

## Actividad de fosfatasa ácida en suelos con adición de secreciones de raíces de dos leguminosas forrajeras

Jocelyne Ascencio\* y Dayana Pérez

Instituto de Botánica Agrícola. Laboratorio de Fisiología Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. Apdo 4579. Maracay 2101. Aragua, Venezuela

### RESUMEN

La enzima fosfatasa ácida (FA) secretada por hongos, microorganismos y raíces de las plantas, actúa sobre la materia orgánica produciendo una mineralización bioquímica del fósforo orgánico, siendo además indicadora de la actividad biológica del suelo. En este trabajo se comparó la actividad de la FA en tres suelos de las sabanas orientales del estado Guárico, Venezuela, clasificados dentro de los órdenes ultisol, entisol y vertisol con un bajo contenido natural de fósforo (inorgánico y orgánico), con y sin la adición de la secreción obtenida de raíces de *Centrosema rotundifolia* y *Crotalaria juncea*. La actividad de la FA se determinó incubando por 1 h a 37°C, 1 g de suelo con el sustrato p-nitrofenil-P en buffer pH 6,5 midiendo el p-nitrofenol formado a 405 nm. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ) en la actividad de la FA en los tres suelos y la mayor actividad en el suelo vertisol lo que podría indicar una mayor actividad biológica asociada a las características físico-químicas del suelo. Por otra parte, se observó que la adición de la secreción radical a los suelos aumentó la actividad de la FA ( $P < 0,05$ ), siendo mayor con la secreción de *Crotalaria juncea* que de *Centrosema rotundifolia* y en el suelo vertisol. Esto demuestra la importancia del tipo de suelo y de las secreciones radicales de diferentes especies de plantas a la rizósfera en la biodisponibilidad del fósforo-orgánico de estos suelos, por lo que ambas variables deben ser consideradas en conjunto, con sus interacciones y no en forma aislada.

**Palabras clave:** actividad biológica, *Centrosema*, *Crotalaria*, fosfohidrolasas, fósforo

### Acid phosphatase activity in soils with the addition of root secretions from two legume species

### ABSTRACT

Acid phosphatase (AP) released by fungi, microorganisms, and plant roots is important for organic-P mineralization in soils, as well as a potential indicator of biological activity. In this study, AP activity was compared among three low phosphorus savanna soils (ultisol, entisol, and vertisol) with and without addition of root secretions from *Centrosema rotundifolia* and *Crotalaria juncea*. Assay for AP activities were based on colorimetric estimation (405 nm) of the p-nitrophenol released when 1 g of soil was incubated with buffered pH 6.5 p-nitrophenyl-P for 1 h at 37°C. The results showed significant differences ( $P < 0,05$ ) in AP activity among soils and a greater activity for the vertisol, because of a higher biological activity associated to physic-chemical characteristics of this soil. Addition of root secretions increased ( $P < 0,05$ ) AP activity to a greater extent in the vertisol soil when root secretions from *Crotalaria juncea* were added. This demonstrates that root secretions and soil type exert an important influence on phosphorus bioavailability in these soils and should be considered as a whole in order to assess the importance of enzymes released from plant roots and microorganisms in phosphorus mineralization.

