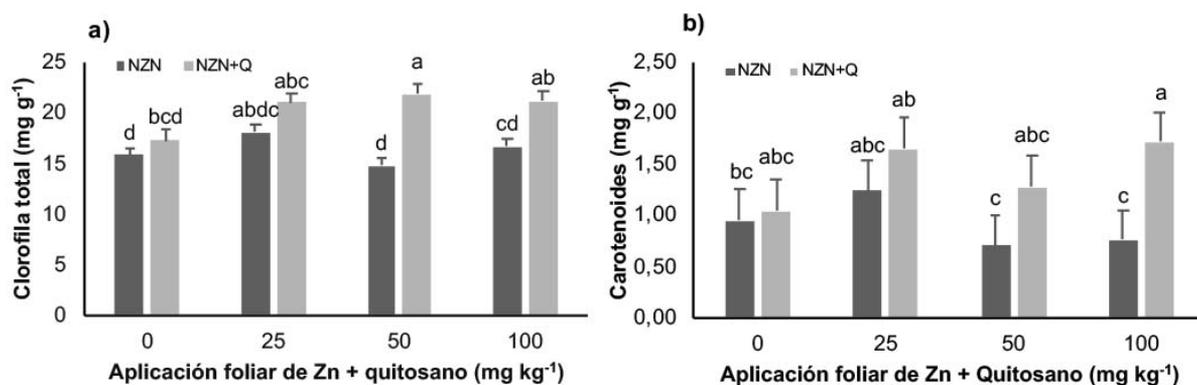


Figura 5. Efecto de la aplicación conjunta de nitrato de zinc y quitosano en el contenido de a) clorofila total y b) carotenoides, de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, durante el periodo de septiembre-octubre de 2021 en Delicias, Chihuahua, México. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher.

Figure 5. Effect of the joint application of zinc nitrate and chitosan on the content of a) total chlorophyll and b) carotenoids, of bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, during the period of September-October 2021 on Delicias, Chihuahua, México.

Different letters indicate significant differences according to LSD Fisher test.

Concentración de zinc

Se encontraron diferencias significativas para la concentración de zinc tanto en hoja como en fruto ($p < 0,05$). Todos los tratamientos aplicados incrementaron la concentración de Zn en hoja y fruto, aumentando progresivamente conforme se incrementaba la dosis de Zn (Figura 6). En el caso de la concentración en hoja los tratamientos con NZN encontraron ligeros incrementos para las tres dosis con relación a su contraparte de NZN+Q; mientras que para el fruto, los resultados para las dosis de 50 y 100 mg kg⁻¹ de NZN+Q obtuvieron valores inversos, incrementando la concentración en comparación con la aplicación de NZN en solitario, estos resultados indican que el quitosano en combinación con altas dosis de Zn pudiese incrementar la traslocación de micronutrientes hacia órganos sumideros como lo es el fruto.

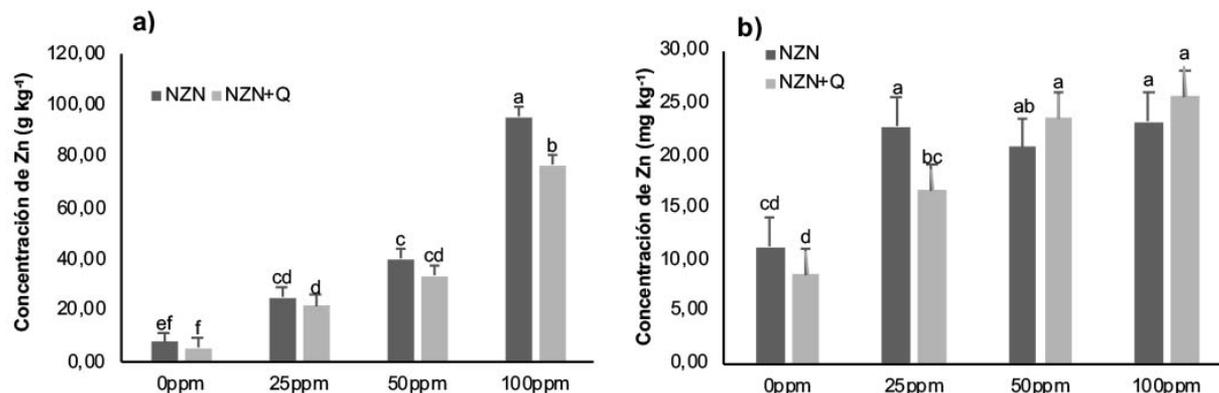


Figura 6. Efecto de la aplicación conjunta de nitrato de zinc y quitosano en la concentración de zinc en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, durante el periodo de septiembre-octubre de 2021 en Delicias, Chihuahua, México.

a) hoja, b) fruto. Letras diferentes indican diferencias significativas según la prueba LSD de Fisher.

