



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**MOVILIZACION DE FOSFATOY RECAMBIO DE RNA EN LA
GERMINACION DE FRIJOLES SENSIBLES Y TOLERANTES
A DEFICIENCIA DE FOSFORO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
JUAN CARLOS RIVERA SANCHEZ



MEXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Jurado Asignado:

Presidente Prof. JORGE MANUEL VAZQUEZ RAMOS
Vocal Prof. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES
Secretario Prof. JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
1er. Suplente Prof. FRANCISCO RUIZ TERAN
2do. Suplente Prof. ALFREDO SALAZAR ZAZUETA

Trabajo realizado en la Facultad de Química. UNAM, Div. de Estudios de Postgrado, Departamento de Bioquímica, Conjunto "E", Edificio de Bioquímica y Farmacia. Laboratorio 115.

Financiado por: PAPIIT-DGAPA-UNAM-IN201105

Asesor del Tema:



ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

Sustentante:



JUAN CARLOS RIVERA SÁNCHEZ

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reserchional.

NOMBRE: Juan Carlos Rivera Sánchez

FECHA: 25/03/04

FIRMA: 

*¿Ayuda realmente el imaginar que existe
alguna explicación plena, objetiva y
verdadera de la naturaleza,
y que la medida apropiada de la
investigación científica es la elongación
con que nos acercamos cada vez más a esa
meta final?*

T.S. JUHN

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a **Dios**, por el hecho de haberme permitido llegar con bien hasta el fin de la carrera.

Agradezco la enorme ayuda que me ha brindado el **Dr. Rogelio Rodríguez**, en la realización de este trabajo y sobre todo por la enorme paciencia que me tuvo en todo el desarrollo del presente trabajo.

A todos los miembros del jurado, les agradezco enormemente el tiempo y los acertados comentarios, al presente trabajo.

A los compañeros del laboratorio 115, que me soportaron el tiempo que me tarde en desarrollar y terminar este trabajo, así como los del 114, los cuales siempre me orientaron en las dudas que me surgieron en todo este tiempo.

Quiero agradecer especialmente a **Ernesto Navarro** por soportarme en toda la carrera, y especialmente por brindarme su Amistad.

DEDICATORIA

Dedico éste trabajo a mis padres, en especial a mi **mamá** por su lucha para que finalmente llegara éste momento. A mí **papá** le agradezco el haberme apoyado en la decisión de tomar éste camino.

Dedico especialmente el presente trabajo a **Lizbeth** por toda la paciencia, la confianza y la motivación que me concedió para que finalmente llegara hasta el final, y por permitirme ser parte de su vida.

Te Adoro.

RESUMEN

La deficiencia de fosfato (Pi) es uno de los factores nutricionales que limitan más el crecimiento de las plantas y, consecuentemente la productividad de los cultivos, ya que el fósforo juega un papel fisiológico y bioquímico central, al participar en la formación de ésteres y anhídridos del ácido fosfórico, en un gran rango de componentes celulares.

En respuesta, los agrónomos fitomejoradores han desarrollado variedades más eficientes en el uso del Pi, para varios cultivares. Entre ellos están las variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris*), una especie de gran importancia alimentaria para nuestro país.

La mayor parte de los estudios sobre la fisiología del Pi se han enfocado a los mecanismos de los que las plantas disponen para asimilar mejor y movilizar más fosfato del suelo, pero otros mecanismos como el recambio de macromoléculas fosforiladas no han sido explorados con igual detalle, por lo que en el presente trabajo, se estudiaron varios aspectos fisiológicos y bioquímicos en cinco variedades de semillas de frijol que han demostrado diferente habilidad para crecer en condiciones de carencia de Pi.

Se encontró que no existe diferencia significativa en el contenido de Pi total en las semillas, ya que dicho compuesto no es movilizado por completo del cotiledón, en el periodo post-germinativo temprano.

Así también se observó que el contenido de sulfato en las semillas es semejante, pero al momento de movilizarse sí se observaron diferencias, lo que comprueba que existe relación entre el metabolismo de azufre y el de fósforo.

En el caso de la cuantificación de fósforo en los lípidos se observó que existen diferencias en su contenido en las variedades analizadas, sin embargo dichas diferencias no correlacionaron claramente con la tolerancia a la deficiencia al fósforo.