**Key words:** biological activity, *Centrosema*, *Crotalaria*, phosphohidrolasas, phosphorus.

---

\*Autor de correspondencia: Jocelyne Ascencio

E-mail: jocelyneorama@gmail.com

## INTRODUCCION

La actividad de la enzima fosfatasa ácida (FA) secretada por hongos, microorganismos y raíces juega un papel de gran importancia en la mineralización del fósforo orgánico en los suelos ya que actúa sobre la materia orgánica produciendo una mineralización netamente bioquímica (McGill y Cole, 1981; Gatiboni *et al.*, 2008; Dakora y Phillips, 2002; Walker *et al.*, 2003; Neumann y Romheld, 2007). Por otra parte, la FA es un indicador del potencial de un suelo para mineralizar fósforo orgánico (Pant y Warman, 2000) y de su actividad biológica (Maire *et al.*, 1999), debido a que la dinámica de la comunidad bacteriana y micorrítica en la rizósfera afecta la producción de enzimas solubilizadoras de fósforo (Gómez-Guiñan, 2004; Marschner y Baumann, 2003) y está correlacionada con el contenido de carbono orgánico del suelo (Juma y Tabatabai, 1978; Dodor y Tabatabai, 2003; Effron *et al.*, 2005). Por lo tanto, la actividad de la FA en suelos está directamente relacionada con el componente biótico y podría aumentar con la exudación de compuestos orgánicos y enzimas fosfohidrolíticas (Marschner y Baumann, 2003; Dakora y Phillips, 2002; Zhang *et al.*, 1997). En relación con lo anterior, se ha demostrado que la actividad de la FA tanto superficial de raíces (asociada a paredes celulares) como secretada por las células (soluble) aumenta con la deficiencia de fósforo en la planta (Kroheler y Linkins, 1988; Ascencio 1997a,b; Rao *et al.*, 1997).

La actividad de la FA es inducible en algunas especies de plantas bajo condiciones de deficiencia de fósforo (Tadano y Sakai, 1991; García y Ascencio, 1992; Ascencio, 1997a; Gilbert *et al.*, 1999), ya que se producen nuevas isoenzimas como lo demuestra el trabajo de Bozzo *et al.* (2002) en cultivo de células de tomate. Dado que la inducción de actividad de la FA se produce bajo condiciones de deficiencia de fósforo, es posible suponer que en suelos con contenido limitado de fósforo disponible la presencia de estas enzimas en el exudado o en la secreción radical podría ser un mecanismo para incrementar la mineralización del fósforo orgánico. Aunque existe suficiente información en relación con el comportamiento y las características de la FA secretada en tejidos y órganos vegetales, existe poca información relacionada con el efecto de la adición de secreciones producidas por las raíces de las plantas en diferentes suelos. En este sentido es importante destacar que la proteína enzimática puede formar complejos con las partículas minerales del suelo especialmente con la arcilla, el ácido tánico y agregados de naturaleza orgánica e inorgánica, ya que se inmoviliza y su actividad disminuye en comparación con la de la enzima libre (Rao *et al.*, 2000), por lo tanto es necesario conocer las características de los suelos para

poder llegar a conclusiones definitivas en relación con las razones del aumento o disminución de la actividad de la FA en diferentes tipos de suelos.

Por lo anteriormente expuesto, el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la adición de secreciones radicales obtenidas de plantas de *Centrosema rotundifolia* y *Crotalaria juncea* sobre la actividad de la FA en tres suelos con suplencia limitada de fósforo.

## MATERIALES Y METODOS

La actividad de la FA se determinó en suelos provenientes de la Estación Experimental La Iguana (Unesr), ubicada en las sabanas al noreste del estado Guárico, Venezuela. Las muestras utilizadas en esta investigación provienen de un trabajo anterior (Siso 2007), donde se colectaron tres tipos de suelos de sabana natural correspondientes a un entisol arenoso pH 4,90; un ultisol areno francoso pH 4,63 y un vertisol arcilloso pH 5,26. El contenido de fósforo disponible en estos suelos se muestra en el Cuadro 1. Los suelos, proporcionados por el Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad central de Venezuela en Maracay, fueron tomados en el horizonte genético superficial A.

Previo a la determinación de la actividad de la FA, las muestras de suelo fueron esterilizadas en autoclave a 121°C por 30 min en frascos cerrados. Los frascos se mantuvieron en estufa a 60°C hasta el momento de realizar las determinaciones ese mismo día.