Figure 6. Effect of the joint application of zinc nitrate and chitosan on the zinc concentration in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Strike, during the period of September-October 2021 on Delicias, Chihuahua, México.

a) leaf, b) fruit. Different letters indicate significant differences according to LSD Fisher test.

Discusión

La producción de biomasa es una de las variables más importantes para poder identificar el desarrollo óptimo de los cultivos (Sánchez et al., 2016). Resultados similares a los obtenidos en el presente estudio se encontraron al aplicar una fuente alterna de Zn en forma sulfato en combinación con quitosano en plantas de frijol cv. Nebraska, encontrando incrementos de entre 34 y 43 % en biomasa fresca (Ibrahim & Ramadan, 2015). De la misma manera, al combinar Zn más quitosano en plantas de frijol a dosis de 10 μ M en la solución nutritiva, alcanzó incrementos de hasta cuatro veces en biomasa seca (Mirbolook et al., 2020). El aumento en la producción de biomasa se puede atribuir a los efectos positivos del quitosano ante radicales libres de oxígeno, disminuyendo su contenido y evitando así el daño por oxidación, lo cual se ha relacionado con un mayor crecimiento vegetativo (Pichyangkura & Chadchawan, 2015). Previamente, se informó que la aplicación foliar de quitosano beneficia el crecimiento vegetativo principalmente bajo condiciones de estrés en diversos cultivos como el frijol, pimiento morrón, entre otros (Abu-Muriefah, 2013; Ghoname et al., 2010; Mondal et al., 2012).

Para la variable de rendimiento, estudios realizados previamente, mencionan que un exceso de Zn puede causar estrés en las plantas lo que afecta su desarrollo y rendimiento, por lo que pudiese explicar porque los tratamientos con las dosis altas obtuvieron los rendimientos más bajos (Sturikova et al., 2018). Para la producción de frijol ejotero en México, Salinas-Ramírez et al. (2012), reportan un promedio de 78 g por planta para frijol ejotero, por lo que los tratamientos de NZN a 50 ppm y NZN+Q a dosis de 25 y 50 mg kg⁻¹ superaron el promedio por planta en 9,3, 19,5 y 20,7g respectivamente. Estudios relacionados con la aplicación foliar de Zn foliar son de gran impacto en la agricultura ya que han obtenido resultados positivos en los cultivos mejorando el desarrollo de la planta e incrementando el rendimiento (Sida-Arreola et al., 2015). Estudios previos indican efectos positivos de la aplicación foliar de quitosano y mencionan que se puede mantener o mejorar la producción en plantas como el chile, frijol y tomate (Pichyangkura & Chadchawan, 2015).

La enzima Nitrato reductasa (NR) es la enzima que se encarga de transformar el nitrato de las plantas en nitrito para posteriormente ser asimilado y convertido a metabolitos nitrogenados, por lo que su reacción puede

ser inducida a la aplicación de nitrato (Maldonado, 2013). En cuanto a la variable NR, diversos estudios indican incrementos de 110 % al aplicar sulfato de Zn foliar en plantas de haba o incrementos de hasta 22 veces al aplicar 4 y 8 mg kg⁻¹ de un nanofertilizante a base de Zn y Mo (Mohamed et al., 2016; Ramírez-Estrada et al., 2022). La aplicación foliar de Zn aumenta la actividad NR, ya que este micronutriente actúa de manera indirecta sobre la asimilación de nitrógeno debido al que juega un papel fundamental para el desarrollo y en la síntesis de proteínas en las plantas (Hemantaranjan & Trivedi, 2015).

Los resultados obtenidos para la variable de actividad fotosintética coinciden con un estudio donde aplicaron zinc de manera foliar en concentraciones de 100 y 200 g ha⁻¹ en plantas de frijol, encontrando aumentos de 42 % en los parámetros relacionados con la fotosíntesis (Yeboah et al., 2021). El tratamiento de NZN+Q a dosis de 25 mg kg⁻¹, obtuvo el rendimiento más elevado en el presente trabajo de investigación, sin embargo, no obtuvo la mayor actividad fotosintética esto se puede explicar debido a que la actividad fotosintética en el frijol comienza a disminuir una vez se acerca al periodo de cosecha, encontrando su punto máximo en la etapa de floración (Chávez-Simental & Alvarez-Reyna, 2012). La actividad fotosintética es un proceso de gran importancia para el desarrollo de los cultivos ya que es la principal fuente de energía para las plantas, deficiencias de zinc pueden afectar este proceso disminuyendo la productividad (Almeraya-del Valle & Sánchez-Quintanar, 2015).

