

FACULTAD DE AGRONOMÍA  
UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

# comisión de estudios de postgrado



POSTGRADO  
EN AGRONOMÍA

**Inducción de la actividad de enzimas fosfohidrolasas bajo condiciones de deficiencia de fósforo en plantas de *Crotalaria juncea* L.**

Giovanna F. Santana M.

Maracay, Diciembre de 2010

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
POSTGRADO EN AGRONOMÍA

**Inducción de la actividad de enzimas fosfohidrolasas bajo condiciones de  
deficiencia de fósforo en plantas de *Crotalaria juncea* L.**

Ing. Agr. Giovanna Santana

Tutora. Dra. Jocelyne Ascencio

Maracay, Diciembre de 2010

Para ser presentado a la Comisión de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, de conformidad con lo dispuesto en el Reglamento Interno de los Estudios de postgrado, como requisito final para optar al título de *Magister Scientiarum* en Agronomía, orientación Fisiología vegetal.

Tutora

Dra. Jocelyne Ascencio

Comité consejero

Dr. Orlando Guenni



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
POSTGRADO EN AGRONOMÍA  
MARACAY

## VEREDICTO

Quienes suscriben, Miembros del Jurado designado por el Consejo de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo de Grado presentado por la ciudadana **GIOVANNA FERNANDA SANTANA MIGLIACIÓN** Cédula de Identidad No. **15.991.687**, bajo el título "**INDUCCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ENZIMAS FOSFOHIDROLASAS BAJO CONDICIONES DE DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN PLANTAS DE *Crotalaria juncea* L.**" a los fines de cumplir con el requisito legal exigido para optar al grado de **Magíster Scientiarum en Agronomía**, dejan constancia de lo siguiente:

1. Leído como fue dicho Trabajo de Grado por cada uno de los Miembros del Jurado, éste fijó el día viernes 10 de diciembre de 2010, a las 09:00 a.m., para que el autora lo defendiera en forma pública, lo que ésta hizo en el Salón "D" del Doctorado en Ciencias Agrícolas, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente las preguntas que le fueron formuladas por el Jurado, todo ello conforme a lo dispuesto en los Artículos 45, 47, 50, 51, 52 y 53 del Reglamento de Estudios de Postgrado vigente.
2. Finalizada la defensa pública del Trabajo de Grado, el Jurado decidió **aprobarlo** con la valoración de **EXCELENTE** por considerar, sin hacerse solidario de las ideas expuestas por el autor, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado. Para dar este Veredicto el Jurado estimó que la obra examinada constituye un aporte de calidad significativa al conocimiento del comportamiento de las plantas bajo condiciones de deficiencia de fósforo y las respuestas metabólicas relacionadas con estos procesos en *Crotalaria juncea* L.

*Giovanna Santana Migliación*  
*[Signature]*



En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, en Maracay a los diez días del mes de diciembre de dos mil diez, dejándose también constancia de que, conforme en la normativa jurídica vigente, actuó como Coordinadora del Jurado, la Tutora Dra. Jocelyne Ascencio.

FIRMAN CONFORMES



**PhD. JOCELYNE ASCENCIO**  
**Coordinadora**  
**C.I. No. 5.019.713**



**PhD. JOSÉ V. LAZO**  
**C.I. No. 3.054.595**



**PhD. GANIMEDES CABRERA**  
**C.I. No. 1.382.163**

/Zully.-  
10/12/10

## DEDICATORIA

*A Dios y mis ángeles guardianes*

*A mi familia*

*A todo aquel que no ha dejado de creer en el mañana.*

## AGRADECIMIENTOS

- ✓ A Dios y a mis ángeles guardianes que siempre me acompañan.
- ✓ A mis padres, por todo el amor, el apoyo moral, económico y por acompañarme a regar las plantas cuando no había más nadie en la universidad. ¡Ustedes son lo mejor del mundo!
- ✓ A mis hermanos Leo, Juan, Melhayí, Nani y Miguel porque cada uno contribuyó sin saberlo a la culminación de este trabajo, colocando de vez en vez los peldaños para hacerme el camino un poco más fácil.
- ✓ Al Centro de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) por la beca que me permitió realizar estudios de Postgrado.
- ✓ A mi hermano mayor, Leo, por haber sido parte importante en los trámites de obtención de la beca.
- ✓ A mi tutora, Prof. Jocelyne Ascencio quien me guió, orientó, y estimuló para hacer bien este trabajo. Más que una tutora de tesis es un ejemplo de tenacidad, disciplina, y toda una gran persona.
- ✓ Al Prof. José Vicente Lazo por los aportes realizados a mi trabajo y por ser un digno ejemplo de trabajo y constancia.
- ✓ Al Ing. Agr. MsC Jorge Ugarte por toda la colaboración en las actividades del laboratorio.
- ✓ A mi amigo José Ángel López, quien siempre estuvo para apoyarme en cada momento. ¡Muchas gracias!!!
- ✓ A mi Profesor Ganímedes Cabrera por sus continuas enseñanzas, por los aportes en realizados a este trabajo y por la confianza que tiene puesta en mí.
- ✓ A la Profesora Dayana Pérez por todo el apoyo desde que comencé a estudiar la maestría y por prestarme un espacio en su oficina ☺
- ✓ A mis Profesores Cástor Zambrano y Orlando Guenni por su ayuda, orientación y por sus innumerables consejos que me sirvieron para seguir adelante aún bajo las adversidades.
- ✓ A los Profesores Omar castillo, Mario Garrido, Zenaida Lozano, Rosalía Velásquez, Mercedes Pérez Macías y Nelly Sanabria por su importante colaboración para poder llevar a cabo este trabajo.
- ✓ A los profesores Ángel Guadarrama y María Ferrarotto por la revisión del anteproyecto y los aportes realizados.

- ✓ Al Profesor Álvaro Anzalone por su aporte durante las correcciones de este trabajo.
- ✓ Al Dr. Eduardo Graterol por la donación de semillas de Crotalaria.
- ✓ Al Ing. Agr. Nelson Pérez por la donación de fertilizante.
- ✓ A mis muy pocos amigos, que contribuyen a liberarme del estrés del trabajo por un rato y con los que me río bastante: Yakari Barrios, Jorge González, Jesús Barroso, Juan Castillo, María Alcano, Luis Martínez, Jessica Guzmán, Cristian Fardella Alias “El padrino mágico”, Teida Hurtado, Nairobi Guzmán, Luis Martínez, Gledys Altuna, Armando Cruz.
- ✓ A mi “negrónomo” Jesús Barroso quien desde siempre me ha dado mucha fuerza y apoyo moral. Inmensamente agradecida por la compañía y el cariño.

Si se me olvida alguien, perdone...

## RESUMEN

En el presente estudio se cuantificó el crecimiento de la biomasa, longitud radical total, fotosíntesis, eficiencias de uso y absorción de fósforo, ácidos orgánicos de bajo peso molecular alrededor de la rizósfera, la inducción de enzimas fosfohidrolasas y valores preliminares de  $K_m$  y  $V_{máx}$  de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical "in vivo" de plantas de crotalaria juncea. Para tales fines, se estableció un diseño completamente aleatorizado con dos tratamientos de fósforo, suficiente (+P=0,86 mMP) y deficiente (-P=0,004 mMP), tomando muestras de plantas a los 15, 20, 25 y 30 días de edad. Los resultados indicaron que el  $P_i$  soluble foliar y el P total disminuyeron bajo -P, conllevando a reducciones en la tasa fotosintética, área foliar y biomasa seca total después de los 25 días de edad. A los 15 y 20 días de edad, las raíces fueron más largas bajo deficiencia de fósforo, sin observarse la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, lo cual se correlacionó con un bajo nivel de acidificación de la rizósfera en -P. Bajo esta condición, las plantas tuvieron una baja eficiencia de absorción de fósforo (EAP) pero una alta eficiencia en el uso (EUP). A los 15 días de edad se observó la inducción de mayor actividad enzimática para fosfatasa ácida, pero los resultados fueron inconsistentes para fitasa. Los estudios preliminares de cinética de fosfatasa ácida usando tres transformaciones de la relación  $v$  vs  $[S]$  mostraron bajos rangos de valores para  $K_m$  en -P en comparación a +P, pero no se pudo ver la saturación de la enzima con el sustrato en la curva. Los resultados confirman que la liberación de esta enzima contribuye a la tolerancia de crotalaria a la deficiencia de fósforo.

Palabras claves: fosfatasa ácida, deficiencia de fósforo, eficiencia de fósforo, fisiología de crotalaria.

## ABSTRACT

This study shows the growth of biomass, total root length, photosynthesis, efficiency of phosphorus absorption, phosphorus use efficiency, the concentration of organic acids of low molecular weight around the rhizosphere, phosphohydrolase enzyme induction and preliminary values of  $K_m$  and  $V_{max}$  of the enzyme acid phosphatase from the "in vivo" root secretion of *Crotalaria juncea* L. plants. For such aims, a complete randomized design with two phosphorus treatments was established; sufficient (+P= 0,86 mMP) and deficient (-P= 0,004 mMP). The samples were taken from plants at 15, 20, 25 and 30 days of age. The result indicated that leaf soluble  $P_i$  and total P decreased under the conditions of low P (-P), leading to reductions in photosynthetic rate, leaf area and total dry biomass after 25 days of age. At 15 and 20 days of age, the roots were longer under phosphorus deficiency, without being observed the release of organic acids of low molecular weight, which was correlated with a low level of acidification of the rhizosphere in -P. Under this condition, the plants had a high efficiency of phosphorus (EPA) and phosphorus use efficiency (PUE). At 15 days of age, the induction of greater acid enzymatic activity for phosphatase was observed, but the results were inconsistent for phytase. Preliminary kinetic studies of acid phosphatase using three transformations of the relationship  $V$  vs  $[S]$  showed with the substrate was observed in the curve. These results confirm that the release of this enzyme contributes to the tolerance of crotalaria to phosphorus deficiency.

**Key words:** Acid phosphatase; phosphorus deficiency, phosphorus efficiency, *Crotalaria*'s physiology.

## TABLA DE CONTENIDO

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| DEDICATORIA.....                                                                                                                                                                                                                                                                                       | i   |
| AGRADECIMIENTO.....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | ii  |
| RESUMEN.....                                                                                                                                                                                                                                                                                           | iii |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                                                                                                                                          | iv  |
| ÍNDICE DE FIGURAS.....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | v   |
| ÍNDICE DE CUADROS.....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | vi  |
| A. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1   |
| B. HIPÓTESIS.....                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 5   |
| C. OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO.....                                                                                                                                                                                                                                                                   | 5   |
| D. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL TRABAJO.....                                                                                                                                                                                                                                                              | 5   |
| <b>E. CAPÍTULO I: EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO SOBRE LA ACUMULACIÓN DE BIOMASA, LONGITUD RADICAL, TASA DE FOTOSÍNTESIS, FÓSFORO SOLUBLE EN TEJIDOS, EFICIENCIA EN EL USO Y ABSORCIÓN DEL FÓSFORO Y LIBERACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN LA RIZÓSFERA EN PLANTAS DE <i>Crotalaria juncea</i> L.</b> |     |
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 7   |
| 2. OBJETIVO GENERAL DEL CAPÍTULO I.....                                                                                                                                                                                                                                                                | 9   |
| 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL CAPÍTULO I.....                                                                                                                                                                                                                                                           | 9   |
| 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 10  |
| 4.1. Generalidades del cultivo de crotalaria.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 10  |
| 4.2. Crotalaria como abono orgánico y cobertura vegetal.....                                                                                                                                                                                                                                           | 11  |
| 4.3. Crotalaria en el control biológico.....                                                                                                                                                                                                                                                           | 12  |
| 4.4. Fósforo en el suelo.....                                                                                                                                                                                                                                                                          | 13  |
| 4.5. Absorción de fósforo por las raíces y su transporte en la planta.....                                                                                                                                                                                                                             | 14  |
| 4.6. Fósforo en las plantas .....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 16  |
| 4.6.1. Fósforo estructural.....                                                                                                                                                                                                                                                                        | 16  |
| 4.6.2. Fósforo en el metabolismo.....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 16  |
| 4.7. Efecto de la deficiencia de fósforo sobre el crecimiento de las plantas.....                                                                                                                                                                                                                      | 19  |
| 4.7.1. Parte aérea.....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 19  |

|                                                                                                                                                                      |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.7.2. Raíces .....                                                                                                                                                  | 20 |
| 4.8. Dinámica en la rizósfera .....                                                                                                                                  | 22 |
| 4.8.1. Acidificación de la rizósfera y producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular para promover la liberación de fósforo poco disponible en el suelo..... | 23 |
| 4.9. Eficiencia de uso y de absorción de fósforo en plantas sometidas a deficiencia .....                                                                            | 29 |
| <br>                                                                                                                                                                 |    |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                                                                                                         | 32 |
| 5.1. Localización del experimento.....                                                                                                                               | 32 |
| 5.2. Registro de variables climáticas y condiciones generales del cobertizo.....                                                                                     | 32 |
| 5.3. Material vegetal y manejo del ensayo.....                                                                                                                       | 32 |
| 5.4. Preparación de la solución nutritiva.....                                                                                                                       | 34 |
| 5.5. Diseño experimental y toma de muestras.....                                                                                                                     | 34 |
| 5.6. Variaciones de pH en la solución nutritiva.....                                                                                                                 | 35 |
| 4.1. Cuantificación del crecimiento de las plantas bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo.....                                                     | 35 |
| 5.7.1. Determinación del área foliar .....                                                                                                                           | 35 |
| 5.7.2. Determinación de la biomasa seca.....                                                                                                                         | 35 |
| 5.7.3 Determinación de la longitud radical.....                                                                                                                      | 36 |
| 5.8. Mediciones de fotosíntesis en plantas.....                                                                                                                      | 37 |
| 5.9. Cambios de pH en la rizósfera .....                                                                                                                             | 37 |
| 5.10. Observación “in vivo” de la liberación de ácidos orgánicos por las raíces de <i>Crotalaria juncea</i> .....                                                    | 37 |
| 5.11. Contenido de fósforo inorgánico soluble en hojas.....                                                                                                          | 38 |
| 5.12. Contenido de fósforo total en la materia seca.....                                                                                                             | 38 |
| 5.13. Eficiencia de uso y absorción de fósforo.....                                                                                                                  | 38 |
| 5.14. Análisis de los resultados.....                                                                                                                                | 39 |
| 6. RESULTADOS.....                                                                                                                                                   | 40 |
| 6.1. Condiciones climáticas en el cobertizo.....                                                                                                                     | 40 |
| 6.2. Variaciones de temperatura en la solución nutritiva.....                                                                                                        | 40 |
| 6.3. Crecimiento de las plantas bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de                                                                                     |    |

|                                                                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| fósforo.....                                                                                                                                                                                                | 41 |
| 6.3.1. Área foliar.....                                                                                                                                                                                     | 42 |
| 6.3.2. Biomasa seca.....                                                                                                                                                                                    | 44 |
| 6.3.3. Longitud radical total.....                                                                                                                                                                          | 47 |
| 6.4. Tasa de fotosíntesis.....                                                                                                                                                                              | 50 |
| 6.5. Cambios de pH en la rizósfera .....                                                                                                                                                                    | 50 |
| 6.6. Producción de ácidos orgánicos.....                                                                                                                                                                    | 51 |
| 6.7. Contenido de fósforo en la planta y eficiencia de uso y absorción.....                                                                                                                                 | 53 |
| 6.7.1. Pi soluble foliar.....                                                                                                                                                                               | 53 |
| 6.7.2. Fósforo total y eficiencias de uso y absorción de fósforo.....                                                                                                                                       | 54 |
| 7. DISCUSIÓN.....                                                                                                                                                                                           | 58 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DEL CAPÍTULO I.....                                                                                                                                                           | 65 |
| <b>F. CAPÍTULO II: ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS FOSFATASA ÁCIDA Y FITASA<br/>EN LA SECRECIÓN RADICAL DE <i>Crotalaria juncea</i> BAJO CONDICIONES<br/>DE SUFICIENCIA Y DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN LA PLANTA.</b> |    |
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                                                                        | 77 |
| 2. OBJETIVO GENERAL DEL CAPÍTULO II.....                                                                                                                                                                    | 79 |
| 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL CAPÍTULO II.....                                                                                                                                                               | 79 |
| 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....                                                                                                                                                                              | 80 |
| 4.1 Estrategias que emplean las plantas bajo deficiencia de fósforo.....                                                                                                                                    | 80 |
| 4.2. Enzimas fosfohidrolasas.....                                                                                                                                                                           | 82 |
| 4.2.1. Enzima Fosfatasa ácida (FA) en plantas y en suelo.....                                                                                                                                               | 82 |
| 4.2.2. Enzima Fitasa (FI).....                                                                                                                                                                              | 87 |
| 4.3. Cinética de las enzimas.....                                                                                                                                                                           | 89 |
| 4.3.1. Cinética de la enzima Fosfatasa ácida (FA).....                                                                                                                                                      | 89 |
| 4.3.2. Cinética de la enzima Fitasa.....                                                                                                                                                                    | 93 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....                                                                                                                                                                                | 95 |
| 5.1. Material vegetal y manejo del ensayo.....                                                                                                                                                              | 95 |
| 5.2. Recolección <i>in vivo</i> de la secreción radical.....                                                                                                                                                | 96 |
| 5.3. Actividad enzimática.....                                                                                                                                                                              | 97 |
| 5.3.1. Determinación del tamaño de la alícuota de la secreción radical .....                                                                                                                                | 97 |
| 5.3.2. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de<br>fosfohidrolasas.....                                                                                                                        | 98 |

|                                                                                                                                          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.3.3. Efecto de la Temperatura sobre la actividad de fosfatasa<br>ácida.....                                                            | 98  |
| 5.3.4. Efecto del pH sobre la actividad de fosfatasa ácida.....                                                                          | 99  |
| 5.4. Determinación preliminar de las contantes $V_{m\acute{a}x}$ y $K_m$ aparentes de la<br>fosfatasa ácida en la secreción radical..... | 99  |
| 6. RESULTADOS.....                                                                                                                       | 100 |
| 6.1. Actividad enzimas fosfohidrolasas.....                                                                                              | 100 |
| 6.2. Valores preliminares de las constantes $V_{m\acute{a}x}$ y $K_m$ aparentes de la<br>fosfatasa ácida de la secreción radical.....    | 107 |
| 7. DISCUSIÓN.....                                                                                                                        | 113 |
| 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DEL CAPÍTULO II.....                                                                                       | 122 |
| G. DISCUSIÓN GENERAL.....                                                                                                                | 129 |
| H. CONCLUSIONES.....                                                                                                                     | 135 |
| I. ANEXOS.....                                                                                                                           | 137 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

| Figura |                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | Pág. |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | Solubilización de un compuesto inorgánico de fósforo por la producción de ácidos orgánicos. Fuente: modificado por Bobadilla y Rincón (2008).....                                                                                                                                                   | 25   |
| 2      | Plantas de crotalaria mantenidas en solución nutritiva bajo un sistema de aireación forzada.....                                                                                                                                                                                                    | 33   |
| 3      | Fluctuación diaria de la temperatura en la solución nutritiva en contacto con las raíces de las plantas.....                                                                                                                                                                                        | 40   |
| 4      | Plantas de <i>crotalaria juncea</i> L. de 30 días de edad obtenidas bajo suficiencia y deficiencia de fósforo.....                                                                                                                                                                                  | 41   |
| 5      | Área foliar promedio (n=9) de plantas de crotalaria a diferentes edades de muestreo en condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo.....                                                                                                                          | 43   |
| 6      | Número de hojas promedio por planta (n=9) de crotalaria a diferentes edades de muestreo en condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo.....                                                                                                                      | 43   |
| 7      | Pesos secos de vastagos y raíces de plantas de <i>Crotalaria juncea</i> en diferentes edades de muestreo bajo condiciones de deficiencia (-P) y suficiencia (+P) de fósforo. <b>A:</b> 15 días de edad, <b>B:</b> 20 días de edad, <b>C:</b> 25 días de edad, <b>D:</b> 30 días de edad. (n=9)..... | 45   |
| 8      | Aspecto general de algunas raíces de crotalaria de 15 días de edad. A: raíces obtenidas en +P; B: raíces obtenidas de -P.....                                                                                                                                                                       | 48   |
| 9      | Longitud radical total (n=3) de crotalaria a diferentes edades de muestreo bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo.....                                                                                                                                 | 49   |
| 10     | Longitud radical específica (n=3) de crotalaria a diferentes edades de muestreo bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo.....                                                                                                                            | 49   |
| 11     | Fluctuaciones del pH en la solución nutritiva desde el momento del                                                                                                                                                                                                                                  |      |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | transplante hasta la última cosecha en plantas de crotalaria.....                                                                                                                                                                                                                                                | 50 |
| 12 | pH en la rizósfera de <i>Crotalaria juncea</i> a los 30 días de edad cultivada en solución nutritiva deficiente (A) y suficiente (B) de fósforo. Abajo se muestra la placa de comparación de colores.....                                                                                                        | 52 |
| 13 | Demostración cualitativa de la liberación de ácidos orgánicos. A. Plantas de <i>crotalaria juncea</i> de 30 días de edad cultivadas un suelo -P contenido en rizotrones de plexiglas; B. Rizotrón con suelo -P usado como testigo. C. Detalle de las raíces no evidencian la liberación de ácidos orgánicos..... | 53 |
| 14 | Concentración de $P_i$ soluble en hojas frescas de <i>crotalaria</i> a diferentes edades de muestreo bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo (n=3).....                                                                                                              | 54 |
| 15 | Concentración de P total en materia seca de hojas, tallos, raíces y planta completa de <i>crotalaria</i> de 30 días de edad bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo (n=9).....                                                                                       | 55 |
| 16 | Contenido de P total en materia seca de hojas, tallos, raíces y planta completa de <i>crotalaria</i> de 30 días de edad bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo (n=9).....                                                                                           | 56 |

## CAPÍTULO II

|    |                                                                                                                           |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 17 | Estrategias de las plantas para adquirir nutrientes en la rizosfera.....                                                  | 81 |
| 18 | Estrategias activadas por las plantas ante la deficiencia de P.....                                                       | 81 |
| 19 | Reacción catalizada por la enzima fosfatasa ácida.....                                                                    | 82 |
| 20 | Reacción catalizada por la enzima Fitasa.....                                                                             | 87 |
| 21 | Acción de la Fosfatasa ácida sobre p-nitrofenil fosfato.....                                                              | 89 |
| 22 | Estructura de los germinadores empleados para obtener plantas sanas y aptas para el transplante a solución nutritiva..... | 95 |
| 23 | Detalle de la recolección de la secreción radical de <i>crotalaria</i> de 15 días                                         |    |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |     |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | de edad.....                                                                                                                                                                                                                                                                           | 96  |
| 24 | Actividad de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de <i>Crotalaria juncea</i> de diferentes edades de muestreo.....                                                                                                                                  | 102 |
| 25 | Actividad de la enzima fitasa en el extracto crudo de la secreción radical de <i>Crotalaria juncea</i> de diferentes edades.....                                                                                                                                                       | 101 |
| 26 | Efecto del tamaño de la alícuota de la secreción radical sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de de <i>Crotalaria juncea</i> de 15 días de edad.....                                                                           | 102 |
| 27 | Efecto del tamaño de la alícuota de la secreción radical sobre la actividad de la fitasa en el extracto crudo de la secreción radical de de <i>Crotalaria juncea</i> de 15 días de edad.....                                                                                           | 103 |
| 28 | Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de de <i>Crotalaria juncea</i> de 15 días de edad.....                                                                                                    | 104 |
| 29 | Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima fitasa en el extracto crudo de la secreción radical de <i>Crotalaria juncea</i> de 15 días de edad.....                                                                                                                | 105 |
| 30 | Efecto de la temperatura sobre la actividad relativa de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de <i>Crotalaria juncea</i> de 15 días de edad.....                                                                                                     | 106 |
| 31 | Efecto del pH sobre la actividad relativa de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de <i>Crotalaria juncea</i> de 15 días de edad.....                                                                                                                | 106 |
| 32 | Representación gráfica de la relación v vs [S] de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) de plantas de crotalaria juncea de 15 días de edad bajo condiciones de: <b>A.</b> deficiencia (p= 0,004 mMP) y <b>B.</b> suficiencia (P=0,86 mMP). Ensayo I.....  | 108 |
| 33 | Representación gráfica de la relación v vs [S] de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) de plantas de crotalaria juncea de 15 días de edad bajo condiciones de: <b>A.</b> deficiencia (p= 0,004 mMP) y <b>B.</b> suficiencia (P=0,86 mMP). Ensayo II..... | 109 |
| 34 | Representaciones gráficas de las transformaciones de la representación v vs [S] de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto                                                                                                                                         |     |

|    |                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
|    | crudo) de <i>Crotalaria juncea</i> L de 15 días de edad. Ensayo 1. <b>A:</b>                                                                                                                                                      | 110 |
|    | Lineweaver Burk, <b>B:</b> Hofstee, <b>C:</b> Wolf. (Ensayo I).....                                                                                                                                                               |     |
| 35 | Representaciones gráficas de las transformaciones de la representación<br>v vs [S] de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto<br>crudo) de <i>Crotalaria juncea</i> L de 15 días de edad. Ensayo 1. <b>A:</b> | 111 |
|    | Lineweaver Burk, <b>B:</b> Hofstee, <b>C:</b> Wolf. (Ensayo II).....                                                                                                                                                              |     |

## ÍNDICE DE CUADROS

### CAPÍTULO I

| Cuadro |                                                                                                                                                                                                                                                                    | Pág. |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1      | Composición química (mL/L) de las soluciones madres a emplear para cada tratamiento.....                                                                                                                                                                           | 34   |
| 2      | Valores promedio del número de hojas y área foliar (cm <sup>2</sup> ) de plantas de <i>Crotalaria juncea</i> a dos edades de muestreo, bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo.....                                                               | 42   |
| 3      | Pesos secos (mg) de plantas de <i>Crotalaria juncea</i> bajo tratamiento suficiente y deficiente de fósforo a cuatro edades de muestreo. Valores promedios y coeficiente de variación.....                                                                         | 46   |
| 4      | Valores promedios y coeficiente de variación de la profundidad de la raíz (PR), Longitud radical (LR) y Longitud radical específica (LRE) de plantas de <i>Crotalaria juncea</i> a diferentes edades bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo..... | 48   |
| 5      | Concentración de fósforo total en plantas de crotalaria de 30 días de edad bajo condiciones de deficiencia (-P) y suficiencia (+P) de fósforo.....                                                                                                                 | 55   |
| 6      | Contenido de fósforo total en plantas de crotalaria de 30 días de edad bajo condiciones de deficiencia (-P) y suficiencia (+P) de fósforo.....                                                                                                                     | 56   |
| 7      | Índices de eficiencia de fósforo en plantas de crotalaria de 30 días de edad bajo condiciones de deficiencia (-P) y suficiencia (+P) de fósforo...                                                                                                                 | 57   |

### CAPÍTULO II

|   |                                                                                                                                                                  |    |
|---|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 8 | Valores referenciales obtenidos para Km y Vmáx de Fosfatasa ácida para diversas especies de plantas usando p-Nitrofenil fosfato como sustrato.....               | 92 |
| 9 | Valores referenciales obtenidos para Km y Vmáx de Fitasa para diversas especies de plantas haciendo uso del sustrato Fitato (Sodio inositol hexakisfosfato)..... | 94 |

- 10 Cálculo de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad bajo condición de deficiencia y suficiencia de fósforo utilizando las transformaciones de la relación  $v$  vs  $[S]$  de Lineweaver Burk, Eadie Hofstee y Wolf, donde  $v$  es la velocidad de reacción y  $[s]$  es la concentración de sustrato..... 112

## A. INTRODUCCIÓN

El fósforo es uno de los nutrientes más importantes para la actividad metabólica de las plantas. En condiciones de suelo no intervenidos por actividad agrícola, este elemento se considera uno de los más limitantes en ecosistemas tropicales naturales debido a que su concentración inorgánica (Pi) se encuentra en valores muy bajos en la solución del suelo (Navarro y Navarro, 2000; Langlade *et al.*, 2002). En su mayor parte se encuentra ligado a la fracción orgánica del suelo, pero también puede encontrarse formando complejos inorgánicos tales como fosfatos de calcio en suelos alcalinos y fosfatos de hierro y aluminio en suelos ácidos, siendo estos últimos los que más se presentan en los suelos de Venezuela. Estas fracciones de fósforo no se encuentran disponibles para las plantas, las cuales absorben estos elementos bajo la forma de iones ortofosfato  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ . La intercepción del Pi puede aumentarse por medio de la proliferación de la raíz, el incremento en la frecuencia y longitud de pelos radicales, modificaciones en la arquitectura de la raíz, y el crecimiento en los horizontes superficiales del suelo, entre otros.

Las respuestas de las plantas a la deficiencia de fósforo varía de acuerdo con las especies, pero en términos generales ocurren reducciones en la biomasa seca, afectando en mayor grado el vástago para favorecer el desarrollo de raíces. Además de esto, también se han reportado reducciones del número de hojas y el área foliar, tanto en plantas cultivadas como silvestres (Ascencio, 1996; Ascencio y Lazo, 1997; Cordero *et al.*, 2005; Oosterhuis *et al.*, 2008).

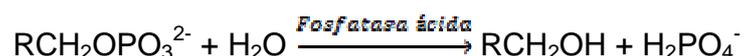
Ante la deficiencia de fósforo en los tejidos, las plantas han generado a través de la evolución, estrategias que permiten soportar esta condición en ambientes naturales no fertilizados con fosfatos, lo cual también se pone de manifiesto en plantas cultivadas. Cuando las plantas perciben la deficiencia de fósforo, se activan algunos mecanismos que les permiten sobreponerse a este estrés abiótico. En este sentido Langlade *et al.* (2002) exponen los siguientes:

- i) Síntesis de transportadores de alta afinidad que pueden absorber Pi cuando la concentración en el medio de crecimiento es muy baja.
- ii) Modificaciones en la morfología radical y la asociación con micorrizas, para mejorar la adquisición de fósforo disponible.
- iii) Secreción de enzimas fosfohidrolasas las cuales liberan Pi por hidrólisis de formas orgánicas de P.
- iv) Acidificación de la rizósfera por el incremento de la liberación de protones, para movilizar fracciones de fósforo en suelos calcáreos.
- v) Secreción de ácidos orgánicos como agentes quelantes que movilizan fosfatos de hierro, aluminio y calcio solubles por formación de complejos con los cationes metálicos.

Las estrategias anteriormente nombradas contribuyen en gran medida al aumento de la eficiencia de absorción de fósforo (EAP), puesto que se manifiestan en las raíces de las plantas deficientes generando cambios en la dinámica normal de la rizósfera.

La Fitasa (FI) y Fosfatasa ácida (FA) son enzimas extracelulares secretadas por las raíces e inducibles bajo condiciones de deficiencia de fósforo en los tejidos, liberando el fósforo de la fracción orgánica del suelo y haciéndolo disponible para las plantas.

Li *et al.* (1997) y Yoshioka *et al.* (2006) indican que el mecanismo de acción de estas enzimas consiste en liberar los iones ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) a través de la hidrólisis de enlaces ésteres y anhídridos de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  de compuestos orgánicos. La reacción ocurre de la siguiente manera:



La Fitasa se ha considerado como una variante especial de la fosfatasa ácida, por su capacidad de liberar el fósforo del ácido fítico también conocido como inositol

hexafosfato, y se encuentra no solo en semillas, polen y plántulas, sino también en la rizósfera (Li *et al.*, 1997). Tanto las plantas como los microorganismos producen estas enzimas (Tarafdar y Claassen, 1988; Yoshioka *et al.*, 2006).

Ae *et al.*, (1990) trabajando con Quinchoncho (*Cajanus cajan*s), demostraron que la producción de ácidos orgánicos, tales como el ácido p- hidroxibencil tartárico (ácido pisdico) y otros ácidos de bajo peso molecular (ácido cítrico, málico y fumárico), ocurre bajo condiciones de deficiencia de fósforo con el fin de solubilizar el fósforo secuestrado tanto por óxidos de hierro en suelos ácidos, como por los óxidos de calcio en suelos calcáreos. Resultados similares obtuvieron Zhang *et al.* (1997) estudiando la respuesta de plantas de *Raghanus sativus* L y *Brassica napus* L, a la deficiencia de P, determinando que la primera especie incrementaba la liberación de ácido tartárico, seguida de ácido málico y succínico, usando preferentemente el P unido al aluminio (P-Al), mientras que en la segunda especie, la liberación de ácido cítrico y málico permitió utilizar más eficientemente el P unido al calcio (P-Ca).

Por lo anterior, la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por las raíces también constituye un mecanismo de las plantas para solubilizar el fósforo en suelos con suplencia limitada, así como en soluciones nutritivas deficientes en P (Zhang *et al.*, 1997). En este sentido, Medina (1999) trabajando con tres variedades de Quinchoncho, determinó que la fracción en dietyl-eter obtenida de los exudados radicales contenía, compuestos orgánicos que solubilizaron el fósforo presente bajo complejos inorgánicos (Fe-P) en suelos Ultisol y Alfisol, por lo que las mismas crecían normalmente bajo estas condiciones.

La interacción de las plantas con microorganismos también ha sido ampliamente reportada a nivel mundial. La actividad *in situ* de FA y FI analizada a partir de un extracto de suelo sin raíces, puede explicarse por la presencia de microorganismos (Gatiboni *et al.*, 2008.), con lo cual se deduce que las poblaciones microbianas también son muy importantes en los procesos de liberación del fósforo en los suelos, contribuyendo al mantenimiento de

ecosistemas que se sustentan sobre suelos pobres en nutrientes, como por ejemplo los suelos de sabana (Friesen *et al.*, 1997) donde se encuentran pastizales nativos e introducidos, así como también en suelos productivos del país donde se usan cultivos de interés agrícola.

En suelos ácidos, la presencia de concentraciones adecuadas de fósforo disponible en el suelo es reducida, lo que restringe la producción agrícola al uso de fertilizantes fosfatados durante cada ciclo de cultivo. En estado silvestre existen especies vegetales, entre ellas la *Crotalaria juncea*, capaces de sobrevivir a las condiciones de suelos marginales del trópico; sin embargo, el mecanismo fisiológico asociado a estas respuestas no ha sido reportado. Las estrategias por las cuales esta especie tolera suelos con suplencia limitada de P, podrían estar asociadas tanto a procesos intrínsecos del metabolismo vegetal, como asociaciones mutualistas con microorganismos.

## **B. HIPÓTESIS**

Si bajo condiciones de deficiencia de fósforo, las plantas de *Crotalaria juncea* L. son capaces de activar estrategias de sobrevivencia, cabría esperar que durante su crecimiento bajo estrés, ocurran variaciones en el crecimiento, así como también la inducción y liberación de enzimas fosfohidrolasas y/o ácidos orgánicos de bajo peso molecular para liberar el fósforo que se encuentra secuestrado bajo formas orgánicas e inorgánicas respectivamente.

## **C. OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO**

Cuantificar las diferencias en biomasa y en la eficiencia en el uso y absorción de fósforo durante el crecimiento de plantas de *Crotalaria juncea* L., así como la determinación cualitativa y cuantitativa de algunas estrategias fisiológicas que se activan bajo condiciones de deficiencia, como la inducción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y la actividad de enzimas fosfohidrolasas en la rizósfera respectivamente, y comparar las características cinéticas ( $K_m$  y  $V_{máx}$ ) de fosfatasa ácida.

## **D. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL TRABAJO**

Bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo:

- ✓ Cuantificar la biomasa en las plantas de *Crotalaria juncea* en estado vegetativo.
- ✓ Cuantificar la tasa de fotosíntesis de plantas.
- ✓ Cuantificar la longitud radical total de plantas de *Crotalaria juncea* en estado vegetativo.
- ✓ Demostrar variaciones de pH en la rizósfera de plantas.
- ✓ Determinar cualitativamente la presencia de ácidos orgánicos “*in situ*” en la rizósfera de las plantas de *Crotalaria juncea*.
- ✓ Determinar el contenido de fósforo total por órganos, así como también el fósforo soluble ( $P_i$ ) foliar.

- ✓ Determinar las eficiencias de uso y absorción de fósforo.
- ✓ Determinar la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y fitasa en la secreción radical obtenida "*in vivo*" (extracto crudo) de plantas de crotalaria en fase vegetativa temprana.
- ✓ Comparar por medio de un estudio preliminar de cinética, las constantes  $K_m$  y  $V_{max}$  de la fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) colectada "*in vivo*" de plantas de *Crotalaria juncea*.

## **E. CAPÍTULO I: EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO SOBRE LA ACUMULACIÓN DE BIOMASA, LONGITUD RADICAL TOTAL, TASA DE FOTOSÍNTESIS, FÓSFORO SOLUBLE FOLIAR, FÓSFORO TOTAL EN TEJIDOS, EFICIENCIA EN EL USO Y ABSORCIÓN DEL FÓSFORO, ACIDIFICACIÓN Y LIBERACIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS EN LA RIZÓSFERA EN PLANTAS DE *Crotalaria juncea* L.**

### **1. INTRODUCCIÓN**

Esta ampliamente documentado que el fósforo es el nutriente más limitante para el crecimiento de las plantas bajo condiciones tropicales debido a que su forma disponible o soluble (Pi) se encuentra en concentraciones muy bajas (cercanas a los 10  $\mu\text{M}$ ) en la solución del suelo (Navarro y Navarro, 2000; Langlade *et al.*, 2002) y en comparación a otros macronutrientes, su movilidad en el suelo se limita a la difusión. Por lo anterior, se hace imposible la producción de cultivos agrícolas de forma intensiva sin el uso de fertilizantes fosfatados, los cuales son costosos, provenientes de fuentes agotables y fijados en su gran parte en el suelo, lo cual le otorga baja eficacia de absorción (del 10 al 30%), lo que quiere decir que de cada 100 Kg de fertilizante aplicado al suelo, las plantas absorben entre 10 y 30 Kg (Casanova, 2005)

De acuerdo a varios autores, la respuesta de las plantas ante la deficiencia de fósforo se manifiesta como un síndrome de estrés, donde se activan diversas estrategias de carácter anatómico, morfológico, fisiológico y metabólico para lograr la sobrevivencia por un período de tiempo determinado, motivo por el cual se han venido desarrollando investigaciones que engloban todos estos aspectos en diferentes especies de interés agrícola o no.

En términos generales la deficiencia de fósforo sobre el crecimiento de las plantas se observa por una reducción de la expansión del área foliar y del peso seco total de las plantas, así como también reducciones en la relación vástago-raíz y el crecimiento foliar, lo cual a su vez limita la tasa de fotosíntesis por

unidad de área foliar significativamente (Rao, 2001). Como resultado, las plantas bajo estrés muestran menor desarrollo.

En suelos deficitarios, la intercepción del bajo contenido de  $P_i$  por las plantas puede aumentarse por medio de la proliferación radical, lo cual incluye mayor longitud radical total, incremento en la frecuencia y longitud de pelos radicales, modificaciones en la arquitectura de la raíz, el crecimiento en los horizontes superficiales del suelo y estableciendo asociaciones simbióticas con micorrizas. Otras estrategias empleadas por las plantas son la asociación con bacterias rizosféricas solubilizadoras de fósforo y la inducción de la síntesis de proteínas enzimáticas secretadas, así como también cambios de pH en la rizósfera por la liberación de protones o por la excreción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, los cuales pueden ser factores que favorecen el incremento en absorción del fósforo por las plantas.