Finalmente la cuantificación de la velocidad de biosíntesis y degradación de RNA total en plántulas recién etioladas, reflejó que al existir una deficiencia de Pi las variedades 22, 40 y 42 reflejan un mejor balance entre su biosíntesis y degradación de RNA, lo que podría indicar que estas variedades cuentan con un metabolismo mejor adaptado a condiciones de bajo Pi y concuerda con su habilidad para tolerar mejor la deficiencia.

En contraste, las variedades PV y especialmente la Canario, presentan una biosíntesis de RNA muy lenta pero una degradación semejante a la de otras variedades estudiadas. Lamentablemente con los datos obtenidos hasta este momento, no es posible aún proponer un mecanismo concreto que relacione las diferencias observadas con la tolerancia a la deficiencia, pero el presente trabajo abre la puerta a futuras investigaciones.

CONTENIDO

1. Abreviaturas	3
2. Introducción.....	4
3. Antecedentes	10
3.1 Relevancia Bioquímica del Fósforo en los Seres Vivos.....	10
3.1.1 Los Fosfolípidos y su Importancia en las Células	10
3.1.2 Composición de los Ácidos Nucleicos y su Importancia	12
3.1.3 El Fósforo y su Participación en las Moléculas de Alta Energía	14
3.1.4 El Fósforo y su Participación en la Regulación de la Actividad Enzimática y de la Expresión Génica.	16
3.2 La forma de Dispersión Reproductiva en las Plantas Superiores	17
3.2.1 Las Semillas de Frijol Común <i>Phaseolus vulgaris</i>	18
3.2.1.1 Origen de la Especie y su Domesticación	18
3.2.1.2 Fisiología y Morfología de la Semilla de Frijol Común <i>Phaseolus vulgaris</i> en Relación con la Domesticación.....	19
3.2.1.3 El Almacenamiento del Fósforo en las Semillas	20
3.3 El Suelo y los Nutrientes	21
3.3.1 Macronutrientes Limitantes para el Crecimiento	21
3.3.2 Química del Fósforo en el Suelo	22
3.3.3 Dinámica de las Fuentes de Fósforo en el Suelo	25
3.4 Las Plantas y el Suelo	26
3.4.1 Fisiología de la Nutrición Mineral	26
3.4.2 Aspectos Ecofisiológicos de la Nutrición Mineral	27
3.4.2.1 Anatomía de las Raíces	27
3.4.2.2 Asociación entre Raíces y Microorganismos para Adquirir Fósforo del Suelo	28
3.4.2.3 Modificaciones Estructurales de las Raíces	28
3.4.2.3 Transportadores de Fosfato	29
3.4.2.4 Secreción de Ácidos Orgánicos por las Raíces, un Sistema de Adquisición de Fosfato	31
3.4.2.5 Importancia de las Fosfatasa en la Adquisición de Fosfato	32
3.4.2.6 La Expresión de Genes, una Estrategia en la Deficiencia de Fosfato.	32
3.5 Adaptaciones Metabólicas	33
4. Justificación	36
5. Hipótesis	38
6. Objetivos	39
6.1 Objetivo General	39
6.2 Objetivos Particulares	39
7. Materiales y Métodos	40
7.1 Materiales.....	40
7.1.1 Material Biológico	40
7.2 Métodos	41
7.2.1 Germinación de las Semillas	41
7.2.2 Cuantificación de Fosfato	41
7.2.3 Calcificación de la Materia Orgánica a Minerales Solubles	42
7.2.4 Medición del Contenido de Fósforo en los Materiales Biológicos Investigados	42
7.2.4.1 Cuantificación de Fosfato Inorgánico en Semilla Seca	42
7.2.4.2 Cuantificación de Fosfato Total en Semilla Seca.....	43
7.2.4.3 Cuantificación de Fosfato Total en Semilla Germinada	43
7.2.4.4 Cuantificación de Fosfato Total en Lípidos en Semilla Seca y Germinada.....	43
7.2.5 Cuantificación de Sulfato.	44
7.2.5.1 Medición del Contenido de Azufre en los Materiales Biológicos Investigados	45