Para los parámetros relacionados con los pigmentos fotosintéticos, los resultados obtenidos para el índice de clorofila se encuentran dentro del rango de 35 a 50 unidades SPAD reportado para plantas de frijol (Medina-Pérez et al., 2018). Resultados similares a los presentados en el presente estudio se encontraron al combinar quitosano más una fuente de Zn, en este caso sin nitrato, encontrando aumentos de 2,5 veces el contenido de clorofila total y 2,3 veces el contenido de carotenoides, en plantas de frijol (Mirbolook et al., 2020). Mientras que, al aplicar diversas fuentes de zinc en plantas de frijol ejotero, encontraron incrementos de 25,4 % en el contenido de clorofila (Bautista-Díaz et al., 2021).

De la misma manera, al aplicar diversas fuentes de Zn de manera edáfica en frijol, obtuvieron aumentos en los niveles de clorofila de hasta 83 % en relación con el control sin la aplicación de zinc (Ponce-García et al., 2019). Los resultados encontrados para la variable de carotenoides presentaron una tendencia similar a los obtenidos para clorofila total lo que pudiera indicar que al igual que la clorofila, los niveles de carotenoides están relacionados con un correcto funcionamiento del metabolismo celular el cual se puede ver influenciado positivamente por la acción del quitosano (Hidangmayum et al., 2019; Ibrahim & Ramadan, 2015). Diversos estudios indican que la aplicación de quitosano de manera foliar aumenta el índice de clorofila, siendo una alternativa interesante sobre todo si la planta enfrenta situaciones de estrés (Abu-Muriefah, 2013; Behboudi et al., 2018; Mondal et al., 2012). Los niveles de clorofila están relacionados con una mayor eficiencia para obtener los nutrientes y un correcto funcionamiento del metabolismo celular y diversos estudios relacionan el efecto del quitosano sobre estos parámetros (Hidangmayum et al., 2019; Ibrahim & Ramadan, 2015).

La concentración de Zn en los tratamientos aplicados se encuentran por encima del límite publicado, en el cual mencionan que para la mayoría de las plantas una concentración de 20 mg kg⁻¹ en hojas maduras es suficiente para alcanzar un correcto desarrollo fisiológico, presentando síntomas de deficiencia por debajo de los 15 mg kg⁻¹ (Broadley et al., 2012). Otros autores consideran un mínimo de 25 ppm y un límite superior de 150 mg kg⁻¹ como valores óptimos para el correcto desarrollo de las plantas en general (Mitra, 2015).

Los resultados obtenidos coinciden con un estudio previo en el cual aplicaron la combinación de Zn más quitosano y obtuvieron valores entre 100 y 200 mg kg⁻¹ en la concentración de Zn para la parte aérea de plantas de frijol, presentando diferencias estadísticas en comparación con el testigo sin aplicación, además al calcular el factor de traslocación del Zn en la planta, encontraron incrementos en relación con el control sin aplicación (Mirbolook et al., 2020). Estudios previos mencionan el efecto del quitosano como quelatador de metales como Zn, relacionando los efectos benéficos que se le atribuyen al quitosano en el desarrollo de las plantas, con un posible rol como acarreador de metales dentro de la planta. Este fenómeno se presenta debido a que la estructura de este compuesto

facilita la unión de iones metálicos mediante intercambio iónico, formación de complejos y un encapsulamiento intra e intermolecular (Deshpande et al., 2017; Liu et al., 2014; Vasconcelos, 2014).

Estos resultados colocan al quitosano como una alternativa para aplicarse en combinación con fertilizantes que contengan zinc, ya que los datos presentados indican que potencializa los efectos positivos del zinc obteniendo mejores rendimientos y una mayor acumulación de biomasa, esto gracias a sus efectos sobre la concentración de este nutriente, el cual está relacionado con aumentos en el contenido de clorofila, lo que genera una mayor actividad fotosintética generando un mayor desarrollo en la planta. Finalmente, hay que indicar que se requiere un mayor número de estudios en cuanto al uso de nitrato de zinc en combinación con quitosano en la horticultura para determinar con certeza su efecto en la fisiología y nutrición de las plantas, además de comprobar sus efectos positivos en otros cultivos.