En este capítulo se evalúan algunas diferencias causadas por la deficiencia de fósforo en el crecimiento de las plantas de *Crotalaria juncea* L., tanto en la parte aérea como en las raíces, así como también en la fotosíntesis, contenido de fósforo total y soluble en los tejidos, eficiencias de uso y absorción de fósforo, involucrando a su vez observaciones cualitativas de la producción de ácidos orgánicos en la rizósfera.

## 2. OBJETIVO GENERAL DEL CAPÍTULO I

Determinar los efectos que causa la deficiencia de fósforo sobre la acumulación de biomasa, la tasa de fotosíntesis, la longitud radical total y producción de ácidos orgánicos, así como también las diferencias en las eficiencias de uso y absorción de fósforo en las plantas de *Crotalaria juncea* en estado vegetativo bajo condiciones de suficiencia y deficiencia.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL CAPÍTULO I

Bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo:

- ✓ Cuantificar la biomasa en las plantas de *Crotalaria juncea* en estado vegetativo.
- ✓ Cuantificar la tasa de fotosíntesis.
- ✓ Determinar el contenido de fósforo total por órganos, así como también el fósforo soluble (Pi) foliar.
- ✓ Determinar las eficiencias de uso y absorción de fósforo.
- ✓ Establecer las posibles diferencias en la longitud radical total de plantas de *Crotalaria juncea* en estado vegetativo.
- ✓ Demostrar variaciones de pH en la rizósfera de plantas.
- ✓ Determinar cualitativamente la presencia de ácidos orgánicos “*in situ*” en la rizósfera de las plantas de *Crotalaria juncea*.

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Generalidades del cultivo de *Crotalaria*

La crotalaria (*Crotalaria juncea* L.) es una planta anual originaria de la India, perteneciente a la familia de las Leguminosas (FABACEAE). Esta especie es considerada como la más importante dentro del género *Crotalaria* el cual abarca alrededor de 350 especies en los trópicos y subtrópicos (Cook y White, 1996), usándose extensamente para mejorar las condiciones de los suelos, y por su capacidad de producir una gran cantidad de biomasa en un tiempo corto de 60 a 90 días (USDA, 1999). La incorporación de los residuos de crotalaria al suelo previene la erosión (Sevilla *et al.*, 1996) y aumenta el pool de materia orgánica del mismo debido a su gran resistencia a la degradación (Rivero, 1995).

En cuanto a su morfología, mide entre 1 a 3 m de alto, y en el tallo de aproximadamente 2 cm de diámetro se desarrollan hojas simples con estipulas. Las plantas de *C. juncea*, en comparación con otras especies de su género, tienen un crecimiento más rápido, y su sistema radical consta de una raíz principal larga con numerosas raíces laterales y ramificaciones (Chee y Chen, 1992) pero con la desventaja de que es sensible a la salinidad y al anegamiento (CIAT, 1999), y además, está influenciada por el fotoperíodo, donde la floración se produce en respuesta a los días cortos, aunque se ha señalado la existencia de selecciones neutras al fotoperíodo (Brunner *et al.*, sf). Para favorecer la germinación de las semillas, el suelo debe tener aproximadamente un 30% de humedad. Se ha señalado a *C. juncea* como resistente a la sequía (Chen *et al.*, 2004), adaptándose a condiciones de suelos semiáridos y calientes.

Una característica desventajosa de las plantas del género *Crotalaria* es su toxicidad por consumo. A este respecto, Frohne y Jürgen (2005) señalan que las hojas y en mayor grado las semillas de las plantas de este género, producen el alcaloide pirrolizidina, el cual tiene actividad hepatotóxica y carcinogénica, señalando algunos casos de envenenamiento en animales.

#### 4.2. **Crotalaria como abono orgánico y cobertura vegetal**

En Venezuela se han realizado muchas investigaciones en relación al potencial de *Crotalaria juncea* como abono orgánico y como un factor modificador de la biomasa microbiana del suelo. En este sentido, Aciego (1995) señala modificaciones de las poblaciones de hongos y microorganismos celulolíticos, como resultado de la incorporación de residuos de crotalaria en el suelo. Rivero (1995) señaló que la incorporación al suelo de los residuos de crotalaria genera un incremento en los rendimientos de maíz durante el primer año, manteniéndose esta tendencia para el segundo y tercer año cuando se mezcló crotalaria con pasto elefante en relación 1:1, lo cual fue asociado por la autora a una relación C/N más favorable para la acción de los microorganismos del suelo. La tasa de descomposición de los residuos incorporados puede variar tanto con la especie vegetal incorporada como por época del año. En relación a esto, Abreu (1996) determinó que durante la época lluviosa, cuando los demás residuos vegetales se descomponen más rápidamente, *Crotalaria juncea* se descompone lentamente, por lo que permanece por más tiempo sobre la superficie del suelo. La autora atribuyó lo observado a una mayor producción de fibra cruda y al igual que Rivero (1995), mencionó a los altos valores de C/N como los responsables de este comportamiento. Lo señalado anteriormente podría estar indicando el efecto protector que tiene estos residuos para prevenir la erosión del suelo.

En cuanto a la producción de materia fresca y seca, Abreu (1996) determinó un alto potencial durante la época lluviosa, disminuyendo en un 70% durante la época seca, pero aún así mostró mayores valores en comparación con otras especies de leguminosas estudiadas. De acuerdo a esta autora, la crotalaria es una especie capaz de tolerar ciertas condiciones de sequía en el suelo, además de ser muy competitiva ante la presencia de malezas debido a su cobertura. Por otra parte, Berlingeri *et al.* (2008) reportan la poca competitividad de esta especie al momento de controlar malezas por cobertura, pero dicho resultado se atribuyó al bajo porcentaje de germinación que tuvieron las semillas.

*Crotalaria* ha sido usada en diferentes suelos y con distintos propósitos, observándose que ha tenido un buen desarrollo aún bajo condiciones edafoclimáticas distintas, siendo utilizada no solo para el mejoramiento de las condiciones físicas del suelo, sino por el aporte de nutrientes por medio de la fijación biológica de nitrógeno o por el aumento de la biodisponibilidad de fósforo en suelos con suplencia limitada (Rivero, 1995; Bravo y Florentino, 1999; Fernandez y Ortega, 2002; López *et al.*, 2006).

En función a su capacidad de prosperar bajo ambientes diversos tanto en el trópico como en el subtrópico, esta especie se ha empleado en muchos países no solo en la agricultura como abono verde, sino también para la producción de fibra fina (USDA, 1999).

#### **4.3. *Crotalaria* en el control biológico**

En la agricultura se ha reportado a esta especie como planta repelente de insectos. En este sentido Orozco (2004) reportó que el cuarto y quinto estado ninfal, así como también el estado adulto de *C. bergi*, sufrieron la toxicidad letal efecto de *Crotalaria*. Por otro lado, también ha sido demostrada su eficacia como antagonista de nemátodos (Chen *et al.*, 2004).

Cardona (2008) señaló que la especie *Crotalaria juncea* usada como abono verde es también eficiente en el control del hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* en Ajonjolí, cuando el mismo se usa en combinación con la especie *Trichoderma harzianum*, la cual es empleada comúnmente como un controlador biológico, demostrándose con esto que *Crotalaria* puede ser integrada al desarrollo de un manejo integrado en este cultivo. El autor señala que este controlador biológico puede ser incorporado al suelo por medio de la *crotalaria* y una vez allí, se da un efecto sinérgico en el control de la enfermedad.

#### 4.4. Fósforo en el suelo

La dinámica del fósforo inorgánico en el suelo se ve fuertemente afectada por el pH del mismo. Cuando el pH se encuentra entre 3 y 4, el fosfato inorgánico precipita formando complejos con el hierro (Fe) y el Aluminio (Al). Este proceso disminuye a medida que el pH se acerca a 5.5, pero a partir de este punto se inicia la formación de otros complejos con el calcio (Ca) que de igual forma terminan por volverse insolubles y precipitar en un óptimo de pH entre 8 y 9. Sin embargo, aunque muy restringido, existe un pequeño rango de pH donde parte de los coloides del suelo logran adsorber el fósforo y mantenerlo en una forma fácilmente cambiante, en este sentido Navarro y Navarro (2000) señalan que el óptimo de pH para la suplencia de fósforo para los cultivos se ubica en un valor de 6,5.

El fósforo en el suelo no solo forma complejos inorgánicos sino también complejos orgánicos. Las formas orgánicas incluyen fósforo bajo la forma de ésteres de ácido ortofosfórico, fosfatos de inositol y fosfolípidos. Puesto que en el suelo existe la presencia de seres vivos, el fósforo también puede ubicarse bajo la forma de ácidos nucleicos (Kass, 1996). De los compuestos orgánicos encontrados en el suelo, el fosfato de inositol es el de mayor proporción, llegando a contener hasta 1/3 del fósforo orgánico en el suelo.

Puesto que la mayor parte del fósforo presente en el suelo se encuentra bajo forma insoluble, no es tomado por las plantas para sus funciones. Para que este elemento pueda ser aprovechado es necesario que se encuentre bajo las formas  $\text{HPO}_4^{2-}$  ó  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , lo cual depende del pH de la solución del suelo.

Además, la tasa de movilidad del fósforo en comparación a otros nutrientes tales como  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{K}^+$  es baja (Barber, 1995). Los suelos altamente meteorizados (Ultisoles y Oxisoles) se caracterizan por presentar un bajo contenido de fósforo total y por lo tanto baja disponibilidad (Friesen *et al.*, 1997). Es por esta razón que el fósforo es uno de nutrientes más limitantes en ecosistemas tropicales, ya que la concentración de P inorgánico (Pi) se sitúa en valores muy bajos en la solución del

suelo (Langlade *et al.*, 2002), puesto que se encuentra ligado tanto a la fracción orgánica, como formando complejos inorgánicos tales como P-Ca en suelos alcalinos y P-Fe y P-Al en suelos ácidos, como es el caso de los suelos venezolanos.

La presencia de suelos predominantemente ácidos en nuestro país, es lo que induce la deficiencia de fósforo en los tejidos vegetales, por lo que se requiere del uso de fertilizantes fosfatados para mejorar los rendimientos en cultivos comerciales.

#### **4.5. Absorción de fósforo por las raíces y su transporte en la planta**

Las plantas absorben el fósforo bajo la forma de iones ortofosfato  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ . En relación a esto, Buchannan *et al.* (2000) señalaron que las técnicas de marcaje con el isótopo radiactivo  $^{32}\text{P}$ , permitieron determinar que la principal forma de absorción y transporte por la planta, es bajo la forma de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ . Lo anterior coincide con lo expresado por Navarro y Navarro (2000) quienes además aseguran que la absorción de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  puede superar hasta diez veces la absorción de  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

La absorción y transporte de Pi sucede a través de un proceso de transporte activo y por medio de transportadores múltiples ubicados en la membrana plasmática (Schachtman *et al.*, 1998), requiriéndose entre 25-40 KJ para transportar 1 mol de Pi dentro de las células (Buchannan *et al.*, 2000), por lo que el transporte debe darse por medio de una bomba ATPasa o un transportador activo secundario acompañado de un gradiente electroquímico transmembrana de  $\text{H}^+$  en la membrana plasmática.

El transporte del Pi en la planta a través de las membranas plasmáticas ocurre por medio de un conjunto de nueve familias de proteínas transportadoras, dentro de las que se señala *Ph1* en Arabidopsis por estar involucrada en la toma del Pi desde la solución del suelo y su redistribución en la planta por medio del simporte

$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{H}^+$  (Smith *et al.*, 2003). Tal como señalan estos autores, no solo la familia *Phy 1* cumple un papel importante en la removilización del Pi interno, sino que también está la familia *Phy 2* la cual se expresa principalmente en el vástago de las plantas de *Arabidopsis*. Muchas de estas familias se expresan en las raíces que se encuentran bajo deficiencia de fósforo, tanto en raíces agrupadas (cluster) como no agrupadas.

Los niveles bajos de Pi en las plantas generan una señal para que ocurra la síntesis de **transportadores de alta afinidad**, la cual es una estrategia adaptativa que tienen las plantas para aclimatarse ante la baja disponibilidad de fósforo en el suelo (Lambers *et al.*, 2006) y que le permite a las raíces absorber P aun en concentraciones muy bajas. Este proceso ha sido estudiado por Muchhal *et al.* (1996) y Liu *et al.* (1998) en plantas de *Arabidopsis thaliana* y tomate (*Lycopersicon esculentum*) respectivamente, asegurando que la producción de los mismos están diferencialmente regulados en tejidos vegetales por el estado de fósforo en la planta. Los autores señalaron que la absorción de fósforo por las plantas puede ocurrir más eficientemente a través de estos transportadores de alta afinidad, los cuales son proteínas embebidas en la membrana plasmática de algunas células tipo en las raíces

Marschner (1995) señala que en vista de las bajas concentraciones de fósforo en el suelo y de los resultados de estudios en toma iónica en el rango de baja concentración ( $<10 \mu\text{M}$ ), se introdujo el término ( $C_{min}$ ), el cual se define como la concentración a la cual la toma iónica neta cesa antes que se agoten completamente los iones, y es importante en la toma iónica del suelo, debido a que es la menor concentración a la cual las raíces pueden extraer un ión de la solución del suelo. Las concentraciones  $C_{min}$  difieren considerablemente entre especies vegetales, encontrándose para fósforo, por ejemplo, un valor de  $0.12 \mu\text{M}$  en tomate,  $0.04 \mu\text{M}$  en soya y  $0.01 \mu\text{M}$  en pastos.

## **4.6. Fósforo en las plantas**

Las funciones que cumple el fósforo en la planta son de vital importancia, y pueden resumirse en estructurales y metabólicas, las cuales se detallan a continuación:

### **4.6.1. Fósforo estructural**

A nivel estructural el fósforo forma parte importante de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), fosfoproteínas y fosfoglúcidos, así como también de las membranas por medio de los fosfolípidos (Marschner, 1995).

Las fosfoproteínas son constituyentes del núcleo celular, las cuales al hidrolizarse, generan ácido fosfórico, aminoácidos y bases purínicas. Los fosfoglúcidos son esteres obtenidos por la unión del ácido fosfórico con diversos azúcares, los cuales forman parte importante en el metabolismo de los carbohidratos. Uno de los fosfoglúcidos más estudiados es el mioinositol 1,2,3,4,5,6-hexaxisfosfato (Fitina), el cual contiene aproximadamente un 22% de fósforo, 12% de Calcio y 15% de Magnesio, constituyendo una fuente de reserva de fósforo, particularmente en granos, tubérculos y rizomas (Li *et al.*, 1997; Navarro y Navarro, 2000).

### **4.6.2. Fósforo en el metabolismo**

La vacuola celular actúa como un pool de almacenamiento o “pool no metabólico” de  $P_i$ . Mimura *et al.* (1995) señalan que las concentraciones de  $P_i$  en el citoplasma varían en un rango de 5-7 mM, mientras que el vacuolar está alrededor de 120 mM, llegando a señalarse que en la planta aproximadamente el 85% se ubica en las vacuolas y el 15% en el citoplasma (Marschner, 1995, Azcón- Bieto y Talón, 2008), pero lo anterior ocurre cuando el suministro de fósforo es el adecuado. En contraste, en las plantas deficientes en fósforo, la mayoría del  $P_i$  se encuentra en el citoplasma y los cloroplastos, formando parte del “pool metabólico”, puesto que la concentración de  $P_i$  en el citoplasma es regulada mediante homeostasis del

fosfato, en el cual  $P_i$  de la vacuola actúa como un buffer cediendo fósforo al citosol (Mimura *et al.*, 1995; Schachtman *et al.*, 1998). Lo anterior también es cierto para el  $P_i$  radical, donde la concentración citoplásmica se mantiene en rangos constantes de 6,0 mM (maíz) y 4,2 mM (arveja) bajo deficiencia de fósforo, a menos que se agote el pool vacuolar (Marschner, 1995).

En la transferencia de energía, el fósforo se presenta bajo la forma de esteres fosfatos y fosfatos ricos en energía, que representan parte importante de maquinaria metabólica celular.

El fósforo es un constituyente esencial de numerosas coenzimas tales como Nicotinamida adenin dinucleótido (NAD); Nicotinamida dinucleótido fosfato (NADP); Flavin adenin dinucleótido (FAD); Coenzima A; Uridín difosfato (UDP), Pirofosfato de tiamina (TPP), fosfato de piridoxal (PAL); entre otros. Así como también de sustancias involucradas con el transporte energético en el metabolismo tales como Adenosín trifosfato (ATP); Adenosín difosfato (ADP) y Adenosín monofosfato (AMP) (Navarro y Navarro, 2000).

La mayoría de los esteres fosfatos son intermediarios en las vías metabólicas de catabolismo y anabolismo. En este sentido, la energía requerida por ejemplo para la biosíntesis de almidón ó para la toma de iones es suplida por un intermediario o coenzima rica en energía, principalmente ATP, el cual es el principal fosfato rico en energía. La energía contenida en los enlaces pirofosfato ricos del ATP pueden también ser transmitida a otras coenzimas que difieren del ATP solo en la base nitrogenada, por ejemplo, la uridina trifosfato (UTP) y la guanosina trifosfato (GTP), las cuales son requeridas para la síntesis de sacarosa y celulosa, respectivamente.

El fósforo inorgánico ( $P_i$ ) también cumple un papel importante como regulador en el metabolismo. Bajo deficiencia extrema de fósforo, las plantas pueden experimentar una reducción de hasta 50 veces en el  $P_i$  citoplasmático metabólico (Plaxton, 2004), lo cual conlleva a disminuciones del ATP y a la activación de rutas

alternativas a la respiración (glicólisis y cadena transportadora de electrones) independientes del ATP, que ayuda a las plantas a sobrevivir bajo condiciones estresantes por medio del uso de la energía contenida en el pirofosfato (~PPi) que es insensible a la deficiencia de Pi (Theodorou y Plaxton, 1993). Lo anterior se lleva a cabo debido a que en muy bajas concentraciones de Pi citoplasmático, se induce la síntesis de isoenzimas que utilizan el PPi como fuente de energía, tales como la PPi-fosfofructokinasa, PEP-fosfatasa, PEP carboxilasa, entre otras, liberando Pi por medio de hidrólisis al citoplasma (Theodorou y Plaxton, 1993; Moraes y Plaxton, 2000; Plaxton, 2004).

Además de esto, una larga condición de deficiencia de fósforo en células en suspensión de *Brassica napus* indujo la activación de bombas de H<sup>+</sup>-PPi en el tonoplasto, lo cual constituye un mecanismo alternativo que mantiene la acidificación de la vacuola empleando PPi como fuente de energía, facilitando también el reciclaje del fósforo durante el estrés (Palma *et al.*, 2000).

Marschner (1995) señala que el Pi es un regulador de varias enzimas en el metabolismo vegetal, manifestando que su contenido en las vacuolas celulares del tejido del fruto del tomate es liberado hacia el citoplasma, estimulando la actividad de la fosfofructokinasa, y de este modo una explosión respiratoria correlacionada con la maduración de los frutos. El retraso de la maduración de los frutos en plantas de tomate deficientes en fósforo puede estar relacionado con esta función del P<sub>i</sub>.

Altas concentraciones de P<sub>i</sub> puede inhibir la síntesis de almidón en los cloroplastos por dos vías. En primer lugar, actuando como inhibidor alostérico de la enzima ADP-glucosa pirofosforilasa, y en segundo lugar por medio de la activación de un translocador de fosfato ubicado en la membrana interna del cloroplasto, que estimulado por el Pi, facilita la salida de triosas fosfato (gliceraldehido 3-fosfato y dihidroxiacetona fosfato) de los cloroplastos por medio del intercambio P<sub>i</sub> ↔ triosa fosfato (Buchanan *et al.*, 2000).

#### **4.7. Efecto de la deficiencia de fósforo sobre el crecimiento de las plantas**

Puesto que el fósforo es un elemento altamente esencial para las plantas, su baja concentración en los tejidos vegetales genera respuestas en el crecimiento que pueden hacerse más evidentes a medida que aumenta el tiempo en deficiencia. En función a lo anterior, Arnaude (1994) señaló que el tomate y *Amarantus* sirven como plantas indicadoras de suelos con suplencia limitada, puesto que las mismas muestran una rápida respuesta ante la deficiencia de fósforo, lo cual se observa en términos generales por una reducción en el crecimiento. Los efectos de la deficiencia de fósforo en este sentido se desglosan a continuación:

##### **4.7.1. Parte aérea**

La deficiencia de fósforo afecta grandemente el área foliar total, la expansión foliar y el número de hojas formadas (Ascencio, 1994). Reducciones en la acumulación de biomasa y el área foliar total también fueron reportadas por Araude (1994) en plantas de caraota, frijol, tomate y pira bajo condiciones de deficiencia, así como también por Ascencio (1996) y Ascencio y Lazo (1997) en frijol, *desmodium*, yuquilla y lecherito, estas últimas tres conocidas como malezas de cultivos agrícolas. En este sentido se señala que cada planta podría utilizar estrategias diversas ante la deficiencia de P, y que esta respuesta no es solo morfológica, anatómica o fisiológica, sino que podrían encontrarse combinaciones entre ellas.

En relación a la reducción del área foliar se ha señalado que es una respuesta a la disponibilidad limitada de agua para la expansión foliar durante el día, causada por la baja conductividad hidráulica del sistema radical como resultado de la deficiencia de fósforo (Marschner, 1995).

La disminución del crecimiento foliar debida a la deficiencia de fósforo, también ha sido reportada en varias ocasiones para especies monocotiledóneas tales como *Zea mays* y *Lolium perenne* (Assuero *et al.*, 2004; Kavanová *et al.*, 2006), señalándose que esto es el resultado de una alteración de la división y elongación

celular (Kavanová *et al.*,2006), por lo que la deficiencia de fósforo reducía la tasa de elongación foliar en un 39% debido a una disminución en la tasa de producción celular (-19%) y longitud celular final (-20%) en plantas de *Lolium perenne*. En un trabajo realizado por Bernal *et al.* (2007), las reducciones del crecimiento de la parte aérea de caraota variedad C60, se explicaron parcialmente por la disminución del P soluble disponible para los procesos celulares.

La deficiencia de P conduce a una típica reducción en la relación peso seco vástago/raíz. En este sentido, Marschner (1995) señala que en frijol (*Phaseolus vulgaris*), esta relación disminuye desde 5,0 en plantas suficientes a 1,9 en plantas deficientes en fósforo, indicando además que, por lo general, esta disminución en plantas deficientes está correlacionada con un incremento en la repartición de carbohidratos hacia las raíces.

#### **4.7.2. Raíces**

La deficiencia de fósforo en las plantas puede afectar el patrón de crecimiento radical. En suelos de baja fertilidad, principalmente con baja suplencia en fósforo, la distribución de las raíces por lo general es superficial. Friesen *et al.* (1997) encontraron que alrededor del 75% de las raíces de maíz y entre el 38 y 42% de las raíces de leguminosas se encontraron en los primeros 10 cm de un suelo oxisol. Por otro lado, bajo condiciones de deficiencia de fósforo, algunas especies modifican su morfología radical y aumentan la producción de pelos absorbentes con el fin de hacer más eficiente la toma de fósforo de suelos con baja suplencia (Lambers *et al.*, 2006).

Arnaude (1994) reportó un mayor crecimiento radical en las plantas de caraota, frijol, tomate y pira bajo condiciones de deficiencia y expresó que tanto las especies como los distintos órganos de la planta responden de forma variada a la deficiencia de fósforo. Para algunas especies silvestres y cultivadas se ha observado una inhibición del desarrollo radical en términos de longitud total de raíces bajo condiciones de deficiencia de P (Ascencio, 1996); sin embargo, la misma autora señala que hay especies que logran evadir este estrés aumentando

la longitud radical, tal es el caso de *Euphorbia heterophylla*, donde se reportó un incremento en la longitud radical de esta planta al final del ciclo de crecimiento bajo una condición de estrés prolongada. Lo anteriormente señalado ha sido reportado para otras especies las cuales aún en condiciones limitantes de P, logran estimular su crecimiento radical para obtener mayor superficie de contacto y poder explorar un volumen de suelo mayor (Sachay *et al.*, 1991; Marschner, 1995). Otra respuesta observada ante el estrés es la disminución del peso seco de la raíz, y con esta aumento en la longitud radical específica, con lo cual se asume que para algunas especies las raíces bajo deficiencia de fósforo son más delgadas, tal como consiguieron Shen *et al.* (2003) en *Lupinus albus*.

En otros estudios recientes relacionados con la morfología radical de *Crotalaria juncea*, Ferrarotto (2009) no encontró diferencias debidas a los tratamientos de fósforo sobre la longitud radical, sin embargo, bajo la condición de deficiencia de fósforo (0,036mMP), se promovió e incrementó la densidad de raíces laterales delgadas de ordenes superiores, lo cual generó un gran aporte a la longitud radical total, siendo la primera raíz lateral formada de menor longitud en comparación al tratamiento suficiente (0,15 mM). Además, la autora señaló que dichas raíces laterales crecieron de forma perpendicular a la raíz principal en toda su extensión. Por otro lado, trabajando con una especie de la familia POACEA, Faye *et al.* (2006) observaron un mayor desarrollo de pelos radicales en *Pennisetum glaucum* bajo condiciones de deficiencia de fósforo.

Por todo lo anteriormente expuesto, la modificación en la morfología radical bajo condiciones de deficiencia de fósforo es una estrategia importante para plantas de diversas familias botánicas (Lambers y Shane, 2007). En este sentido, la deficiencia de fósforo en los tejidos vegetales genera la formación de raíces proteoideas, las cuales se han definido como raíces que forman uno o varios grupos a lo largo de su longitud, pudiéndose encontrar 10 ó más raicillas muy juntas con crecimiento limitado (Watt y Evans, 1999) formando como una estructura en forma de cepillo. Han sido reportadas no solo por poseer una morfología distinta, sino también una maquinaria fisiológica que le permite a las

plantas sobrevivir a la deficiencia por medio del manejo de la interfase suelo-planta o rizósfera (Dinkelanker *et al.*, 1989). Este tipo de raíces se han reportado en gran medida para plantas de *Lupinus albus*, asociándose esto a una respuesta morfológica ante la deficiencia de fósforo. Los resultados de Shen *et al.* (2003) parecen indicar que la iniciación de raíces cluster en *Lupinus albus* responden más a la concentración de P en el vástago que en la raíz.

Las asociaciones simbióticas con hongos tales como las micorrizas también son estrategias que emplean las plantas para adquirir fósforo en suelos limitantes. En este sentido, las micorrizas son vitales en casi todos los ecosistemas terrestres, formando simbiosis con aproximadamente el 80% de las plantas vasculares y mejorando el estatus de fósforo de las mismas y por ende su crecimiento. En términos generales, las micorrizas extienden la superficie de contacto radical, llegando a zonas de suelo donde las raíces no han explorado, con lo cual pueden absorber el P que se encuentra disponible en esa zona. (Peterson *et al.*, 2004)

#### **4.8. Dinámica en la rizósfera**

La rizósfera es la interfase suelo-raíz donde se generan mecanismos que determinan la absorción de nutrientes al interior de la raíz, por lo que constituye una zona donde ocurren interacciones entre factores bióticos y abióticos (Ascencio, 1996). Cuando las raíces liberan exudados radicales, lo hacen directamente en la rizósfera.

La rizósfera representa aquella zona del suelo donde las raíces de las plantas, entran en una constante dinámica con otras raíces presentes y con organismos que bien pueden ser parásitos o beneficiosos. Esta dinámica incluye un conjunto de señales químicas entre las raíces y los organismos vecinos, lo cual afecta positiva o negativamente las poblaciones de ambos organismos.

Según Walker *et al.* (2003), un exudado radical constituye una gran variedad de compuestos químicos secretados por las raíces de las plantas dentro del suelo. A través de estos exudados de diferente naturaleza química, las raíces pueden

regular la biomasa microbiana de la rizosfera, hacer frente a los herbívoros, estimular a organismos simbioses benéficos, cambiar las propiedades químicas y físicas del suelo, e inhibir el crecimiento de otras plantas.

Las plantas transfieren a la rizósfera entre 5 y 21% de los fotosintetizados (Marschner, 1995), llegándose a reportar que hasta un 25% de estos están constituidos por ácidos orgánicos, lo cual constituye cantidades suficientes para movilizar el P del suelo (Pinton *et al.*, 2007). La producción de ácidos orgánicos también ha sido reportada en los microorganismos de la rizósfera (Bobadilla y Rincón, 2008).

En respuesta a las condiciones de deficiencia de fósforo, las plantas tienden a modificar el contenido de la rizósfera por la liberación de diferentes compuestos a través de las raíces, ocasionando en muchos casos su acidificación por medio de la excreción de protones y/o ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Ascencio y Lazo, 2001; Shen *et al.*, 2003)

#### **4.8.1. Acidificación de la rizósfera y producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular para promover la liberación de fósforo poco disponible en el suelo.**

La acidificación por las raíces es uno de los factores que pueden afectar la dinámica de los nutrientes y disponibilidad de los mismos en la rizósfera, la cual ha sido relacionada con la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y liberación de protones por modificaciones de la relación catión-anión y asociaciones con microorganismos (Dinkelaker *et al.*, 1989; Ascencio y Lazo, 2001; Zhu *et al.* 2005; Lambers *et al.*, 2006).

La liberación de protones ( $H^+$ ) por las raíces hacia la rizósfera ha sido reportada por varios autores, los cuales lo han relacionado con una absorción mayor de cationes en comparación a los aniones, con el fin de compensar el desbalance generado. Si por el contrario el desbalance se genera por exceso de aniones

sobre los cationes, las raíces exportan iones bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) o hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), aumentando el pH en la rizósfera.

Los ácidos orgánicos de bajo peso molecular también cumplen un rol importante en la disminución del pH en la rizósfera, encontrándose que el citrato y el  $\text{H}^+$  mantienen una relación estequiométrica de 1:1.3 en las raíces proteoideas de *Lupinus albus* (Zhu *et al.*, 2005)

Bajo condiciones de deficiencia de fósforo las raíces de *Lupinus albus* liberan una gran cantidad de citrato desde las raíces (Gardner *et al.*, 1983; Johnson *et al.*, 1994; Marschner, 1995; Neumann *et al.*, 2000, Zhu *et al.*, 2005), lo cual representa entre el 11 y el 23% del total del peso seco de las plantas (Dinkelaker *et al.*, 1989). Recientemente Zhu *et al.*, (2005) determinaron que a través de los exudados de las raíces proteoideas es posible encontrar no solo citrato, sino también  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^-$  y malato

El producto primario de la biosíntesis de carboxilatos bajo la deficiencia de fósforo es el oxalacetato (reacción PEPC), el cual es rápidamente convertido en malato por reacción MDH. El oxalacetato y malato producido por la ruta de la PEPC, pueden actuar como precursores de la síntesis del citrato (Pinton *et al.*, 2007). Sin embargo, se ha señalado que existen otras rutas que en menor grado están involucradas en la acumulación intracelular del citrato en raíces de plantas bajo deficiencia de fósforo, por medio de la regulación de las enzimas que degradan el citrato como aconitasa, la isoforma citosólica de la isocitrato deshidrogenasa y varias deshidrogenasas del ciclo de los ácidos tricarbónicos (TCA). Un incremento en la síntesis de ácidos orgánicos coincide con una mayor actividad de PEPC (Johnson *et al.*, 1994), así como también un incremento en la exudación (Johnson *et al.*, 1996)

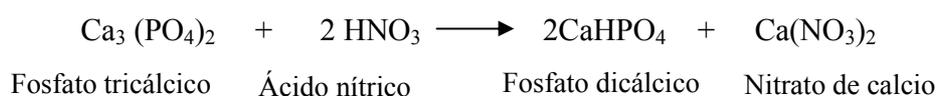
La reducción de la respiración radical puede contribuir a la acumulación del citrato. La acumulación de citrato en raíces agrupadas de lupino estuvo relacionada también con la reducción de la expresión y actividad de citrato liasa

dependiente de ATP. La enzima cataliza la escisión dependiente de ATP de citrato en oxalacetato y Acetil Co-A (Johnson *et al.*, 1994; Kania *et al.*, 2003).

El estado de desarrollo de las plantas puede afectar significativamente la magnitud de la exudación de ácidos orgánicos. En muchas plantas, aunque se ha reportado un aumento proporcional en la acumulación del citrato (Dinkelaker *et al.*, 1989), el malato es el anión carboxilato en mayor cantidad, el cual se acumula en los tejidos radicales para su liberación en respuesta a la deficiencia de P (Pinton *et al.*, 2007).

La liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular ha sido reportada por varios autores (Dinkelaker *et al.*, 1989; Ae *et al.*, 1990; Marschner, 1995; Zhang *et al.*, 1997, Shen *et al.*, 2003), y ha sido muy estudiada en la rizósfera de las raíces proteoideas de *Lupinus albus* (Dinkelaker *et al.*, 1989; Shen *et al.*, 2003). La función de dichos ácidos es liberar fósforo desde complejos inorgánicos tales como Ca-P; Fe-P; Al-P a través de la formación de complejos con los compuestos que lo tenían secuestrado (Dinkelaker *et al.*, 1989; Ae *et al.* 1990, Zhu *et al.*, 2005).

Los citratos, en particular el ácido cítrico, son muy eficientes para disolver el fósforo bajo la forma de fosfato tricálcico (poco soluble), en una reacción similar a la observada a continuación:



**Figura 1.** Solubilización de un compuesto inorgánico de fósforo por la producción de ácidos orgánicos. Fuente: modificado por Bobadilla y Rincón (2008).

La acumulación de ácidos orgánicos en los tejidos radicales y la excreción de protones y citrato desde las raíces agrupadas, es un síntoma asociado a estados avanzados de deficiencia, lo cual sugiere que la liberación de ácidos orgánicos es inducida por cambios metabólicos durante el desarrollo de las raíces agrupadas (Neumann *et al.*, 2000), pero la naturaleza del ácido orgánico varía dependiendo

del tejido y la fase de desarrollo de la raíz. En este sentido, estos mismos autores señalan que el ácido cítrico se acumuló en altos niveles en las raíces agrupadas maduras y senescentes de plantas de lupino blanco, mientras que en raíces jóvenes y no agrupadas se acumuló fue el ácido málico.

Una observación *in situ* de la reacción de ácidos orgánicos en la rizósfera fue observada por Dinkelaker *et al.* (1989), quienes haciendo uso de rizotrones que contenían suelos con -P, consiguieron que las plantas de lupino liberaban ácido cítrico (citrato) por las raíces después de diez semanas de la siembra, lo cual indujo la formación de pequeñas masas blanquecinas “precipitadas” de citrato de calcio en la rizósfera de las raíces proteoideas, lo cual fue relacionado con una de las estrategias que usan estas plantas para liberar el Pi de la fracción inorgánica del suelo. El resultado anterior indica que la deficiencia de P induce la liberación de ácidos orgánicos por las raíces, lo cual fue confirmado por Hoffland *et al.* (1989) trabajando con plantas de *Brassica napus* L. Estos autores señalaron que esta especie por estar fisiológicamente adaptada a la deficiencia de P, disuelve la roca fosfórica a través de la liberación de ácido cítrico y ácido málico en suelos con suplencia limitada de fósforo. Sin embargo, Hoffland *et al.* (1992) trabajando con *Sisymbrium officinale* y *B. napus* bajo soluciones nutritivas +P (0.25 mM P) y -P (0 mM P), consiguieron que para ambas especies los niveles de malato y citrato excretados fueron bajos, encontrándose un ligero incremento cuando se trataron con solución -P.

En relación a plantas estresadas por deficiencia de fósforo, Marschner (1995) señaló que la exudación radical de ácidos orgánicos de bajo peso molecular aumenta para las dicotiledóneas, haciendo especial énfasis en especies de leguminosas, señalando que en alfalfa (*Medicago sativa*) aún cuando el peso seco total no había sido deprimido por la deficiencia de fósforo (pero la relación raíz/vástago comenzó a disminuir), ocurrió un incremento cerca del doble de la exudación radical del ácido cítrico. Además, también señaló que la exudación fue alta en garbanzo (*Cicer arietinum*) y maní (*Arachis hypogaea*), pero baja en soya

(*Glycine max*) y moderada en frijol. Los principales compuestos eran ácido cítrico en garbanzo y ácido fumárico en maní.

La exudación de ácidos orgánicos no parece estar controlada por el pH del suelo y tomando en cuenta lo señalado en párrafos anteriores, la naturaleza del compuesto exudado parece estar determinada más bien por la especie vegetal que las produce. Lo mismo fue confirmado por Ae *et al.* (1990), quienes reportaron para el cultivo de quinchoncho compuestos distintos a los señalados por Hoffland *et al.* (1989) y Hoffland *et al.* (1992). En este caso, se encontró que el quinchoncho produce compuestos como el ácido *p*-hidroxibencil tartárico (ácido piscídico) y otros ácidos de bajo peso molecular (ácido cítrico, málico y fumárico), para solubilizar el fósforo secuestrado tanto por óxidos de hierro (FeIII-P) a pH bajos, como por complejos con calcio (Ca-P) en suelos calcáreos. El ácido piscídico (ácido tartárico *p*-hidroxibencil), es un fuerte quelante del Fe(III), por lo que moviliza los fosfatos de hierro poco solubles. Según Marschner (1995) no es muy efectivo en la liberación de fosfatos de calcio escasamente solubles.

Los ácidos orgánicos generan movilización de P en la rizósfera (Marschner, 1995) formando complejos por quelación de iones metálicos tales como el Fe, Al, Ca que están asociados al P insoluble, haciendo que el fósforo por desorción, quede en forma disponible para las plantas (Ae *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 1997). En suelos calcáreos, una alta exportación de H<sup>+</sup> puede contribuir a la disolución de fosfatos de calcio solubles en ácido. De todas las especies de carboxilatos identificados en los exudados radicales, el citrato y oxalato son los más eficientes en la movilización de formas poco solubles de P (Neumann y Römheld, sf<sup>\*</sup>).

La exudación de ácidos orgánicos por las raíces de las plantas es una respuesta fisiológica de adaptación ante la deficiencia de fósforo. Lo anterior fue confirmado por Zhang *et al.* (1997) con *Raghanus sativus* L, (una planta que habita suelos

---

<sup>\*</sup> Sf: Sin fecha reportada en la investigación.

ácidos del sureste de China) bajo condiciones de deficiencia de P. Dicha planta libera ácidos orgánicos (málico, succínico y tartárico), que estuvieron relacionados con la liberación del P desde complejos de hierro y aluminio tal y como ocurriría en los suelos ácidos en los cuales se desarrolla comúnmente esta especie. Del mismo modo, en ese mismo trabajo, las plantas de *Brassica napus* L. que habitan en suelos calcáreos de China liberaron ácido málico y ácido cítrico por las raíces, lo cual estuvo relacionado con la utilización del P unido al calcio.

La capacidad de liberar el P inorgánico unido a un metal en particular depende de la especie. En un trabajo realizado por Ascencio y Lazo (2001), se determinó indirectamente la capacidad que tienen varias especies para solubilizar el P de fuentes inorgánicas no disponibles tomando en cuenta la cantidad de biomasa producida. En este sentido, demostraron que plantas de frijol (*Vigna unguiculata*), caraota (*Phaseolus vulgaris*) y pega-pega (*Desmodium tortuosum*) poseen mayor capacidad de liberar el P unido al calcio (Ca-P) que del Fe-P, sugiriendo que esta respuesta podría estar coordinada por la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular.

En las raíces existen zonas donde la actividad de exudación de los ácidos orgánicos de bajo peso molecular es más acentuada, tal es el caso de los ápices radicales o cofias, así como también la abundancia de pelos radicales está relacionado con una alta actividad secretoria (Neumann y Römheld, sf). Las raíces agrupadas o "cluster roots" también han sido asociadas a la producción de una alta exudación de ácidos orgánicos (Dinkelaker *et al.*, 1989).