### Determinación de la actividad de la FA

Para la determinación de la actividad de la FA en suelos se utilizó el método colorimétrico de Tabatabai y Bremmer (1969) y se siguió el procedimiento descrito por Tabatabai (1982) que consistió en incubar 1 g de suelo seco con 0,2 mL de tolueno (bacterioestático) y la solución amortiguadora compuesta por buffer tris-hidroximetil-amino metano/ácido maleico/ácido

**Cuadro 1.** Fósforo disponible obtenido por diferentes soluciones extractoras

Suelo	Solución extractora			
	Olsen	Bray I modif.	Melich I	Melich II
	----- mg/kg -----			
Entisol	8,75 (B) <sup>1</sup>	4,22 (B)	3,32 (B)	2,80 (B)
Vertisol	5,07 (B)	3,62 (B)	1,67 (B)	6,82 (B)
Ultisol	4,42 (B)	3,75 (B)	1,85 (B)	3,95 (B)

<sup>1</sup>B: Contenido bajo

Fuente: Siso (2007)

cítrico/ácido bórico/NaOH ajustada a pH 6,5 con HCl 0,1 M a la que se le adicionó el sustrato de la FA p-nitrofenilfosfato (pNFF) 25 mM, preparado con la misma solución amortiguadora. La mezcla de reacción se incubó a 37°C en baño maría durante 1 h agitando frecuentemente, al cabo de la cual se interrumpió la reacción con una solución 0,5M de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}:\text{NaOH}$  (1:1). La suspensión de suelo obtenida se filtró a través de papel de filtro Whatman N° 1 y se midió la absorbancia de la solución filtrada en un espectrofotómetro Spectronic-21 a 405 nm para determinar el p-nitrofenol (PNP) formado en la reacción de hidrólisis del (PNP) catalizada por la FA, mediante comparación con la curva patrón de PNP.

En las determinaciones con la secreción radical se utilizó adicionalmente un control con la secreción radical inactivada en baño maría a 100°C. Los resultados se expresan en  $\mu\text{g}$  PNP/g de suelo/h.

### Obtención de la secreción radical *in vivo*

Se utilizó la metodología de Tadano y Sakai (1991) modificada por Ascencio *et al.* (2011) que consistió en germinar las semillas de *C. rotundifolia* y *C. juncea* en arena de río desinfectada con formol y descarbonatada, y una vez obtenidas las plántulas se trasplantaron a recipientes de 900 mL con solución nutritiva Hoagland deficiente en fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 0,01 mM. Al cabo de 15 d las raíces de tres plantas intactas se encerraron dentro de tubos de diálisis (12-14 KDa, 49 mm diámetro y 300 mm de largo) con una solución de NaCl 100 mM. El tubo con la planta se transfirió a un envase de 3 L con NaCl 100 mM y se dejó a 23°C durante 24 h, al cabo de las cuales se colectó el contenido del tubo de diálisis. El filtrado claro y cristalino de cada lote de tres plantas se utilizó para los ensayos de actividad de la FA sobre los tres suelos mencionados. Cada determinación se realizó por triplicado.

### Ensayo de actividad de la FA en los suelos con la adición de la secreción radical

Para determinar el tamaño de la alícuota de la secreción de raíces a ser utilizada en las determinaciones de la actividad de FA en los suelos, se realizó un ensayo de actividad con 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 y 3,0 mL de la secreción radical. A partir de la relación actividad entre la FA y el tamaño de la alícuota, se seleccionó 2,0 mL como el tamaño de la alícuota de la secreción radical de *C. rotundifolia* y *C. juncea* a ser añadida a los suelos para las determinaciones de la actividad de la FA. Para los suelos con y sin adición de 2,0 mL de la secreción radical, se preparó un control para sustraer la absorbancia debida a impurezas y posible presencia de compuestos orgánicos extraíbles con

NaOH. Los controles se prepararon siguiendo el mismo procedimiento utilizado para las muestras, pero añadiendo el sustrato pNFF después de la adición de la solución  $\text{CaCl}_2:\text{NaOH}$ , esto es, inmediatamente antes de filtrar. En las determinaciones con la secreción radical se utilizó adicionalmente un control con la secreción radical inactivada en baño maría a 100°C.

### Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con un arreglo factorial de dos factores: extracto crudo de raíces de *C. rotundifolia* y *C. juncea* (dos niveles) y tipos de suelos provenientes del estado Guárico: entisol, ultisol y vertisol (tres niveles), para un total de seis tratamientos con seis repeticiones. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de medias con Tukey a nivel de  $P < 0,05$  utilizando el programa Statistix (2009).

## RESULTADOS

Como se observa en el Cuadro 2, los resultados del análisis de varianza demuestran que existen diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) en la variable actividad enzimática de la FA para las secreciones radicales de *C. rotundifolia* y *C. juncea* para los suelos y en la interacción secreción radical  $\times$  suelo, por lo que la adición de la secreción radical proveniente de cada una de las especies a cualquiera de los tres suelos bajo estudio, podría afectar la actividad de la enzima. Por otra parte, de acuerdo a la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, la secreción radical de *C. juncea* permitió una mayor actividad de la FA en  $\mu\text{g}$ PNP por gramo de peso fesco de raíces (g PF) por hora que la de *C. rotundifolia* independientemente del tipo de suelo (Cuadro 2). En relación con la actividad de la FA en los suelos testigos,

**Cuadro 2.** Actividad enzimática de la fosfatasa ácida para el efecto de la interacción de la secreción del extracto crudo de raíces de *Centrosema rotundifolia* y *Crotalaria juncea* y tres suelos provenientes del estado Guárico, Venezuela.

Suelo	Secreción	
	<i>Crotalaria juncea</i>	<i>Centrosema rotundifolia</i>
	----- $\mu\text{g}$ PNP/g raíz/h -----	
Vertisol	11,00 <sup>a</sup>	3,79 <sup>ab</sup>
Entisol	1,95 <sup>b</sup>	1,86 <sup>b</sup>
Ultisol	1,19 <sup>b</sup>	1,60 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup>Letras diferentes indican medias con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

a los que no se le adicionó la secreción radical, el suelo que presentó la mayor actividad ( $\mu\text{g PNP/g suelo/h}$ ) fue el vertisol ( $P < 0,05$ ); los suelos entisol y ultisol se comportaron de manera similar y no mostraron diferencias significativas entre ellos (Cuadro 3).

Cabe resaltar que la secreción radical de *C. juncea* en el suelo vertisol tuvo la mayor actividad de la FA ( $P < 0,05$ ) seguida por la de la secreción radical de *C. rotundifolia* con el mismo suelo, por lo que a diferencia de los otros dos suelos, el suelo vertisol mostró la mayor actividad de FA con la secreción radical de ambas especies (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran, que aunque se observaron diferencias entre los tres tipos de suelos, la actividad de la FA se ubicó muy por debajo de lo que se ha obtenido para otros tipos de suelos (Trasar-Cepeda *et al.*, 2000). Por otra parte, López *et al.* (1999) reportaron valores bajos de actividad de la FA en la rizósfera de plantas de sorgo y lo atribuyeron al efecto inhibitor del fósforo residual presente en el suelo. De acuerdo a los autores, esto evidencia el efecto inhibitor del fósforo disponible en el suelo. En el presente estudio, la actividad de la FA en el suelo vertisol fue significativamente mayor que en los suelos ultisol y entisol, entre los cuales las diferencias no fueron estadísticamente significativas, lo que podría indicar una mayor actividad biológica en el suelo vertisol.

Por otro lado, cuando se adicionó a los suelos la secreción radical de plantas de *C. rotundifolia*, se observó mayor actividad de la FA en el suelo vertisol en comparación con el ultisol y el entisol, aunque los valores siguieron la misma tendencia a lo observado en los suelos sin la secreción radical. La actividad de la FA en los suelos a los que se le adicionó la secreción radical de *C. rotundifolia* fue también significativamente mayor en el suelo vertisol, lo cual parece indicar que, en efecto, las raíces de las plantas actúan secretando enzimas como

la FA, pero que además, las características biológicas y fisicoquímicas de los suelos influyen en la modulación de la actividad.