Conclusiones

La aplicación de nitrato de zinc más quitosano obtuvo incrementos para las variables de producción de biomasa, rendimiento y contenido de zinc en fruto y favoreció la actividad fotosintética y los parámetros relacionados con los pigmentos fotosintéticos. Además, la aplicación foliar de nitrato de zinc más quitosano a 25 mg kg⁻¹ ppm fue la dosis más eficiente en favorecer la acumulación de biomasa y el rendimiento en frijol ejotero, superando el promedio de 78 g por planta previamente reportado para la variedad Strike.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al laboratorio de Fisiología y Nutrición Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Delicias, por facilitar las instalaciones para llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

- Abu-Muriefah, S. S. (2013). Effect of chitosan on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants grown under water stress conditions. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*, 3(6), 192-199.
- Bautista-Diaz, J., Cruz-Alvarez, O., Hernández-Rodríguez, O. A., Sánchez-Chávez, E., Jacobo-Cuellar, J. L., Preciado-Rangel, P., Ávila-Quezada, G. D., & Ojeda-Barrios, D. L. (2021). Zinc sulphate or zinc nanoparticle applications to leaves of green beans. *Folia Horticulturae*, 33(2), 365-375. <https://doi.org/10.2478/fhort-2021-0028>
- Behboudi, F., Tahmasebi Sarvestani, Z., Kassae, M. Z., Modares Sanavi, S. A. M., Sorooshzadeh, A., & Ahmadi, S. B. (2018). Evaluation of chitosan nanoparticles effects on yield and yield components of barley (*Hordeum vulgare* L.) under late season drought stress. *Journal of Water and Environmental Nanotechnology*, 3(1), 22-39. <https://doi.org/10.22090/jwent.2018.01.003>

- Broadley, M., Brown, P., Cakmak, I., Rengel, Z., & Zhao, F. (2012). Function of nutrients: micronutrients. In P. Marschner (Ed.), *Mineral nutrition of higher plants* (pp. 191-248). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00007-8>
- Chávez-Simental, J. A., & Alvarez-Reyna, V. D. P. (2012). Ecofisiología de seis variedades de frijol bajo las condiciones climáticas de la Región Lagunera. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(2), 299-309. <http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/index.php/agricolas/article/view/1464>
- De Ron, A. M., Papa, R., Bitocchi, E., González, A. M., Debouck, D. G., Brick, M. A., Fourie, D., Marsolais, F., Beaver J., Geffroy, V., McClean, P., Santalla, M., Lozano, R., Yuste-Lisbona, F. J., & Casquero, P. A. (2015). Common bean. In A. De Ron (Ed.), *Grain legumes. Handbook of plant breeding* (Vol. 10, pp 1-36). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2797-5_1
- Almeraya-del Valle, É. V., & Sánchez-Quintanar, E. (2015). Adaptaciones fotosintéticas en las plantas para mejorar la captación del carbono. *Ciencia*, 79, 74-79. https://amc.edu.mx/revistaciencia/images/revista/66_4/PDF/AdaptacionesFotosinteticas.pdf
- Deshpande, P., Dapkekar, A., Oak, M. D., Paknikar, K. M., & Rajwade, J. M. (2017). Zinc complexed chitosan/TPP nanoparticles: a promising micronutrient nanocarrier suited for foliar application. *Carbohydrate Polymers*, 165, 394-401. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.061>
- Fernández, V., Sotiropoulos, T., & Brown, P. (Eds.). (2015). *Fertilización foliar. Principios científicos y prácticas de campo*. Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes.
- Ghonomie, A. A., El-Nemr, M. A., Abdel-Mawgoud, A. M. R., & El-Tohamy, W. A. (2010). Enhancement of sweet pepper crop growth and production by application of biological, organic, and nutritional solutions. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6(3), 349-355.
- Hemantaranjan, A., & Trivedi, A. K. (2015). Influence of boron and zinc on nitrate and nitrite reductase activity in roots and leaves, and sulfur containing amino acids, protein, and oil content in seeds of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *International Journal of Science Research & Science Technology*, 1(3), 30-38. <https://www.ijrst.com/IJSRST15133>
- Hernández-Figueroa, K. I., Sánchez-Chávez, E., Ojeda-Barríos, D. L., Chávez-Mendoza, C., Muñoz-Márquez, E., & Palacio-Márquez, A. (2022). Efectividad a la aplicación de bioestimulantes en frijol ejotero bajo estrés hídrico. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13(SPE28), 149-160. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3270>
- Hidangmayum, A., Dwivedi, P., Katiyar, D., & Hemantaranjan, A., (2019). Application of chitosan on plant responses with special reference to abiotic stress. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(2), 313-326. <https://doi.org/10.1007/s12298-018-0633-1>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.11.010>
- Kocal, N., Sonnewald, U., & Sonnewald, S. (2008). Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiology*, 148(3), 1523-1536. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127977>
- Liu, D., Li, Z., Zhu, Y., Li, Z., & Kumar, R. (2014). Recycled chitosan nanofibril as an effective Cu (II), Pb (II) and Cd (II) ionic chelating agent: adsorption and desorption performance. *Carbohydrate Polymers*, 111, 469-476. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.018>