La liberación de carboxilatos y otros componentes de bajo peso molecular puede estar mediada por difusión a lo largo de un gradiente de concentración entre el citosol (rango mM) y la solución del suelo en la rizósfera ( $\mu\text{M}$ ), existiendo cada vez más evidencias de que la ocurrencia de una liberación selectiva de compuestos quelantes (Citrato, malato, oxalato, los cuales están involucrados en la movilización de nutrientes) pudiera estar coordinado por mecanismos específicos

de transporte, como canales aniónicos con una alta liberación de H<sup>+</sup> o K<sup>+</sup> para mantener el balance de cargas (Neumann *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2000).

Las diferentes condiciones de crecimiento y la edad de las plantas pudieran ser factores influyentes en la cantidad del ácido orgánico que es liberado a la rizósfera. En este sentido Gardner *et al.* (1983) encontraron que las plantas de lupino de 6 semanas de edad liberaron 979  $\mu\text{mol.planta}^{-1}$  de citrato (11% del peso seco total de la planta), mientras que Dinkelaker *et al.* (1989), para la misma especie, reportaron 5460  $\mu\text{mol.planta}^{-1}$  de citrato liberado (23% del peso seco de la planta) a las 13 semanas de edad.

#### **4.9. Eficiencia de uso y de absorción de fósforo en plantas sometidas a deficiencia**

La eficiencia de las plantas para crecer en un medio con bajo contenido de fósforo, se puede dividir en dos grandes aspectos: la eficiencia en la absorción de P (EAP) y la eficiencia en el uso del P (EUP). Marschner (1995) definió en forma general la eficiencia en la absorción (EAP) en términos de la toma total de fósforo por planta por unidad de peso o longitud radical total, y a la eficiencia en uso del fósforo (EUP) como la producción de materia seca por unidad de nutriente contenida en ella. Sin embargo, las interpretaciones de las eficiencias pueden variar dependiendo de su forma de expresión puesto que varios autores establecen las eficiencias tomando en cuenta diversos criterios, por ejemplo, en caraota, Hernandez *et al.* (1996) estimaron la eficiencia en el uso del P como la relación entre la biomasa total formada en función al porcentaje de fósforo en la biomasa, mientras que en trigo, Melchiori *et al.* (2004) reportaron la eficiencia de uso como los kg de grano producido por cada kg de P disponible y los kg de materia seca total producida por kg de fósforo disponible, y la eficiencia de absorción como los kg de P absorbido por cada kg de P disponible.

Una alta eficiencia en la absorción del fósforo puede estar asociada con un sistema radical más fino y más activo en su bioquímica y fisiología. Un ejemplo de

esto lo constituye entre otras especies, el quinchoncho (*Cajanus cajan*) el cual usa rápidamente los fosfatos de hierro escasamente solubles mediante la exudación del ácido piscídico que compleja al Fe(III) en la rizósfera (Ae *et al.*, 1990) y el lupino que cumple funciones similares por medio de la exudación de citrato (Dinkelanker *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1994). Por otro lado, también se ha reportado que la deficiencia de P aumenta la absorción de Pi por medio de la transcripción y traducción selectiva de transportadores de alta afinidad (Raghothama, 2000). Por otro lado, la EUP está relacionada con una mejor utilización interna del Pi almacenado dentro de un tejido dado o por retranslocación en la planta (Marschner, 1995).

Rao *et al.*, (1995) evaluando 7 pastos y 12 leguminosas forrajeras, determinaron que un incremento en la fertilidad mejora la toma de fósforo en ambos grupos, pero que bajo deficiencia, los pastos tuvieron mayor EUP estimada como producción de biomasa seca del vástago (g) por unidad de fósforo (g) contenido en la planta. En otros trabajos, Ascencio (1996) y Ascencio y Lazo (1997) encontraron que la EUP, medida como biomasa seca producida por mg de P total en *Euphorbia heterophylla*, *Cajanus cajan* y *Desmodium tortuosum*, fue mayor en el tratamiento deficiente (0,01 mM P), ocurriendo lo contrario para la EAP, expresada como los mg P por gramo de biomasa seca radical, la cual disminuyó significativamente en el tratamiento deficiente. En los estudios nombrados, se observó un patrón diferencial en la distribución del P dentro de la planta. En este sentido, *Ruellia tuberosa* y *Cajanus cajan*, localizaron mayor cantidad de P en las raíces que en las hojas en el tratamiento deficiente, mientras que para *Euphorbia heterophylla* los patrones fueron similares para deficiencia y suficiencia. Los resultados anteriores indican que algunas especies son capaces de producir biomasa aún con un bajo contenido de fósforo en los tejidos, lo cual puede ser una estrategia de sobrevivencia ante la deficiencia, lo cual coincide con Briceño (2001) para plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) y con Cordero *et al.* (2005) en *Crotalaria spectabilis* Roth, quienes señalaron que las mismas poseen una alta capacidad de respuesta ante el estrés por fósforo debido a que aumentan la eficiencia en su uso del fósforo bajo condiciones de deficiencia.

Existen evidencias experimentales que afirman que la eficiencia del uso de P depende del genotipo evaluado. Gómez *et al.* (1996) estudiando 10 genotipos de caraota, consiguieron que los mayores valores de EUP se obtuvieron en el cultivar BAT 271 y los menores en CC 25-9N, y que dicha eficiencia se iba haciendo mayor a medida que las plantas estaban bajo concentraciones más limitantes de fósforo. Resultados similares consiguieron Hernández *et al.* (1996) en 3 cultivares de caraota y Melchiori *et al.* (2004) en 8 cultivares de trigo.

Ascencio y Lazo (2001) determinaron que la capacidad de absorber y usar P, evidenciado como una mayor producción de biomasa total, también varía con las especies y la fuente de fósforo empleada para la experimentación. Por ejemplo, en quinchoncho, los valores de EAP fueron similares en los tres tratamientos de fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Fe-P y Ca-P) , pero la EUP fue mucho mayor del Fe-P, mientras que para la leguminosa desmodio o pega-pega tanto los valores de EAP como EUP estuvieron elevados al hacer uso de la misma fuente. Así mismo el frijol mostró mayor capacidad para utilizar el P del Ca-P que del Fe-P. Puesto que se observó una acidificación en la solución nutritiva, los autores sugirieron que dichas plantas podrían poseer un mecanismo de liberación de ácidos orgánicos y/o protones desde las raíces a la rizósfera que favorecería la absorción del P a partir de estas fuentes inorgánicas poco solubles. Además de esto, señalaron que la eficiencia de absorción de P (EAP) como los mg de P movilizados a la parte aérea, se expresa mejor en términos de longitud total.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Localización del experimento**

El ensayo se llevó a cabo en el cobertizo de Investigación del Laboratorio de Metabolismo y Fisiología de Malezas y Cultivos Tropicales, y las determinaciones de las variables de crecimiento se realizaron en este mismo laboratorio ubicado en el Instituto de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela.

### **5.2. Registro de variables climáticas y condiciones generales del cobertizo**

El crecimiento de las plantas se llevó a cabo en un cobertizo con paredes de malla fina metálica y techo de fibra de vidrio. En el transcurso de los experimentos se registraron las variaciones diarias de radiación solar, temperatura y humedad relativa. Los datos de temperatura y humedad se obtuvieron con un termohigrómetro (marca Weather Measure modelo H-302), y la radiación solar por medio de un piranómetro (marca Weathertronics modelo 3010).

### **5.3. Material vegetal y manejo del ensayo**

El material vegetal se obtuvo a partir de semillas de *Crotalaria juncea* provenientes de San Carlos, Edo. Cojedes y refrigeradas desde el año 2005. La especie fue escogida debido a que la misma es capaz de crecer de forma silvestre en suelos ácidos y oligotróficos, por lo cual se infirió que posee algún mecanismo que le permite tolerar estas condiciones de estrés.

Las semillas previamente desinfectadas con vitavax se sembraron en envases de 480 mL de capacidad que contenían arena lavada, descarbonatada con HCl al 2% y desinfectada con calor. El riego se realizó tres veces por semana con agua destilada hasta lograr plantas con dos hojas completamente expandidas, las cuales se transfirieron a solución nutritiva.

Para el trasplante se seleccionaron plantas homogéneas, cuyas raíces fueron introducidas individualmente por el orificio central (2,5 cm de diámetro) ubicado en la tapa de envases de 900 mL que contenían solución nutritiva Hoagland II bajo dos tratamientos, +P= 0,86 mMP (suficiencia) y -P= 0,004 mMP (deficiencia), ambos con 48 repeticiones. Para favorecer la adecuada oxigenación al sistema radical, se hizo uso de bombas de pecera marca Elite 802, las cuales se conectaron a cada envase por medio de una red de manguerillas de plástico flexible que se introdujeron por una abertura de 0,5 mm a un extremo de la tapa de cada envase. La solución se reemplazó cada cinco días después de la transferencia, manteniendo invariable su concentración. En la Figura 2 se muestra un detalle de las plantas en el cobertizo.



**Figura 2.** Plantas de crotalaria mantenidas en solución nutritiva bajo un sistema de aireación forzada

#### 5.4. Preparación de la solución nutritiva

Se usaron sales puras grado analítico para preparar solución nutritiva Hoagland II. La composición de la solución nutritiva representada por concentración en mM de cada elemento fue la siguiente: N= 15,0; K= 6,0; Ca= 5,0; Mg=2,0; S=2,0; Fe= 1,0; B=1,0; Mn= 1,0; Cu= 1,0; Zn= 1,0; Mo= 1,0, siendo la única diferencia la concentración de fósforo, donde +P= 0,86 mM, -P= 0,004 mM. Esta última preparada a partir de una solución madre de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,05 M.

La composición química en la solución de cada tratamiento empleada puede observar en el Cuadro 1.

**Cuadro 1.** Composición química (mL/L) de las soluciones madres a emplear para cada tratamiento.

| Compuesto                                                               | mL/L de solución nutritiva |                 |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-----------------|
|                                                                         | +P (0,86 mM P)             | -P (0,004 mM P) |
| <b><math>\text{KNO}_3</math>, 1,0 M</b>                                 | 5,0                        | 5,0             |
| <b>Ca (<math>\text{NO}_3</math>)<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O 1,0 M</b> | 5,0                        | 5,0             |
| <b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 1 M</b>                          | 1,0                        | -               |
| <b><math>\text{KH}_2\text{PO}_4</math> 0,05 M</b>                       | -                          | 0,08            |
| <b><math>\text{MgSO}_4</math>. 7H<sub>2</sub>O 1,0M</b>                 | 2,0                        | 2,0             |
| <b>Solución de Fe</b>                                                   | 1,0                        | 1,0             |
| <b>Micronutrientes</b>                                                  | 1,0                        | 1,0             |

#### 5.5. Diseño experimental y toma de muestra

El ensayo se llevó a cabo bajo un diseño completamente aleatorizado, con los siguientes dos tratamientos: +P= 0,86 mMP; -P= 0,004 mMP en la solución nutritiva, estableciendo 48 para cada uno. El nivel de referencia -P se estableció tomando como referencia un ensayo preliminar y en base a Ferrarotto y Ascencio (2007). La unidad experimental estuvo conformada por una planta en un envase.

Se realizaron 4 muestreos de 12 plantas por tratamiento a los 15, 20, 25 y 30 días después de la siembra. En cada tratamiento se tomaron 9 plantas para mediciones de área foliar, peso seco y fósforo total, mientras que con las 3 restantes se determinó el crecimiento radical y la fracción soluble de fósforo (Pi) foliar.

#### **5.6. Variaciones de pH en la solución nutritiva.**

Con el fin de determinar las variaciones del pH, se tomaron alícuotas de tres unidades experimentales al azar por tratamiento cada dos días de una solución nutritiva continua. Las mediciones se realizaron con un potenciómetro (marca Hanna Instruments modelo 8520) desde el momento de la transferencia hasta la última cosecha.

#### **5.7. Cuantificación del crecimiento de las plantas bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo**

##### **5.7.1. Determinación del área foliar**

Una vez separadas las hojas, se determinó el área foliar total de 9 plantas con ayuda de un medidor electrónico (marca Hayashi Denkott modelo AAM-7).

##### **5.7.2. Determinación de la biomasa seca**

Para determinar el peso seco, la parte aérea (vástago=hojas + tallo) y radical de 9 plantas por tratamiento, se colocaron por separado en bolsas de papel previamente identificadas, para posteriormente llevarlas a estufa a 70°C por 48h.

Una vez seco, el material aéreo y radical, se pesó en balanza analítica (marca Sartorius, modelo 2462) y la relación vástago/raíz se derivó de las mediciones anteriores.

### 5.7.3. Determinación de la longitud radical

Al momento de la cosecha se extrajeron las raíces de 3 plantas para cada tratamiento, y en un cilindro graduado de 25 mL, se determinó el volumen de agua (V) en cm<sup>3</sup> desplazado por cada una de ellas. Una vez tomado estos valores, las muestras se conservaron en etanol hasta el momento de las mediciones de longitud, las cuales se realizaron siguiendo el método de las intersecciones de Tennant (1975), como sigue:

La muestra radical preservada en etanol, se rehidrató transfiriéndola a una batería de etanol en el orden siguiente: 30, 20 y 10% durante 30 minutos. La tinción de las raíces se realizó con una solución de safranina 0,05% por 5 minutos, para posteriormente, con la ayuda de una aguja de disección y solución jabonosa, extenderlas sobre una cuadrícula de 1 cm x 1cm y contar las intersecciones totales (verticales y horizontales) por medio de un contador manual. Los valores obtenidos permitieron realizar las estimaciones de longitud radical total, tal y como establece el método:

- ✓ Estimaciones de longitud radical total:

$$L = \frac{11}{14} * 1cm * N^{\circ} \text{ total de intersecciones}$$

- ✓ Estimaciones de la longitud Radical Específica (LRE):

$$LRE = \frac{L}{\text{peso seco de raíces}}$$

## **5.8. Mediciones de fotosíntesis en plantas**

Las mediciones de fotosíntesis se realizaron a los 30 días de edad con un sistema portátil de medición marca ADC (modelo LCpro+), y los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol CO}_2 / \text{m}^2 / \text{s}$ .

## **5.9. Cambios de pH en la rizosfera**

Con el objeto de visualizar la alcalinización o acidificación de la rizósfera de raíces completas, se empleó el procedimiento descrito por Hoffland *et al.* (1989), en el cual se usó una solución con agar al 1% en solución nutritiva -P ajustada a pH 5.8 y un indicador de púrpura de bromocresol al 0.015%. La solución de agar se aplicó sobre las raíces de crotalaria en una bandeja de vidrio y se esperó 24 h a 22°C. Simultáneamente, se prepararon placas de comparación de colores (sin planta) usándose una serie de soluciones buffer  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1M, en el rango de pH siguiente: 3.0; 4.0; 5.0; 6.0; 7.0; 8.0; 9.0 y el indicador púrpura de bromocresol (Ascencio, 1996).

## **5.10. Observación “in vivo” de la liberación de ácidos orgánicos por las raíces de *Crotalaria juncea*.**

Siguiendo la metodología de Dinkelaker y Marschner (1997), se usaron por triplicado, rizotrones de plexiglás de 30x12x3 cm, con 700 g de un suelo areno franco con suplencia limitada de P, proveniente de la Estación Experimental “La iguana” en el estado Guárico cuyas características se describen en el Anexo 1, el cual se esterilizó a 120°C por 72 horas y se fertilizó con 1 ppm de  $\text{KNO}_3$  según sugerencia del Instituto de Edafología de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Bajo condiciones de cobertizo, se sembraron tres semillas de crotalaria, poniéndose en contacto a la tapa deslizante del rizotrón, para posteriormente cubrir sus paredes con papel de aluminio e inclinar para favorecer el desarrollo de las raíces cerca de la tapa deslizante. Los riegos se realizaron cada 3 días con agua destilada y las observaciones se realizaron hasta

los 30 días de edad con el fin de determinar la ocurrencia de algún cambio cualitativo en la rizósfera, tal como la formación de precipitados. Al rizotróon testigo no se le sembraron semillas.

#### **5.11. Contenido de fósforo inorgánico soluble en hojas.**

Para determinar el contenido de Pi soluble foliar se cortaron discos de hojas frescas de las mismas plantas usadas para evaluar crecimiento radical y se maceraron en frío con ácido acético 2% para posteriormente enraizar hasta 50 mL e incubar en hielo por 30 minutos. La solución se centrifugó a 10000 rpm a 4°C y el sobrenadante se analizó según metodología de Fiske Subarrow (1925) modificado por Cooper (1979). La concentración de fósforo inorgánico soluble se expresó en  $\mu\text{g Pi. g}^{-1}$  de peso fresco de hojas.

#### **5.12. Contenido de fósforo total en la materia seca.**

Para determinar el contenido de fósforo total, se tomó por triplicado 0,1 g de materia seca finamente molida en malla 40 de raíces, tallos y hojas, y para cada órgano se hicieron tres repeticiones constituidas por una muestra compuesta de tres plantas cada una del último muestreo (30 días de edad). Las determinaciones analíticas de fósforo se realizaron en el laboratorio de química analítica del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) por medio del método colorimétrico amarillo de vanadato de Olsen.

#### **5.13. Eficiencia de uso y absorción de fósforo**

Las eficiencias de absorción y de uso del fósforo, se calcularon en base al criterio de Ascencio y Lazo (2001), en el cual se emplearon las siguientes relaciones:

- ✓ Eficiencia de absorción de P (EAP) como los mg de P total en parte aérea por cada metro de longitud radical.

$$EAP = \frac{P \text{ total en vástago (mg)}}{\frac{\text{longitud de raíces (m)}}{P \text{ total en solución nutritiva (mg)}}$$

- ✓ Eficiencia de uso de P (EUP) como los g de biomasa seca aérea por cada mg de P total en la planta completa.

$$EUP = \frac{\text{Biomasa seca del vástago (g)}}{\text{P total en la planta (mg)}}$$

- ✓ Índice de distribución de P (IDP) como la relación entre Ptotal en hojas y raíces.

$$IDP = \frac{\text{P total en hojas (mg)}}{\text{P total en raíces (mg)}}$$

#### **5.14. Análisis de los resultados**

Se empleó la prueba de t-Student ( $\alpha=0.05$ ), para determinar diferencias debidas a los tratamientos, y la estadística descriptiva para poder observar variabilidad dentro de un mismo tratamiento.

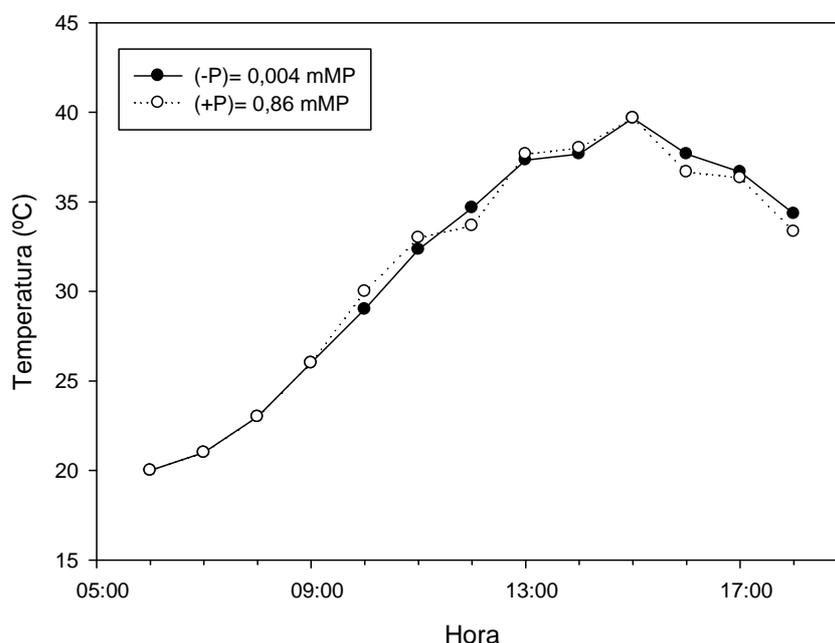
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Condiciones climáticas en el cobertizo

El registro climático de ocho semanas durante el transcurso de la experimentación, reflejó promedios de radiación solar de  $12,14 \text{ MJ.m}^{-2}.\text{dia}^{-1}$  y valores promedios de temperaturas máxima y mínima de  $36,05^{\circ}\text{C}$  y  $19,27^{\circ}\text{C}$  respectivamente con humedad relativa máxima de  $86,1\%$  y mínima de  $28,1\%$ .

### 6.2. Variaciones de temperatura en la solución nutritiva

Durante el transcurso del día se presentó una fluctuación máxima de temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$  en la solución nutritiva, registrándose un mínimo de  $20^{\circ}\text{C}$  a las 6:00 horas y un máximo de  $40^{\circ}\text{C}$  a las 15:00 horas, a partir del cual comienza a descender (Figura 3).



**Figura 3.** Fluctuación diaria de la temperatura en la solución nutritiva en contacto con las raíces de las plantas

### 6.3. Crecimiento de las plantas bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo

El efecto de la deficiencia de fósforo en plantas de crotalaria se observó morfológicamente por una reducción del crecimiento en términos de área foliar y peso seco total, las cuales se hicieron más evidentes a partir de los 25 días de edad (Anexos 6 y 8). En la Figura 4, se observa una muestra del aspecto general de plantas de crotalaria de 30 días de edad, obtenidas bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo.



**Figura 4.** Plantas de *Crotalaria juncea* L. de 30 días de edad obtenidas bajo suficiencia y deficiencia de fósforo

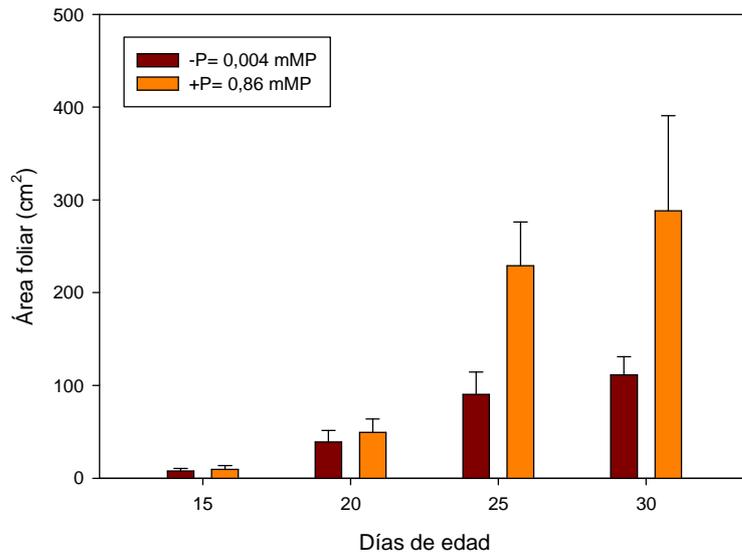
### 6.3.1. Área foliar

En términos generales, los valores de área foliar aumentaron con la edad de las plantas, pero bajo condición -P, dichos valores siempre estuvieron por debajo del testigo +P (Cuadro 2). A los 15 y 20 días, las reducciones del área foliar fueron de 18,70% (de 9,41 en +P a 7,65 cm<sup>2</sup> en -P) y de 20,30% (de 49,2 en +P a 39,21 cm<sup>2</sup> en -P) respectivamente. Las diferencias estadísticas se obtuvieron a partir de los 25 días de edad (Anexos 6 y 8), con clara reducción del área foliar en plantas sometidas a deficiencia de fósforo, la cual fue de 60,5% (desde 228,92 cm<sup>2</sup> en el testigo +P hasta 90,46 cm<sup>2</sup> en -P) (Figura 5, Cuadro 2). La misma tendencia se observó en plantas de 30 días de edad, en el cual la reducción de este parámetro fue de 61,3% (desde 228,22 cm<sup>2</sup> en el testigo +P hasta 111,11 cm<sup>2</sup> en -P) (Figura 5, Cuadro 2). En estas dos últimas edades de muestreo, se registraron reducciones del número de hojas por plantas bajo condiciones de deficiencia, las cuales fueron de 23,5% a los 25 días (desde de 17 en el testigo +P hasta 13 en -P) y de 27,3% a los 30 días (desde 22 hojas en el testigo +P hasta 16 en -P). Sin embargo, aunque esto fue así, a los 25 días no se detectaron diferencias estadísticas entre los tratamientos (Figura 6, Anexo 6).

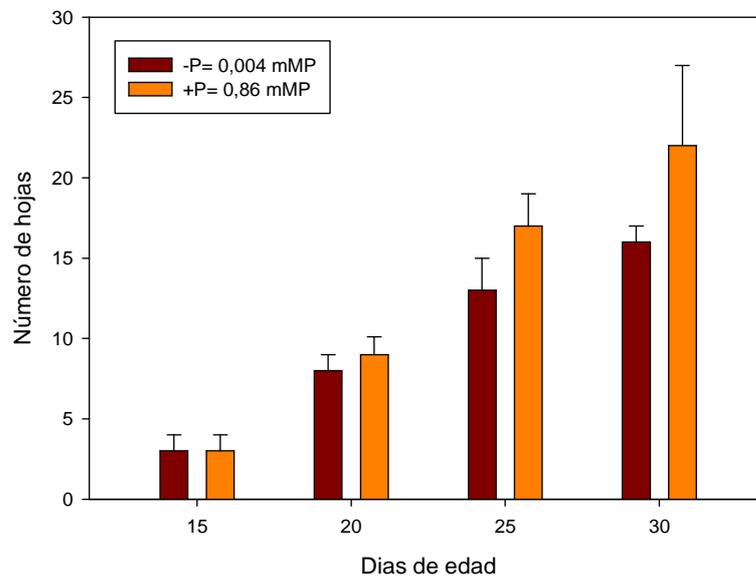
**Cuadro 2.** Valores promedio del número de hojas y área foliar (cm<sup>2</sup>) de plantas de *Crotalaria juncea* a cuatro edades de muestreo, bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo.

| Edad (días) | TRATAMIENTO | Nºhojas   | CV (%) | AF total (cm <sup>2</sup> ) | CV (%) |
|-------------|-------------|-----------|--------|-----------------------------|--------|
| 15          | (-P)        | 3,0 ± 1,0 | 33,88  | 7,65±2,76                   | 36,08  |
|             | (+P)        | 3,0±1,0   | 25,60  | 9,41±4,08                   | 43,30  |
| 20          | (-P)        | 8,0±1,0   | 7,41   | 39,21±12,10                 | 30,86  |
|             | (+P)        | 9,0±1,1   | 12,42  | 49,2±14,6                   | 29,68  |
| 25          | (-P)        | 13,0±2,0  | 13,12  | 90,46±23,74                 | 26,240 |
|             | (+P)        | 17,0±2,0  | 11,54  | 228,92±46,99                | 20,528 |
| 30          | (-P)        | 16,0±1,0  | 7,82   | 111,40±19,33                | 17,355 |
|             | (+P)        | 22,0±5,0  | 22,12  | 288,22±102,63               | 35,610 |

(-P)= 0,004 mMP; (+P)= 0,86 mMP; n=9



**Figura 5.** Área foliar promedio (n=9) de plantas de crotalaria a diferentes edades en condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo.



**Figura 6.** Número de hojas promedio por planta (n=9) de crotalaria a diferentes edades en condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo.

### 6.3.2. Biomasa seca

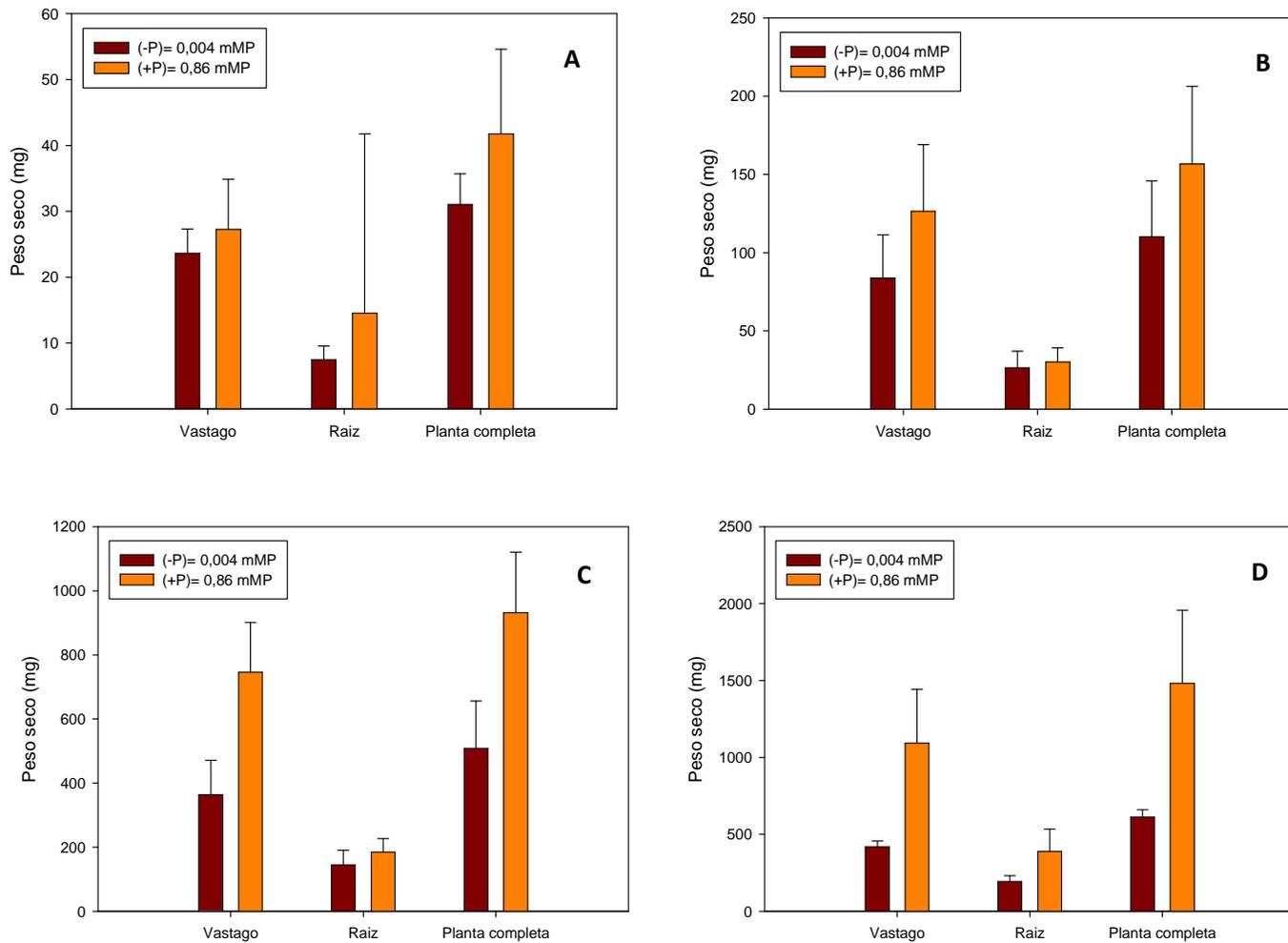
En la Figura 7 se muestran los resultados de peso seco del vástago, raíz y planta completa, y en el Cuadro 3 los valores reflejados por órganos y la relación vástago/raíz.

En términos generales se observó menor acumulación de materia seca en plantas que crecieron bajo el tratamiento deficiente (-P), la cual se hacía más evidente a medida que transcurría el tiempo. A excepción de las plantas de 15 días de edad, los porcentajes de reducción con relación al testigo +P siempre fueron mayores para el vástago que para la raíz, siendo respectivamente de 13,29 y 48,79% a los 15 días, 33,85 y 11,90% a los 20 días; 52,67 y 21,85% a los 25 días y 61,74 y 50,20% a los 30 días (Figura 7).

A los 15 días, la biomasa en las plantas de crotalaria no mostraron diferencias estadísticas, excepto en el peso seco de la raíz (Anexo 2), la cual se redujo en 48,79% bajo condiciones de deficiencia de fósforo (de 14,5 en +P hasta 7,4 en -P). A los 20 días de edad, aunque los pesos de las raíces fueron similares para ambos tratamientos, comienzan a observarse disminuciones en la relación vástago/raíz bajo condiciones de deficiencia (de 4,3 en +P hasta 3,4 en -P) (Cuadro 3).

A los 25 días de edad, las plantas de crotalaria mostraron un descenso de 45,4% en la acumulación de materia seca total bajo condiciones de deficiencia de P con respecto al testigo suficiente (de 931,5 mg en +P hasta 508,3 mg en -P). Aun cuando no existieron diferencias estadísticas para ninguna variable de peso seco (anexo 6), dicha reducción del peso seco total se generó como consecuencia de descensos en el peso seco de todos los órganos evaluados, siendo más significativo en hojas y tallos, los cuales mostraron valores de 52,2% (desde 486,9 mg en +P hasta 232,5 mg en -P) y de 49,5% (desde 259,4 mg en +P hasta 131,0 mg en -P) respectivamente, y en tercer lugar la raíz con un 21,9% en la condición -P (desde 185,3 mg en +P hasta 144,8 mg en -P) (Cuadro 3). También se

determinó un decremento en la relación peso seco vástago/raíz de 36,6% (desde 4,1 en +P hasta 2,6 en -P).



**Figura 7.** Pesos secos de vástagos y raíces de plantas de *Crotalaria juncea* en diferentes edades de muestreo bajo condiciones de deficiencia (-P) y suficiencia (+P) de fósforo. **A:** 15 días de edad, **B:** 20 días de edad, **C:** 25 días de edad, **D:** 30 días de edad. (n=9).

**Cuadro 3.** Pesos secos (mg) de plantas de *Crotalaria juncea* bajo tratamiento suficiente y deficiente de fósforo a cuatro edades de muestreo. Valores promedios y coeficiente de variación.

| Edad (días) | Trat. | HOJA        | CV (%) | TALLO       | CV (%) | RAÍZ        | CV (%) | PStotal      | CV (%) | Vástago/raíz | CV (%) |
|-------------|-------|-------------|--------|-------------|--------|-------------|--------|--------------|--------|--------------|--------|
| 15          | (-P)  | 13,2± 3,2   | 24,41  | 10,4±2,0    | 19,72  | 7,4 ±2,1    | 28,61  | 31,0±4,6     | 14,93  | 3,4±0,9      | 26,37  |
|             | (+P)  | 14,5±5,5    | 38,13  | 12,7±3,3    | 25,62  | 14,5±5,5    | 38,13  | 41,74±12,88  | 30,86  | 1,9±0,3      | 17,77  |
| 20          | (-P)  | 57,1±19,4   | 33,96  | 26,5±8,9    | 33,44  | 26,6±10,6   | 39,76  | 110,3±35,5   | 32,23  | 3,4±0,9      | 25,77  |
|             | (+P)  | 86,9±32,5   | 37,40  | 39,5±15,2   | 38,58  | 30,2±9.1    | 30,26  | 156,7±49,5   | 31,58  | 4,3±0,9      | 20,27  |
| 25          | (-P)  | 232,5±69,6  | 29,94  | 131,0±38,7  | 29,57  | 144,8±45,3  | 31,30  | 508,3±147,5  | 29,02  | 2,6±0,5      | 19,29  |
|             | (+P)  | 486,9±94,1  | 19,32  | 259,4±65,5  | 25,26  | 185,3±41,2  | 22,26  | 931,5±188,8  | 20,26  | 4,1±0,5      | 12,88  |
| 30          | (-P)  | 280,5±43,9  | 15,67  | 164,6±34,4  | 20,87  | 193,5±36,9  | 19,09  | 638,6±104,7  | 16,40  | 2,3±0,35     | 14,93  |
|             | (+P)  | 671,1±172,1 | 25,65  | 422,6±188,8 | 44,66  | 388,5±145,7 | 37,50  | 1482,2±474,0 | 31,98  | 2,9±0,6      | 21,81  |

(-P)= 0,004 mMP; (+P)= 0,86 mMP;  
n=9

Las limitaciones en el crecimiento fueron aún más marcadas a los 30 días de edad, reportándose disminuciones del 56,9% bajo deficiencia de fósforo (desde 1482,2 mg en el testigo +P hasta 638,6 mg en -P), así como también diferencias significativas para todas las variables de peso seco evaluadas (Anexo 8). Las mayores reducciones bajo deficiencia se observaron en el tallo con un 61,8% (desde 422,6 mg en el testigo +P hasta 164,6 mg en -P), seguido de las hojas con un 58,2% (desde 671,1 mg en +P hasta 280,5 mg en -P), y en tercer lugar las raíces con un 50,2% (desde 388,5 mg en +P hasta 193,5 mg en -P) (Figura 7, Cuadro 3). La relación vástago/raíz tuvo un descenso del 20,7% (de 2,9 en +P a 2,3 en -P).

### **6.3.3. Longitud radical total**

En la Figura 8 se muestra un aspecto general de raíces de crotalaria de 20 días de edad crecidas en +P y -P. Para todas las edades, una característica común de las plantas bajo deficiencia fue el alargamiento de las raíces secundarias superficiales en comparación a las obtenidas en suficiencia, donde se observó homogeneidad.

Los resultados obtenidos para longitud radical total y longitud radical específica se pueden observar en el Cuadro 4 y las Figuras 9 y 10. Para los dos primeros muestreos a los 15 y 20 días de edad, se manifestó un aumento en la longitud radical total cuando las plantas fueron sometidas al tratamiento deficiente, estando más acentuada a los 20 días, donde en promedio hubo un incremento en más del doble de la longitud (2,44 veces) bajo dicha condición (de 137,5 cm en el testigo +P hasta 335,7 cm en -P).

Por otro lado, en los siguientes dos muestreos, la tendencia fue contraria, obteniéndose disminuciones de la longitud total de las raíces bajo deficiencia a los 25 días en un 19,76% con respecto al testigo suficiente (desde 1434,5 cm en +P hasta 1153,4 cm en -P) y en un 7,81% a los 30 días (desde 1787,8 cm hasta 1648,17 cm) (Cuadro 4), pero no fue significativa estadísticamente.

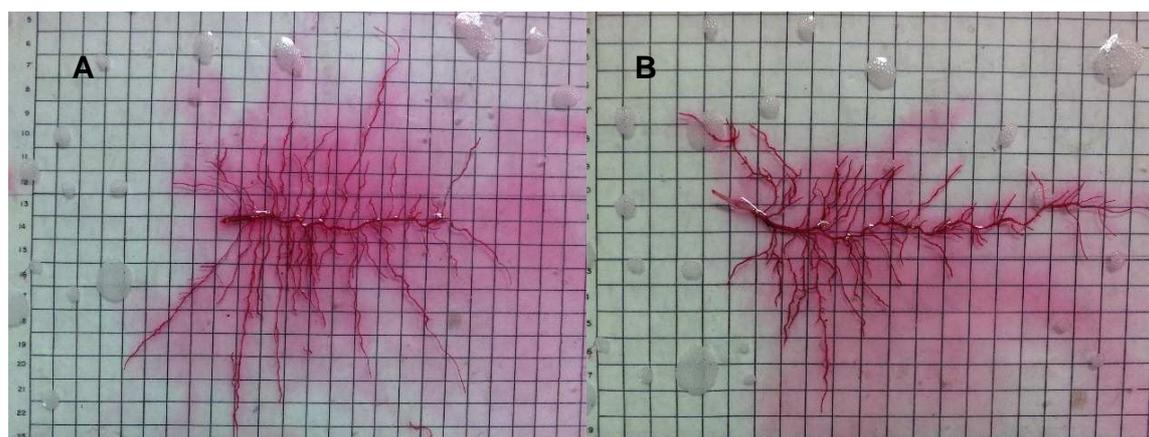
La longitud radical específica (LRE) a los 15 y 20 días de edad fue mayor bajo deficiencia, pero no fue así a los 25 y 30 días, donde mostró valores similares a +P (Cuadro 4, Figura 10). Para esta variable no se lograron obtener diferencias estadísticas entre los tratamientos para ninguna edad de muestreo (ver anexos).