7.2.5.2 Cuantificación de Sulfato Total en Semilla Seca	45
7.2.5.3 Cuantificación de Sulfato Total en Semilla Germinada	45
7.2.5.4 Cuantificación de Sulfato Total en Lípidos en Semilla Seca y Germinada	46
7.2.6 Análisis de las Clases de Lípidos	46
7.2.7 Marcaje del RNA Total "in vivo"	46
7.2.7.1 Extracción del RNA y Cuantificación de la Uridina Incorporada en Macromoléculas.	47
7.2.7.2 Cuantificación de la Estabilidad del RNA "in vivo"	48
7.2.7.3 Ajuste de los Datos de Acumulación y Degradación de RNA a un Modelo Exponencial.	48
.....	48
8. Resultados	50
8.1 Fosfato en Semilla Seca	50
8.2 Fosfato en Lípidos en Semilla Seca	52
8.3 Fosfato en las Plántulas Etioladas a los 7 Días.....	53
8.4 Peso de los Tejidos de las Plántulas Etioladas a los 7 Días.....	56
8.5 Fosfato en Lípidos en las Plántula Etioladas a los 7 Días.....	57
8.6 Sulfato Total y en Lípidos en Semilla Seca y Plántulas Etioladas	58
8.10 Clases de Lípidos	60
8.11 Recambio de RNA en las Semillas Germinadas.....	61
9. Discusión	67
11. Bibliografía	71
12. Anexos	75
12.1 Anexo 1	75
12.2 Anexo 2	79
12.3 Anexo 3	80

1. ABREVIATURAS

P	Fósforo
Pi	Fosfato
PA	ácido fítico (mioinositol; [1,2,3,4,5,6] hexakisfosfato)
HEPES	Ácido (N-[2-hidroxietyl-piperizin-N'-]2-etanosulfónico)
TRIS	tris (hidroximetil) aminometano
EDTA	etilendiaminotetraacetato
SDS	duodecil sulfato de sodio
TCA	ácido tricloroacético.
NADH	Nicotinamida-adenin-dinucleótido
NADH	Nicotinamida-adenin-dinucleótido fosfato
ATP	Trifosfato de adenosina
GTP	Trifosfato de guanosina
FAD	Flavín dinucleótido

2. INTRODUCCIÓN

Todas las formas de vida, desde los microorganismos más primitivos, hasta los eucariontes pluricelulares más evolucionados, tienen en común un requerimiento nutricional de ciertos minerales para llevar a cabo su crecimiento y funciones normales.

Las plantas se distinguen de los organismos llamados heterótrofos, en que pueden aprovechar la energía lumínica para satisfacer sus necesidades energéticas y poseen todas las habilidades metabólicas para crecer con base únicamente en nutrientes minerales, privilegio que comparten sólo con ciertos grupos de bacterias (Doetsch & Cook, 1973).

Los requerimientos nutricionales de las plantas incluyen, además del dióxido de carbono que toman de la atmósfera, del hidrógeno y oxígeno presentes en el agua, cuatro macronutrientes y varios micronutrientes. Los primeros son Nitrógeno (N), Fósforo (P), Azufre (S) y Potasio (K), mientras que los segundos incluyen magnesio (Mg), Calcio (Ca), Zinc (Zn), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Molibdeno (Mo), Boro (B), Cobre (Cu), Cobalto (Co) y Cloro (Cl). Para satisfacer sus requerimientos de macronutrientes, las plantas absorben del suelo a través de sus raíces diversos minerales como Nitratos, Nitritos y Amonio, que son fuente de N, fosfato inorgánico (Pi) que es fuente de P y Sulfato (SO_4^{2-}) como fuente de S. En contraste, la mayoría de los otros elementos son asimilados en forma de sus respectivos iones, quizá con excepción del B y el Mo. Aunque todos los elementos antes mencionados son importantes para la vida, algunos juegan un papel determinante, ya que son requeridos en mayor cantidad. Por otro lado, algunos elementos son más abundantes que otros y se encuentran en la naturaleza en forma más fácil de asimilar (Kochian, 2000).

Dados estos factores, la experiencia agrícola de la humanidad y diversos estudios han aportado evidencias muy claras de que el N y el P son los dos elementos cuya disponibilidad limita, en mayor medida, el crecimiento de las plantas (Raghothama, 2001).

En la gran mayoría de los organismos, el P se encuentra únicamente en forma de Pi, ya sea libre, o como ester o diester orgánico formando parte de las macromoléculas centrales de la vida como son: ácidos nucleicos, fosfolípidos, nucleótidos relacionados con el manejo de la energía como el ATP, el GTP, el FAD, el NAD y el NADP, además de participar en la regulación de la actividad de muchas enzimas de diversas vías metabólicas y otras proteínas, incluyendo muchas de las relacionadas con la regulación de la expresión génica. (Theodorou & Plaxton, 1993).