- Maldonado, J. M. (2013). Asimilación del nitrógeno y del azufre. In J. Azcón-Bieto, & M. Talón (Eds.), *Fundamentos de fisiología vegetal* (pp. 287-303). McGraw-Hill Interamericana de España.
- Medina-Pérez, G., Fernández-Luqueño, F., Trejo-Téllez, L. I., López-Valdez, F., & Pampillón-González, L. (2018). Growth and development of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) var. pinto Saltillo exposed to iron, titanium, and zinc oxide nanoparticles in an agricultural soil. *Applied Ecology & Environmental Research*, 16(2), 1883-1897. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1602_18831897
- Mirbolook, A., Rasouli-Sadaghiani, M., Sepehr, E., Lakzian, A., & Hakimi, M. (2020). Synthesized Zn (II)-amino acid and-chitosan chelates to increase Zn uptake by bean (*Phaseolus vulgaris*) plants. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 831-847. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10151-y>
- Mitra, G. N. (2015). Regulation of nutrient uptake by plants. New Delhi: Springer, 10, 978-981. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2334-4>
- Mohamed, H. I., Elsherbiny, E. A., & Abdelhamid, M. T. (2016). Physiological and biochemical responses of *Vicia faba* plants to foliar application with zinc and iron. *Gesunde Pflanzen*, 68(4), 201-212. <http://dx.doi.org/10.1007/s10343-016-0378-0>
- Mondal, M. M., Malek, M. A., Puteh, A. B., Ismail, M. R., Ashrafuzzaman, M., & Naher, L. (2012). Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. *Australian Journal of Crop Science*, 6(5), 918-921. https://www.cropj.com/malek_6_5_2012_918_921.pdf
- Morales-Rivera, A., López-Castañeda, C., Kohashi-Shibata, J., Miranda-Colín, S., & García-Esteva, A. (2015). Comparación de los componentes del rendimiento en variedades de frijol en condiciones de acidez y humedad residual del suelo en el sur de Veracruz. *Terra Latinoamericana*, 33(4), 309-319. <https://www.terralatinoamericana.org.mx/index.php/terra/article/view/69>
- Palacio-Márquez, A., Ramírez-Estrada, C. A., Gutiérrez-Ruelas, N. J., Sánchez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Chávez-Mendoza, C., & Sida-Arreola, J. P. (2021). Efficiency of foliar application of zinc oxide nanoparticles versus zinc nitrate complexed with chitosan on nitrogen assimilation, photosynthetic activity, and production of green beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Scientia Horticulturae*, 288, Article 110297. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110297>
- Palacio-Márquez, A., Ramírez-Estrada, C. A., Sánchez, E., Ojeda-Barrios, D. L., Chávez-Mendoza, C., Sida-Arreola, J. P., & Preciado-Rangel, P. (2022). Use of biostimulant compounds in agriculture: chitosan as a sustainable option for plant development. *Notulae Scientia Biologicae*, 14(1), 11124-11124. <https://www.notulaebiologicae.ro/index.php/nsb/article/download/11124/9453>
- Pichyangkura, R., & Chadchawan, S. (2015). Biostimulant activity of chitosan in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 49-65. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2015.09.031>
- Ponce-García, C. O., Soto-Parra, J. M., Sánchez, E., Muñoz-Márquez, E., Piña-Ramírez, F. J., Flores-Córdova, M. A., ... & Yáñez Muñoz, R. M. (2019). Efficiency of nanoparticle, sulfate, and zinc-chelate use on biomass, yield, and nitrogen assimilation in green beans. *Agronomy*, 9(3), Article 128. <https://doi.org/10.3390/agronomy9030128>
- Ramírez-Estrada, C. A., Sánchez, E., Flores-Córdova, M. A., Chávez-Mendoza, C., Muñoz-Márquez, E., Palacio-Márquez, A., & Hernández-Figueroa, K. I. (2022). Efficiency and assimilation of nitrogen in bean plants through foliar application of zinc and molybdenum nano fertilizer. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 50(2), 12719-12719. <https://doi.org/10.15835/nbha50212719>