**Cuadro 4.** Valores promedios y coeficiente de variación de la Longitud radical (LR) y Longitud radical específica (LRE) de plantas de *Crotalaria juncea* a diferentes edades bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo.

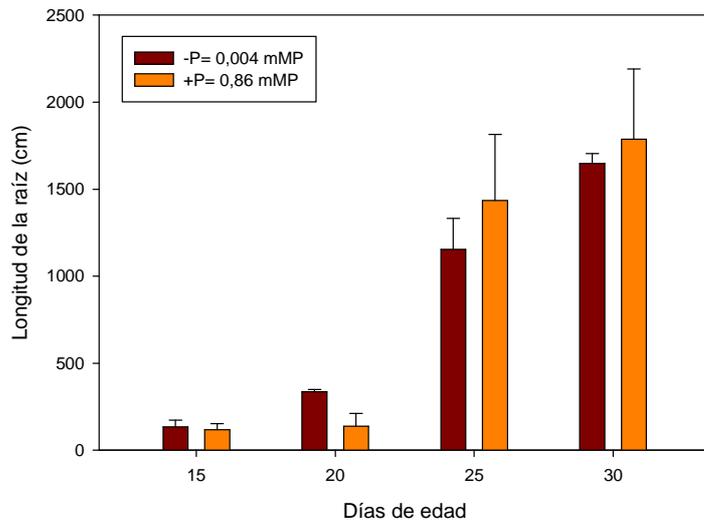
| Edad (días) | TRAT | LR total(cm)  | CV (%) | LRE (cm/mg)  | CV (%) |
|-------------|------|---------------|--------|--------------|--------|
| 15          | (-P) | 133,5±38,9    | 29,16  | 26191±3406,5 | 13,01  |
|             | (+P) | 117,6±34,2    | 29,08  | 20478±4544,4 | 22,19  |
| 20          | (-P) | 335,7±12,3    | 3,66   | 19861±4582,9 | 23,07  |
|             | (+P) | 137,5±73,1    | 53,15  | 12016±2072,4 | 17,25  |
| 25          | (-P) | 1153,4±177,73 | 15,41  | 13844±3565,6 | 25,76  |
|             | (+P) | 1434,5±379,24 | 26,44  | 15680±3730,0 | 23,79  |
| 30          | (-P) | 1648,2±55,837 | 3,39   | 14496±2570,3 | 17,73  |
|             | (+P) | 1787,8±401,95 | 22,48  | 15278±4020,8 | 26,32  |

(-P)= 0,004 mMP; (+P)= 0,86 mMP;

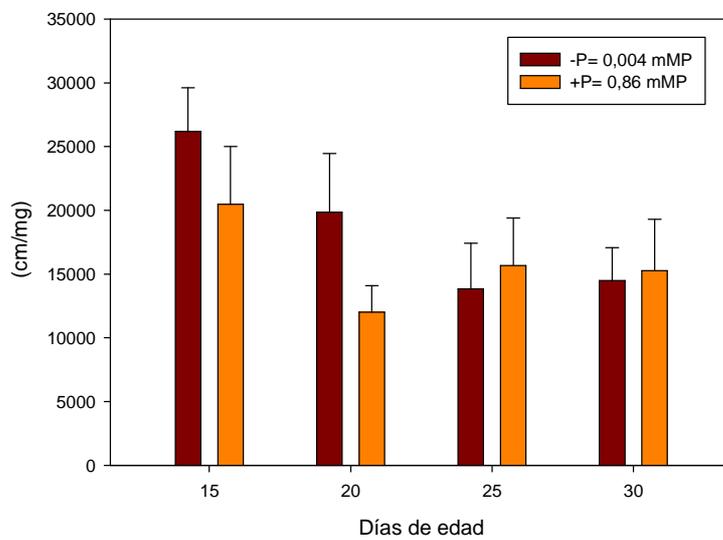
n=3



**Figura 8.** Aspecto general de algunas raíces de crotalaria de 15 días de edad. A: raíces obtenidas en +P; B: raíces obtenidas de -P.



**Figura 9.** Longitud radical total (n=3) de crotalaria a diferentes edades de muestreo bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo.



**Figura 10.** Longitud radical específica (n=3) de crotalaria a diferentes edades de muestreo bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo.

#### 6.4. Tasa de fotosíntesis

Los resultados de la tasa de fotosíntesis en plantas de *Crotalaria juncea* de 30 días de edad fueron:

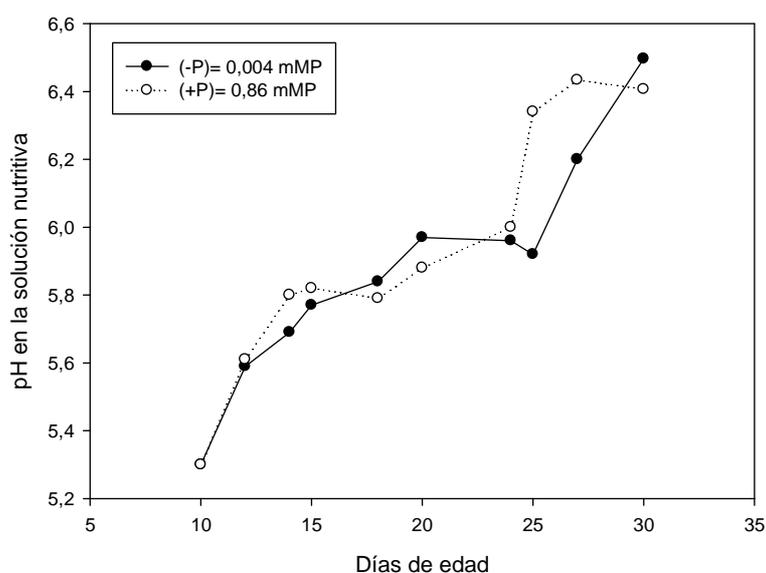
Tratamiento -P (0,004 mMP)=  $30 \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Tratamiento +P (0,86 mMP)=  $41 \mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

#### 6.5. Cambios de pH en la rizósfera

En la Figura 11 se observan los cambios de pH en las soluciones nutritivas +P y -P. La tendencia fue hacia la alcalinización, la cual iba aumentando a medida que las plantas avanzaban en su crecimiento, encontrándose los valores más altos a los 30 días de edad.

Bajo deficiencia de fósforo, el pH se incrementó en un máximo 1,20 unidades con respecto al pH inicial (de 5,3 a 6,50), mientras que bajo condición de suficiencia el incremento fue de 1,11 (de 5,3 a 6,41), pero no siempre los valores de pH en la solución nutritiva -P estuvieron por encima de +P durante todas las edades de las plantas evaluadas.



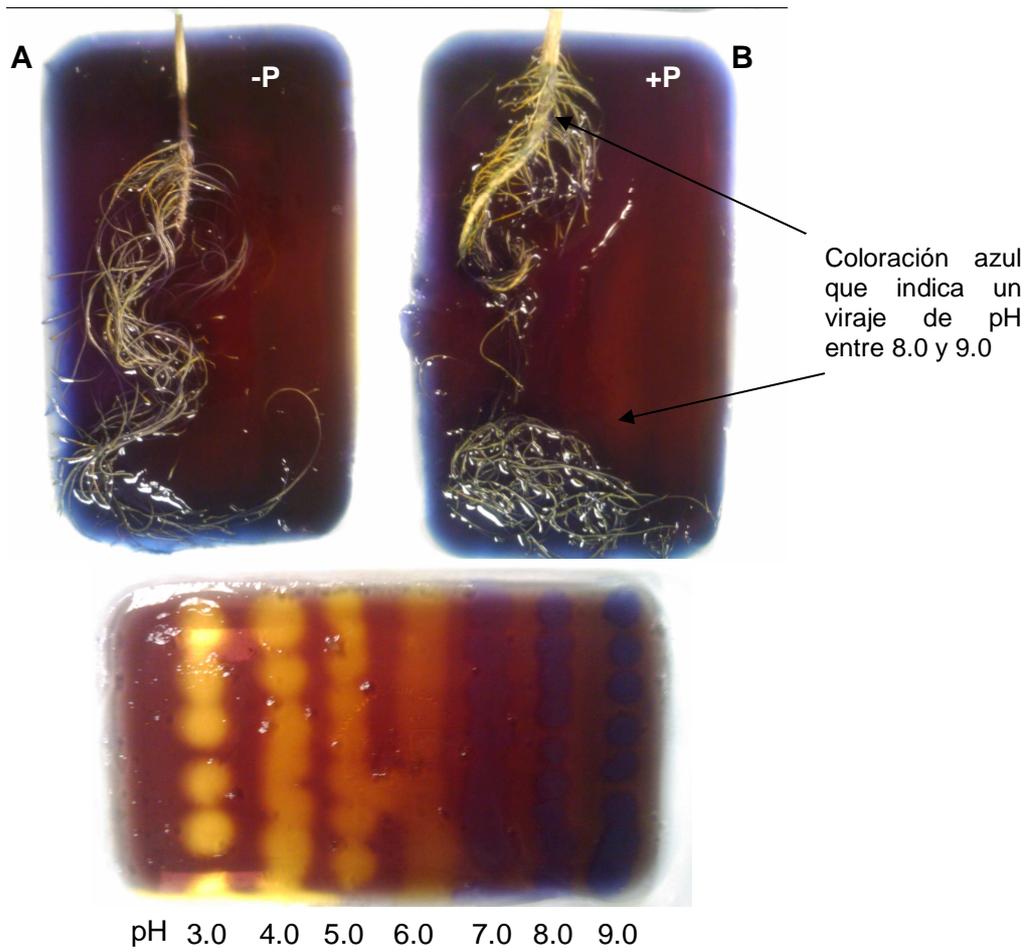
**Figura 11.** Fluctuaciones del pH en la solución nutritiva desde el momento del transplante hasta la última cosecha en plantas de crotalaria.

En cuanto a la observación del efecto de la deficiencia de P sobre el pH de la rizósfera en placas de agar, aún cuando la prueba se repitió varias veces, la coloración del agar a pH inicial de 5.8 no logró obtener el color amarillo pálido característico del púrpura bromocresol al momento del montaje del experimento, por lo cual se presume que el colorante empleado no se hallaba en óptimas condiciones. Sin embargo, por las razones antes expuestas se procedió a realizar una serie de pH en el rango de 3.0 a 9.0 sobre placas de agar sin plantas que permitiera comparar el viraje en el pH de la rizósfera bajo condiciones +P y -P.

La visualización cualitativa de los cambios de pH sobre agar se observan en la Figura 12. Los resultados obtenidos para plantas suficientes (Figura 12B) muestran una tendencia hacia la alcalinización, la cual se observa por la formación de una coloración azulada alrededor de las raíces, indicando que el pH pudiera estar entre 8 y 9, mientras que en tratamiento -P (Figura 12A), se observó la aparición de un color azul menos acentuado, lo que indica que el pH estaría ubicado alrededor de pH 7,0.

## **6.6. Producción de ácidos orgánicos**

En la Figura13 se pueden observar las plantas de *Crotalaria juncea* de 30 días de edad creciendo en rizotrones bajo condición de suplencia limitada de fósforo (Figura 13A), el testigo sin plantas (Figura 13B) y un detalle del crecimiento de la raíz (Figura 13C). Puesto que no se observó la formación de precipitados blancos alrededor de las raíces, los resultados obtenidos indican que bajo las condiciones de experimentación no se logró evidenciar la liberación de ácidos orgánicos en la rizósfera.



**Figura 12.** pH en la rizósfera de *Crotalaria juncea* a los 30 días de edad cultivada en solución nutritiva: (A) deficiente y (B) suficiente de fósforo. Abajo se muestra la placa de comparación de colores.



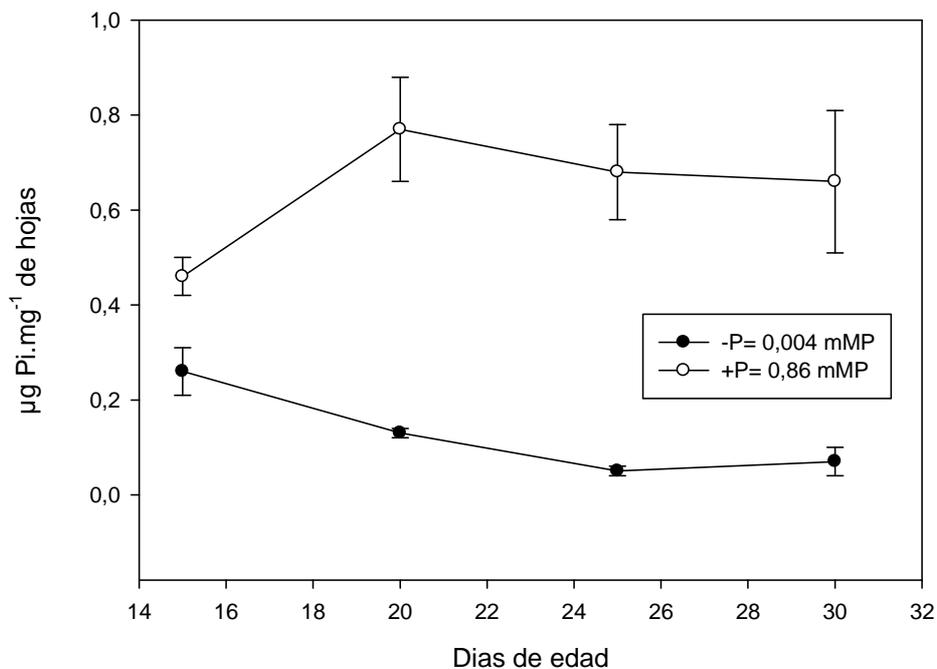
**Figura 13.** Demostración cualitativa de la liberación de ácidos orgánicos. A. Plantas de crotalaria juncea de 30 días de edad cultivadas un suelo -P contenido en rizotrones de plexiglas; B. Rizotrón con suelo -P usado como testigo. C. Detalle de las raíces no evidencian la liberación de ácidos orgánicos.

## **6.7. Contenido de fósforo en la planta y eficiencia de uso y absorción.**

### **6.7.1. Pi soluble foliar**

Se observó una clara diferencia entre la concentración del Pi en tejido foliar fresco en deficiencia y suficiencia (Figura 14). La tendencia general del Pi soluble fue a la disminución a medida que transcurría el crecimiento de las plantas. En comparación al testigo +P, las reducciones en la concentración de fósforo inorgánico soluble expresada como  $\mu\text{g Pi. mg}^{-1}$  de hojas frescas en -P fueron del 44,14% a los 15 días de edad (de 0,46 en +P a 0,26 en -P); 82,87% a los 20 días

(0,77 en +P a 0,13 en -P); 92,12% a los 25 días (0,69 en +P a 0,05 en -P) y del 89,83% a los 30 días (de 0,66 en +P a 0,07 en -P).



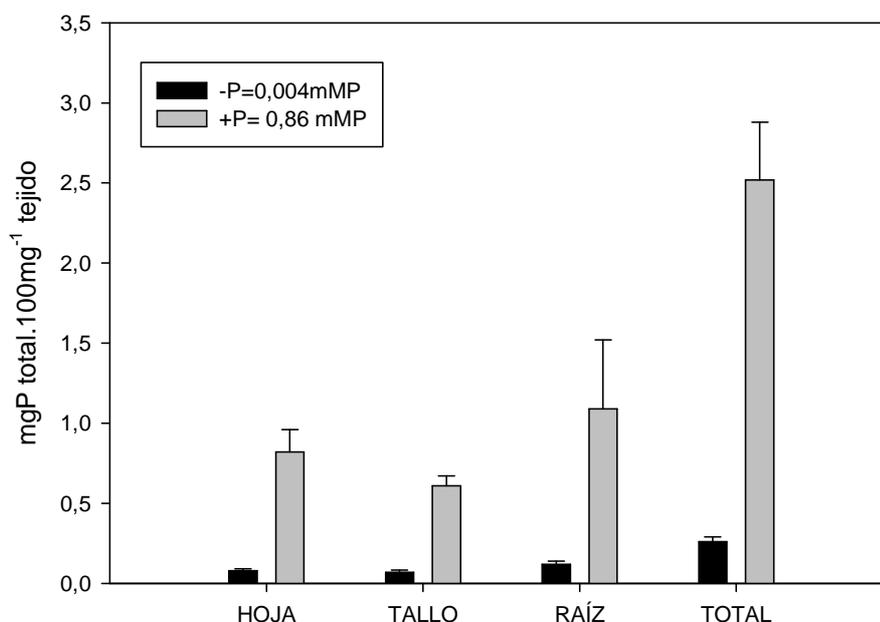
**Figura 14.** Concentración de Pi soluble en hojas frescas de crotalaria a diferentes edades de muestreo bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo (n=3).

### 6.7.2. Fósforo total y eficiencias de uso y absorción de fósforo

Los resultados de las determinaciones de fósforo total obtenidas por digestión de la materia seca tanto de órgano como de la planta completa se pueden observar en las Figuras 15 y 16 y en los Cuadros 5 y 6.

En el tratamiento deficiente, las concentraciones de fósforo total (P total) expresadas como porcentaje ( $\text{mg P} \cdot 100 \text{ mg}^{-1}$  de tejido seco) a los 30 días,

siempre estuvieron por debajo del testigo +P para todos los órganos de la planta evaluados, observándose reducciones similares para las hojas, tallos y raíces, las cuales fueron del 89,33%, 89,01% y 90,28% respectivamente. Esto generó que para la planta completa una disminución del 89,56%.



**Figura 15.** Concentración de P total en materia seca de hojas, tallos, raíces y planta completa de crotalaria de 30 días de edad bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo (n=9).

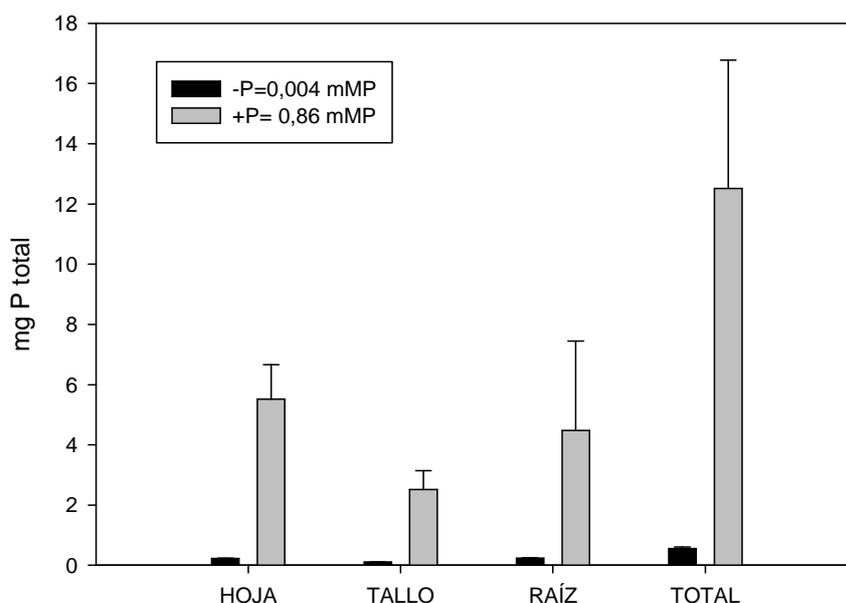
**Cuadro 5.** Concentración de fósforo total en plantas de crotalaria de 30 días de edad bajo condiciones de deficiencia (-P) y suficiencia (+P) de fósforo

| (mg P/100 mg MS) |           |            |           |                 |
|------------------|-----------|------------|-----------|-----------------|
| Tratamiento      | Hojas     | Tallos     | Raíces    | Planta completa |
| (-P)             | 0,08±0,01 | 0,07±0,012 | 0,12±0,02 | 0,26±0,03       |
| (+P)             | 0,82±0,14 | 0,61±0,06  | 1,09±0,43 | 2,52±0,36       |

(-P)= 0,004 mMP; (+P)= 0,86 mMP  
n=9 plantas

Asimismo, el contenido de fósforo por órganos, expresado como mg de P total, también mostró valores menores bajo condición de deficiencia, con reducciones

del 94,01% en hojas (de 5,52 en +P a 0,22 en -P), 95,63% en tallos (2,52 en +P a 0,11 en -P), 94,87% en raíces (de 4,48 en +P a 0,23 en -P), lo cual generó a su vez una reducción del 95,23% en la planta completa (de 12,52 en +P a 0,56 en -P) en comparación al testigo +P. Para ambos tratamientos, el órgano que mostró proporcionalmente menor contenido de fósforo fue el tallo (Figura 16, Cuadro 6).



**Figura 16.** Contenido de P total en materia seca de hojas, tallos, raíces y planta completa de crotalaria de 30 días de edad bajo condiciones de suficiencia (+P=0,86mMP) y deficiencia (-P=0,004mMP) de fósforo (n=9).

**Cuadro 6.** Contenido de fósforo total en plantas de crotalaria de 30 días de edad bajo condiciones de deficiencia (-P) y suficiencia (+P) de fósforo

| (mg P en MS) |           |            |           |                 |
|--------------|-----------|------------|-----------|-----------------|
| Tratamiento  | Hojas     | Tallos     | Raíces    | Planta completa |
| (-P)         | 0,22±0,03 | 0,11±0,004 | 0,23±0,02 | 0,56±0,05       |
| (+P)         | 5,52±1,14 | 2,52±0,62  | 4,48±2,97 | 12,52±4,26      |

(-P)= 0,004 mMP; (+P)= 0,86 mMP  
n=9 plantas

Los resultados de las eficiencias de absorción de fósforo (EAP), de uso del fósforo (EUP) y el índice de distribución o partición de fósforo (IDP) se muestran en el Cuadro 7.

La EAP, expresada como miligramos de P contenidos en la biomasa aérea por metro de longitud total de las raíces y miligramos de P en solución nutritiva, aumentó significativamente (9,4 veces) bajo condición de deficiencia, con valores de 2000,12 en comparación a los 212,4 que mostró el testigo +P. Al igual, la EUP expresada como la biomasa aérea producida por miligramo de P en la biomasa total, se mostró 8,7 veces mayor bajo condiciones de deficiencia, con valores de 0,78 en -P en comparación a los 0,09 del testigo +P. El

IDP estuvo ligeramente disminuido en plantas estresadas bajo la condición -P con valores de 0,94 en comparación al 1,32 del testigo +P.

**Cuadro 7.** Índices de eficiencia de fósforo en plantas de crotalaria de 30 días de edad bajo condiciones de deficiencia (-P) y suficiencia (+P) de fósforo

| Tratamiento | EAP<br>(mg P en PA. m <sup>-1</sup> L raíces.<br>mg P <sup>-1</sup> en solución) | EUP<br>(g de peso seco PA. mg <sup>-1</sup><br>P en la planta) | IDP<br>(mg P hojas/mg P raíz) |
|-------------|----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| (-P)        | 2000,12                                                                          | 0,78                                                           | 0,94                          |
| (+P)        | 212,51                                                                           | 0,09                                                           | 1,32                          |

(-P)= 0,004 mMP; (+P)= 0,86 mMP; PA: Parte aérea; L: longitud  
n=9 plantas

## 7. DISCUSIÓN

Muchas han sido las especies vegetales cultivadas y silvestres donde se han estudiado el efecto de la deficiencia de fósforo sobre el crecimiento (Ascencio 1996, Bernal *et al.*, 2007; Oosterhuis *et al.*, 2008, entre otros). Sin embargo, aunque el género *Crotalaria* se ha venido insertando en los últimos años con diversos fines en la agricultura, son muy pocos los trabajos realizados que han permitido determinar el efecto del estrés por deficiencia de fósforo sobre su fisiología (Cordero *et al.*, 2005, Ferrarotto y Ascencio, 2007; Ferrarotto, 2009).

En este estudio, el efecto de la deficiencia de fósforo sobre *Crotalaria juncea* L. se manifestó por una baja acumulación del peso seco total de las plantas, pero en mayor grado, en una reducción del área foliar, que se hizo más acentuada a medida que transcurrían los días en deficiencia de fósforo, coincidiendo con lo señalado por Cordero *et al.* (2005) y Oosterhuis *et al.* (2008), quienes encontraron que en *Crotalaria spectabilis* y *Gossypium hirsutum* la deficiencia del fósforo generó severas reducciones en el área foliar. En este trabajo, las mayores reducciones del área foliar se encontraron a los 25 y 30 días con 60,5% y 61,3% respectivamente (Cuadro 2), lo cual significa que las diferencias entre plantas estresadas y no estresadas fueron bastante marcadas. Estos resultados también concuerdan con los obtenidos en *Ruellia Tuberosa* y *Euphorbia heterophylla* (Ascencio y Lazo, 1997), *Lycopersicum esculentum* (Briceño, 2001), *Crotalaria spectabilis* (Cordero *et al.*, 2005), *Phaseolus vulgaris* (Bernal *et al.*, 2007). Dicha reducción del área foliar bajo deficiencia se ha señalado como el resultado de una alteración de la división y elongación celular (Kavanová *et al.*, 2006), lo cual afecta la expansión foliar y el número de hojas formadas (Ascencio, 1994; Ascencio y Lazo, 1997), lo que podría implicar la activación de un mecanismo regulatorio del control de la división en hojas estresadas por deficiencia de P (Chiera *et al.*, 2002). Aun cuando en este trabajo hubo una reducción del área foliar en deficiencia, las disminuciones del número de hojas en 23,50% y 27,3% en -P a los 25 y 30 días de edad respectivamente, no fueron significativas estadísticamente.

Las reducciones en la acumulación de biomasa, reflejada en los bajos valores de peso seco total obtenidas en este trabajo con plantas de crotalaria bajo deficiencia de fósforo, también se ha señalado como una respuesta muy común en otras especies cultivadas o no, tales como *Desmodium tortuosum* y *Cajanus cajan* (Ascencio, 1996; Ascencio y Lazo, 2001), *Ruellia tuberosa* y *Euphorbia heterophylla* (Ascencio y Lazo, 1997), *Lycopersicon esculentum* (Briceño, 2001), *Phaseolus vulgaris* (Ascencio y Lazo, 2001, Bernal *et al.*, 2007), *Gossypium hirsutum* L. (Oosterhuis *et al.*, 2008). Así mismo, Ascencio (1996) señaló, que las reducciones de la biomasa bajo condición -P podría estar asociada primariamente a las reducciones del desarrollo del área foliar, lo cual generan diferencias en la tasa fotosintética. En concordancia con lo anterior, las reducciones en el crecimiento (Figura 4) y en los pesos secos en crotalaria bajo estrés por P (Cuadro 3, Figura 7), se pueden explicar parcialmente por disminuciones en la tasa de fotosíntesis, las cuales fueron de 41  $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}$  área foliar.  $\text{s}^{-1}$  en +P a 30  $\mu\text{mol CO}_2\cdot\text{m}^{-2}$  área foliar.  $\text{s}^{-1}$  en -P. Es probable que estas reducciones de la tasa fotosintética en deficiencia se deban a cambios internos en la planta, como ocurrió en *Glycine max* por disminuciones en el tamaño del pool RuBP (Fredden *et al.*, 1989) y en *Helianthus annuus* y *Zea mays* por reducciones excesivas en el ATP (Jacod y Lawlor, 1992).

En comparación a +P, los pesos secos de los vástagos siempre fueron menores bajo el tratamiento -P. En este sentido, los porcentajes de reducción hallados entre +P y -P para el vástago fueron del 13,29% a los 15 días, 33,85% a los 20 días; 52,67% a los 25 días y 61,74% a los 30 días (Figura 7). En todos los muestreos, a excepción de los 15 días, se redujo más el peso seco en el vástago que en las raíces, lo cual concuerdan con lo hallado por Ascencio y Lazo (1997), Briceño (2001), Fragoso *et al.* (2005) y Bernal *et al.*, (2007) quienes señalaron que en las plantas de nabo, yuca, Euphorbia, tomate, soya y caraota, la deficiencia de fósforo afectó en mayor medida el crecimiento del vástago en relación a la raíz, y con López-Bucio (2003) y Fragoso *et al.* (2005), quienes afirman que la deficiencia de fósforo limita el desarrollo de la parte aérea de las plantas, para

favorecer el desarrollo de las raíces. Sin embargo, aunque en este experimento, no se observaron aumentos en los pesos secos de las raíces bajo condiciones de deficiencia (-P), sí se pudieron detectar disminuciones de la relación vástago/raíz (Cuadro 3) lo cual según diversos autores es un marcador de estrategias morfológicas que les permite a las plantas escapar a la deficiencia de fósforo en los tejidos, como es el caso de las leguminosas *Arachis pintoi* (Watanabe *et al.*, 2006), *Phaseolus vulgaris* (Parra *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2007) y otras plantas como *Desmodium tortosum* y *Cajanus cajan* (Ascencio, 1996), entre otras. Aunque los datos aquí obtenidos indican que no siempre existe aumento de la biomasa radical bajo deficiencia (-P), las raíces de *Crotalaria juncea* parecen continuar su crecimiento a expensas del vástago.

Se ha establecido que para muchas especies, entre las que se mencionan *Cajanus cajan* (Ascencio, 1996), una respuesta ante la deficiencia de fósforo es el aumento de la longitud radical total (L), con el fin de poder explorar mayor volumen de sustrato y encontrar el fósforo en zonas donde pudiera estar disponible. Los resultados obtenidos en este trabajo indicaron que las raíces de las plantas de crotalaria estresadas por deficiencia de fósforo, fueron más largas que las obtenidas en +P solo durante los dos primeros muestreos (a los 15 y 20 días), estando más acentuada a los 20 días, donde hubo un incremento en más del doble (2,44 veces), mostrando a su vez valores de longitud radical específica más altos (19861 cm/mg en -P y 12016 cm/mg en +P) que indica que para ese momento, las raíces de esta especie fueron más largas y delgadas que aquellas obtenidas en el testigo, lo cual había sido observado cualitativamente al hacer comparaciones con raíces en +P al momento de la cosecha (Cuadro 4, Figuras 9 y 10). Resultados similares al anterior consiguieron Shen *et al* (2003) en *Lupinus albus*, en el cual la longitud radical específica se incrementó rápidamente desde 17m.g<sup>-1</sup> a 28m.g<sup>-1</sup> a los 40 días bajo condición -P.

A los 25 y 30 días de edad se observaron bajos porcentajes de disminución de la longitud radical total en -P de 19, 76% y 7,81% respectivamente, los cuales no

pueden considerarse como reducciones significativas, a diferencia de otras especies tales como *Lycopersicum esculentum* de 21 días bajo estrés (García y Ascencio, 1992), *Desmodium tortuosum* (Ascencio, 1996) y otras plantas silvestres como *Euphorbia heterophylla* y *Ruellia tuberosa* (Ascencio y Iazo, 1997), donde la deficiencia de fósforo redujo significativamente la longitud de las raíces.

Los resultados obtenidos en este trabajo parecen señalar que las plantas de crotalaria podrían estar activando esta estrategia morfológica en su estado más temprano del crecimiento vegetativo, lo cual a su vez estaría indicando que este tipo de respuestas ante el estrés dependen de otros factores intrínsecos a las plantas, tales como la edad.

Las respuestas en el crecimiento ante el estrés por fósforo son diversas y varían con las especies. Para algunas, entre las que se denota *Lupinus albus* es muy común el surgimiento de raíces agrupadas (proteoideas), las cuales tienen una maquinaria fisiológica distinta a las raíces normales (Dinkelaker *et al.*, 1989; Shen *et al.*, 2003; Shane y Lambers, 2005), así como también en *Arabidopsis thaliana* se ha observado el aumento de la longitud de pelos absorbentes (Bates y Lynch, 1996) y en *Crotalaria juncea*, la deficiencia de fósforo no induce la formación de raíces proteoideas, pero sí genera el surgimiento de raíces laterales de órdenes superiores (Ferraro, 2009). Las observaciones realizadas en este estudio permitieron conocer que bajo deficiencia de fósforo parece ocurrir un alargamiento de las raíces secundarias superficiales (Figura 8), tal como reportaron Friesen *et al.* (1997) quienes manifestaron que entre el 38 y 42% de las raíces de leguminosas bajo deficiencia de P se encontraron en los primeros 10 cm de un suelo oxisol.

La capacidad de respuesta de las plantas a la condición de deficiencia depende a su vez del genotipo de la especie, un ejemplo de esto fue publicado por Parra *et al.* (2004), quienes determinaron que el cultivar de caraota C60 presenta susceptibilidad a la deficiencia, considerando a MAR 1 como tolerante puesto que aún bajo estrés no disminuye significativamente la biomasa del vástago,

conservando a su vez una relación vástago/raíz similar a la obtenida en suficiencia, lo cual es una característica importante de aquellas plantas que son eficientes en la absorción del fósforo. El trabajo anterior fue confirmado por Bernal *et al.* (2007) haciendo uso de los mismo cultivares. Así mismo, mientras que en algunas especies como *Desmodium tortuosum* (Ascencio, 1996), no parece ocurrir un incremento del crecimiento radical, en otras como *Cajanus cajan*s (Ascencio, 1996), si se activa esta estrategia bajo condiciones de estrés por fósforo, lo cual indica que los resultados obtenidos en una especie en particular no es extrapolable para otros genotipos de la misma u otras especies.

En función a las raíces, las estrategias fisiológicas que se activan en esta zona y modifican la dinámica de la rizósfera como respuesta a la deficiencia de fósforo, también son importantes para otorgar a las plantas parte de la tolerancia al estrés. Aquí, se estudiaron las variaciones en el pH de la solución nutritiva cuya tendencia general fue hacia la alcalinización en ambos tratamientos (Figura 11). Tal como lo expresó De Rijck y Schrevens (1998), los cambios de pH obtenidos en la solución, pueden originarse por reacciones de disociación, complejación y precipitación, lo cual hace variar la composición química de la solución nutritiva, así como también por una absorción desigual de iones y cationes. En este sentido Dakora y Phillips (2002) señalan que cuando la absorción aniónica excede la catiónica, las raíces de las plantas secretan  $\text{HCO}_3^-$  para mantener el potencial eléctrico en la neutralidad, incrementando así el pH de la rizósfera, Este y otros estudios han permitido determinar que las raíces de las plantas cumplen un rol modificador importante del pH de la rizósfera (Ascencio y Lazo, 2001; Briceño, 2001). Los resultados obtenidos en la solución nutritiva (Figura 11) apoyan los reflejados en la técnica de placas de agar (Figura 12), donde también se evidenció alcalinización (entre pH 8,0 y 9,0) de la rizósfera en raíces cultivadas en +P y en menor grado en el tratamiento -P (alrededor de pH 7,0). Con la técnica de agar no se lograron encontrar valores de pH menores a 7,0 en -P. Aunque bajo estas condiciones de experimentación, la técnica de agar no permitió observar acidificación, como hallaron Briceño (2001), Parra *et al.* (2004) y Cordero *et al.* (2005) en tomate,

carota y *Crotalaria spectabilis* bajo condición de deficiencia respectivamente, sí se logró observar que el pH estuvo por debajo del testigo suficiente. Aunque muchos reportes han señalado la exudación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular por las raíces como una respuesta de gran importancia bajo deficiencia de P (Dinkelanker *et al.*, 1989; Hoffland *et al.*, 1989; Johnson, 1994; Neumann *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2003), para liberar el fósforo secuestrado bajo formas inorgánicas poco solubles (Ca-P; Al-P, Fe-P), en este estudio no se manifestaron evidencias perceptibles de su producción, lo cual puede explicar parcialmente el hecho de no encontrar en gran medida acidificación de la rizósfera de raíces bajo condiciones de deficiencia, por lo cual se presume que las plantas de *Crotalaria juncea* tiene un comportamiento fisiológico distinto ante la condición -P.

Las estrategias anteriormente señaladas son empleadas por las plantas para absorber de forma eficiente el fósforo del suelo y de esta forma al menos mantener un estatus mínimo de fósforo requerido para sus funciones vitales. Bajo condiciones de deficiencia de P, los contenidos de P total en hojas y raíces disminuyen drásticamente (Watanabe *et al.*, 2006). En este trabajo, también se hallaron valores menores del contenido de P total bajo deficiencia en todos los órganos de la planta, observándose una significativa reducción en el vástago (Cuadro 6), así como también reducciones del Pi soluble foliar, la cual se hace mayor a medida que transcurre el tiempo en deficiencia. El Pi soluble está involucrado en las reacciones metabólicas de las plantas, lo que nos hace suponer que bajo estas condiciones estresantes, ocurre una redistribución del P hacia las raíces, afectando así los pesos secos de la parte aérea (Cuadro 3 y Figura 7). Estos resultados difieren con los hallados por Bernal *et al.* (2007) en el cultivar de carota tolerante MAR1, en el cual el contenido de P disminuyó en la raíz debido a una retranslocación hacia el vástago, por lo que no se afectó en gran medida su materia seca aérea, pero concuerdan con Watanabe *et al.*, (2006), en plantas de *Arachis pintoi*.

La capacidad que muestran las plantas para crecer en un medio con bajo contenido de fósforo, dependen tanto de la eficiencia del uso del P como de la eficiencia de absorción (Marschner, 1995). En este sentido, aunque bajo las condiciones de este trabajo, las raíces de *Crotalaria juncea* de 30 días no mostraron diferencias significativas de longitud en ambos tratamientos, la eficiencia de absorción de P (EAP) aumentó en gran medida (9,4 veces) bajo la condición -P, lo cual señala que comparativamente, las plantas deficientes logran por medio de diversas estrategias, absorber más fósforo por longitud de raíces en la solución nutritiva con menor contenido de P. Bajo condiciones de este estudio, también se observó que la eficiencia de uso del fósforo (EUP) aumentó casi 9 veces en condición -P (Cuadro 7), lo cual indica que bajo estrés, las plantas logran producir mayor cantidad de materia seca aérea por cada miligramo de P total contenida en ella, en comparación a aquellas crecidas en +P, lo que demuestra que es una de las estrategias activadas para su sobrevivencia, tal como señalaron Briceño (2001) en tomate y Cordero *et al.* (2005) en *Crotalaria spectabilis*. Asimismo, Ascencio y Lazo (2001), encontraron que las plantas de frijol tratadas continuamente con la fuente poco soluble Ca-P, presentaron una baja EAP y alta EUP, lo cual acordaron como una combinación deseable en condiciones de suelos marginales.

En resumen, las plantas de *Crotalaria juncea* bajo deficiencia de fósforo reducen la acumulación de biomasa seca y los valores de relación vástago/raíz. Las diferencias en longitud radical debidas a la deficiencia se registraron solo a los 15 y 20 días de edad, estando el máximo a los 20 días. Aunque no se observó la producción de ácidos orgánicos por las raíces, si se evidenció una pequeña disminución del pH en la rizósfera bajo -P, la cual tendió hacia la neutralidad. Los resultados obtenidos en este capítulo afirman que aunque los valores de fósforo total en todos los órganos y el fósforo soluble foliar, siempre fueron menores bajo condiciones de deficiencia de fósforo, la tolerancia de *Crotalaria juncea* a dicho estrés se debe fundamentalmente a una alta eficiencia en la absorción y en el uso interno del fósforo.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DEL CAPÍTULO I

**ABREU, X.** 1996. Evaluación de cuatro leguminosas como barbecho mejorado durante dos épocas del año para ser usadas como cultivos de cobertura. *Venezuelos*. 4:8-13.

**ACIEGO, J.** 1995. Efectos de los abonos verdes (*Crotalaria juncea*) y los sistemas de labranza conservacionista sobre la dinámica de algunas poblaciones microbianas de un suelo del valle medio del Río Yaracuy. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía. UCV. 191 pp.