La disponibilidad de Pi es uno de los factores nutricionales que limitan más la productividad de los cultivos (Raghothama, 2001), porque el Pi biodisponible en el suelo suele ser escaso, a pesar de que la cantidad de P en el suelo puede llegar a ser alta. En suelos con alta cantidad de materia orgánica el fósforo orgánico (P-org) puede representar entre el 20 y 80 % del P que se encuentra en el suelo y debe ser mineralizado para ser asimilable para las plantas (Raghothama, 1999 y Junk et al, 1993). La concentración de Pi asimilable por las plantas en el suelo es de aproximadamente 10 μM , razón por la cual las plantas tienen que generar estrategias para tomarlo de manera óptima y mecanismos para satisfacer sus necesidades fisiológicas con la cantidad asimilada de este macronutriente (Junk et al, 1993). En los sistemas agrícolas para tratar de solucionar este problema de baja disponibilidad, se ha intensificado el uso de fertilizantes, pero lamentablemente si se superpone un mapa de los suelos pobres en Pi con el mapa de los sitios en los que la productividad agrícola es alta, se observaría una coincidencia de gran preocupación, ya que

se ha observado que el uso indiscriminado de fertilizantes incrementa sólo hasta cierto límite la productividad de los cultivos y mucho fertilizante se desperdicia (Horst et al, 2001).

Aunado a estos problemas, los yacimientos con minerales ricos en Pi, que se explotan en la producción de fertilizantes como el Superfosfato de Calcio Triple, son pocos en el mundo y las reservas comprobadas que contiene se agotarán en tan sólo unas décadas (Abelson, 1999). Finalmente, el del consumo de alimentos en un planeta sobrepoblado exige el aumento de la capacidad de la producción agrícola, la cual no es ilimitada y, eventualmente, la demanda puede llegar a superar la producción (Maddison, 1988).

En virtud de todo lo anterior, la comprensión de los procesos bioquímicos que determinan la productividad de las plantas cultivables es del máximo interés, no sólo científico sino también económico. Por ende, hacen falta estudios más detallados acerca de las estrategias que permitan entender los mecanismos que las plantas usan para contrarrestar la deficiencia de Pi en los suelos, ya que un mejor conocimiento de dichos mecanismos nos llevará a desarrollar estrategias agrícolas y tecnológicas para mejorar la producción de los cultivos, haciendo un uso óptimo de los fertilizantes. A la fecha, los agrónomos fitomejoradores han seleccionado algunas variedades cultivables como el maíz, soya, trigo, cebada y frijol; que son cultivares de importancia económica por su alto consumo, que se ha observado que aprovechan más eficientemente el Pi que tienen disponible. El frijol, *Phaseolus vulgaris* es una de las especies para las que el mejoramiento cobra gran valor; por un lado, su semilla es de gran importancia alimentaria en nuestro país (Miranda, 1991), y por otro, se trata de un cultivo poco tolerante a la deficiencia de Pi, que se cultiva en numerosos suelos pobres de México y que puede contender con la deficiencia de nitrógeno sin fertilizantes químicos, gracias a su capacidad para establecer asociación con

bacterias simbióticas capaces de fijar nitrógeno atmosférico. De hecho, el empleo de los llamados biofertilizantes (*Rhizobium etli*), se ha visto como una gran alternativa para la agricultura mexicana, puesto que el nitrógeno fijado puede ser, ya como nitrógeno orgánico, aprovechado también por otros cultivares que se planten en el mismo campo de cultivo, ya sea simultáneamente, o bien, en ciclos agrícolas sucesivos, pero esta estrategia no resuelve el problema del fósforo.

El frijol se cultiva extensamente en el territorio nacional con variedades adaptadas tanto a regiones templadas como tropicales. Diversos estudios históricos y arqueológicos han aportado numerosos datos acerca del consumo de maíz y frijol en Mesoamérica y Norteamérica, que abarcan desde el periodo precolombino hasta nuestros días, lo que convierte a la agricultura nacional en una conocedora experta del cultivo y cuidado de estas semillas (Miranda, 1991).