Como se ha podido observar, la actividad de la FA fue diferente con la adición de secreción radical de *C. rotundifolia* o de *C. juncea*. En los suelos ultisol y entisol con adición de la secreción radical de *C. rotundifolia* se observaron diferencias no significativas en la actividad de la FA, estadísticamente menores que en el suelo vertisol. Por otra parte, con la adición de la secreción radical de *C. juncea* a los suelos se observó la misma tendencia de una menor actividad de la FA en los suelos ultisol y entisol y una actividad significativamente mayor en el suelo vertisol.

Los resultados de este estudio indican que tanto el tipo de suelo como el origen de la secreción radical (plantas de Centrosema o Crotalaria) tienen influencia sobre la actividad de la FA del suelo. La actividad de la FA, además de depender del componente biótico responsable de la secreción de la enzima (microorganismos, raíces de las plantas), está muy influenciada por otras propiedades fisicoquímicas del suelo, tales como pH, cantidad de materia orgánica y especialmente la cantidad de fósforo inorgánico (iones ortofosfato) producto de la mineralización, o añadido en forma de fertilizante comercial, que regulan o inhiben la actividad de la FA en los mismos. Los suelos utilizados para este estudio, provenientes de las sabanas orientales del estado Guárico, presentaron valores iniciales muy bajos tanto de fósforo inorgánico como de fósforo orgánico, posiblemente debido al bajo contenido natural de minerales con fósforo en estos suelos o a que los compuestos de fósforo se encuentran en sus formas más recalcitrantes y no disponibles (Siso, 2007). Las diferencias en pH se mantuvieron dentro del rango ácido y la cantidad de fósforo disponible; en los tres tipos de suelo se encuentra dentro del rango de contenido bajo. Aunque se ha observado inhibición de la actividad de las fosfomonoesterasas en los suelos, tales como la FA, debido a la presencia de fosfatos inorgánicos, esta inhibición depende del nivel de fosforo inorgánico en el suelo y disminuye cuando la cantidad de ortofosfato disminuye de 10 a 1  $\mu\text{mol}$  por gramo de suelo (Juma y Tabatabai, 1978). Habría que explorar esta posibilidad en un estudio futuro con estos suelos.

Las características de los suelos que fueron mencionadas anteriormente favorecen la actividad de la FA; sin embargo, la textura del suelo podría jugar un papel relevante, principalmente el contenido y tipo de arcilla, ya que la proteína enzimática podría ser secuestrada en la forma de un complejo arcilla-enzima, con lo cual se produciría una disminución apreciable de la actividad. Sin embargo, esto no podría explicar

**Cuadro 3.** Actividad enzimática de la fosfatasa ácida en tres suelos provenientes del estado Guárico, Venezuela.

Suelo	Actividad $\mu\text{g PNP/g suelo/h}$
Vertisol	7,3983 <sup>a</sup>
Entisol	1,9108 <sup>b</sup>
Ultisol	1,3992 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup>Letras diferentes indican medias con diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0,05$ ).

la mayor actividad de la FA en el suelo vertisol de textura arcillosa y la menor en el ultisol de textura areno francosa cuando se añadió a dichos suelos la secreción radical de las plantas, la cual contenía la enzima FA, que podría haber sido inmovilizada mediante la formación de complejos. El tipo y cantidad de materia orgánica en estos suelos también podría ayudar a explicar este comportamiento. Esta posibilidad no puede ser discutida con la información derivada de este trabajo.

Es importante aclarar que en todas las determinaciones de la actividad de la FA se adicionó a los suelos el substrato a excepción de los controles sin substrato, por lo tanto las diferencias observadas corresponden al efecto aditivo producido por la enzima presente en la secreción de raíces sobre el substrato artificial y los posibles substratos naturales presentes en el suelo, cuya hidrólisis también podría haber sido catalizada por la FA proveniente de la secreción radical.