**AE, N., J. ARIHARA, K. OKADA, T. YOSHIHARA, C. JOHANSEN.** 1990 Phosphorus uptake by pigeon pea and its role in cropping systems of Indian subcontinent. *Science* 248: 477-480.

**ARNAUDE, O.** 1994. Influencia del estrés por fósforo sobre el desarrollo y la respiración en caraota (*Phaseolus vulgaris* CV. Manuare), frijol (*Vigna unguiculata* CV. Tuy), Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Pira (*Euphorbia heterophylla*) y Amaranthus (*Amaranthus dubius*). Tesis de maestría. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. 179 pp.

**ASCENCIO, J.** 1994. Acid phosphatase as a diagnostic tool. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25: 1553-1564.

**ASCENCIO, J.** 1996. Growth strategies and utilization of phosphorus in *Cajanus cajan* L. Millsp. and *Desmodium tortuosum* (Sw) DC under phosphorus deficiency. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27: 1971-1993.

**ASCENCIO, J., J.V. LAZO.** 2001. Crecimiento y eficiencia de fósforo de algunas leguminosas cultivadas en arena regada con soluciones nutritivas con fosfatos inorgánicos de hierro y de calcio. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 18:13-32.

**ASCENCIO J; J.V LAZO.** 1997. Growth evaluation during the vegetative phase of dicotyledonous weeds and under phosphorus deficiency. *Journal of plant Nutrition.* 20: 27-45 pp.

**ASSUERO, S., A. MOLLIER, S. PELLERIN.** 2004. The decrease in growth of phosphorus-deficient maize leaves is related to a lower cell production. *Plant Soil* 132: 85-90.

**AZCÓN-BIETO, J., M. TALÓN.** 2008. Fundamentos de Fisiología vegetal. 2° Edición. Editorial McGraw-Hill. Interamericana. 639 pp.

**BARBER, S.** 1995. Soil Nutrient Bioavailability: A mechanistic Approach Wiley. New York. 414 pp.

**BATES, T., P. LYNCH.** 1996. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment.* 19: 529-538

**BERLINGERI, C., N. JUNCOSA, T. PÉREZ.** 2008. Evaluación de cinco leguminosas en barbecho mejorado para el control de malezas en la planicie del Río Motatán, Estado Trujillo, Venezuela. *Agron. Trop.* 58: 117-123.

**BERNAL, L; P. COELLO, J. ACOSTA, E. MARTINEZ.** 2007. Efecto de la deficiencia de fósforo en el metabolismo de carbono de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). *Agrociencia.* 41: 417-423 pp.

**BRAVO, C., A. FLORENTINO.** 1999. Efecto de diferentes sistemas de labranza sobre las propiedades físicas del suelo y su influencia sobre el rendimiento del Algodón. *Bioagro.* 9: 67-75.

**BRICEÑO, Z.** 2001. Estudio de algunas respuestas fisiológicas y Bioquímicas de *Lycopersicon esculentum* Mill var. Rio Grande bajo condiciones de deficiencia y

suficiencia de fósforo. Tesis de maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 117 pp.

**BRUNNER, B., S. MARTÍNEZ, L. FLORES, P. MORALES.** Sf. *Crotalaria*. Proyecto de Agricultura Orgánica. Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales. Estación Experimental de Lajas. Puerto Rico. [Disponible en línea, 25/07/2009]: <http://proorganico.info/crotalaria2.pdf>

**BUCHANNAN, B., W. GRUISSEM, R. JONES.** 2000. Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. 1367 pp.

**CARDONA, R.** 2008. Efecto del abono verde y *Trichoderma harzianum* sobre la población de esclerocios y la incidencia *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 25: 440-454

**CASANOVA, E.** 2005. Introducción a la Ciencia del Suelo. CDCH. Universidad Central de Venezuela. 482 pp.

**CHEE, Y.K., C.P. CHEN.** 1992. *Crotalaria juncea* L. In: 't Mannetje, L. and Jones, R.M. Eds: Plant Resources of South-East Asia No 4. Forages. Pudoc-DLO, Wageningen, the Netherlands. 98-100 pp.

**CHEN, Z; Y. CHEN; W. DICKSON.** 2004. Nematology, advances and perspectivas. Vol 2. Tsinghua University. CABI Publishing. 1254 páginas

**CHIERA, J., J. THOMAS, t. RUFTY.** 2002. Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. Journal and experimental Botany. 53: 473-481.

**CIAT.** 1999. Manejo de coberturas en el departamento de Santa Cruz. 89 pp.

**COOK, C., G. WHITE.** 1996. *Crotalaria juncea*: A potential multi-purpose fiber crop. In: J. Janick (ed.), Progress in new crops. ASHS Press, Arlington, VA. p.

389-394. [Disponible en línea, 25/07/2009]:  
<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1996/v3-389.html>

**COOPER, G.** 1979. The tools of biochemistry. Chapter 2: Spectrophotometry. Determination of inorganic phosphate. Wiley. Interscience Publication. New York. 423 pp.

**CORDERO, Y; BRICEÑO, Z; ASCENCIO, J.** 2005. Respuestas fisiológicas de *Crotalaria spectabilis* Roth cultivada en solución nutritiva deficiente y suficiente en fósforo. Anales de Botánica Agrícola. 12:19-30.

**DAKORA, F., D. PHILLIPS.** 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low nutrient environment. Plant and Soil. 245: 35-47.

**DE RIJCK G., E. SCHREVEVS.** 1998. Comparison of the Mineral Composition of Twelve Standard Nutrient Solutions. J. Plant Nutr. 21: 2115-2125.

**DINKELAKER, B., V. RÖMHELD, H. MARSCHNER.** 1989. Citric and excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). Plant, Cell and Environ. 12: 285- 292.

**FAYE, I; O. DIOUF; A. GUISSÉ; M. SÈNE AND N. DIALLO.** 2006. Characterizing Root Responses to Low Phosphorus in Pearl Millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.]. Agron J 98:1187-1194

**FERNANDEZ, N; L. ORTEGA.** 2002. Efecto de la edad de incorporación de dos abonos verdes sobre algunas propiedades del suelo y el rendimiento del rábano (*Raphanus sativus*). Venesuelos 10:18-31

**FERRAROTTO, M.** 2009. Morfología del sistema radical de *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae) y su capacidad de solubilización de fósforo en condiciones de suplencia limitada en soluciones nutritivas. Tesis doctoral. Doctorado en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay. 225 pp.

**FERRAROTTO, M; J. ASCENCIO**, 2007. Determinación de niveles de referencia de fósforo en plantas de *Crotalaria juncea* L. XVII Con. Ven. Bot. 636-639 p.

**FISKE, C; Y. SUBBAROW**. 1925. Colorimetric determination of phosphorus. The journal of biological chemistry. 66(2).

**FRAGOSO, S., E. MARTINEZ, S. VÁSQUEZ, J. ACOSTA, P. COELLO**. 2005. Respuesta de la Soya (*Glyxine max*) a la deficiencia de fosfato. Agrociencia. 39: 303-310 pp.

**FREDEEN, A., I. RAO, N. TERRY**. 1989. Influence of phosphorus nutrition on growth and carbon partitioning in *Glycine max*. Plant Physiol. 89: 225-230.

**FRIESEN, D; I.M, RAO; R. THOMAS; A. OBERSON; J. SANZ**. 1997. Phosphorus acquisition and cycling in crop and pasture in low fertility tropical soils. T. Ando *et al.* (Edit), Plant nutrition-for sustainable food production and environment. 493-498.

**FROHNE, D; H. JÜRGEN**. 2005. Poisonous plants. Manson Publishing. 2º Edición. 469 pp.

**GARCÍA, M., J. ASCENCIO**. 1992. Root morphology and acid phosphatase activity in Tomato plants during development of and recovery from phosphorus stress. J. Plant Nut. 15: 2491- 2503.

**GARDNER, W.K., D. A. BARBER, D. G. PARBERY**. 1983. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus*. III. The probable mechanism by which movement in the soil/root interface is enhanced. Plant Soil 70:107-124.

**GATIBONI, L., J. KAMINSKI, D. DOS SANTOS, G. BRUNETTO.** 2008. Fósforo da biomassa microbiana e atividade de fosfatases ácidas durante a diminuição do fósforo disponível no solo. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.43, n.8, p.1085-1091.

**GÓMEZ, L., V. VADEZ, G. HERNÁNDEZ, T. SÁNCHEZ, V. TOSCANO.** Eficiencia del uso del fósforo en diez genotipos de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L). *Agronomía mesoamericana* 7: 41-46.

**HERNÁNDEZ, G., V. TOSCANO, N. MÉNDEZ, L. GÓMEZ, M. MULLINGS.** 1996. Efecto de la concentración de fósforo sobre su asimilación en tres genotipos de frijol común. nota técnica. *Agronomía mesoamericana* 7: 80-85.

**HOFFLAND, E., G. R. FINDENEGG, .J. A. NELEMANS.** 1989. Solubilization of rock phosphate by rape. II. Local root exudation of organic acids as a response to P-starvation. *Plant Soil* 113: 161-165.

**HOFFLAND, E., R. VAN DER BOOGAARD, J. NELEMANS, G. FINDENEGG.** 1992. Biosynthesis and root exudation of citric and malic acids in phosphate-starved rape plants. *New Phytol.* 122:675-680.

**JACOB, J., LAWLOR, D.** 1992. Dependence of photosynthesis of sunflower and maize on phosphate supply, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxigenase activity, and ribulose-1,5-biohosphate pool size. *Plant physiol.* 98: 801-807.

**JOHNSON, J., D. ALLAN, C. VANCE.** 1994. Phosphorus Stress-Induced Proteoid Roots Show Altered Metabolism in *Lupinus Albus*. *Plant Physiol.* 104: 657-665

**JOHNSON, J., C. VANCE, D. ALLAN.** 1996. Phosphorus Deficiency in *Lupinus Albus*. Altered lateral Root Development and Enhanced Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Plant Physiol.* 112: 31-41.

**KANIA, A., N. LANGLADE, E. MARTINOIA, G. NEUMANN.** 2003. Phosphorus deficiency induced modifications in citrate catabolism and in cytosolic pH as related to citrate exudation in cluster roots in white lupinus. *Plant and Soil*. 248: 117-127.

**KASS, D.** 1996. Fertilidad de suelos. UNED. 1º Edición. San José, Costa Rica. 272 pp.

**KAVANOVÁ, M; F. LATTANZI; A. GRIMOLDI; H. SCHNYDER.** 2006. Phosphorus deficiency decreases cell division and elongation in grass leaves. *Plant Physiology*. 141: 766-775.

**LAMBERS, H., M. SHANE, M. CRAMER, S. PEARSE, E. VENEKLAAS.** 2006. Root structure and functioning for efficient acquisition of phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Annals of Botany*. 98: 693-713.

**LAMBERS, H., M. SHANE.** 2007. Role of root clusters in phosphorus acquisition and increasing biological diversity in agriculture. *Research: Gene-Plant-Crop relations*. Chapter 19. Springer. 337-250.

**LANGLADE, N., G. MESSERLI, L. WEISSKOPF, S. PLAZA, N. TOMASI; J. SMUTNY, G. NEUMANN, E. MARTINOIA, A. MASSONNEAU.** 2002. ATP citrate lyase: cloning, heterologous expression and possible implication in root organic acid metabolism and excretion. *Plant, Cell and Environ*. 25:1561–1569.

**LI, M., T. SHINANO, T. TADANO.** 1997b. Distribution of exudates of Lupin Roots in the rhizosphere under Phosphorus Deficient Conditions. *Soil Sci. Plant Nutr*. 43: 237- 245.

**LOPEZ, M; ALFONZO, N; FLORENTINO, A; PEREZ, M.** 2006. Dinámica del fósforo y reducción del aluminio intercambiable en un ultisol sometido a manejo conservacionista. *INCI*. 31:293-299.

**LÓPEZ- BUCIO, J., A CRUZ, L. HERRERA.** 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Op. Plant Biol*. 6:1-8.

**MARSCHNER, H.** 1995. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press. Second edition. 889pp

**MEDINA, E.** 1999. Capacidad de aprovechamiento del fósforo en variedades de quinchoncho (*cajanus cajan* (L.) millsp) en suelos con diferentes niveles de fósforo aprovechable. Tesis de maestría. Universidad Central De Venezuela, Facultad De Agronomía. Maracay-Edo. Aragua.

**MELCHIORI, R., O. CAVIGLIA, P. ABBATE.** 2004. Variaciones en la eficiencia de uso y utilización del fósforo entre cultivares de trigo. Revista Científica Agropecuaria, 8, 91-98.

**MIMURA, T.** 1995. Homeostasis and transport of inorganic phosphate in plants. Plant Cell Physiol 36: 1-7

**MUCHHAL, U., J. PARDO, K. RAGHOTHAMA.** 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci. 93:10519-10523

**NAVARRO, S; G. NAVARRO.** 2000. Química agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. Ediciones Mundi-Prensa. 488 pp.

**NEUMANN G., A. MASSONNEAU, E. MARTINOIA, V. ROMHELD.** 1999. Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. Planta 208: 373-382.

**NEUMANN, G., A. MASSONNEAU, N. LANGLADE, B. DINKELAKER, C. HENGELER, V. ROE, E. MARTINOIA.** 2000. Physiological Aspects of Cluster Root Function and Development in Phosphorus-deficient White Lupin (*Lupinus albus* L.). Ann. Bot. 85: 909-919.

**NEUMANN G., V. RÖMHELD.** Sf. Root-induced changes in the availability of nutrients in the rhizosphere. Disponible [el línea: 25 Junio de 2009] en: <http://www-mykopat.slu.se/Newwebsite/kurser/SUMMER05/READING/Roemheld/NeumannRoemheld1.pdf>

**OOSTERHUIS, D; A. BIBI; E. GONIAS; M. MOZAFFARI.** 2008. Cotton growth and physiological responses to phosphorus deficiency. Wayne E. Sabbe Arkansas Soil Fertility Studies.

**OROZCO, J.** 2004. Evaluación de tres plantas repelentes asociadas al cultivo de maíz para el manejo del chinche (*cyrtomonus bergi*). Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. UNIVERSIDAD DE CALDAS, Manizales. 74 pp. [En línea: 23/07/2009] Disponible en: [http://www.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/tesis\\_james\\_orozco.pdf](http://www.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/tesis_james_orozco.pdf)

**PALMA, D., E. BLUMWALD, W. PLAXTON.** 2000. Upregulation of vacuolar H<sup>+</sup> translocating pyrophosphatase by phosphate starvation of Brassica napus (rapeseed) suspension cell cultures. FEBS Letters. 486: 155-158.

**PARRA, C; E. MARTÍNEZ; J. ACOSTA; P. COELLO.** 2004. Respuesta a la deficiencia de fosfato de genotipos de frijol contrastantes en su capacidad de crecer en suelos con bajo contenido de fósforo. Agrociencia 38: 131-139.

**PETERSON L., H. MASSICOTTE, L. H. MELVILLE.** 2004. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology. CABI Publishing, CAB International. Ed: P.B. Cavers. University of Western Ontario. 173

**PINTON, R., Z. VARANINI, P. NANNIPIERI.** 2007. The Rhizosphere. Biochemistry and Organic substances at the Soil-Plant interface. 2nd . Edition. Taylor and Francis Group. CRC Press. 512 pp.

**PLAXTON, W.** 2004. Plant Response to Stress: Biochemical Adaptations to Phosphate Deficiency. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*, R. M. Goodman, Ed. Marcel Dekker Inc. New York. 976–980 pp.

**RAGHOTHAMA, K.** 2000. Phosphate transport and signaling. *Current Opinion in Plant Biology*. 3:182–187

**RAO, I.** 2001. Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: the case of common bean and tropical forages. CIAT. Chapter 29. In: *Handbook of Plants and crop Physiology*. Second Edition. Marcel Dekker Inc. New York. 997 pp.

**RAO, I., M. AYARZA, R. GARCÍA.** 1995. Adaptive attributes of tropical forage species to acid soils I. Differences in plant growth, nutrient acquisition and nutrient utilization among C<sub>4</sub> grasses and C<sub>3</sub> legumes. *Journ of Plant Nutr.* 18: 2135-2155.

**RIVERO, C.** 1995. Efecto de la incorporación de residuos orgánicos sobre algunas propiedades de un alfisol degradado. *Venezuelos*. 3:55-61

**SACHAY, J; R.WALLACE; M. JOHNS.** 1991. Phosphate stress response in hydroponically grown maize. *Plant Soil* 132, 85-90.

**SCHACHTMAN, D., R. REID, S. AYLING.** 1998. Phosphorus uptake by plants: From Soil to Cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.

**SEVILLA, V., R. MIJARES, R. RODRIGUEZ, X. ABREU.** 1996. Efecto de uso de coberturas vegetales y abonos orgánicos sobre pérdidas de suelo y agua en dos suelos agrícolas venezolanos. *Venezuelos*. 4: 14-18.

**SHANE, M.; H. LAMBERS.** 2005. Cluster roots: A curiosity in context. *Plant and Soil*. 274:101–125

**SHEN, J., Z. RENGEL, C. TANG, F. ZHANG.** 2003. Role of phosphorous nutrition in development of cluster roots and release of carboxylates in soil-grown *Lupinus albus*. *Plant and Soil*. 248: 199-206.

**SMITH, F., S. MUDGE, A. RAE, D. GLASSOP.** 2003. Phosphate transport in plants. *Plant and Soil*. 248: 71-83.

**TARAFDAR, J; CLAASSEN, N.** 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 5: 308- 312.

**TENNANT, D.** 1975. A test of modified line intersect method of estimating root length. *J. Ecology*. 63:995-1006.

**THEODOROU, M., W. PLAXTON.** 1993. Metabolic adaptation of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol*. 101: 339-344.

**USDA.** 1999. Sunn hemp. *Crotalaria juncea* L. [En línea: 23/07/2009] Disponible en: <http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=CRJU>

**WALKER, T., H. PAL, E. GROTEWOLD, J. VIVANCO.** 2003. Root exudation and Rhizosphere Biology. *Plant Physiol*. 132:44-51.

**WATANABE, O., M. OSAKI, H. YANO, I. RAO.** 2006. Internal Mechanisms of Plant Adaptation to Aluminum Toxicity and Phosphorus Starvation in Three Tropical Forages. *Journal of Plant Nutrition*. 29: 1243 – 1255.

**WATT, M., J. EVANS.** 1999. Proteoid Roots. *Physiology and Development*. *Plant Physiol*. 121: 317–323.

**YOSHIOKA, I; M. SÁNCHEZ; M. BOLAÑOS.** 2006. Actividad de fosfatasas ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo. *Agronómica*. 55 (2)

**ZHANG, F; J. MA; Y. CAO.** 1997. Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acid and utilization of sparingly soluble inorganic

phosphates by radish (*Raghanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. Plant and Soil. 196:261-264.

**ZHU, Y., F. YAN, C. ZÖRB, S. SCHUBERT.** 2005. A Link Between Citrate and Proton Release by Proteoid Roots of White Lupin (*Lupinus albus* L.) Grown Under Phosphorus-deficient Conditions?. Plant Cell Physiol. 46: 892–901.

## **F. CAPÍTULO II: ACTIVIDAD DE LAS ENZIMAS FOSFATASA ÁCIDA Y FITASA EN LA SECRECIÓN RADICAL DE *Crotalaria juncea* BAJO CONDICIONES DE SUFICIENCIA Y DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN LA PLANTA.**

### **1. INTRODUCCIÓN**

Tal como se observó en el capítulo I, el contenido de P total se reduce en las plantas de *Crotalaria juncea* sometidas a deficiencia, así como también el fósforo foliar soluble (Pi) empleado para las funciones metabólicas. Esto y las mediciones de crecimiento de las plantas permitieron asumir que bajo estas condiciones de estrés ocurre una retranslocación del fósforo hacia las raíces, las cuales siguen creciendo a expensas del vástago. Aunque se demostró que las plantas de *Crotalaria* poseen una alta eficiencia en el uso del fósforo interno, pueden existir en ella otras estrategias que además le permita adquirir el fósforo del suelo, para posteriormente absorberlo por las raíces.

Como ya se conoce, las estrategias fisiológicas empleadas bajo deficiencia varían entre las especies estudiadas, y los mecanismos que operan en la rizósfera para sobrevivir a la deficiencia de fósforo son sumamente importantes, porque determinan a la planta la capacidad de absorber el fósforo que se encuentra aun en muy bajas concentraciones en el suelo.

Rao (2001) señala que la suplencia de fósforo en el suelo y su adquisición por las raíces de las plantas podría mejorarse por tres vías: 1) Con un sistema radical largo que entre en contacto con el P del suelo, que tal como se mostró en el Capítulo I de este trabajo, solo fue un mecanismo de gran influencia en las edades más tempranas del crecimiento, 2) mejorando el mecanismo de absorción de P por unidad de longitud de raíces, 3) por medio de la habilidad de usar el P orgánico o inorgánico insoluble en el suelo. Para esta última estrategia, la secreción de enzimas fosfohidrolasas cumplen un rol importante,

puesto que tienen la función de liberar el fósforo insoluble que se encuentra bajo formas orgánicas del suelo, y hacerlo soluble y disponible para las plantas en la rizósfera.

Este capítulo II se centra en la evaluación de la inducción de la actividad de enzimas fosfohidrolasas (fosfatasa ácida y fitasa) liberadas por las raíces hacia la rizósfera, así como también la ejecución de un estudio preliminar de cinética de la fosfatasa ácida en el cual se compara las constantes  $K_m$  y  $V_{máx}$  con otros estudios realizados por diversos autores. Con lo anterior se espera determinar si la liberación de esta enzima por las raíces hacia la rizósfera es uno de los mecanismos de tolerancia empleados por las plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de deficiencia de fósforo.

## 2. OBJETIVO GENERAL DEL CAPÍTULO II

Comparar la capacidad de inducción de la actividad de fosfatasa ácida y fitasa bajo condiciones de deficiencia de fósforo y las constantes  $K_m$  y  $V_{max}$  de la fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) colectada “*in vivo*” de plantas de *Crotalaria juncea*.

## 3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS DEL CAPÍTULO II

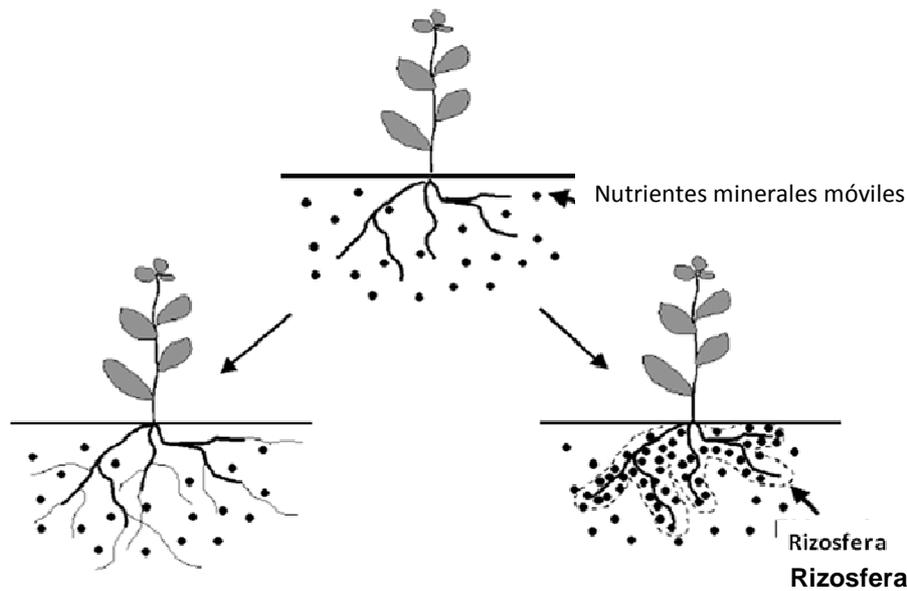
- ✓ Determinar la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y fitasa en la secreción radical obtenida “*in vivo*” (extracto crudo) de plantas de crotalaria en fase vegetativa temprana bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo.
- ✓ Comparar por medio de un estudio preliminar de cinética, las constantes  $K_m$  y  $V_{max}$  de la fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) colectada “*in vivo*” de plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo.

## 4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 4.1. Estrategias que emplean las plantas bajo deficiencia de fósforo

Debido a que el fósforo es un elemento esencial y que por lo general la suplencia adecuada en el suelo se encuentra restringida a un rango muy reducido de pH, las plantas han generado estrategias que les han permitido soportar y sobrevivir a esta condición en ambientes naturales no fertilizados con fosfatos, lo cual también se ha puesto de manifiesto en plantas cultivadas (Dinkelaker *et al.*, 1989; Ascencio, 1997; Briceño *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 2004; Cordero *et al.*, 2005)

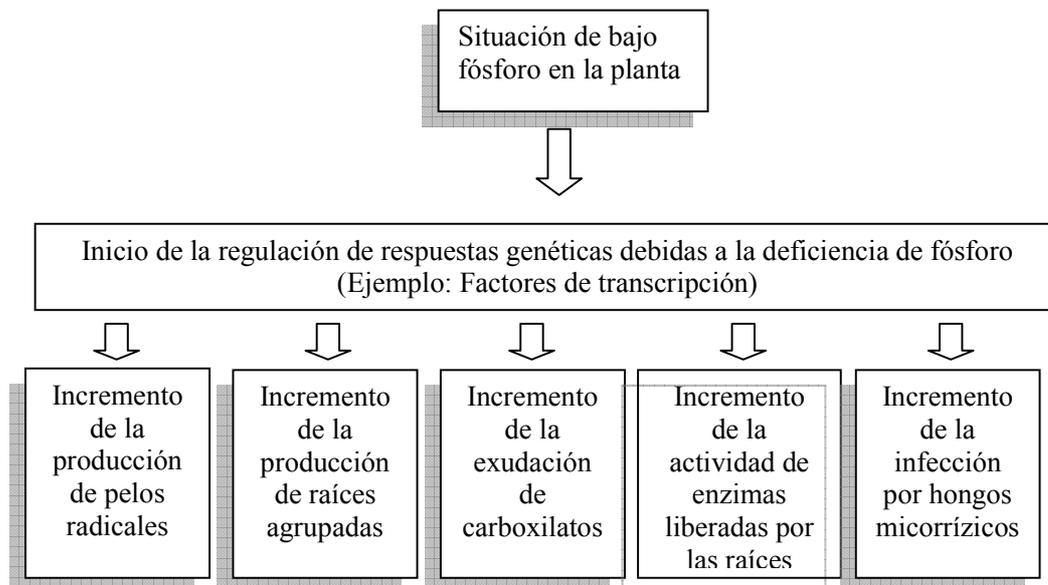
Tal como se expresó en la revisión de literatura del capítulo I de este trabajo, cuando las plantas detectan en su metabolismo una deficiencia de fósforo, se activan a nivel celular ciertos mecanismos que les permiten sobreponerse a este estrés abiótico, la cual incluye respuestas que dependen tanto del tiempo de duración del estrés, como de la genética de las especies (Parra *et al.*, 2004; Yadav y Tarafdar, 2004). Aunque se han reportado respuestas de orden morfológico tales como las modificaciones en la arquitectura radical (Johnson *et al.*, 1996; Lamont, 2003; Ferrarotto, 2009), asociaciones con micorrizas, estimulación de la densidad y longitud de pelos radicales (Bates y Lynch, 1996) (Figura 17 A), otras estrategias de orden fisiológico también son de suma importancia para incrementar de la capacidad de absorción de fósforo bajo condiciones limitantes (Dinkelaker *et al.*, 1989; Neumann *et al.*, 2000) (Figura 17 B), y dentro de estas, se han reportado a las enzimas fosfohidrolasas como las responsables de la tolerancia a la deficiencia de fósforo en plantas (Figura 18) (García y Ascencio, 1992; Ascencio, 1997; Briceño, 2001).



**A.** Incremento de la disponibilidad espacial. Estimulación del crecimiento radical. Elongación y proliferación de pelos radicales. Incremento de la formación de raíces finas. Incremento de la colonización por micorrizas

**B.** Incremento de la disponibilidad química. Modificaciones en la química de la rizósfera en: pH, potencial redox, liberación de quelantes de metales, liberación de enzimas.

**Figura 17.** Estrategias de las plantas para adquirir nutrientes en la rizosfera (Modificado de Neumann y Römheld, sf).



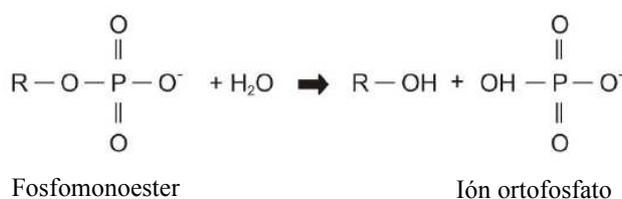
**Figura 18.** Estrategias activadas por las plantas ante la deficiencia de P. (Modificado de Lambers *et al.*, 2006).

## 4.2. Enzimas fosfohidrolasas

### 4.2.1. Enzima Fosfatasa ácida (FA) en plantas y en suelo

La Fosfatasa ácida es una glicoproteína que cataliza la liberación del Pi a partir de fuentes orgánicas. Por ser una enzima glicosidasa, se encuentra protegida contra las enzimas proteolíticas (Haynes, 1998). Se han reportado fosfatasas que difieren en su especificidad por el sustrato (Li y Tadano, 1996). Las que muestran mayor especificidad son las enzimas fitasas, pero existen otras como las fosfatasas ácidas púrpuras que contienen un centro metálico y poseen baja especificidad por el sustrato, además de esto se caracterizan por ser insensible a la inhibición por tartrato y por mostrar una coloración púrpura en la mezcla de reacción (Bozzo *et al.*, 2002).

El mecanismo que emplean estas enzimas consiste en solubilizar el fósforo a partir de fuentes orgánicas, es decir, actúan liberando los iones ortofosfatos ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) por medio de la hidrólisis de enlaces ésteres y anhídridos de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  que se forman en los compuestos orgánicos (Li *et al.*, 1997; Yoshioka *et al.*, 2006), tal como se muestra en la figura 19 a continuación:



**Figura 19.** Reacción catalizada por la enzima fosfatasa ácida

Fuente: Pant y Warman (2000).

La fosfatasa ácida es una enzima cuya actividad es inducida bajo de la deficiencia de fósforo en todos los tejidos y órganos vegetales, lo cual varía también con la capacidad de respuesta que tengan las plantas bajo deficiencia de fósforo. En

función a lo anterior, Li y Tadano (1996), evaluando la actividad de FA extraída de hojas, tallos, raíces y secreción radical de tomate y lupino, demostraron que para todos los tejidos la actividad en plantas de lupino estuvo muy por encima que las de tomate, además de esto, la actividad de FA en la secreción por unidad de peso seco de raíz estuvo aproximadamente tres veces más alta que la del tomate, lo cual demuestra la mayor habilidad que tiene el lupino para tolerar la deficiencia de fósforo por medio de esta estrategia. Cordero *et al.* (2005) trabajando con *Crotalaria spectabilis* consiguieron que las mismas mostraban mayor actividad fosfatasa a los 33 días de edad, y que bajo condiciones de deficiencia, la actividad superaba en 40,12% la del testigo (de 448,07 en +P hasta 748, 25  $\mu\text{mol PNP. g}^{-1}$  PsR.  $\text{h}^{-1}$  en -P). Esta es otra información que demuestra la inducción de la actividad de esta enzima bajo condición -P.

Algunas investigaciones realizadas a partir de secreciones radicales, la han mostrado como un homodímero que consiste de dos subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 68 KDa en tomate y de 72 KDa en lupino (Li y Tadano, 1996), encontrándose variaciones en cuanto al peso molecular. Haran *et al.* (2000) observaron dos proteínas de 42 y 84 KDa, que tenían actividad fosfatasa en raíces de *Brassica juncea* bajo condiciones suficientes de fósforo (1mM de P), pero la actividad de ambas se incrementó en plantas deficientes, siendo la de 84 KDa (homodímero cuyas subunidades son de 42 KDa) la isoenzima secretada en mayor proporción con un óptimo de pH de 4,6. Lo anterior demuestra que bajo deficiencia de fósforo ocurre la activación de isoenzimas que ya estaban presentes.

Bajo condiciones de deficiencia, Basha (1983) consiguió aislar una FA de 240 Kda en semillas de maní, de la cual se componía de seis subunidades idénticas de 42,5 KDa. Aunque la mayoría de los reportes realizados acerca de la estructura de esta enzima la caracterizan como un homodímero, algunas excepciones fueron reportadas por Bozzo *et al.* (2002), quienes señalaron haber realizado el primer reporte de dos isoenzimas de fosfatasa ácida púrpura monoméricas de 84 y 57 KDa a partir de cultivo de células de tomate, pero estudios recientes de FA

purificada de plantas de Lupino blanco, han mantenido su caracter homodímico (dos subunidades), señalando pesos moleculares de 140 KDa y 72KDa (Wasaki *et al.*, 2008).

La aparición de isoenzimas también ha sido reportada bajo condiciones de deficiencia de P en varias especies vegetales. En este sentido, Li y Tadano (1996) señalaron que solo una de las tres isoenzimas observadas estuvo más presente en los extractos radicales de Tomate y Lupino, pero que aun así, las tres son secretadas activamente en la rizósfera cuando las plantas se encuentran en condiciones de deficiencia de fósforo. Trull *et al.* (1997) reportaron la aparición de algunas isoenzimas tanto en raíces como en tallo de Arabidopsis, pero solo algunas fueron inducidas por el estrés por fósforo. Por otro lado, Bozzo *et al.* (2002) encontraron dos fosfatasas ácidas a las que llamaron SAP1 y SAP2, las cuales poseían una reducida especificidad, diferenciándose tanto en el peso molecular (84 y 57 KDa respectivamente), como en la necesidad de cationes divalentes para ser potente en su actividad, demostrando que solo SAP2 fue activada por iones  $Mg^{2+}$ .

Realizando estudios en tomate, Zimmerman *et al.* (2004), consiguieron tres isoenzimas de fosfatasa ácida púrpura, StPAP1, StPAP2 y StPAP3 que se expresan en raíces y tallos. La primera es homóloga a la que tienen los mamíferos y las cianobacterias, mientras que las otras dos son tipos únicos en plantas. De las tres, StPAP1 no responde a cambios en la concentración de fósforo en el medio de crecimiento externo, y es expresado en varios tejidos, por lo que pueden tener una función independiente al estado de nutrición con P en la planta.

La existencia de diferentes familias de esta enzima se ha reportado en varias ocasiones, manifestándose que además de su función solubilizadora de P desde compuestos orgánicos, también están involucradas en las respuestas al estrés por enfermedades, sequía y salinidad (Bozzo *et al.*, 2002; Terol *et al.*, 2002).

Puesto que la presencia de esta enzima ha sido reportada en otros organismos, su actividad *in situ* a partir de un extracto de suelo sin raíces puede explicarse

entonces, por la presencia de microorganismos (Tarafdar y Claassen, 1988) con lo cual se deduce que las poblaciones microbianas también son muy importantes en los procesos de liberación del fósforo en los suelos, lo que en efecto contribuye al mantenimiento de ecosistemas que se sustentan sobre suelos pobres en nutriente, como son los suelos de sabana, donde se encuentran pastizales nativos e introducidos, así como también en suelos productivos del país donde se usan cultivos de interés agrícola. En el caso de especies vegetales, la habilidad de secretar fosfatasa ácida por las raíces varía no solo con la especie sino también según el estadio de crecimiento y el tiempo de exposición al estrés. Para este último punto, García y Ascencio (1992) encontraron que en plantas de tomate (*Lycopersicum esculentum*), la actividad fosfatasa ácida era mayor en plantas con mayor cantidad de días bajo deficiencia de fósforo. Por otro lado, Ascencio (1994) haciendo uso de *Vigna unguiculata*, *Gossypium hirsutum* y *Cajanus cajan*s, consiguió que la actividad de la FA decrece con la edad de las tres plantas.

En un estudio realizado por Duff *et al.* (1991), se demostró que la actividad FA varió con la cantidad de proteína, y con la síntesis *de novo* como el principal proceso de regulación en la fase de transición de inducción en *Brassica nigra*, además de esto, también consiguieron dos isoenzimas que se inducían al mismo tiempo bajo condiciones de deficiencia de fósforo, lo cual también coincidió con el incremento del potencial de absorción de Pi por las células. Los mismos autores aseguraron que estas isoenzimas parecen ser parte de un gran grupo interespecífico de proteínas vegetales que divergen, pero que tienen un ancestro común

Haran *et al.* (2000) manifestaron que la actividad FA secretada por las raíces de las plantas de *Brassica juncea* incrementó diariamente y fue mucho más acentuada en plantas tratadas con la concentración más baja de fósforo inorgánico. Lo anterior confirma lo revelado por algunas investigaciones donde midiendo la actividad de FA en células en suspensión de soya y tomate, se logró determinar que la actividad de la enzima disminuía en presencia de fósforo

inorgánico, actuando este último como un inhibidor competitivo (Lebansky *et al.*, 1992; Bozzo *et al.*, 2002).

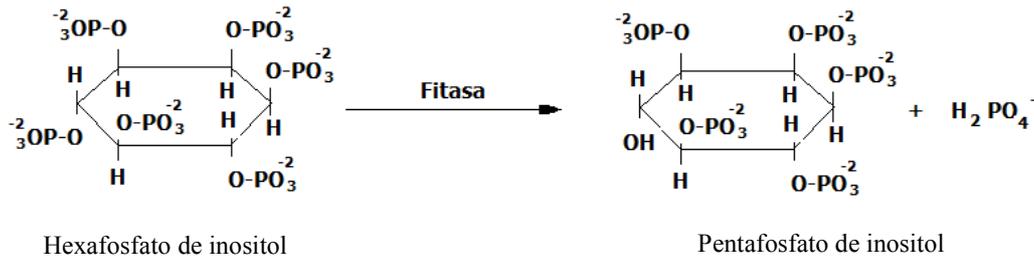
Wasaki *et al.* (2008) explican que FA es una enzima inducible puesto que el ARNm LASAP2 que codifica para esta enzima, se acumula debido a una disminución interna de fósforo en los tejidos, activándose de esta forma su secreción hacia el medio externo.

Una hipótesis realizada por Haram *et al.* (2000) en función a sus observaciones en plántulas de *Arabidopsis*, propone que las mismas todavía conservan reservas de fósforo bajo la forma de compuestos orgánicos como el ácido fítico en las hojas, y en base a esto, la actividad de FA se visualiza en inicio tanto en las hojas como en la zona meristemática apical, por lo que primero se consumen las reservas endógenas de fósforo bajo la forma orgánica señalada, para posteriormente inducir la formación de FA en las raíces, las cuales se encargarían de liberar este elemento de los compuestos orgánicos en el suelo.

Wasaki *et al.* (2008) trabajando con plantas de Lupino blanco bajo tratamiento +P y -P. lograron localizar histoquímicamente, a través de un sustrato con un cromómero fluorescente, la actividad de la FA en las raíces, determinando que la mayor actividad medida en términos de fluorescencia se ubicó en la epidermis y el tejido vascular de las plantas mantenidas en -P. Resultados similares ya se habían obtenido por Zimmerman *et al.* (2004) usando plantas de tomate, los cuales señalaron que la mayor actividad fosfomonoesterasa es predominante en tejidos vasculares, tanto del tallo como de la raíz, así como también en la epidermis de las raicillas de raíces expuestas a bajos niveles de fósforo.