Los registros estadísticos gubernamentales muestran que en 1996, la producción nacional de frijol colocaba a México como cuarto lugar a nivel mundial, después de la India, Brasil y China. Lamentablemente, la demanda nacional ha superado la producción y esta semilla se ha importado del Brasil en cantidades importantes, desde ese año y hasta la fecha (INEGI, 1998-2003). Los programas establecidos para fortalecer la producción nacional de frijol y maíz por parte del Gobierno Federal en los sexenios anteriores y el actual, no han permitido superar a la demanda nacional (SAGARPA, 1997-2003).

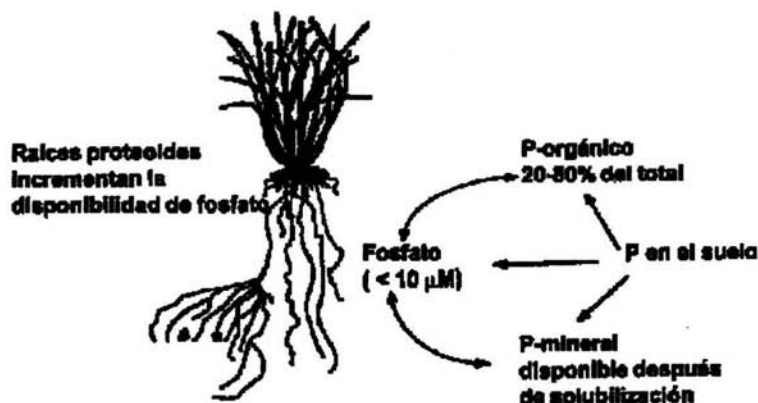
Comparativamente, en el mismo periodo y a nivel nacional, el uso y la producción de fertilizantes nitrogenados y fosfatados se ha mantenido en un nivel constante (INEGI, 1997-2003), lo que refleja una baja en la disponibilidad y aprovechamiento de dichos agroquímicos.

Como es natural, la primera línea de ataque a los mecanismos mediante los cuales la planta hace más disponible y asimila el Pi del suelo, incluye respuestas bioquímicas, fisiológicas y adaptaciones morfológicas (Raghothama, 2001).

Se ha demostrado que cuando las plantas se someten a inanición de Pi, éstas evocan respuestas fisiológicas que les permiten emplear el Pi asimilado más eficientemente, de manera que pueden desarrollarse y reproducirse mejor con menor cantidad de este macroelemento (Plaxton, 1996). Entre las adaptaciones morfológicas destaca principalmente el incremento de la raíz, con lo cual se logra tener más superficie de contacto con el suelo (Lynch, 1997), lo que se acompaña de respuestas fisiológicas y bioquímicas como la expresión de transportadores de alta y baja afinidad por Pi, en las células de la raíz y pelos radiculares (Raghothama, 1999; Lenburg & O'Shea, 1996), además de un aumento en la disponibilidad del Pi del suelo, promovida por exudados radiculares con ácidos orgánicos, para disolver sales insolubles de Pi (Marschner, 1995) y fosfatasas diversas, para la degradar el P-orgánico a Pi (Barret et al, 1998; vease figura 2.1). Algunas líneas de investigación se han enfocado en la identificación de genes característicos de plantas con tolerancia al bajo Pi, con la intención de usar dichos genes para transformar plantas que necesitan grandes cantidades de Pi para poder desarrollarse (Raghothama, 1999). Muchas de estas investigaciones se han centrado en clonar y estudiar la expresión de los genes para las fosfatasas, o los transportadores de Pi, que son parte importante de la fisiología del Pi en las plantas (Lenburg & O'Shea, 1996).

A pesar de los esfuerzos anteriores, no se puede disponer de más P que el que está presente en el suelo y, si éste no es suficiente, la planta tendrá que buscar la manera de desarrollarse y reproducirse con lo que se encuentre disponible.

En este sentido, se ha encontrado que bajo inanición de P_i , algunas especies responden expresando enzimas capaces de emplear pirofosfato como sustrato rico en energía en varias reacciones metabólicas (Plaxton, 1996).



Mecanismos por los cuales las plantas adquieren fósforo del suelo.