En suelos sin esterilizar, como los de este estudio, parte de la actividad de la FA pudo haberse originado de la enzima proveniente de microorganismos del suelo. Los suelos utilizados en este estudio presentan niveles bajos de fósforo determinados por todas las metodologías empleadas (Siso, 2007) dentro de un rango menor a 5 mg/kg y de acuerdo a este autor, en estos suelos existe una fijación continua de fósforo, por lo que para que sea disponible para las plantas deben suceder una serie de transformaciones en el componente mineral del suelo. Desde un punto de vista fisiológico, las plantas en estas condiciones podrían utilizar como alternativa en el corto plazo, el mecanismo de inducción de actividad de enzimas fosfohidrolasas, como la FA en las raíces, para la disolución de fósforo orgánico (Rao *et al.*, 1997; Ascencio, 1997a; Gatiboni *et al.*, 2008; Ascencio *et al.*, 2011). La activación del mecanismo de inducción de actividad de la FA bajo condiciones de deficiencia de fósforo en el suelo es una respuesta compleja desde el punto de vista bioquímico, pero se produce fundamentalmente cuando la planta percibe la señal de deficiencia de este mineral en los tejidos. La secreción radical conjuntamente con la secreción/exudación de enzimas por bacterias, hongos y otros microorganismos del suelo (Walker *et al.*, 2003), actúa hidrolizando la fracción orgánica y liberando el fósforo inorgánico.

Tal como se discutió previamente, en este estudio el suelo vertisol presentó en todos los casos la mayor actividad de la FA con y sin la adición de secreciones radicales y por otra parte, la secreción obtenida de las raíces de *Crotalaria juncea* mostró una mayor actividad de la FA que la obtenida de raíces de *Centrosema rotundifolia*. Esto permite inferir que el efecto de plantas de *Crotalaria* sobre la biodisponibilidad de fósforo del suelo sería mayor que el de plantas de *Centrosema*.

## CONCLUSIONES

Los suelos de sabana, pobres en fósforo disponible, utilizados bajo las condiciones de este estudio mostraron baja actividad de la FA. La actividad de la FA fue diferente en los tres tipos de suelos, pero siempre fue mayor en el suelo vertisol. La adición de secreciones radicales provenientes de plantas de *Centrosema* y *Crotalaria* aumentó la actividad de la FA en los suelos observándose diferencias en actividad al utilizar las secreciones radicales de las dos especies de plantas. La mayor actividad se observó en el suelo vertisol con la adición de la secreción radical de *Crotalaria juncea*.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (Proyecto: 01.31.4908.2005) por el financiamiento de esta investigación y al Ing. Jorge Ugarte por la asistencia técnica durante la realización de los ensayos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ascencio, J. 1997a. Root secreted acid phosphatase kinetics as a physiological marker for phosphorus deficiency. *J. Plant Nut.* 20:9-26.
- Ascencio, J. 1997b. Kinetic properties and *in situ* visualization of acid phosphatase secretion from cowpea roots under P-deficiency. In Ando, T.; F. Kounosuke; M. Tadahito; M. Hideaki (Eds.) *Plant Nutrition for Sustainable Food Production and Environment*. Kluwer. Tokio, Japón. pp. 317-318.
- Ascencio, J.; G. Santana; J. Pacheco. 2011. Propiedades fosfohidrolíticas, alelopáticas y fungicidas de secreciones y exudados radicales de especies de importancia agronómica. Editorial Académica Española. Saarbrücken, Alemania. 85 pp.
- Bozzo, G.; K. Raghothama; W. Olkaxton. 2002. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isoenzymes from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *Eur. J. Biochem.* 269:6278-6286.
- Dakora, F.; D. Phillips. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environments. *Plant Soil.* 245:35-47.
- Dodor, D.; M. Tabatabai. 2003. Effect of cropping systems on phosphatases in soils. *J. Plant Nut. Soil Sci.* 166:7-13.