#### 4.2.2. Enzima Fitasa (FI)

Las fitasas son enzimas que catalizan la ruptura de enlaces monoesteres específicamente del fitato (inositol hexafosfato), liberando el fósforo inorgánico (Lang *et al*, 2008) según la siguiente reacción:



**Figura 20.** Reacción catalizada por la enzima Fitasa (Modificado por Briceño, 2001)

El ácido fítico o fitato como forma de almacenamiento del fósforo en raíces, tubérculos, granos, semillas y polen es probablemente una gran fuente de fósforo encontrada en las fracciones de fósforo orgánico en los suelos. La tasa de degradación de fitatos es también controlada por el  $P_i$ , puesto que los altos niveles de  $P_i$  reprimen la síntesis de fitasas (Marschner, 1995).

La fitasa se ha considerado como una variante especial de la fosfatasa ácida por su capacidad de liberar el fósforo del ácido fítico, el cual se encuentra no solo en semillas, polen y plántulas, sino también en la rizósfera (Li *et al.*, 1997).

A diferencia de la fosfatasa ácida, la fitasa no siempre es inducible ante la deficiencia de fósforo en todas las plantas, tal como señalaron Gilbert *et al.* (1999) estudiando exudados de raíces de lupino. El primer trabajo reportado acerca del incremento de la actividad de FI secretada por raíces bajo condiciones de deficiencia de fósforo fue realizado por Li *et al.* (1997) quienes trabajando con 16 plantas llegaron a la conclusión que solo tres de ellas, *Brachiaria decumbens* CIAT 606, *Stylosanthes guianensis* CIAT 184 y tomate, presentaron los valores más altos de actividad fitasa y señalaron que la secreción de esta enzima podría formar

parte de un mecanismo adaptativo que funciona para algunas plantas bajo condiciones de deficiencia de P. Sin embargo, aunque estos resultados indican actividad extracelular, se han generado opiniones contrarias en cuanto a esta característica, encontrándose que para varias especies la enzima no actúa de manera efectiva para el uso del fitato externo (Richardson *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2001), aunque esta es una de las fuentes de fósforo orgánico con mayor proporción en los suelos. Por otro lado, recientemente se ha señalado que algunas plantas, entre ellas las leguminosas anuales *Vigna aconitifolia* y *Vigna radiata* así como también árboles y pastos responden a la deficiencia de fósforo incrementando la actividad extracelular fitasa en suelos áridos (Yadav y Tarafdar, 2004), esta idea es confirmada por Lung *et al.* (2008) quien halló en exudados radicales de *Nicotiana tabacum* una enzima FA púrpura con alta actividad Fitasa.

La enzima fitasa es una de las dos variantes especiales de la enzima fosfatasa ácida, muy específica de sustrato puesto que libera el fósforo solo del ácido fítico (Fitato), el cual es también conocido como inositol hexafosfato, y se encuentra no solo en semillas, polen y plántulas, sino también en la rizósfera (Li *et al.*, 1997; Parra *et al.*, 2004). Tanto las plantas como los microorganismos producen esta enzima (Yoshioka *et al.*, 2006).

Parra *et al.* (2004) trabajando con dos genotipos de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de deficiencia, observaron que la actividad Fitasa aumentó en el cultivar C60, mientras que disminuyó en MAR 1, con lo que se comprueba que uno de los factores que influyen sobre la respuesta de las plantas ante la deficiencia de fósforo es el genotipo de la especie. Lo anterior es confirmado por Yadav y Tarafdar (2004) quienes observaron una gran variación de la actividad fitasa en la rizósfera de plantas distintas, cuatro cultivos anuales, dos especies de pasto y tres especies arbóreas, lo cual confirma que la actividad de dicha enzima varía con las especies vegetales.

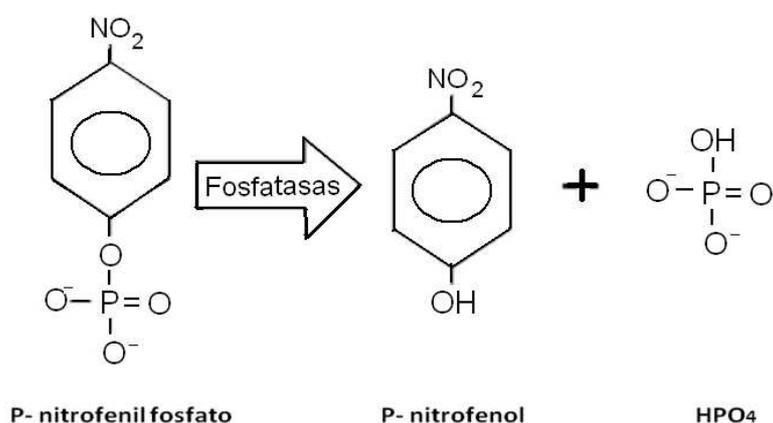
### 4.3. Cinética de las enzimas

La cinética es el estudio de las reacciones enzimáticas y los factores que la afectan. A través de la cinética enzimática se logra describir y estudiar el comportamiento o la actividad de una enzima ante un sustrato por el cual tiene afinidad.

La concentración del sustrato donde la enzima trabaja a la mitad de la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) se denomina  $K_m$ . Ambos valores pueden variar dependiendo de una condición ambiental estresante (Ascencio, 1997; Briceño, 2001).

#### 4.3.1. Cinética de la enzima Fosfatasa ácida (FA)

Para la fosfatasa ácida el mejor sustrato artificial empleado para los ensayos de actividad y cinética es el p-Nitrofenil fosfato (Juma y Tabatabai, 1988), por ello es el universalmente usado (Cuadro 8). En presencia de la enzima, el p- Nitrofenil fosfato (p-NPP) es convertido a p-nitrofenol (p-PNP), liberando el Pi ( $HPO_4^-$ ), tal como se muestra en la Figura 21.



**Figura 21.** Acción de la fosfatasa ácida sobre p-nitrofenil fosfato (Modificado por Bobadilla y Rincón, 2008).

Los valores de  $K_m$  y  $V_{max}$  varían dependiendo entre otros factores, de la genética de las especies y del extracto con el cual se trabajan los ensayos de cinética (Cuadro 8). En este sentido, los valores de  $K_m$  en un extracto purificado siempre resultan ser muchos más bajos que aquellos obtenidos en el extracto crudo, lo cual puede deberse a la presencia de inhibidores competitivos con el sustrato en este último.

Bajo condiciones de deficiencia de fósforo se ha señalado el surgimiento de isoenzimas que le otorgan tolerancia a las especies ante esta condición estresante. En este sentido, Bozzo *et al* (2002) consiguieron la inducción de dos isoenzimas en tomate, de las cuales SAP2 actuaba más eficientemente ante la deficiencia, en comparación con la otra isoenzima SAP1, que mostró valores de  $V_{máx}$  aparente entre 150 y 300% más altos y una  $K_m$  más baja.

Ascencio (1997) expresó que obtener los valores de  $K_m$  de la enzima extraída *in vivo* es muy importante puesto que si los valores de  $K_m$  de las enzimas liberadas están alrededor de las concentraciones de P orgánico en el suelo, entonces podría pensarse que la liberación de las mismas por las raíces forman parte de una estrategia de la planta para tolerar a la deficiencia de P. En este orden, si la enzima secretada tiene una baja  $K_m$  y una alta  $V_{máx}$  su contribución en el mecanismo de tolerancia ante las condiciones de deficiencia de P sería muy substancial.

Según los datos recolectados en el Cuadro 8 y bajo las condiciones en particular de cada experimento, se observa una amplia diversidad cinética para las especies estudiadas, indicadas por los valores de  $V_{máx}$  y  $K_m$ , encontrándose para este último parámetro valores de  $K_m$  desde muy bajos (0,0139 mM de p-Nitrofenilfosfato en un extracto purificado de tabaco) hasta valores más altos de 4,5 para tomate.

Por ejemplo, los valores de  $K_m$  aparente para la enzima proveniente del extracto crudo radical de *Desmodium* (Ascencio, 1996), posee un bajo valor de  $K_m$  y alto

valor de  $V_{m\acute{a}x}$  ante la deficiencia de P. En el extracto crudo radical de quinchoncho (Ascencio, 1997) los valores de  $K_m$  fueron más o menos similares en los tratamientos +P y -P, pero la  $V_{m\acute{a}x}$  aparente de la enzima se mostró mucho más alta bajo condiciones de deficiencia (0,01 mM P), lo mismo fue obtenido por Briceño (2001) para FA en el extracto crudo de Tomate, donde se observó que a valores similares de  $K_m$ , la velocidad de la enzima aumentó más de 6 veces bajo deficiencia. Para especie *Euphorbia heterophyla* las velocidades máximas son similares, pero el bajo valor de  $K_m$  en condiciones de deficiencia (0.09 mM en comparación a 2.14mM en suficiencia) compensa esta situación. En los cuatro casos antes relatados, la enzima podría estar contribuyendo a la tolerancia ante la deficiencia de P.

Aquellas enzimas con baja  $V_{m\acute{a}x}$  y alta  $K_m$ , no ejercen una mayor contribución a las estrategias de tolerancia de las plantas a las condiciones de deficiencia (Ascencio, 1997), tal es el caso de la especie *Ruellia tuberosa* reportada por la misma autora.

Las enzimas FA presentan inhibición por algunos metales tales como  $Zn^{2+}$  (Hübel y Beck, 1996).

**Cuadro 8.** Valores referenciales obtenidos para Km y Vmáx de Fosfatasa ácida para diversas especies de plantas usando p-Nitrofenil fosfato como sustrato.

| Especie                                               | Extracto   | pH óptimo | Km (mM)              | Vmáx (μmol PNP/h)            | Referencia                    |
|-------------------------------------------------------|------------|-----------|----------------------|------------------------------|-------------------------------|
| <i>Células en suspensión Glycine max</i>              | Purificado | 5,5       | 0,3                  | -                            | LeBansky <i>et al.</i> (1992) |
| <i>Lupinus albus</i>                                  | Purificado | 4,3       | 0,027                | 200*                         | Ozawa <i>et al.</i> (1995)    |
| <i>Lycopersicum esculentum</i>                        | Purificado | 5,6       | 0,003                | 182*                         | Li y Tadano (1996)            |
| <i>Desmodium tortuosum</i>                            | crudo      | -         | (S) 0,50<br>(D) 0,36 | (S) 55,55<br>(D) 83,33       | Ascencio (1996)               |
| <i>Cajanus cajans</i>                                 | crudo      | -         | (S) 0,69<br>(D) 0,80 | (S) 126,46<br>(D) 130,0      | Ascencio (1997)               |
| <i>Euphorbia heterophylla</i>                         | crudo      | -         | (S) 2,14<br>(D) 0,95 | (S) 95,0<br>(D) 90,0         | Ascencio (1997)               |
| <i>Ruellia tuberosa</i>                               | crudo      | -         | (S) 2,23<br>(D) 3,59 | (S) 12,98<br>(D) 12,27       | Ascencio (1997)               |
| <i>Lycopersicum esculentum</i>                        | Crudo      | 5,0       | (S) 0,68<br>(D) 0,54 | (S) 261.5**<br>(D) 1630,77** | Briceño (2001)                |
| <i>Células en suspensión Lycopersicum esculentum*</i> |            | -         | (a) 4,5<br>(b) 3,3   | (a) 246***<br>(b) 940***     | Bozzo <i>et al.</i> (2002)    |
| <i>Nicotiana tabacum</i>                              | Purificado | 5,0-5,5   | 0,0139               | -                            | Lung <i>et al.</i> (2008)     |

NR= No reportado;

\* Velocidad expresada en  $\mu\text{M min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ ; \*\* Velocidad expresada en  $\mu\text{M PNP h}^{-1} \text{g}^{-1}$  peso seco de raíces; \*\*\* Velocidad expresada en  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$

(S)= Valores cinéticos obtenidos a partir de una solución suficiente de 1mM P.

(D)= Valores cinéticos obtenidos a partir de una solución suficiente de 0,01mM P; (D´)= 0.05 mM p

(a)= Valor de la variable para la isoenzima SAP1; (b)= Valor de la variable para la isoenzima SAP2

#### 4.3.2. Cinética de la enzima Fitasa

En comparación con las fosfatasas ácidas, los estudios cinéticos de la Fitasa son escasos. Similar a lo mostrado para la fosfatasa ácida, los trabajos realizados por otros investigadores muestran valores de  $K_m$  y  $V_{\max}$  de la fitasa que difieren con las especies (Cuadro 9), hallándose valores de  $K_m$  que van desde  $0,0147 \mu\text{M}$  en el extracto purificado de Tabaco, hasta  $200 \mu\text{M}$  en el extracto purificado de *Allium fistulosum* L.

Trabajando con extractos de cotiledones de soya, Hegeman (1999) purificó una enzima fitasa, la cual ensayó bajo diferentes concentraciones de diversos sustratos tales como fitato, p-nitrofenil fosfato (p-NPP), adenosin trifosfato (ATP) y polifosfato, con el fin de determinar los parámetros cinéticos  $K_m$  y  $V_{\max}$ , consiguiendo que los valores de  $K_m$  para el fitato fue de  $61 \mu\text{M}$ , la cual fue significativamente más baja que las obtenidas para el ATP ( $1704 \mu\text{M}$ ), polifosfato ( $3267 \mu\text{M}$ ) o p-NPP ( $4347 \mu\text{M}$ ), lo cual demuestra la alta afinidad que tiene esta enzima al fitato.

Briceño (2001) usando el sustrato fitato de sodio y magnesio, y trabajando con el extracto crudo de la secreción radical obtenida de plantas de tomate bajo condiciones de deficiencia y suficiencia, consiguió que en la condición de deficiencia la enzima presenta una  $K_m$  más alta y una  $V_{\max}$  más baja, lo que sugiere que esta enzima del extracto crudo radical, no aporta en gran medida a las estrategias que desarrollan las plantas para sobrevivir ante en estrés por fósforo.

**Cuadro 9.** Valores referenciales obtenidos para Km y V<sub>máx</sub> de Fitasa para diversas especies de plantas haciendo uso del sustrato fitato (sodio inositol hexakisfosfato)

| Especie                          | Extracto   | pH optim. | Km<br>( $\mu$ M)           | V <sub>máx</sub>              | Referencia                     |
|----------------------------------|------------|-----------|----------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| <i>Zea mays</i>                  | Purificado | 5,0 – 5,1 | (a) 43<br>(b) 25<br>(c) 24 | -                             | Hübel y Beck<br>(1996)         |
| <i>Allium fistulosum</i> L       | Purificado | 5,5       | 200                        | 500***                        | Phillippy,<br>(1998)           |
| <i>Lycopersicum esculentum</i> * | Crudo      | 4,5       | (-p) 0,25*<br>(+P) 0,15*   | (-p) 431,4**<br>(+P) 522,76** | Briceño,<br>(2001)             |
| <i>Nicotiana tabacum</i>         | Purificado | 5,0-5,5   | 0,01                       | -                             | Lung <i>et al.</i> ,<br>(2008) |

\* Valores de Km expresados en mM usando el sustrato fitato de sodio y magnesio.

\*\* Valores de V<sub>max</sub> expresados en  $\mu$ g Pi.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup> PsR.

\*\*\* Valores de V<sub>max</sub> expresados en  $\mu$ mol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>

(-P) Concentración deficiente de fósforo (0,05mM P) en la solución nutritiva.

(+P) Concentración suficiente de fósforo (1mM P) en la solución nutritiva

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Material vegetal y manejo del ensayo

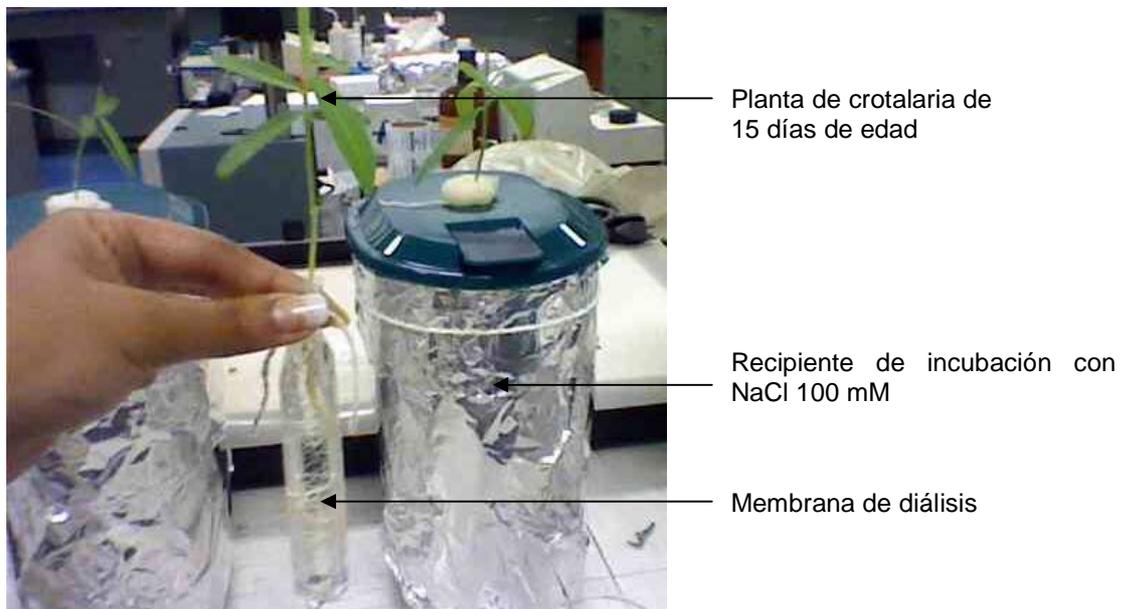
Se hizo uso del mismo lote de semillas empleado para los experimentos del Capítulo I, las cuales se desinfectaron con vitavax. Para la construcción del germinador, se colocó papel absorbente blanco a lo largo de una franja de papel de aluminio de 10 cm x 40 cm, y una vez humedecido, se colocaron cinco semillas equidistantes entre si y a 1 cm de distancia del borde. Para cubrir las semillas, se colocó una franja de plástico transparente y otra lámina de papel de aluminio. El conjunto se enrolló en forma de cilindro y se introdujo en un vaso plástico (Figura 22) para posteriormente agregar agua destilada hasta 1/3 de su capacidad. Con este sistema se logró obtener plantas sanas, con un sistema radical fuerte y apto para los trasplantes a solución nutritiva, tal como se relató en el capítulo I de este trabajo.



**Figura 22.** Estructura de los germinadores empleados para obtener plantas sanas y aptas para el transplante a solución nutritiva

## 5.2. Recolección *in vivo* de la secreción radical

Para la recolección de la secreción se empleó la metodología descrita por Tadano y Sakai (1991), en la cual se colocan individualmente y por triplicado, las raíces frescas de 15 días de edad de +P y -P en un tubo de diálisis (12 KDa, 35 mm de diámetro y 150 mm de largo) con 30 mL de NaCl 100mM, para posteriormente transferirlo a un envase de 3 L de capacidad envuelto en papel de aluminio (Figura 23) que contenía la misma solución de NaCl. Pasadas 24 horas a las condiciones de temperatura del laboratorio, se recogió por separado la secreción contenida en cada membrana, y se centrifugó a 1000 rpm, para obtener el sobrenadante con el cual se realizaron las determinaciones de actividad enzimática. Las raíces se colocaron en estufa a 70°C por 48 horas con el fin de determinar su peso seco.



**Figura 23.** Detalle de la recolección de la secreción radical de crotalaria de 15 días de edad.

### 5.3. Actividad enzimática

Para determinar la actividad de la enzima fosfatasa ácida (FA), se empleó el método de Ueki y Sato (1977), en el cual se tomó una alícuota de la secreción radical con la enzima, para ponerla en contacto con la mezcla de reacción que contiene el sustrato p-nitrofenilfosfato (p-NPP) 2,5 mM y buffer Acetato de sodio 50 mM pH 5,0, la mezcla se incubó en baño María a 34°C durante 30 minutos, deteniendo la reacción con una solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. La lectura del p-nitrofenol (PNP) liberado a 405 nm se realizó con un espectrofotómetro Spectronic 21. Se preparó una curva patrón con PNP (Anexo 10) y los resultados se expresaron en  $\mu\text{mol}$  de paranitrofenol por hora por peso seco de raíces ( $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

Para determinar la actividad de la fitasa (FI), se usó la metodología de Li *et al.* (1997), en el cual se puso en contacto una alícuota de la secreción radical con la enzima y la mezcla de reacción con el sustrato fitato de magnesio y potasio 1,5 mM en buffer acetato de sodio 100 mM a pH 5. La reacción se incubó a 37°C por una hora y la reacción se detuvo con ácido tricloroacético (TCA) al 10%. Después de emplear el método de Fiske y Subarrow (1925) modificado por Cooper (1979), la lectura del Pi liberado se realizó con un espectrofotómetro Spectronic 21. Se preparó una curva patrón de Pi (Anexo 11) y los resultados se expresaron en  $\mu\text{g Pi} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$ .

#### 5.3.1. Determinación del tamaño de la alícuota de la secreción radical

Para la fosfatasa ácida, se incubó por triplicado 0,67; 1,17, 1,3, 2,0, 2,5, 3,3 y 4,0 ml de la secreción radical que posee la enzima con la mezcla de reacción la cual contenía p-NPP 2,5 mM y buffer acetato de sodio 50mM. La reacción se detuvo adicionando 6 ml una solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y se midió el PNP formado a 405 nm. La actividad enzimática se obtuvo interpolando en la curva patrón de PNP y se expresó en  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$

Para la fitasa, se incubó por triplicado 0,67; 1,17; 1,3; 2,0; 2,5; 3,3 y 3,82 ml de la secreción radical con la enzima, en la mezcla de reacción de fitato de magnesio y potasio 1.5 mM en buffer acetato de sodio 100 mM. Las reacciones interrumpieron con la adición de 6 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, y después de realizar la metodología de Fiske y Subarrow (1925) modificada por Cooper (1975), se midió el Pi liberado a 820 nm. La actividad enzimática se obtuvo interpolando en la curva patrón de Pi y se expresó en  $\mu\text{g Pi. g}^{-1} \text{PsR. h}^{-1}$ .

### **5.3.2. Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de fosfohidrolasas**

Para fosfatasa ácida se incubó por triplicado una alícuota de 12 mL de la secreción radical con el sustrato P-NPP 2.5 mM en buffer acetato de sodio 50mM. De cada uno de estos viales se tomaron alícuotas de 1 mL a los 0, 5, 10, 20, 30, 50, 60 y 120 minutos. La reacción se detuvo en tubos de ensayo que contenían 3mL de solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , y se midió el PNP formado a 405 nm. La actividad enzimática se obtuvo interpolando en la curva patrón de PNP y se expresó en  $\mu\text{mol PNP. g}^{-1} \text{PsR. h}^{-1}$

Para la fitasa se incubó por triplicado una alícuota de 11,46 mL de la secreción radical con la enzima, en la mezcla de reacción de fitato de magnesio y potasio 1.5 mM en buffer acetato de sodio 100 mM La reacción se detuvo en tubos de ensayo que contenían 3mL de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, y después de aplicar la metodología de Fiske y Subarrow (1925) modificada por Cooper (1975), se determinó el Pi liberado a 820 nm. La actividad enzimática se obtuvo interpolando en la curva patrón de Pi y se expresó en  $\mu\text{g Pi. g}^{-1} \text{PsR. h}^{-1}$ .

### **5.3.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad de fosfatasa ácida**

Se incubó por triplicado 4 ml de la secreción radical con la enzima en la mezcla de reacción con sustrato p-NPP 2,5 mM en buffer acetato de sodio 50mM, a temperaturas de 20, 30, 35, 40, 45 y 50°C durante 30 minutos. La reacción se detuvo adicionando 6 ml de solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y se midió el PNP

formado a 405 nm. La actividad enzimática se obtuvo interpolando en la curva patrón de PNP y se expresó en  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$

#### **5.3.4. Efecto del pH sobre la actividad de fosfatasa ácida**

Se incubaron por triplicado y durante 30 minutos, 4 mL de la secreción radical con la enzima a la mezcla de reacción constituida por el sustrato p-NPP 2.5 mM en la serie de pH siguiente: 3,0; 4,0; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0 y 8,0, preparadas con buffer acetato de sodio 50mM, a excepción del pH 8,0 que se preparó con buffer Tris HCl. La reacción se detuvo adicionando 6 ml de solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , y se midió el PNP formado a 405 nm. La actividad enzimática se obtuvo interpolando en la curva patrón de PNP y se expresó en  $\mu\text{m PNP} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR}$ .

#### **5.4. Determinación preliminar de las constantes $V_{\text{máx}}$ y $K_{\text{m}}$ aparentes de la fosfatasa ácida de la secreción radical.**

Las constantes cinéticas  $K_{\text{m}}$  y  $V_{\text{máx}}$  se determinaron ensayando con la serie de concentraciones del sustrato p-NPP siguiente: 1,0; 1,25; 1,43; 1,67; 2,0; 2,50; 3,30; 5,50 mM, haciendo uso de 6 ml de una secreción compuesta de tres plantas de la misma edad (20 días) y del mismo tratamiento. Se siguieron las condiciones óptimas para pH, temperatura y tiempo de incubación ensayadas en los pasos anteriores. La reacción se detuvo adicionando 10 ml de una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , y se midió el PNP formado a 405 nm.

Las curvas de velocidad ( $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$ ) vs concentración del sustrato (mM p-NPP) se graficaron, y los valores de  $K_{\text{m}}$  y  $V_{\text{máx}}$  aparentes de la enzima en la secreción radical sin purificar bajo deficiencia (-P= 0,004 mMP) y suficiencia (+P= 0,86 mMP) se determinaron por medio de las transformaciones matemáticas de Lineweaver Burk, Eady-Hofstee y Wolf, con el fin de obtener un rango de valores de las constantes y compararlos con otros estudios realizados para otras especies. Las gráficas de las transformaciones se realizaron con el programa SigmaPlot 10.0.

## 6. RESULTADOS

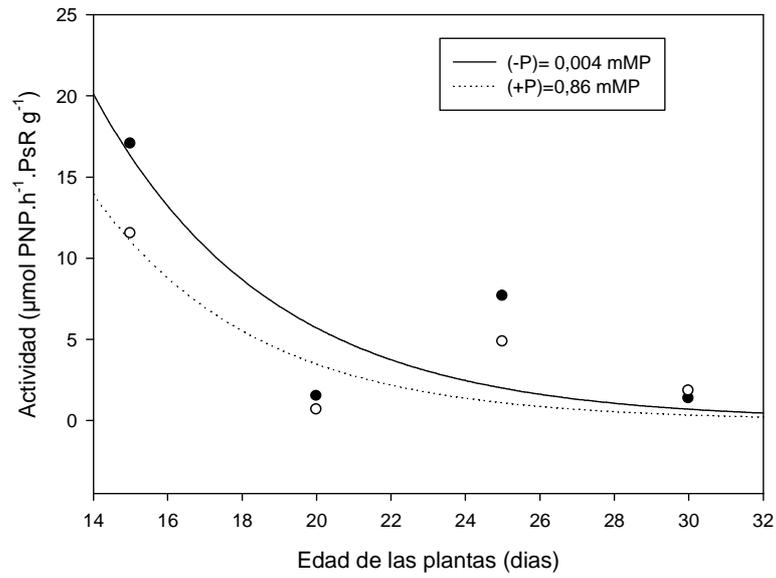
### 6.1. Actividad enzimas fosfohidrolasas

En un ensayo preliminar se evaluaron plantas de diferentes edades, con el fin de poder establecer el momento óptimo de recolección de la secreción radical, donde la actividad de la enzima fuera óptima. Los resultados obtenidos permitieron determinar que se indujo la actividad de fosfatasa ácida expresada en  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en el extracto crudo bajo condición  $-P$ , con un óptimo a los 15 días de edad (Figura 24). Los menores valores de actividad se hallaron a los 20 días de edad, para volver a aumentar a los 25 días.

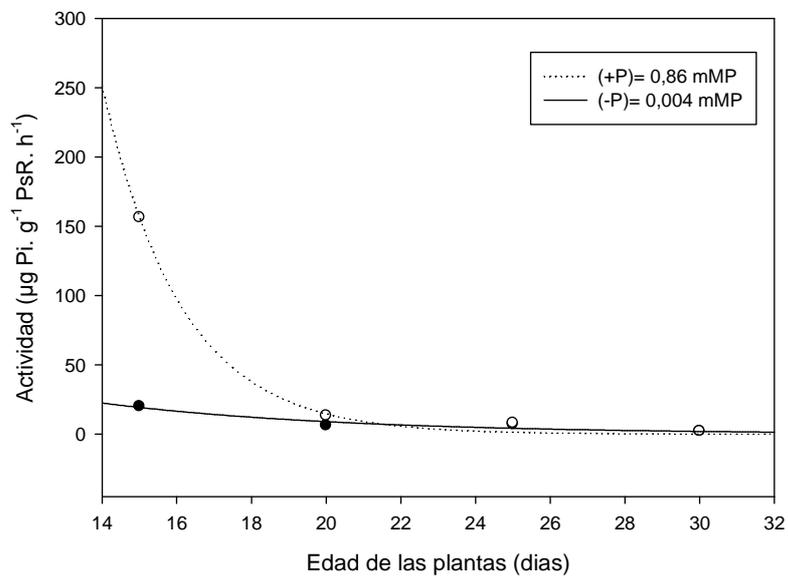
Las determinaciones de actividad de fosfatasa ácida bajo condición  $-P$  en casi todas las edades, superan a las obtenidas en  $+P$  (Figura 24), mostrando aumentos de 32,45% a los 15 días (de 11,51 en  $+P$  a 17,05  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en  $-P$ ), 55,61% a los 20 días (de 0,66 en  $+P$  a 1,49  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en  $-P$ ), 36,63% a los 25 días (de 4,86 en  $+P$  a 7,66  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en  $-P$ ), sin inducción de actividad por deficiencia a los 30 días.

Por otro lado, en la Figura 25 se observa que para la enzima fitasa no se observó la inducción de la actividad en el extracto crudo bajo la condición  $-P$ , puesto que los valores expresados en  $\mu\text{g Pi} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en  $-P$  estuvieron por debajo del tratamiento suficiente. El pico máximo de actividad se encontró a los 15 días de edad, mostrando diferencias muy marcadas entre  $+P$  y  $-P$ , con valores de 156,467 y 19,98  $\mu\text{g Pi} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  respectivamente, lo cual indica que bajo estas condiciones la actividad en  $-P$  se redujo en un 87, 23%.

Para las edades siguientes, la actividad disminuyó para ambos tratamientos, pero las reducciones fueron más marcadas en  $+P$ .



**Figura 24.** Actividad de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria juncea* de diferentes edades.



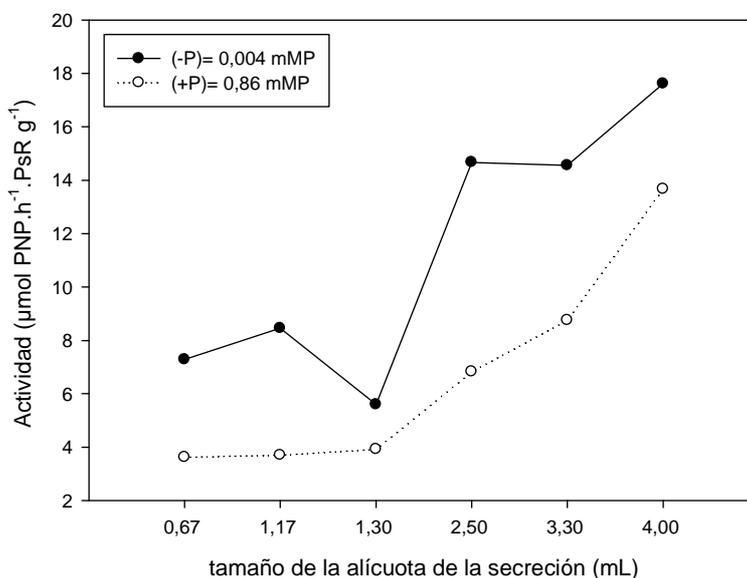
**Figura 25.** Actividad de la enzima fitasa en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria juncea* de diferentes edades.

Dado que los mayores valores de actividad se encontraron a los 15 días de edad, las determinaciones de las condiciones óptimas de los ensayos (alícuota de la secreción, tiempo de incubación, pH y temperatura) y las determinaciones preliminares de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  se realizaron justo en ese momento de muestreo.

En términos generales, para ambas enzimas, la actividad aumentó a medida que se incrementó el tamaño de la alícuota empleada.

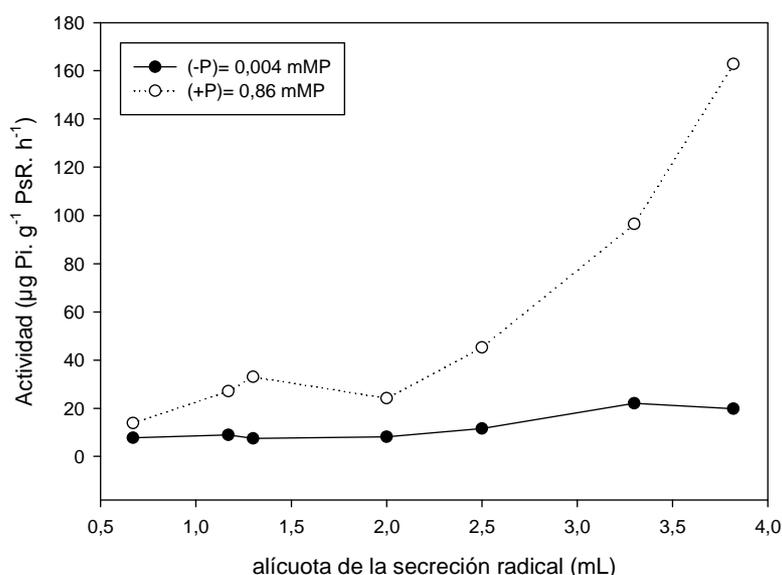
Para fosfatasa ácida se registraron grandes diferencias entre los tratamientos +P y -P, observándose una reducción de la actividad a la alícuota de 1,30 mL en el tratamiento deficiente, para posteriormente volverse a incrementar.

Desde la alícuota más pequeña (0,67 mL) hasta la más grande (4 mL), la actividad se incrementa desde 7,29 a 17,62  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en -P y desde 3,62 a 13,67  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en +P. Los máximos de actividad enzimática expresada en  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  se observaron cuando se empleó una alícuota de 4 mL de secreción radical (Figura 26).



**Figura 26.** Efecto del tamaño de la alícuota de la secreción radical sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad.

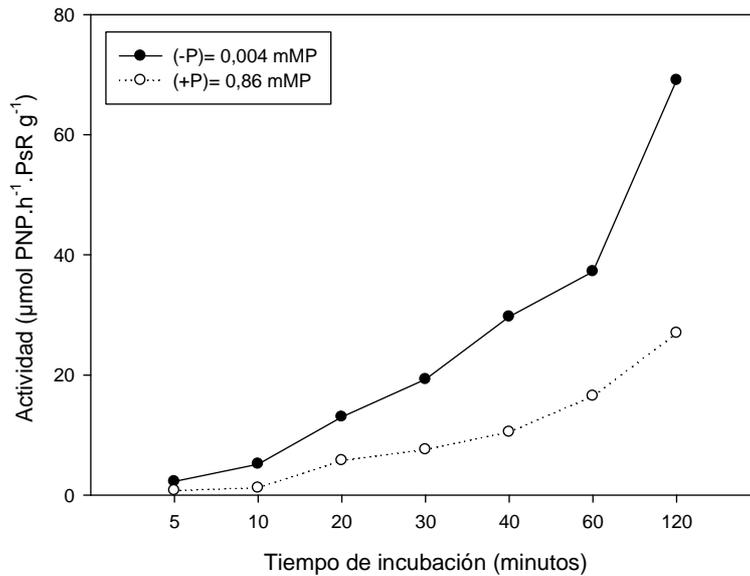
Para fitasa, la actividad en -P se mantuvo prácticamente constante con el incremento de la alícuota empleada, mientras que en +P siempre aumentó. Las mayores diferencias entre los tratamientos se registraron a un tamaño de 3,82 mL, donde la actividad fue de 162,84  $\mu\text{g Pi. g}^{-1} \text{PsR. h}^{-1}$  en +P, hasta 19,81  $\mu\text{g Pi. g}^{-1} \text{PsR. h}^{-1}$  en -P, lo que representa una disminución del 87,83% (Figura 27)



**Figura 27.** Efecto del tamaño de la alícuota de la secreción radical sobre la actividad de la fitasa en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad.

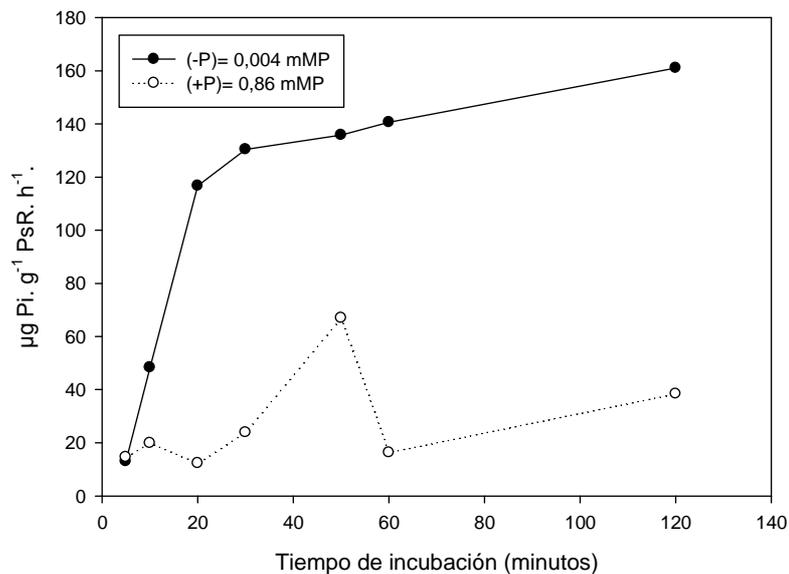
En la Figura 28 se muestra el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida, expresada en  $\mu\text{mol PNP. g}^{-1} \text{PsR. h}^{-1}$ , en el cual se observa que a 34°C pH 5,0, la actividad mostró linealidad alrededor de los 10 minutos en +P y -P. Del mismo modo, se observa un aumento de la actividad a medida que transcurre el tiempo, encontrándose el máximo a los 120 minutos. Los valores de actividad encontrados para -P y +P fueron respectivamente de 2,26 y 0,78  $\mu\text{mol PNP. g}^{-1} \text{PsR. h}^{-1}$  a los 5 minutos; 5,17 y 1,23  $\mu\text{mol PNP. g}^{-1} \text{PsR. h}^{-1}$  a los 10 minutos; 13,03 y 5,79  $\mu\text{mol PNP. g}^{-1} \text{PsR. h}^{-1}$  a los 20 minutos; 19,28 y

7,59  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  a los 30 minutos; 29,71 y 10,53  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  a los 40 minutos; 37,23 y 16,52  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  a los 60 minutos y de 69,09 y 26,98  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  a los 120 minutos.