Figura 2.1 Esquema que resume las fuentes más importantes de P_i disponible para su movilización y asimilación desde el suelo hacia la planta (Tomado de Coello, 2001)

Por otro lado, se ha encontrado que expresan ciertas fosfatasa intracelulares específicas que promueven la liberación de P_i de ciertos compuestos fosforilados (Podestá & Plaxton, 1994a). Finalmente, se han identificado algunos mecanismos para sustituir al menos una fracción de fosfolípidos por sulfolípidos en los cloroplastos (Essigmann, 1998).

Por lo tanto, es viable suponer que las plantas podrían tener mecanismos adicionales para hacer un uso más eficiente del P_i asimilado, lo que indica que se requieren más estudios para identificarlos.

3. ANTECEDENTES

3.1 RELEVANCIA BIOQUÍMICA DEL FÓSFORO EN LOS SERES VIVOS

Todos los seres vivos están formados por moléculas orgánicas que están formadas por sólo seis elementos de naturaleza no metálica: oxígeno (O), carbono (C), hidrógeno (H), nitrógeno (N), azufre (S) y fósforo (P).

El P en su estado oxidado forma fácilmente anhídridos poliméricos, así como mono y diésteres de fosfato en las sustancias orgánicas, siendo así componente estructural de los fosfolípidos, ácido nucleicos y moléculas intermediarias en el manejo de energía, protagonista en procesos de regulación y en el metabolismo intermediario, así como también es regulador de la actividad de una gran cantidad de proteínas.

3.1.1 LOS FOSFOLÍPIDOS Y SU IMPORTANCIA EN LAS CÉLULAS

El término lípido (del griego lípos, “grasa”) se refiere a cualquier sustancia apolar natural.

Los lípidos se clasifican en simples y compuestos.

Los lípidos simples son moléculas hidrocarbonadas de diversa complejidad, incluyendo, alcoholes, ácidos grasos, esfingoides y esteroides. (Morrison & Boyd, 1990).

Por otro lado, los lípidos complejos son combinaciones de uno a más ácidos grasos con alcoholes como el glicerol (acilglicéridos), con los alcoholes grasos (ceras), o con las bases esfingoides (esfingolípidos).

A su vez, estos esqueletos básicos pueden encontrarse modificados (Figura 3.1) con glúcidos (glucolípidos), o con ésteres de fosfato (fosfolípidos), que generalmente incluyen también bases tales como la serina (fosfatidilcolina), la etanolamina (fosfatidiletanolamina), la colina (fosfatidilcolina), o bien, una segunda molécula de glicerol (fosfatidilgliceroles).

De entre estos compuestos, los fosfolípidos son los más importantes, puesto que son un componente estructural fundamental de las membranas celulares de prácticamente todos los organismos vivos. En términos generales, las principales funciones de los fosfolípidos en las plantas superiores son:

- i) Servir como componentes estructurales de membrana.
- ii) Representan un cierto componente del almacenamiento de energía y carbono.
- iii) Son parte de los mecanismos de transferencia de electrones.
- iv) Proporcionan protección frente a factores físicos y químicos.
- v) Funciones de señalización de (ej. Ácido fosfatídico).

En la plantas, la biosíntesis de fosfolípidos involucra una regulación compleja y muy estricta en la que participan los cloroplastos y otros plastidios, en donde se sintetizan los ácidos grasos, y los sistemas de membranas plastidiales, mitocondriales y del retículo endoplásmico, en donde se sintetizan los distintos tipos de fosfolípidos. Los ácidos grasos recién sintetizados en los plastidios, pueden ser incorporados directamente a ácido fosfatídico en los cloroplastos, los cuales son precursores inmediatos de los fosfolípidos denominados de tipo procariótico, o exportados al citoplasma como ésteres de CoA, en donde sirven de sustrato para la síntesis de fosfolípidos denominados de tipo eucariótico lo que ocurre en el retículo endoplásmico.

El ácido fosfatídico en el cloroplasto es usado en la síntesis de diversos fosfolípidos de tipo procariótico y pueden además ser enviados al retículo endoplásmico para su posterior modificación (Somerville, 2000).