- Rivas-García, T., González-Gómez, L. G., Boicet-Fabré, T., Jiménez-Arteaga, M. C., Falcón-Rodríguez, A. B., & Terrero-Soler, J. C. (2021). Respuesta agronómica de dos variedades de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a la aplicación del bioestimulante con quitosano. *Terra Latinoamericana*, 39(7), 1-9. <https://doi.org/10.28940/terra.v39i0.796>
- Salinas-Ramírez, N., Escalante-Estrada, J. A., Rodríguez-González, M., & Sosa-Montes, E. (2012). Rendimiento y calidad nutrimental de frijol ejotero en dos ambientes. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 35(4), 317-323. <https://revistafitotecniamexicana.org/documentos/35-4/6a.pdf>
- Sánchez C. (2006). Caracterización del estado nutricional y fisiológico en plantas de judía (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Strike) sometidas a un estrés por nitrógeno. [Tesis doctoral, Universidad de Granada]. Repositorio DIGIBUG de la Universidad de Granada <https://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10481/1348/16475185.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, E., Ruiz, J. M., & Romero, L. (2016). Compuestos nitrogenados indicadores de estrés en respuesta a las dosis tóxicas y deficientes de Nitrógeno en frijol ejotero. *Nova Scientia*, 8(16), 228-244. <https://doi.org/10.21640/ns.v8i16.439>
- Shrestha, S., Brueck, H., & Asch, F. (2012). Chlorophyll index, photochemical reflectance index and chlorophyll fluorescence measurements of rice leaves supplied with different N levels. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 113, 7-13. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.04.008>
- Sida-Arreola, J. P., Sánchez, E., Ávila-Quezada, G. D., Acosta-Muñoz, C. H., & Zamudio-Flores, P. B. (2015). Biofortificación con micronutrientes en cultivos agrícolas y su impacto en la nutrición y salud humana. *Tecnociencia Chihuahua*, 9(2), 67-74. <https://vocero.uach.mx/index.php/tecnociencia/article/view/591>
- Singh, H., Sharma, A., Bhardwaj, S. K., Arya, S. K., Bhardwaj, N., & Khatri, M. (2021). Recent advances in the applications of nano-agrochemicals for sustainable agricultural development. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 23(2), 213-239. <https://doi.org/10.1039/D0EM00404A>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2024, abril 30). *Panorama agroalimentario 2023*. <https://online.pubhtml5.com/vqdk/rvdl/>
- Sturikova, H., Krystofova, O., Huska, D., & Adam, V. (2018). Zinc, zinc nanoparticles and plants. *Journal of Hazardous Materials*, 349, 101-110. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.01.040>
- Ugalde-Acosta, F. J., Tosquy-Valle, O. H., López-Salinas, E., & Francisco-Nicolás, N. (2011). Productividad y rentabilidad del cultivo de frijol con fertirriego en Veracruz, México. *Agronomía Mesoamericana*, 22(1), 29-36. <https://doi.org/10.15517/am.v22i1.8663>
- Vasconcelos, M. W. (2014). Chitosan and chitoooligosaccharide utilization in phytoremediation and biofortification programs: current knowledge and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 5, 616. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00616>
- Wellburn A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls a and b as well total carotenoids, using various solvents whit spectrophotometer of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144, 307-313. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)81192-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)81192-2)
- Wolf, B. (1982). A comprehensive system of leaf analyses and its use for diagnosing crop nutrient status. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 13(12), 1035-1059. <https://doi.org/10.1080/00103628209367332>
- Yeboah, S., Asibuo, J., Oteng-Darko, P., Asamoah Adjei, E., Lamptey, M., Owusu Danquah, E., Waswa, E., & Butare, L. (2021). Impact of foliar application of zinc and magnesium aminochelate on bean physiology and productivity in Ghana. *International Journal of Agronomy*, 2021, Article 9766709. <https://doi.org/10.1155/2021/9766709>