**Figura 28.** Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad.

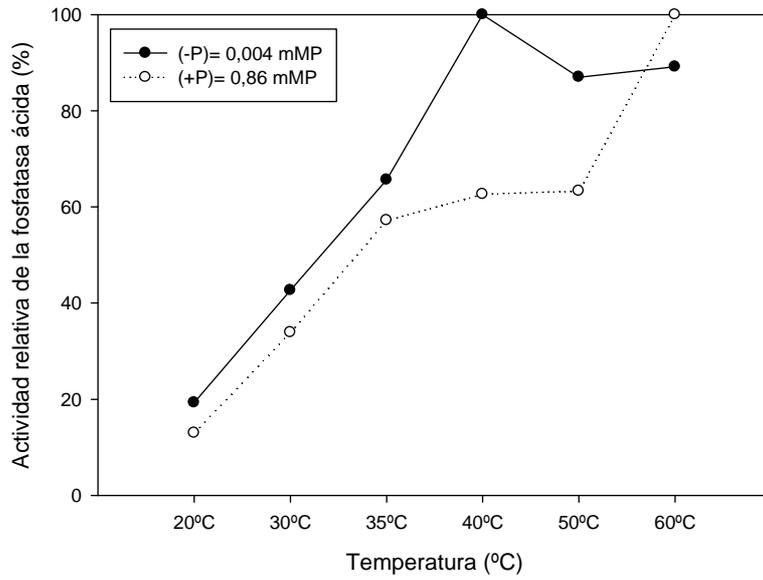
Para fitasa, los resultados obtenidos fueron inconsistentes, encontrándose que los valores de actividad en  $-P$  superan a los de  $+P$  (Figura 29), lo cual no concuerda con lo obtenido en determinaciones anteriores, donde se observó la actividad enzimática en función a las edades y del tamaño de la alícuota (Figuras 25 y 27).



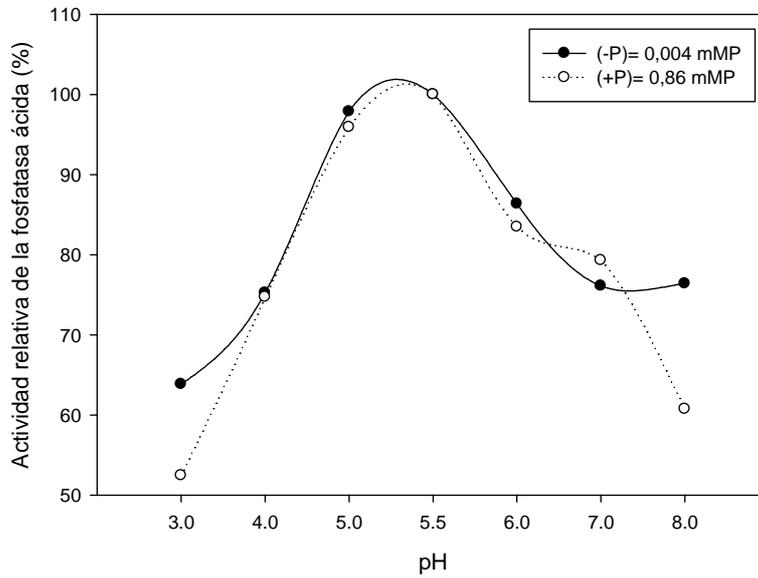
**Figura 29.** Efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima fitasa en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad.

En la Figura 30 se muestra el efecto de la temperatura sobre la actividad relativa expresada en porcentaje de la enzima fosfatasa ácida. Se puede observar que la actividad relativa fue en aumento a medida que se incrementó la temperatura en la mezcla de reacción, alcanzando un óptimo de 40°C en -P, a partir del cual comienza a descender. En el tratamiento +P, la actividad permaneció constante en un rango de 35-50°C, para después aumentar a los 60°.

Además de la temperatura, otro de los factores tomados en cuenta durante las mediciones de actividad enzimática es el pH. En función a lo anterior, en la Figura 31, se muestra el efecto que tiene el pH sobre la actividad relativa de la enzima fosfatasa ácida del extracto crudo de raíces de plantas de 15 días de edad. Para todos los rangos de pH evaluados, la actividad relativa siempre estuvo por encima del 50%, observándose que la actividad es mayor al 80% en un rango de pH entre 5.0 y 6.0 en ambos tratamientos, con un óptimo en pH 5.5. bajo la condición -P, las reducciones de actividad a pH 3.0, 4.0, 7.0 y 8.0 fueron de 36,15%, 24,75%, 23,90% y 23,59% respectivamente, experimentando un leve aumento en pH 8.0



**Figura 30.** Efecto de la temperatura sobre la actividad relativa de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad.



**Figura 31.** Efecto del pH sobre la actividad relativa de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad.

## 6.2. Valores preliminares de las constantes $V_{m\acute{a}x}$ y $K_m$ aparentes de la fosfatasa \u00e1cida de la secreci\u00f3n radical.

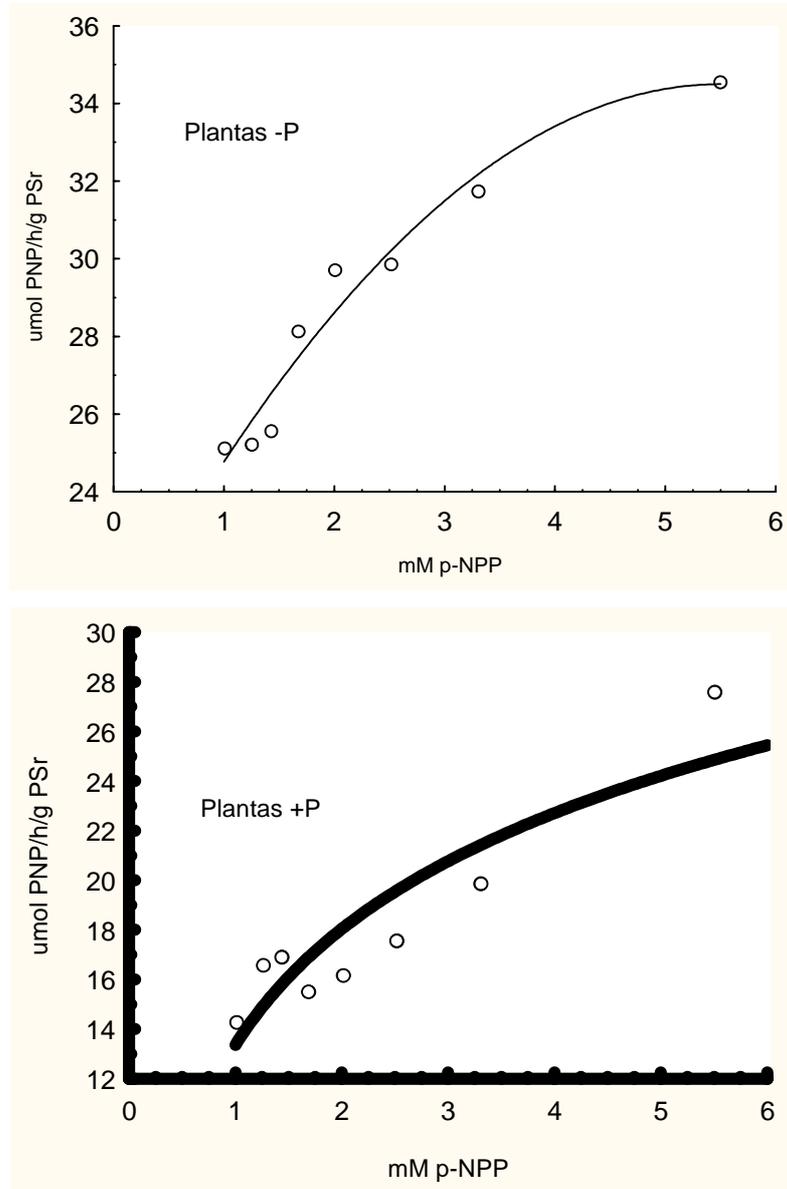
En las Figuras 32 y 33 se muestran los resultados de dos ensayos usando la secreci\u00f3n radical (extracto crudo) “*in vivo*” de plantas de *Crotalaria juncea* de 15 d\u00edas de edad crecidas en condiciones de suficiencia (0,86 mMP) y deficiencia (0,004 mMP) de f\u00f3sforo. En ambas figuras, la relaci\u00f3n entre la velocidad enzim\u00e1tica expresada en  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  vs la concentraci\u00f3n del sustrato p-NPP en mM, no reflej\u00f3 la cin\u00e9tica t\u00edpica de Michaelis Menten.

Aunque los valores de velocidad fueron en aumento a medida que se incrementaba la concentraci\u00f3n del sustrato, no se observ\u00f3 saturaci\u00f3n de la enzima con las concentraciones de sustrato empleadas. Los valores m\u00ednimos de velocidad de reacci\u00f3n obtenidos para los ensayos 1 y 2 respectivamente cuando se hizo uso de la menor concentraci\u00f3n de sustrato (1 mM p-NPP), fueron de 25,13 y 17,29  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en -P en comparaci\u00f3n con los 14,31 y 15,69  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en +P, mientras que los m\u00e1s altos valores de velocidad de reacci\u00f3n encontrados en estos ensayos cuando se us\u00f3 la mayor concentraci\u00f3n (5mM p-NPP) fueron de 30,58 y 24,99  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en -P y de 27,62 y 24,40  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en +P (Figuras 32 y 33).

Los resultados obtenidos se analizaron por medio de tres transformaciones gr\u00e1ficas (Figuras 34 y 35) que arrojaron ecuaciones matem\u00e1ticas de ajuste, con las cuales se calcularon  $K_m$  aparentes y  $V_{m\acute{a}x}$  (Cuadro 10). Los datos obtenidos aqu\u00ed demuestran que la mayor\u00eda de las transformaciones de la cin\u00e9tica tuvieron buen ajuste, con valores de  $r^2$  por encima de los 0,70, a excepci\u00f3n de la transformaci\u00f3n de Eadie Hofstee en el primer ensayo, cuyo  $r^2$  fue de 0,49 en +P.

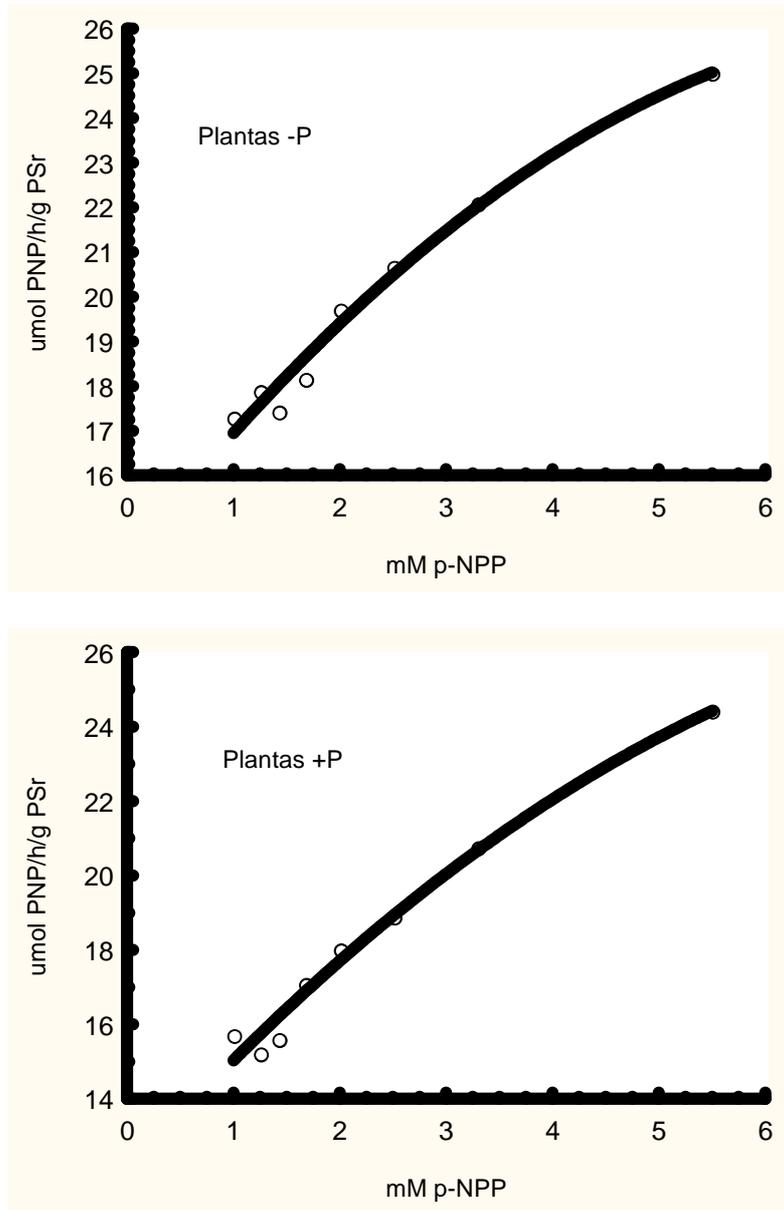
En t\u00e9rminos generales los valores de  $K_m$  obtenidos en -P estuvieron por debajo de los de +P y en la mayor\u00eda de los casos, con el uso de las transformaciones, los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  fueron similares entre los tratamientos. Es importante acotar que al no observarse saturaci\u00f3n de la enzima por el sustrato, la interpolaci\u00f3n de las ecuaciones de ajuste no refleja verdaderamente las  $V_{m\acute{a}x}$  para la enzima.

## ENSAYO I

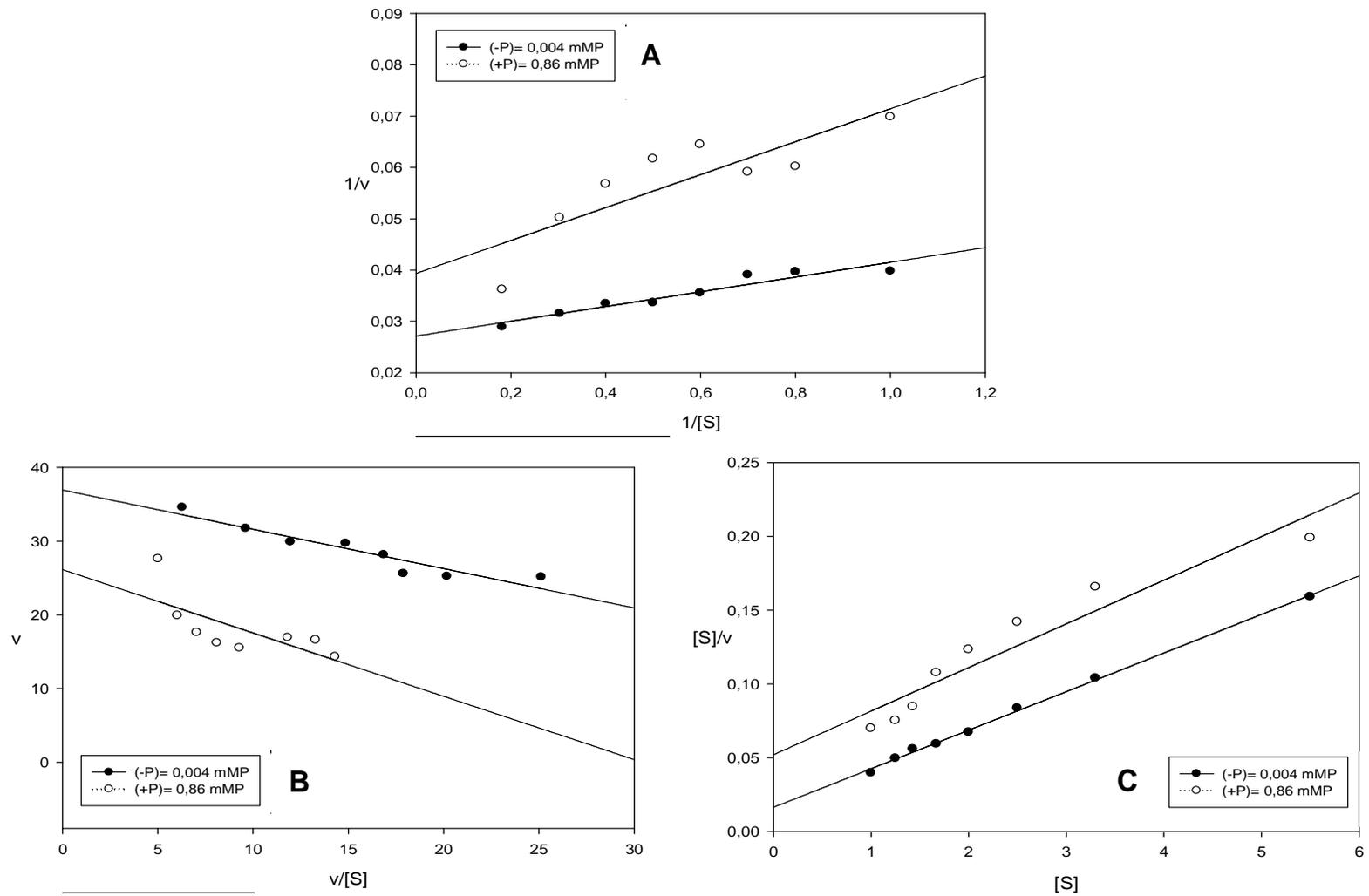


**Figura 32.** Representación gráfica de la relación  $v$  vs  $[S]$  de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) de plantas de crotalaria juncea de 15 días de edad bajo condiciones de: **A.** deficiencia ( $p= 0,004$  mMP) y **B.** suficiencia ( $P=0,86$  mMP) de fósforo. Ensayo I

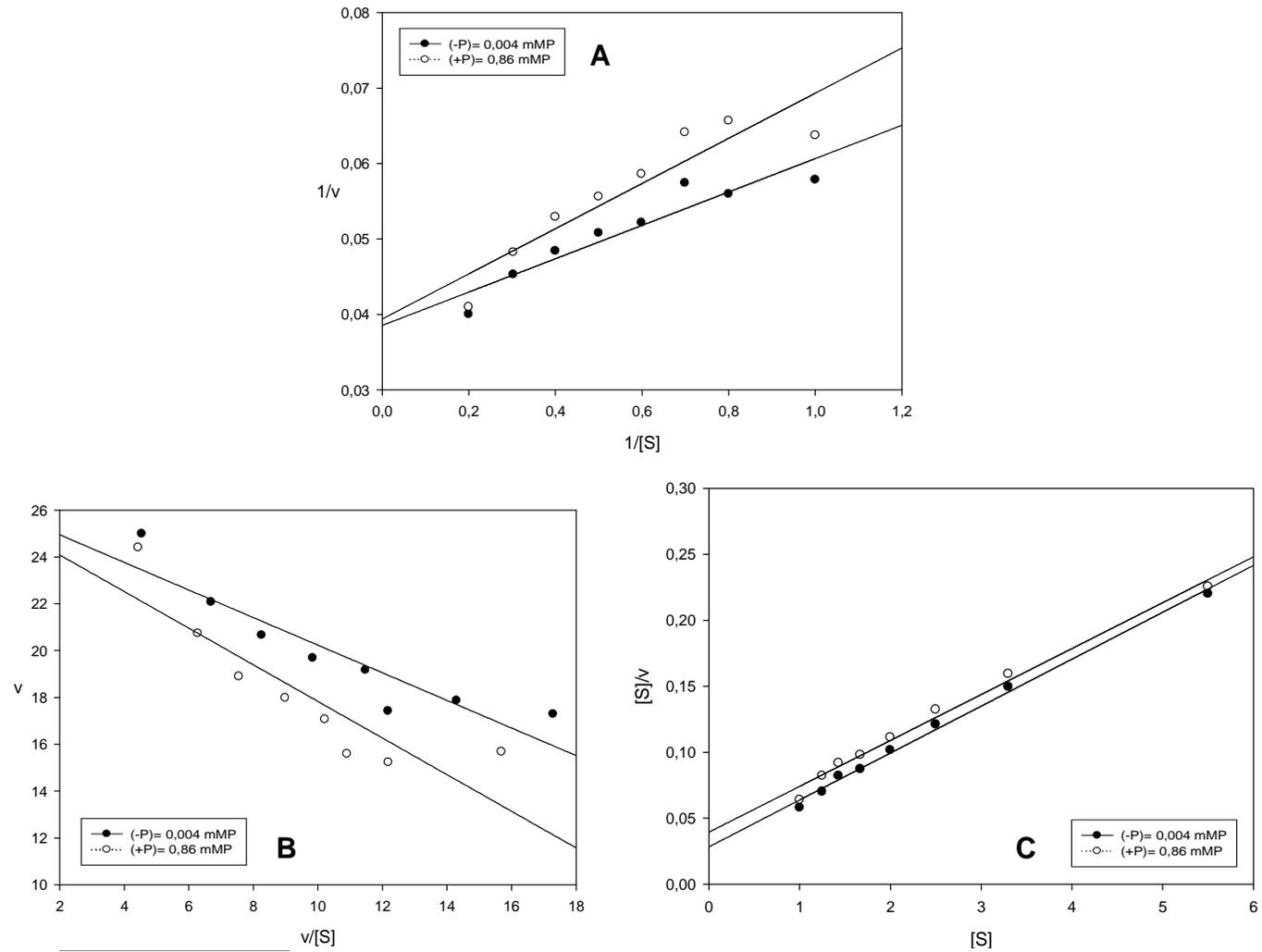
## ENSAYO II



**Figura 33.** Representación gráfica de la relación  $v$  vs  $[S]$  de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) de plantas de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad bajo condiciones de: **A.** deficiencia ( $p = 0,004$  mMP) y **B.** suficiencia ( $P = 0,86$  mMP) de fósforo. Ensayo II.



**Figura 34.** Representaciones gráficas de las transformaciones de la representación  $v$  vs  $[S]$  de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad. Ensayo 1. **A:** Lineweaver Burk, **B:** Hofstee, **C:** Wolf. (Ensayo I)



**Figura 35.** Representaciones gráficas de las transformaciones de la representación  $v$  vs  $[S]$  de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad. Ensayo 1. **A:** Lineweaver Burk, **B:** Hofstee, **C:** Wolf. (Ensayo II)

**Cuadro 10.** Cálculo de las constantes cinéticas Km y Vmáx de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical (extracto crudo) de *Crotalaria juncea* de 15 días de edad bajo condición de deficiencia y suficiencia de fósforo utilizando las transformaciones de la relación v vs [S] de Lineweaver Burk, Eadie Hofstee y Wolf, donde v es la velocidad de reacción y [s] es la concentración de susstrato.

| Transformación                        | Ensayo | Tratamiento | Ecuación de ajuste | r <sup>2</sup> | Km<br>(mM p-NPP) | Vmáx<br>(μmol PNP. g <sup>-1</sup> PsR. h <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------|--------|-------------|--------------------|----------------|------------------|-----------------------------------------------------------|
| Lineweaver<br>Burk<br>(1/v vs 1/[S]). | I      | -P          | Y =0,0271+0,0144x  | 0,9209         | 0,53             | 36,90                                                     |
|                                       |        | +P          | Y= 0,0393+0,0321x  | 0,7144         | 0,82             | 25,44                                                     |
|                                       | II     | -P          | Y=0,0385+0,0221x   | 0,8869         | 0,57             | 25,97                                                     |
|                                       |        | +P          | Y=0,0394+0,0299x   | 0,8542         | 0,76             | 25,38                                                     |
| Wolf<br>([S]/v vs [S])                | I      | -P          | Y=0,0520+ 0,0296x  | 0,9075         | 1,75             | 33,78                                                     |
|                                       |        | +P          | Y=0,0163+ 0,0262x  | 0,9980         | 0,62             | 38,04                                                     |
|                                       | II     | -P          | Y=0,0282+0,0356x   | 0,9948         | 0,79             | 28,08                                                     |
|                                       |        | +P          | Y=0,0393+0,0348x   | 0,9888         | 1,13             | 28,73                                                     |
| Eadie Hofstee<br>(v vs v/[S])         | I      | -P          | Y=36,9396-0,5331x  | 0,8929         | 0,53             | 36,94                                                     |
|                                       |        | +P          | Y=26,1334-0,8593x  | 0,4997         | 0,86             | 26,13                                                     |
|                                       | II     | -P          | Y=26,1232-0,5892x  | 0,8487         | 0,59             | 26,12                                                     |
|                                       |        | +P          | Y=25,6493-0,7819x  | 0,7837         | 0,78             | 25,64                                                     |

-P= 0,004 mMP; +P= 0,86 mMP

## 7. DISCUSIÓN

Mucho se ha investigado acerca de las respuestas al estrés por deficiencia de fósforo en plantas, y dentro de este síndrome, la producción y liberación de enzimas fosfohidrolasas se ha establecido como una estrategia de tolerancia tanto para especies cultivadas como no cultivadas (Goldstein *et al.*, 1988; Duff *et al.*, 1991; Ascencio, 1994; LeBansky *et al.*, 1992; Li y Tadano, 1996; Ascencio, 1997; Bozzo *et al.*, 2000). Pocas investigaciones se han centrado en las respuestas que tienen las plantas de *Crotalaria juncea* bajo deficiencia de fósforo (Ferrarotto, 2009), pero ninguna referencia bibliográfica se encontró acerca de el efecto de la deficiencia sobre la actividad de enzimas fosfohidrolasas para esta especie.

Se conoce que uno de los puntos importantes a tomar en cuenta cuando se realizan estos trabajos de actividad enzimática, es establecer el momento de recolección de la secreción radical, puesto que la actividad de las enzimas varía con la edad de las plantas. Una disminución de la actividad de la enzima fosfatasa ácida con la edad de las plantas de *Vigna unguiculata*, *Gossypium hirsutum* y *Cajanus cajan*s, fue reportada por Ascencio (1994), así como también, por Miller *et al* (2001), quienes encontraron que tanto en raíces normales como en proteoideas de lupino, los niveles de FA incrementaron cuando las plantas tenían de 10 a 14 días de edad bajo la condición -P y Briceño (2001), trabajando con plantas de tomate, observó que la actividad de FA en plantas de 45 días era mayor que la encontrada a los 33 días de edad.

En base a lo anterior, se realizó un ensayo preliminar con plantas de 15, 20, 25 y 30 días, que permitieran determinar el momento adecuado para realizar los muestreos. Los resultados se observan en las Figuras 24 y 25, donde se manifestó claramente que la actividad máxima para ambas enzimas provenientes de la secreción radical (extracto crudo) de *Crotalaria juncea* bajo condición -P, ocurre a los 15 días de edad, por lo cual todos los muestreos y recolecciones de la secreción para los ensayos de actividad, se realizaron justo en ese momento, realizando todas las corridas de

actividad el mismo día de la recolección de la secreción. Según lo observado en el capítulo I, las plantas de crotalaria de 15 días de edad cultivadas en +P y -P, no muestran diferencias tangibles en relación al crecimiento en área foliar y peso seco, pero los datos de actividad enzimática obtenidos aquí demuestran que para este momento dichas plantas ya comenzaban a responder fisiológicamente ante la deficiencia de fósforo liberando tempranamente enzimas fosfohidrolasas. Lo observado en este trabajo difiere de lo reportado por Ascencio (1996), quien manifestó que la actividad de fosfatasa ácida en *Cajanus* y *Desmodium* se incrementó cuando dichas plantas sufrieron una disminución entre el 40 y 90% en sus pesos secos, lo cual indicaba estrés severo. Lo anterior podría estar indicando que la inducción y liberación de estas enzimas por las raíces de las plantas no siempre van acoplados con cambios evidentes en el crecimiento.

La disminución en el contenido de Pi actúa como una señal que estimula la secreción y la actividad de la enzima fosfatasa ácida (Fragoso *et al.*, 2005). Aunque en este trabajo no se midió el contenido de Pi soluble radical, sí se realizaron mediciones del Pi soluble en hojas. Las enormes reducciones del Pi foliar en edades superiores a los 15 días (82,87% a los 20 días, 92,12% a los 25 días y 89,83% a los 30 días) (capítulo I, Figura 14) parecen indicar retranslocación del mismo desde las hojas hacia las raíces, lo cual podría ser una causa de limitación para la actividad de esta enzima en la secreción radical.

El hecho de que se observara mayor actividad a esta edad de muestreo podría explicarse por un aumento en la cantidad de proteína enzimática (Duff *et al.*, 1991), la activación de isoenzimas que ya estaban presentes en suficiencia (Haran *et al.*, 2000) o el surgimiento de nuevas isoenzimas (Li y Tadano, 1996; Bozzo *et al.*, 2002; Starnes *et al.*, 2008).

Starnes *et al.* (2008) trabajando con dos cultivares de *Lolium multiflorum* encontraron que la inducción de una isoenzima en respuesta a la deficiencia de fósforo, estuvo relacionado con un incremento sustancial de actividad de fosfatasa ácida, la cual disminuyó cuando las mismas se transfirieron a un medio suficiente en fósforo.

Aunque las mediciones de actividad a los 20 días se realizaron siguiendo el mismo protocolo, para fosfatasa ácida los valores a dicha edad de muestreo no parecen ajustarse a la tendencia esperada, puesto que ocurre una reducción muy drástica (de 91,23%) en un lapso de 5 días cuando se compara con el muestreo inicial a los 15 días. Sin embargo, aunque no está claro ese valor de actividad, es probable que para el tercer y cuarto muestreo, correspondientes a los 25 y 30 días, los incrementos de la actividad de fosfatasa ácida se deban a una síntesis *de novo* de la enzima, inducida por controles regulatorios internos en la planta, tal como reportaron Goldstein *et al.* (1988) en células en suspensión de *Lycopersicum esculentum* y por Duff *et al.* (1991) en células en suspensión de *Brassica nigra*, ambas bajo deficiencia de fósforo.

Existen muchos reportes acerca de la inducción de la enzima fosfatasa ácida bajo condiciones de deficiencia de fósforo, tanto en extracto de tejidos como en células en suspensión y en la secreción radical. Goldstein *et al.* (1988) señalaron que la actividad de esta enzima aumentó 2,7 veces cuando las células en suspensión de tomate se transfirieron a un medio deficiente, coincidiendo con Baldwin *et al.* (2001) y Briceño (2001) en el extracto crudo de la secreción radical de tomate. Los resultados obtenidos en este trabajo con *Crotalaria juncea* muestran la misma tendencia ante la deficiencia de fósforo, observándose que para casi todas las edades, las determinaciones de actividad de fosfatasa ácida bajo condición -P supera a las obtenidas en +P (Figura 24). Los valores de actividad fosfatasa ácida de 11,51 en +P y 17,05  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en -P obtenidos en este trabajo para *Crotalaria juncea* están dentro de los rangos esperados de actividad de fosfatasa ácida en secreciones radicales; sin embargo, Cordero *et al.* (2005) reportan en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria spectabilis* de 33 días de edad, valores tan elevados como 448,07 y 748,25  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  para +P y -P respectivamente. Sin embargo, la inducción de la actividad bajo la condición -P observada para esta enzima en el extracto crudo de la secreción radical de *Crotalaria juncea* sugiere que una vez liberado por las raíces hacia la rizósfera, la fosfatasa ácida actúa de forma efectiva en la mineralización del Pi encontrado bajo formas orgánicas, constituyendo parte de una estrategia importante bajo deficiencia, tal

como ha sido reportado por otros autores en diferentes especies (Ascencio, 1997, Briceño, 2001; Cordero, 2005).

Por otro lado, los resultados aquí obtenidos mostraron que al contrario de la fosfatasa ácida, no ocurre la inducción la de actividad de la enzima fitasa en el extracto crudo de la secreción radical bajo la condición -P (Figura 25), lo cual difiere de lo señalado por Briceño (2001) haciendo uso de secreción radical de tomate, pero coincide con Gilbert *et al.* (1999), quienes consiguieron que la deficiencia de Pi no causó incrementos en la actividad de dicha enzima en *Lupinus albus* L, lo cual confirma que las respuestas de las plantas ante la deficiencia de fósforo varían entre especies.

Para establecer un protocolo adecuado para las corridas de actividad enzimática, se hace necesario el estudio de los factores que puedan optimizarla, tales como la determinación del tamaño de la alícuota de la secreción radical empleada, el pH, la temperatura y el tiempo de incubación.

Así, en la Figuras 26 y 27 se observa el efecto que tiene el tamaño de la alícuota sobre la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y fitasa respectivamente. En ambos casos, la tendencia general es hacia un incremento de la actividad a medida que se usa mayor volumen de secreción radical, lo cual podría explicarse por el hecho de que un aumento en el volumen de secreción, incluye también un aumento en la concentración de enzima estudiada. Los resultados obtenidos concuerdan con lo reportado por Briceño (2001) estudiando fosfatasa ácida y fitasa en la secreción radical de *Lycopersicum esculentum*. Por lo anteriormente expresado, para los siguientes ensayos del efecto del pH, temperatura y tiempo de incubación sobre la actividad enzimática, se decidió emplear las alícuotas de 4mL para fosfatasa ácida y 3,82 mL para fitasa.

En los resultados obtenidos sobre el efecto del tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima fosfatasa ácida (Figura 28), se observa que a los 120 minutos

se halla una gran actividad enzimática, infiriéndose con esto que bajo las condiciones de experimentación empleadas, y tomando en cuenta que se hace uso del extracto crudo o no purificado, la enzima actúa lentamente en la transformación del sustrato p-nitrofenilfosfato al producto p-paranitofenol, reacción que podría ser más rápida en presencia de la enzima purificada. La mayoría de los protocolos de actividad de esta enzima, realizan las corridas en tiempos de 30 minutos, lo cual se ha considerado acorde para muchas especies evaluadas (Ascencio, 1997; Juma y Tabatabai, 1999; Briceño, 2001; Cordero *et al.*, 2005). En nuestro caso, aun cuando se observó gran actividad a los 120 minutos, la linealidad se encontró en tiempos cercanos a 10 minutos, por lo que también se consideró acorde realizar las corridas de actividad y cinética durante 30 minutos.

En la Figura 29, se mostró el efecto que tiene el tiempo de incubación sobre la actividad de la enzima fitasa en el extracto crudo. Los valores de actividad en este caso fueron mayores en -P, lo cual supone que en este caso sí hubo inducción de actividad bajo dicha condición, lo cual comparado con los anteriores ensayos realizados con la misma enzima, muestran inconsistencia. Se infiere que lo anterior podría deberse a la naturaleza de las secreciones, y al hecho de que las plantas de crotalaria conservan su genoma y características de planta silvestre, por lo que puede ocurrir variabilidad de esta enzima, dando por ende resultados que no estuvieron acorde con las determinaciones anteriores usando el extracto crudo de la secreción radical y el mismo protocolo. En función de esto, los estudios para fitasa deben hacerse por medio de metodologías que permitan su purificación, tal como han realizado otros investigadores (Panara *et al.*, 1990; Hübel y Beck, 1996; Bozzo *et al.*, 2002).

Cuando se ajustan protocolos para actividad enzimática, la temperatura es uno de los factores importantes a ser tomado en cuenta, puesto que un aumento desproporcionado por encima del rango de tolerancia de la enzima desestabilizan los puentes de hidrógeno de su estructura terciaria, causando desnaturalización y por ende la pérdida de su actividad (Illanes, 2008). La mayoría de los reportes definen a las enzimas fosfohidrolasas como enzimas estables a temperaturas por debajo de

60°C, tal es el caso de fosfatasa ácida purificada a partir de la secreción radical de tomate y lupino (Li y Tadano, 1996, Briceño, 2001) y de fitasa proveniente del homogeneizado radical de maíz (Hübel y Beck, 1996). Panara *et al* (1990) consiguieron que en el homogeneizado radical de plantas de *Hordeum vulgare* la temperatura óptima de fosfatasa ácida estuvo alrededor de 30-35°C, con una rápida y pronunciada pérdida de actividad a 60°C. Para las enzimas extracelulares halladas en la secreción radical se ha reportado mayor tolerancia a los aumentos de temperatura; así, Briceño (2001) consiguió que para la fosfatasa ácida en tomate la actividad mostró un óptimo entre 34 y 40°C, mientras que Lung *et al* (2008) el óptimo de actividad a los 45°C en tabaco. Los resultados obtenidos en este trabajo haciendo uso de secreción radical de crotalaria, igualmente muestran que esta enzima es resistente a las altas temperaturas (Figura 30), hallándose un óptimo de actividad a 40°C en condición -P, a partir del cual comienza a descender, mientras que en +P, la actividad permaneció constante en un rango de 35-50°C, para después aumentar a los 60°C. Aunque no se encontraron reportes de otros investigadores, lo anterior podría estar demostrando que bajo condiciones de deficiencia ocurre la inducción de una isoenzima con resistencia diferencial a la temperatura, que aquella que se genera bajo condiciones de suficiencia. La gran resistencia al calor puede atribuirse a su condición de enzima glicosilada (Bozzo *et al.*, 2002).

Aunque bajo la condición -P, la temperatura óptima fue de 40°C, se prefirió hacer uso de 30°C para la cinética, con el fin de evitar aquellas temperaturas que pudieran inactivar la enzima.

El otro factor a tomar en cuenta en los ensayos de actividad es el pH. Moreno (1985) y Lenninger (2001) informan que la estabilidad de la estructura de las proteínas y enzimas depende en gran medida de las cadenas laterales de aminoácidos porque influyen en las fuerzas hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno que conforman su estructura terciaria. Se sabe que las propiedades físico químicas de estas cadenas laterales pueden verse afectadas por cambios en el pH, debido a que es posible que se origine una modificación tanto en la ionización de los grupos químicos del sitio activo, como también en otros grupos químicos que mantienen la estructura catalítica

de la enzima, por lo que la misma podría perder esta conformación y con ella su actividad. La mayoría de los trabajos con diversas especies evaluando la actividad de fosfatasa ácida, muestran que el pH óptimo está en un rango entre 5.0-6.0 (Gibbins y Norris, 1962; Panara *et al.*, 1990; Bozzo *et al.*, 2002; Lung *et al.*, 2008; Tabaldi *et al.*, 2008), reportándose que en la secreción radical de lupino y tomate, el pH de 3.0 y 6.5 causaron disminuciones del pH en 30 y 50% respectivamente (Li y Tadano, 1996). Los resultados obtenidos en esta investigación afirman que la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical de *Crotalaria juncea* muestra más del 80% de actividad relativa entre el rango de pH 5.0-6.0, con un óptimo en 5.5 (Figura 31). En función a lo anterior, se decidió correr las mezclas de reacción a pH 5.0 en los estudios de cinética.

Puesto que las determinaciones para la enzima fitasa mostraron inconsistencia, los ensayos preliminares de cinética solo se realizaron para la enzima fosfatasa ácida. Aunque se han reportado diversos trabajos acerca de la cinética de la fosfatasa ácida purificada (LeBansky *et al.*, 1992; Ozawa *et al.*, 1995; Li y Tadano, 1996; Bozzo *et al.*, 2002; Lung *et al.*, 2008), son pocos los trabajos donde se han determinado las constantes cinéticas a partir del extracto crudo de la secreción radical (Ascencio, 1996, 1997; Briceño, 2001).

En las Figuras 32 y 33 se observa que las curvas de  $v$  vs  $[S]$  de la enzima fosfatasa ácida en la secreción radical, no se ajustaron a la cinética típica de Michaelis Menten. Esto podría explicarse por el hecho de que en el extracto crudo puede ocurrir la existencia de una mezcla de isoenzimas que podrían actuar a distintas velocidades y con distintos valores de  $K_m$ , o a la presencia de inhibidores que compiten con el sustrato por el sitio activo de la enzima.

En relación a la velocidad de reacción, los valores fueron en aumento a medida que se incrementaba la concentración del sustrato, encontrando que con un mínimo de 1 mM p-NPP, la enzima mostró valores que de 25,13 y 17,29  $\mu\text{mol PNP} \cdot \text{g}^{-1} \text{PsR} \cdot \text{h}^{-1}$  en el ensayo I y II respectivamente (Figuras 32 y 33), mientras que con la más alta empleada en este trabajo, de 5 mM p-NPP, no se logró observar la saturación de la

enzima, aun cuando dicha concentración correspondió en promedio de 5 -9 veces el valor de la  $K_m$ . Por lo anterior, para próximos ensayos de cinética en el extracto crudo, es recomendable ajustar el protocolo con el uso de un rango más amplio de concentraciones de sustratos, que permitan obtener valores de  $V_{m\acute{a}x}$  y  $K_m$  más atinados.