- Effron, D; M. Jimenez; R. Difrieri; J.Prause.2005. Relación de la actividad de fosfatasa ácida con especies forestales dominantes y con algunas propiedades del suelo de un bosque argentino. Inform. Tecn. 17:3-7.
- García, M; J.Ascencio.1992. Root morphology and acid phosphatase activity in tomato plants during development of and recovery from phosphorus stress. J. Plant Nutr. 15:2491-2503.
- Gatiboni, L; J. Kaminski; D. Dos Santos;G. Brunetto. 2008. Fósforo da biomasa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuicao do fosforo disponible no solo. Pesq. Agropec. Bras.43:1085-1091.
- Gilbert, G; J. Knight; C.Vance;D. Allan. 1999. Acid phosphatase activity in phosphorus deficient white lupin roots. Plant Cell Environ. 22:801-810.
- Gómez-Guiñan, Y. 2004. Actividad de las fosfatasa ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) en hongos de la rizósfera de *Arachis hypogaea* (Papiloneaceae). Rev. Biol. Trop. 52:287-295.
- Juma, N.; M. Tabatabai. 1978. Distribution of phospho-monoesterases in soils. Soil Sci. 126:101-108.
- Kroehler, C.; A. Linkins. 1988. The root surface phosphatases of *Eriophorum vaginatum*: effects of temperature, pH, substrate concentrations and inorganic phosphorus. Plant Soil. 105:3-10.
- López, M.; R. Ramírez.; J. Paolini. 1999. Actividad de la fosfatasa ácida en la rizósfera de tres cultivares de sorgo fertilizado con superfosfato triple y roca fosfórica. Agron. Trop. 49:119-134.
- Maire, N; D. Borcard; E. Lackzko;W. Matthey.1999. Organic matter cycling in grassland and strategies of the living communities. Soil Biol. Biochem. 31:281-293.
- Marschner, P; K. Baumann. 2003. Changes in bacterial community structure induced by mycorrhizal colonisation in split-root maize. Plant Soil. 251:279-289.
- McGill, W.; C. Cole. 1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. Geoderma 26:267-286.
- Neumann, G; V. Romheld. 2007. Root-induced changes in the availability of nutrients in the rhizosphere. In Pinton, R.; P. Naninpiéri (Eds.) The Rhizosphere. Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface. 2<sup>da</sup>ed. CRC Press. Nueva York. EUA. pp 23-72.
- Pant, H; P. Warman. 2000. Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases. Biol. Fertil. Soils. 30:306-311.
- Rao, I; V. Borrero; J. Ricaurte; R. García; M. Ayarza. 1997. Adaptive attributes of tropical forage species to acid soils.III. Differences in phosphorus acquisition and utilization as influenced by varying phosphorus supply and soil type. J. Plant Nutr. 20:155-80.
- Rao, M., A.Violante, L. Gianfreda. 2000. Interaction of acid phosphatase with clays, organic molecules and organ-mineral complexes: kinetics and stability. Soil Biol. Biochem. 32: 1007-1014.
- Siso, W.R. 2007. Estudio del fósforo en algunos suelos venezolanos. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía.Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 66 p.
- Statistix. 2009. Statistix Program. Analytical Software. Ver. 8.0. Tallahassee, EUA.
- Tabatabai, M. 1982. Soil enzymes. In: Page, A.L. (Ed.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy. Madison, EUA. pp. 903-947.
- Tabatabai, M.; J. Bremmer. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. Soil Biol. Biochem. 1:301-307.
- Tadano, T; H. Sakai. 1991. Secretion of acid phosphatases by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. Soil Sci.. Plant Nutr. 37:129-140.
- Trasar-Cepeda, C; M. Leirós; S. Seoane; F. Gil-Sotres.2000. Limitations of soil enzymes as indicators of soil pollution. Soil Biol. Biochem. 25:295-296.
- Walker, T; H. Palbais; D. Grotewol; J. Vivanco. 2003. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiol. 132:44-51.
- Zhang,F; J. Ma; Y. Cao.1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble organic phosphates by radish (*Raphanus sativus* L) and rape (*Brassica napus* L.) plants. Plant Soil. 196:261-264.