Los datos mostrados en el Cuadro 10 son producto de determinaciones realizadas por medio de las ecuaciones de ajuste de las respectivas transformaciones de la relación  $v$  vs  $[S]$  (Figuras 34 y 35), obteniéndose los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  por medio de las interpolaciones de estas gráficas; estos valores sirven como referencia para poder comparar la fosfatasa ácida de *Crotalaria juncea* con las de otras especies de plantas.

A nivel fisiológico, el estudio de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  en diversos escenarios de nutrición por fósforo es importante, puesto que constituyen marcadores de tolerancia a la deficiencia de fósforo en plantas (Ascencio 1996, 1997). En este sentido, la misma autora señala si los valores de  $K_m$  de las enzimas liberadas están alrededor de las concentraciones de P orgánico en el suelo, entonces podría esperarse que la liberación de las mismas por las raíces forman parte de una estrategia de la planta para tolerar la deficiencia de P. Lo anterior tiene gran importancia a nivel agronómico puesto que nos permitiría determinar aquellas especies con tolerancia a la deficiencia que son capaces de generar semillas viables bajo dicha condición, e introducirlas entonces en programas de mejoramiento genético.

Los resultados aquí obtenidos (Cuadro 10) muestran en términos generales, que cuando se compara con suficiencia, la fosfatasa ácida de la secreción radical muestra bajos y similares valores de  $K_m$  y de  $V_{m\acute{a}x}$  respectivamente en condiciones de deficiencia de fósforo en plantas, tal como señaló Ascencio (1997), para la fosfatasa ácida de la secreción radical de *Euphorbia heterophylla*, manifestando así que los valores de  $K_m$  más bajos, compensan las  $V_{m\acute{a}x}$  similares. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que para este estudio preliminar, el hecho de no encontrar saturación de la enzima es una limitación para el cálculo de  $V_{m\acute{a}x}$  por medio de la interpolación en las curvas de ajuste, por lo cual es muy probable que lo reportado

aquí constituya solo una velocidad de reacción más de la enzima. No obstante, por los mayores valores de actividad observados bajo la condición -P al inicio de la experimentación, se puede inferir que las velocidades máximas estarían por encima a las obtenidas en +P.

Puesto que la  $K_m$  es la concentración del sustrato en el cual la enzima trabaja a la mitad de la velocidad máxima, al encontrarse valores de  $K_m$  aparentes más bajos en deficiencia, se podría decir que la liberación de esta enzima hacia la rizósfera, trabajaría mejor hidrolizando el Pi que se encuentra en muy bajas concentraciones a partir de fuentes orgánicas en el suelo, porque con menor uso de sustrato, trabaja a la mitad de su máxima velocidad, logrando tolerar de esta forma la deficiencia, lo cual coincide con Ascencio (1996) y Briceño (2001) para plantas de *Desmodium tortuosum* y *Lycopersicum esculentum* respectivamente, pero no así para *Ruellia tuberosa* cuya fosfatasa ácida mostró valores de  $K_m$  por encima del testigo +P.

Lo anteriormente descrito señala que la liberación de fosfatasas ácidas por las raíces de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de deficiencia podría aportar en buena medida a las estrategias que le permiten tolerar la deficiencia de fósforo en los tejidos.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA DEL CAPÍTULO II

**ASCENCIO, J.** 1994. Acid phosphatase as a diagnostic tool. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 25(9, 10): 1553-1564.

**ASCENCIO, J.** 1996. Growth strategies and utilization of phosphorus in *Cajanus cajan* L. Millsp. and *Desmodium tortuosum* (Sw) DC under phosphorus deficiency. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 27 (5-8): 1971-1993.

**ASCENCIO, J.** 1997. Root secreted acid phosphatase kinetics as a Physiological Marker for Phosphorus Deficiency. *Journal of Plant Nutrition.* 20 (1): 9-26.

**BALDWIN, J., A, KARTHIKEYAN, K. RAGHOTHAMA.** 2001. LEPS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol.* 125: 728-737.

**BASHA SM.** 1983. Purification and characterization of an acid phosphatase from peanut (*Arachis hypogaea*) seed. *Can J Bot.* 62:385–391. [Resumen disponible en línea, 25/07/2009]: <http://rparticle.web-p.cisti.nrc.ca/rparticle/AbstractTemplateServlet?calyLang=eng&journal=cjb&volume=62&year=1984&issue=2&msno=b84-058>

**BATES, T., P. LYNCH.** 1996. Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment.* 19: 529-538

**BOBADILLA, C; S. RINCÓN.** 2008. Aislamiento y evaluación de bacterias fosfato solubilizadoras a partir de compost obtenido de residuos plaza. Trabajo de grado para Microbiólogo ambiental. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 87 pp.

**BOZZO, G; K.G RAGHOTHAMA; W. PLAXTON.** 2002. Purification and characterization of two secreted purple acid phosphatase isozymes from phosphate-

starves tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures. *Aur. J. Biochem.* 269: 6278-6286.

**BRICEÑO, Z.** 2001. Estudio de algunas respuestas fisiológicas y Bioquímicas de *Lycopersicon esculentum* Mill var. Rio Grande bajo condiciones de deficiencia y suficiencia de fósforo. Tesis de maestría. Facultad de Agronomía. Universidad Central de Venezuela. 117 pp.

**COOPER, G.** 1979. The tools of biochemistry. Chapter 2: Spectrophotometry. Determination of inorganic phosphate. Wiley. Interscience Publication. New York. 423 pp.

**CORDERO, Y; BRICEÑO, Z; ASCENCIO, J.** 2005. Respuestas fisiológicas de *Crotalaria spectabilis* Roth cultivada en solución nutritiva deficiente y suficiente en fósforo. *Anales de Botánica Agrícola.* 12:19-30.

**DINKELAKER, B; V. RÖMHELD; H. MARSCHNER.** 1989. Citric and excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell and Environment.* 12: 285- 292.

**DUFF, S; W. OLAXTON; D. LEFEBVRE.** 1991. Phosphate-starvation response in plant cell: De novo synthesis and degradation of acid phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. Plant Biology.* 88: 9538-9542.

**FERRAROTTO, M.** 2009. Morfología del sistema radical de *Crotalaria juncea* L. (Fabaceae) y su capacidad de solubilización de fósforo en condiciones de suplencia limitada en soluciones nutritivas. Tesis doctoral. Doctorado en Ciencias Agrícolas. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay. 225 pp.

**FISKE, C; Y. SUBBAROW.** 1925. Colorimetric determination of phosphorus. *The J. Biol. Chem.* 66: 375–400.

**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.

**GIBBINS, L., W. NORRIS.** 1962. Phytase and phosphatase in Dwarf Bean, *Phaseolus vulgaris*. *Biochem. J.* 86: 67-71.

**GILBERT, G., J. KNIGHT, C. VANCE, D. ALLAN.** 1999. Acid phosphatase activity in phosphorus-deficient white lupin roots. *Plant, Cell and Environ.* 22: 801–810

**GOLDSTEIN, A., D.BAERTLEIN, R. MCDANIEL.** 1988. Phosphate Starvation Inducible Metabolism in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.*87:711-715.

**HARAN, S; S. LOGENDRA, M. SESKAR, M. BRATANOVA, AND I. RASKIN.** 2000. Characterization of Arabidopsis Acid Phosphatase Promoter and Regulation of Acid Phosphatase Expression. *Plant Physiol.* 124: 615–626

**HAYNES, P.** 1998. Phosphoglycosylation: a new structural class of glycosylation? MINI REVIEW. *Glycobiology.* 8:1-5.

**HEGEMAN, C.** 1999. Isolation and characterization of soybean genes involved in phytic acid metabolism: phytase and l-myo-inositol-1-phosphate synthase. Thesis Doctor of Philosophy in Plant Pathology, Physiology and Weed Science. Blacksburg, Virginia. 157 pp.

**HÜBEL, F; E. BECK.** 1996. Purification, Characterization, and Localization of Enzyme Activity and Its Putative Substrate. *Plant Physiol.*112: 1429-1436

**ILLANES, A.** 2008. Enzyme Biocatalysis Principles and Applications. Capítulo 1. Introduction. 1ra Edición. Springer Science + Business Media B.V. 1-39 pp.

**JOHNSON, J., C. VANCE, D. ALLAN.** 1996. Phosphorus Deficiency in *Lupinus Albus*. Altered lateral Root Development and Enhanced Expression of Phosphoenolpyruvate Carboxylase. *Plant Physiol.* 112: 31-41.

**JUMA, N; M. TABATABAI.** 1988. Hydrolysis of organic phosphates by corn and soybean roots. *Plant and Soil.* 107: 31-38.

**LAMBERS, H; M. SHANE; M. CRAMER; S. PEARSE; E. VENEKLAAS.** 2006. Root Structure and Functioning for Efficient Acquisition of Phosphorus: Matching Morphological and Physiological Traits. *Annals of Botany* 98: 693–713.

**LAMONT, B.** 2003. Structure, ecology and physiology of root clusters – a review. *Plant and Soil* 248: 1–19.

**LEBANSKY, B; T. MCKNIGHT; L. GRIFFING.** 1992. Purification and characterization of a Secreted Purple Phosphatase from Soybean Suspension cultures. *Plant Physiol.* 99: 391-395.

**LEHNINGER, A.** 1995. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2da Edición. Ediciones omega, S.A. Barcelona, España.

**LI, M; T. TADANO.** 1996. Comparison of characteristics of acid phosphatases secreted from roots of Lupin and Tomato. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 42: 753-763.

**LI, M; A. OSAKI; I. M. RAO; T. TADANO.** 1997. Secretion of phytase from the roots of several plants species under phosphorus deficient conditions. *Plant and Soil.* 195: 161-169.

**LUNG, S; A. LEUNG; R. KUANG; Y. WANG; P. LEUNG; B. LIM.** 2008. Phytase activity in tobacco (*Nicotiana tabacum*) root exudates is exhibited by a purple acid phosphatase. *Phytochemistry* 69: 365–373.

**MARSCHNER, H.** 1995. Mineral nutrition of higher plants. London: Academic Press. Second edition. 889pp

**MILLER, S., J. LIU, D. ALLAN, C. MENZHUBER, M. FEDOROVA, C. VANCE.** 2001. Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots phosphorus-stressed white lupin. *Plant physiol.* 127: 594-606.

**MORENO, J.** 1985. Enzimas, teoría y problemas. 2da edición. Ediciones Espasande. Caracas- Venezuela. 189 pp.

**NEUMANN, G.; A. MASSONNEAU; N. LANGLADE; B. DINKELAKER C. HENGELER; V. ROE; E. MARTINOIA.** 2000. Physiological Aspects of Cluster Root Function and Development in Phosphorus-deficient White Lupin (*Lupinus albus* L.). *Annals of Botany* 85: 909-919 pp.

**NEUMANN G; V. RÖMHELD.** Sf. Root-induced changes in the availability of nutrients in the rhizosphere. Disponible [el línea: 25 Junio de 2009] en: <http://www-mykopat.slu.se/Newwebsite/kurser/SUMMER05/READING/Roemheld/NeumannRoemheld1.pdf>

**OZAWA K., M. OSAKI, H. MATSUI, M. HONMA, T. TADANO.** 1995. Purification and properties of acid phosphatase secreted from lupin roots under phosphorus-deficiency conditions. *Soil Sci Plant Nutr.* 41: 461–469.

**PANARA, F., S. PASQUALINI, M. ANTONIELLI.** 1990. Multiple forms of barley root acid phosphatase: purification and some characteristic of major cytoplasmic isoenzyme. *Biochim. et Biophys. Acta.* 1037: 73-80.

**PANT, H; P.WARMAN.** 2000. Enzymatic hydrolysis of soil organic phosphorus by immobilized phosphatases. *Biol. Fertil. Soils* 30:306–311.

**PARRA, C; E. MARTÍNEZ; J. ACOSTA; P. COELLO.** 2004. Respuesta a la deficiencia de fosfato de genotipos de frijol contrastantes en su capacidad de crecer en suelos con bajo contenido de fósforo. *Agrociencia* 38: 131-139.

**PHILLIPPY, B.** 1998. Purification and Catalytic Properties of a Phytase from Scallion (*Allium fistulosum* L.) Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46 (9), pp 3491–3496

**RAO, I.** 2001. Role of physiology in improving crop adaptation to abiotic stresses in the tropics: the case of common bean and tropical forages. CIAT. Chapter 29. In: *Handbook of Plants and crop Physiology*. Second Edition. Marcel Dekker Inc. New York. 997 pp.

**RICHARDSON, A; P. HADOBAS; J. HAYES.** 2000. Acid phosphomonoesterase and Phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. *Plant, Cell and Environment*. 23: 397- 405.

**RICHARDSON, A; P. HADOBAS; J. HAYES.** 2001. Extracellular secretion of *Aspergillus* phytase from *Arabidopsis* roots enables plants to obtain phosphorus from phytate. *The Plant Journal* (2001) 25(6): 641-649.

**STARNES, D., P. PADMANABHAN, S. SAHI.** 2008. Effect of P sources on growth, P accumulation and activities of phytase and acid phosphatases in two cultivars of annual ryegrass (*Lolium multiflorum* L.). *Plant. Physiol. and Biochem.* 46: 580-589.

**TABALDI, L., R. RUPPENTHAL, L. BELMONTE, D. CARGNELUTTI, J. FABBRIN, V. MORSCH, M. CHITOLINA.** 2008. *Ciencia Rural*, Santa Maria. 38: 650-657.

**TADANO, T., H. SAKAI.** 1991. Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus –deficient conditions. *Soil. Sci. Plant. Nutr.* 37: 129-140.

**TARAFDAR, J; CLAASSEN, N.** 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatases produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 5: 308- 312.

**TEROL, J., M. BARGUES, P. CARRASCO, M. PÉREZ-ALONSO, N. PARICIO.** 2002. Molecular Characterization and Evolution of the Protein Phosphatase 2A B' Regulatory Subunit Family in Plants. *Plant Physiology*. 129: 808–822.

**TRULL, M. C., M. J. GUILTMAN, J. P. LYNCH, J. DEIKMAN.** 1997. The responses of wild-type and ABA mutant *Arabidopsis thaliana* plants to phosphorus deficiency. *Plant Cell Environ*. 20: 85-92.

**UEKI, K., S. SATO.** 1977. Regulation of phosphatase synthesis by orthophosphate in cultures tobacco cells. *Plant cell Physiol*. 18: 1253-1263.

**WASAKI, J; S. KOJIMA; H. MARUYAMA; S. HAASE; M. OSAKI; E. KANDELER.** 2008. Localization of acid phosphatase activities in the roots of White lupin plants grown under phosphorus-deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*. 54: 95-102.

**YADAV, B; J TARAFDAR.** 2004. Phytase activity in the Rizosphere of crops, trees and grasses under arid environment. *Journal of Arid Environments*. 58: 285-293.

**YOSHIOKA, I; M. SÁNCHEZ; M. BOLAÑOS.** 2006. Actividad de fosfatasa ácida y alcalina en suelo cultivado con plátano en tres sistemas de manejo. *Agronómica*. 55 (2)

**ZIMMERMAN, P; B. REGIERER, J. KOSSMANN, E. FROSSARD, N. AMRHEIN, M. BUCHER.** 2004. Differential Expression of Three Purple Acid Phosphatases from Potato. *Plant biol*. 6: 519-528

## G. DISCUSIÓN GENERAL

Tal como se observó en el capítulo I, los datos obtenidos para los muestreos de plantas de *Crotalaria juncea* a los 15, 20, 25 y 30 días de edad, señalaron que la deficiencia de fósforo reduce el área foliar (Capítulo I, Cuadro 2, Figura 5) y la acumulación de la biomasa seca (Capítulo I, Figura 7, Cuadro3), las cuales se hacían cada vez más limitantes a medida que aumentaba el tiempo bajo condición – P. Para ambos parámetros, dichas reducciones comenzaron a hacerse evidentes después de los 20 días como respuesta a la deficiencia de fósforo, mostrándose reducciones del 60,5% y 61,3% en el área foliar a los 25 y 30 días de edad respectivamente, así como también en los pesos secos, donde los porcentajes de reducción con relación al testigo +P siempre fueron mayores para el vástago que para la raíz, siendo respectivamente de 52,67 y 21,85% a los 25 días y 61,74 y 50,20% a los 30 días. Lo anterior logró explicarse parcialmente por medio de mediciones en la tasa de fotosíntesis, la cual se vio reducida bajo deficiencia de fósforo desde  $41 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{área foliar} \cdot \text{s}^{-1}$  en +P hasta  $30 \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \text{área foliar} \cdot \text{s}^{-1}$  en –P. Encontrar menores valores de área foliar y acumulación de biomasa es una respuesta común para una gran variedad de plantas reportadas en las cuales se ha evaluado el efecto de la deficiencia de fósforo sobre el crecimiento (Ascencio, 1996; Ascencio y Lazo, 1997; Briceño, 2001; Cordero, 2005, oosterhuis et al., 2008). En este trabajo se observó que las reducciones en el área foliar total también son debidas a una menor cantidad de hojas producidas en –P (Capítulo I, Cuadro 2, Figura 6). Los estudios de crecimiento son importantes porque las reducciones marcadas entre los tratamientos puede ser usado como un criterio para seleccionar el momento para ensayos de actividad enzimática (Ascencio, 1997). Además de esto, en un trabajo anterior, Ascencio (1996) señaló que la actividad de fosfatasa ácida en cajanus y Desmodium se incrementó cuando las plantas sufrieron una disminución entre el 40% y el 90% de sus pesos secos, indicando estrés severo. Lo anteriormente expuesto, no corresponde con los resultados obtenidos en este trabajo, puesto que la mayor liberación y actividad de fosfatasa ácida se observó a los 15 días cuando todavía no existían evidencias visibles de estrés por parte de las plantas (Capítulo II, Figura 24). Si bien es cierto que las respuestas en el crecimiento

son una consecuencia de lo que ocurre internamente en la planta, estos resultados parecen indicar que el momento en el cual se observan síntomas de estrés severo, no necesariamente va de la mano con el momento en que se liberan las enzimas hacia la rizósfera, lo cual confirma lo reportado por Ascencio (1994, 1997) acerca de la importancia que tiene el estudio de actividad como una herramienta de diagnóstico, y también como marcadores fisiológicos de la tolerancia al estrés por fósforo.

Las reducciones en el crecimiento son respuestas que han sido relacionadas con una disminución del fósforo interno o en los tejidos de las plantas (Briceño, 2001), lo cual constituye el suiche que estimula la síntesis, liberación y actividad de las enzimas fosfohidrolasas (Fragoso, 2005).

Aunque en este trabajo no se midió el contenido de Pi soluble en radical, sí se realizaron mediciones del Pi soluble en hojas. Las enormes reducciones del Pi foliar en edades superiores a los 15 días (82,87% a los 20 días, 92,12% a los 25 días y 89,83% a los 30 días) (Capítulo I, Figura 14) parecen indicar retranslocación del mismo desde las hojas hacia las raíces, lo cual podría ser una causa de limitación para la actividad de esta enzima en la secreción radical. Por otro lado, se conoce que el Pi soluble es solo una pequeña parte del fósforo total que es usada para las reacciones metabólicas de las plantas. Puesto que a los 30 días se determinaron reducciones severas del 95,23% en el fósforo total en la planta y de 94,87% en las raíces, por lo que se puede asumir que la misma tendencia se observó para el Pi soluble. Sin embargo, aun bajo estas condiciones, no se logró determinar la inducción de la enzima fosfatasa ácida en la secreción radical, por lo cual también es probable que este hecho no solo dependa del contenido de Pi en la planta, sino también obedezca a una actividad conjunta del Pi con otros señalizadores internos cuya síntesis o actividad es diferencial dependiendo del estado de desarrollo. Por otro lado, puesto que todos los procesos fisiológicos están regulados genéticamente, también es probable que las reducciones de actividad después de los 15 días se deban a una menor producción de la cantidad de proteína enzimática o que aún

generándose la misma cantidad de proteína enzimática, se sintetizan isoenzimas que poseen menor afinidad por el sustrato.

Así mismo, dentro de las respuestas al estrés por fósforo, a los 15 días no solo se observó mayor inducción de actividad fosfatasa ácida, sino que también se hallaron evidencias del inicio de una estimulación en la longitud radical total debida a deficiencia de fósforo en un 11, 91%, la cual se hizo 2.44 veces mayor a los 20 días (Capítulo I, Cuadro 4, Figura 9), con lo cual se manifiesta que bajo condiciones de estrés, las plantas de *Crotalaria juncea* activan respuestas diversas que pueden coexistir en un mismo lapso de tiempo.

Las estrategias activadas ante la deficiencia son variadas, y se manifiestan tanto a nivel morfológico como fisiológico. En nuestro trabajo, además de observar aumento en la longitud radical total hasta los 20 días, durante todas las edades se manifestó un alargamiento de las raíces secundarias superficiales (Figura 8), tal como reportaron Friesen *et al.* (1997) quienes manifestaron que entre el 38 y 42% de las raíces de leguminosas bajo deficiencia de P se encontraron en los primeros 10 cm de un suelo oxisol. En el orden fisiológico, además de la liberación de fosfohidrolasas, la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular también ha sido reportado en varias ocasiones (Dinkelaker *et al.*, 1989; Hoffland *et al.*, 1989; Johnson, 1994; Neumann *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2003). Tal como se observó en las figuras 12 y 13, de este estudio, para plantas de crotalaria hasta los 30 días de edad, no hubo evidencia alguna de la formación de complejos en forma de precipitados blancos en la rizósfera, como los observados por Dinkelaker *et al.* (1989) haciendo uso de *Lupinus Albus*, del mismo modo, las reducciones en el pH de la rizósfera de las plantas estresadas tampoco ocurrieron en gran medida. Por lo anteriormente expuesto, es más probable que la reducción a un aproximado de pH 7,0 en -P en comparación al rango de 8,0-9,0 en +P sea debido a la liberación de protones directamente, y no a la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular.

Pero aún cuando no se logró evidenciar la liberación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular en la rizósfera, el incremento de 9,4 veces en la eficiencia de absorción del Pi (EAP) que mostró crotalaria este trabajo demuestra la importancia que tiene la liberación y actividad de la fosfatasa ácida como estrategia de sobrevivencia ante el estrés, así como también la actuación de otros mecanismos que no fueron estudiados en este trabajo. Así mismo, la eficiencia en el uso interno del fósforo (EUP) también aumentó en gran medida (8.7 veces) bajo condiciones de deficiencia (cuadro 7), tal como consiguió Ascencio (1996) en *Euphorbia, cajanus* y *Ruellia*; así como también García y Ascencio (1992) y Briceño (2001) en tomate, señalándose incrementos hasta de 2.2 veces en plantas crecidas bajo niveles deficientes. Lo señalado aquí confirma lo expresando por Marschneer (1995) y Ascencio y Lazo (2001), quienes afirman que uno de los mecanismos que emplean las plantas para sobrevivir a la deficiencia de Pi, están basados en un buen uso del fósforo interno. Esta característica es importante puesto que por ser hereditaria, podría incluirse en programas de mejoramiento genético.

En los estudios de las enzimas fosfohidrolasas, a pesar de haberse seguido exactamente el protocolo y realizarse varias repeticiones, la actividad fitasa mostró inconsistencia, por lo que para efectos de esta discusión solo se emplearán los resultados para la fosfatasa ácida.

La fosfatasa ácida, tal como se observó en el capítulo II, Figura 30, muestran que esta enzima obtenida a partir de la secreción radical (extracto crudo) bajo condición +P y -P tiene tolerancia diferencial a la temperatura, pero en términos generales posee una gran resistencia al calor, lo cual puede atribuirse a su condición de enzima glicosilada (Bozzo *et al.*, 2002). Bajo condición -P se alcanzó un óptimo de 40°C, a partir del cual comienza a descender, mientras que en el tratamiento +P, la actividad permaneció constante en un rango de 35-50°C, para después aumentar a los 60°. Los valores de temperatura aquí obtenidos corresponden con los reportados para enzimas fosfohidrolasas de otras especies, las cuales se han señalado como enzimas estables por debajo de 60°C, (Li y Tadano, 1996, Hübel y Beck, 1996,

Briceño, 2001). Tal como se señaló en la discusión del capítulo II, a pesar de no se encontrarse reportes de otros investigadores, lo anterior podría estar indicando que bajo condiciones de deficiencia ocurre la inducción de una isoenzima con resistencia diferencial a la temperatura, que aquella que se genera bajo condiciones de suficiencia. Cuando se evaluó el efecto a diferentes rangos de pH, la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical de *Crotalaria juncea* mostró más del 80% de actividad relativa entre el rango de pH 5,5-6,0, con un óptimo en 5,5 (Capítulo II, Figura 31), lo cual coincide con la mayoría de los trabajos realizados con especies diversas (Gibbins y Norris, 1962; Panara *et al.*, 1990; Bozzo *et al.*, 2002; Lung *et al.*, 2008; Tabaldi *et al.*, 2008). Lo anterior sirvió para establecer tiempos de incubación de 30 minutos y pH de 5.0 para así realizar las determinaciones preliminares de las constantes  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ . En base a que este es el primer estudio realizado para la enzima fosfatasa ácida en la secreción radical de crotalaria, para establecer el rango de concentraciones de sustrato a ensayar, no se contó con valores referenciales, por lo cual, para dar inicio a este estudio se estableció ensayar con la serie de concentraciones de sustrato p-NPP que fue de 1 -5 mM, con la cual a pesar de haber realizado dos ensayos, no se ajustó a la cinética típica de Michaelis-Menten. Tal como se señaló en la discusión del capítulo II, esta respuesta pudo ser debida al uso del extracto crudo, donde puede ocurrir la presencia de inhibidores enzimáticos y una mezcla de isoenzimas con valores distintos de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ . Puesto que no se observó saturación de la curva  $v$  vs  $[S]$  (Figuras 32 y 33), los valores de  $V_{m\acute{a}x}$  hallados por medio de las transformaciones pudieran variar, por lo que habría que ensayar con una serie de sustrato más amplia comenzando con concentraciones menores a 1mM p-NPP, y por encima de 5 mM p-NPP, que fue lo utilizado en este estudio.

Tal como señaló Ascencio (1996), el área foliar y los valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de las enzimas secretadas por las raíces, son buenos marcadores de la tolerancia de las plantas al estrés. En nuestro caso, los valores de  $K_m$  obtenidos por medio de las representaciones de Lineweaver Burk, Eadie Hofstee y Wolf, siempre estuvieron por debajo bajo condiciones de deficiencia, lo cual es muy importante puesto que nos da información de que la enzima fosfatasa ácida secretada por las raíces estresadas,

hace un uso más eficiente del fósforo, porque es capaz de trabajar a la mitad de la velocidad máxima con una menor concentración de sustrato, que extrapolado a la vida real sería el fósforo bajo formas orgánicas hallados en el suelo.

En conclusión, la tolerancia de las plantas de *Crotalaria juncea* constituye un síndrome ante el estrés por deficiencia de fósforo, el cual incluye disminuciones en el área foliar y relación del peso seco vástago/raíz, elevada eficiencia en el uso del fósforo (EUP) y absorción del fósforo (EAP), estimulación del alargamiento de aquellas raíces cercanas a la superficie del suelo, mayor longitud radical total hasta los 15 días de edad y secreción de fosfatasa ácida por las raíces en etapas tempranas del crecimiento vegetativo. En este trabajo se reportan por primera vez valores para  $K_m$  (aparente) de la enzima fosfatasa ácida de la secreción radical de *crotalaria juncea*, siendo muy importante que los menores valores de  $K_m$  se observaron bajo condiciones de deficiencia de fósforo en la planta.

## H. CONCLUSIONES

- ✓ La baja suplencia de fósforo ocasionó reducciones en el contenido de fósforo soluble foliar y fósforo total en los tejidos de las plantas, conllevando a disminuciones en la biomasa seca, área foliar y relación del peso seco vástago/raíz que se hacen más evidentes a partir de los 25 días de edad. Bajo estas condiciones, se estimula del alargamiento de raíces cercanas a la superficie del suelo en todas las edades de muestreo, pero la mayor longitud radical total ocurrió solo en los estados más tempranos del crecimiento, haciéndose más acentuada a los 20 días.
- ✓ Los valores de la eficiencia en la absorción del fósforo (EAP) y la eficiencia en el uso del fósforo (EUP) estuvieron muy por encima de los obtenidos en plantas +P.
- ✓ La actividad de la enzima fosfatasa ácida en el extracto crudo de la secreción radical fue mayor bajo condiciones de que de suficiencia de fósforo en la planta, lo cual se demuestra que su actividad se induce bajo esta condición, lo cual es una estrategia de tolerancia a dicho estrés. No se observó la inducción de fitasa.
- ✓ Los valores de  $K_m$  (aparente) de la fosfatasa ácida en la secreción radical obtenida de plantas fueron menores bajo condiciones de deficiencia de fósforo, lo cual es indicativo que la enzima requiere menor concentración de sustrato (P), por lo que trabaja más eficientemente en condiciones de deficiencia de fósforo.

### **Conclusión general:**

**Las plantas de *Crotalaria juncea* bajo las condiciones de este estudio, mostraron estrategias fisiológicas asociadas con el crecimiento de la planta, la morfología radical y la inducción de enzimas fosfatasas ácidas secretadas por las raíces, lo que sugiere que esta especie posee mecanismos que le permiten sobrevivir bajo condiciones de deficiencia de fósforo. Por lo anterior se acepta la hipótesis planteada al inicio de esta investigación.**

# **ANEXOS**

## Anexo 1. ANÁLISIS DE SUELO.

SUELO ESTACIÓN EXPERIMENTAL LA IGUANA, MUNICIPIO SANTA MARIA, ESTADO GUÁRICO. N= 96 MUESTRAS

| Parámetro                                                               | Profundidad (cm)    |                     |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------|
|                                                                         | 0-5                 | 5-15                |
| % Arcilla                                                               | 2,50 (0,38)         | 2,94 (0,09)         |
| % Limo                                                                  | 12,51 (1,15)        | 11,00 (0,98)        |
| % Arena total                                                           | 84,99 (4,16)        | 86,06 (7,35)        |
| ▪ % amf                                                                 | 6,99 (0,32)         | 3,17 (0,89)         |
| ▪ % af                                                                  | 48,91 (5,15)        | 29,05 (2,13)        |
| ▪ % am                                                                  | 25,29 (1,12)        | 44,59 (3,32)        |
| ▪ % ag                                                                  | 3,29 (0,78)         | 7,98 (1,12)         |
| ▪ % amg                                                                 | 0,51 (0,11)         | 1,27 (0,08)         |
| Clase textural                                                          | aF                  | aF                  |
| pH                                                                      | 5,01 (0,18)         | 4,81 (0,25)         |
| Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )            | 27,53 (1,32)        | 23,62 (3,26)        |
| Capacidad de intercambio catiónico ( $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) | 3,06 (0,89)         | 2,30 (0,66)         |
| Materia orgánica ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                      | 1,33 (0,30)         | 1,23 (0,26)         |
| Nitrógeno inorgánico ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                 | 20,36 (7,33)        | 16,28 (3,01)        |
| Nitrógeno total (%)                                                     | 0,039 (0,007)       | 0,031 (0,006)       |
| <b>Fósforo (<math>\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}</math>)</b>              | <b>11,30 (3,26)</b> | <b>10,01 (3,62)</b> |
| Potasio ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                              | 41,95 (8,46)        | 22,26 (7,12)        |
| Calcio ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                               | 57,73 (15,17)       | 45,76 (13,99)       |
| Magnesio ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                             | 35,13 (8,49)        | 32,58 (9,55)        |
| Sodio ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                                | 7,2 (1,25)          | 8,1 (3,18)          |
| Hierro ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                               | 27,84 (8,47)        | 30,52 (7,40)        |
| Cobre ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                                | 0,33 (0,13)         | 0,42 (0,13)         |
| Manganeso ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                            | 5,03 (1,40)         | 2,08 (0,82)         |
| Zinc ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )                                 | 1,27 (0,35)         | 1,31 (0,80)         |

Valores promedio de toda la parcela. Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación Standard.

**Anexo 2.** Resumen de los resultados de la prueba t-Student para las variables área foliar, peso seco de hoja, tallo, raíz y peso seco total de plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo a los 15 días de edad ( $\alpha= 0,05$ ;  $n=9$ ).

| Variable medida    | Valor de t | Probabilidad | Significancia |
|--------------------|------------|--------------|---------------|
| Área foliar        | -1.11      | 0.1451       | n.s           |
| Número de hojas    | -0.84      | 0.3129       | n.s           |
| Peso seco de raíz  | -3.61      | 0.0069       | *             |
| Peso seco de tallo | -1.81      | 0.1077       | n.s           |
| Peso seco hoja     | -0.65      | 0.0728       | n.s           |
| Peso seco total    | 1.27       | 0.0921       | n.s           |
| Relación PSr/PSv   | -5.63      | 0.4111       | n.s           |

\* Diferencias significativas al 5%

n.s: no hay diferencias al 5%

**Anexo 3.** Resumen de los resultados de la prueba t-Student para las variables longitud radical (LR), longitud radical específica (LRE) y superficie radical específica (SER) de plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo a los 15 días de edad ( $\alpha= 0,05$ ;  $n=3$ ).

| Variable medida | Valor de t | Probabilidad | Significancia |
|-----------------|------------|--------------|---------------|
| LR              | 0.53       | 0.4353       | n.s           |
| LRE             | 1.74       | 0.3598       | n.s           |
| SRE             | 1.50       | 0.4533       | n.s           |

\* Diferencias significativas al 5%

n.s: no hay diferencias al 5%

**Anexo 4.** Resumen de los resultados de la prueba t-Student para las variables área foliar, peso seco de hoja, tallo, raíz y peso seco total de plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo a los 20 días de edad ( $\alpha= 0,05$ ;  $n=9$ ).

| Variable medida    | Valor de t | Probabilidad | Significancia |
|--------------------|------------|--------------|---------------|
| Área foliar        | -1.58      | 0.3049       | n.s           |
| Número de hojas    | -2.22      | 0.0491       | *             |
| Peso seco de raíz  | -0.78      | 0.3442       | n.s           |
| Peso seco de tallo | -2.21      | 0.0741       | n.s           |
| Peso seco hoja     | -2.37      | 0.0823       | n.s           |
| Peso seco total    | -2.29      | 0.1841       | n.s           |
| Relación PSr/PSv   | 0.65       | 0.0074       | *             |

\* Diferencias significativas al 5%

n.s: no hay diferencias al 5%

**Anexo 5.** Resumen de los resultados de la prueba t-Student para las variables longitud radical (LR), longitud radical específica (LRE) y superficie radical específica (SRE) de plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo a los 20 días de edad ( $\alpha= 0,05$ ;  $n=3$ ).

| Variable medida | Valor de t | Probabilidad | Significancia |
|-----------------|------------|--------------|---------------|
| LR              | 4.63       | 0.0275       | *             |
| LRE             | 2.70       | 0.1698       | n.s           |
| SRE             | 1.28       | 0.2508       | n.s           |

\* Diferencias significativas al 5%

n.s: no hay diferencias al 5%

**Anexo 6.** Resumen de los resultados de la prueba t-Student para las variables área foliar, peso seco de hoja, tallo, raíz y peso seco total de plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo a los 25 días de edad ( $\alpha= 0,05$ ;  $n=9$ ).

| Variable medida    | Valor de t | Probabilidad | Significancia |
|--------------------|------------|--------------|---------------|
| Área foliar        | -7.89      | 0.0353       | *             |
| Número de hojas    | -5.15      | 0.3234       | n.s           |
| Peso seco de raíz  | -4.43      | 0.3980       | n.s           |
| Peso seco de tallo | -7.03      | 0.0792       | n.s           |
| Peso seco hoja     | -7.81      | 0.2064       | n.s           |
| Peso seco total    | -5.93      | 0.2504       | n.s           |
| Relación PSv/PSr   | -6.46      | 0.4377       | n.s           |

\* Diferencias significativas al 5%

n.s: no hay diferencias al 5%

**Anexo 7.** Resumen de los resultados de la prueba t-Student para las variables longitud radical (LR), longitud radical específica (LRE) y superficie radical específica (SRE) de plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo a los 25 días de edad ( $\alpha= 0,05$ ;  $n=3$ ).

| Variable medida | Valor de t | Probabilidad | Significancia |
|-----------------|------------|--------------|---------------|
| LR              | -1.16      | 0.1801       | n.s           |
| LRE             | -0.62      | 0.4775       | n.s           |
| SRE             | -0.99      | 0.3518       | n.s           |

\* Diferencias significativas al 5%

n.s: no hay diferencias al 5%

**Anexo 8.** Resumen de los resultados de la prueba t-Student para las variables área foliar, peso seco de hoja, tallo, raíz y peso seco total de plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo a los 30 días de edad ( $\alpha= 0,05$ ;  $n=9$ ).

| Variable medida    | Valor de t | Probabilidad | Significancia |
|--------------------|------------|--------------|---------------|
| Área foliar        | -5.08      | 0.0000       | *             |
| Número de hojas    | -3.72      | 0.0004       | *             |
| Peso seco de raíz  | -4.89      | 0.0004       | *             |
| Peso seco de tallo | -4.82      | 0.0000       | *             |
| Peso seco hoja     | -7.44      | 0.0004       | *             |
| Peso seco total    | -5.52      | 0.0001       | *             |
| Relación PSv/PSr   | -2.70      | 0.0520       | n.s           |

\* Diferencias significativas al 5%

n.s: no hay diferencias al 5%

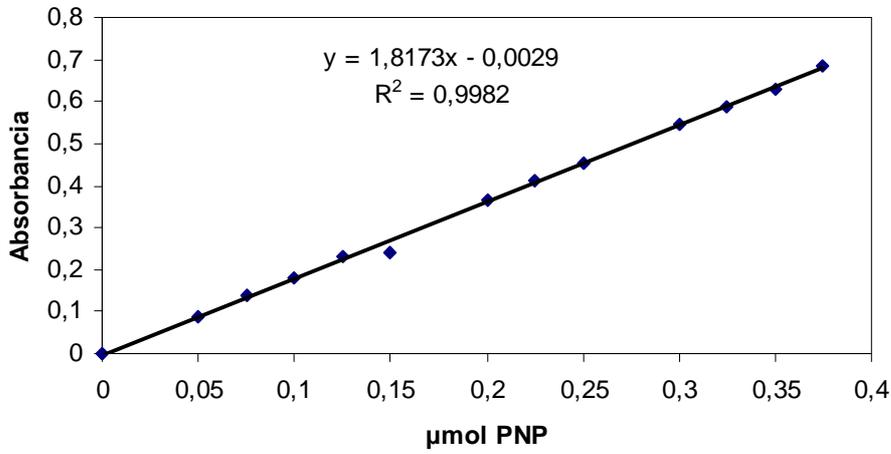
**Anexo 9.** Resumen de los resultados de la prueba t-Student para las variables longitud radical (LR), longitud radical específica (LRE) y superficie radical específica (SRE) de plantas de *Crotalaria juncea* bajo condiciones de suficiencia y deficiencia de fósforo a los 30 días de edad ( $\alpha= 0,05$ ;  $n=3$ ).

| Variable medida | Valor de t | Probabilidad | Significancia |
|-----------------|------------|--------------|---------------|
| LR              | -0.60      | 0.0189       | *             |
| LRE             | -0.28      | 0.2901       | n.s           |
| SRE             | -0.61      | 0.3002       | n.s           |

\* Diferencias significativas al 5%

n.s: no hay diferencias al 5%

**Anexo 10. Curva patón de Paranitofenol (PNP)**



**Anexo 11. Curvas patrones de Pi**