Fosfolipido	Estructura
Fosfatidilcolina (PC) (lecitina)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOC}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{CHOO}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH} \\ \parallel \quad \\ (\text{CH}_3)_3\text{NCH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array} $
Fosfatidiletanolamina (PE) (cefalina)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOC}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{CHOO}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH} \\ \parallel \quad \\ \text{NCH}_2\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array} $
Fosfatidilglicerol (PG)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOC}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{CHOOC}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH} \\ \\ \text{CH}_2\text{OOC}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH} \end{array} $
Fosfatidilserina (PS)	$ \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OOC}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH} \\ \\ \text{O} \quad \text{O} \quad \text{CHOO}-\text{CH}_2(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH} \\ \parallel \quad \\ \text{NH}_4^+\text{COOCH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{CH}_2 \\ \\ \text{O} \end{array} $

Figura 3.1. Los fosfoglicéridos más comunes en las células vegetales.

3.1.2 COMPOSICIÓN DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS Y SU IMPORTANCIA

En toda célula hay moléculas formadas por polímeros naturales y entre ellos, los conocidas como ácidos nucleicos, son centrales en la existencia de la vida, por ser las depositarias de la información genética hereditaria de las células.

Los ácidos nucleicos se encuentran presentes en todo organismo vivo, el ácido ribonucleico (RNA) y el ácido desoxirribonucleico (DNA) son polímeros integrados por unidades monoméricas llamadas nucleótidos (figura 3.2).

Cada nucleótido está formado por tres partes químicas: un grupo fosfato, un azúcar sencillo de 5 carbonos (ribosa o desoxirribosa) y una base nitrogenada (purina o pirimidina).

Las secuencia de bases nitrogenadas son lo que determina el contenido informacional del DNA o RNA.

Las bases que se observan en los polinucleótidos son las purinas adenina y guanina y las pirimidinas citosina, timina y uracilo (Morrison & Boyd, 1990; Sugiura & Tekeda, 2000).

EL DNA es el almacén de la información hederitaria del organismo su **replicación** ocurre durante la fase llamada "S" del ciclo celular, previo a la división celular. Fragmentos de dicha información, llamados genes se encuentran señalados por secuencias definidas llamadas promotores y sirven para la síntesis de moléculas de RNA, es decir para la **transcripción** de los genes. Los RNAs son casi siempre de una sola cadena polinucleotídica, están presentes en todos los tipos de células y se dividen en grupos llamados mensajeros (mRNA), RNA de transferencia (tRNA) y RNA ribosomal (rRNA).

Los tres tipos son estructuras de una sola cadena transcritas a partir de un molde de DNA, pero una vez formadas, los tres tipos de RNA participan en el proceso final de la expresión genética, en el que la información es interpretada en forma secuencial de aminoácidos, *i.e.* proteínas, proceso que se conoce como **traducción** (Sugiera & Tekeda, 2000). Aún la para la traducción se requiere de abundante fosfato, tanto para la provisión de energía, como para la regulación del proceso.

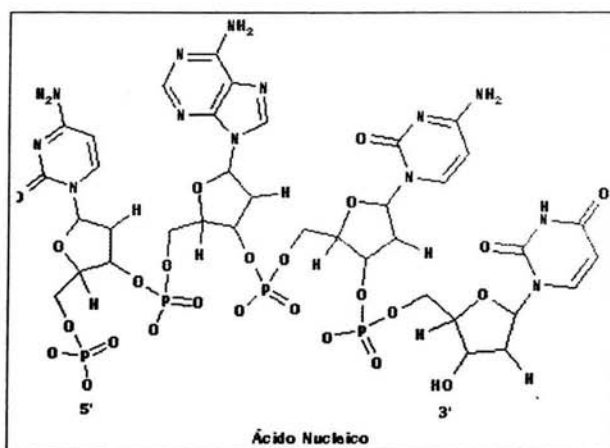


Figura 3.2. Estructura química de una cadena de ácido desoxirribonucleico

3.1.3 EL FÓSFORO Y SU PARTICIPACIÓN EN LAS MOLÉCULAS DE ALTA ENERGÍA

En las células, su funcionalidad se sustenta en reacciones químicas y compuestos químicos, por lo que la conversión de energía a su forma química es de gran importancia. Gran parte de las moléculas intermediarias involucradas en el manejo de la energía son moléculas fosforiladas. Las reacciones redox que llevan a la oxidación de compuestos reducidos (como los carbohidratos o los ácidos grasos) generan electrones de alto potencial atrapados en moléculas intermediarias fosforiladas como el NAD(P)H, y el FADH₂ (Figura 3.3).

La energía almacenada en el NAD(P)H puede ser empleada directamente por la célula como equivalentes de reducción o ser canalizada hacia la formación de un gradiente electroquímico transmembranal.

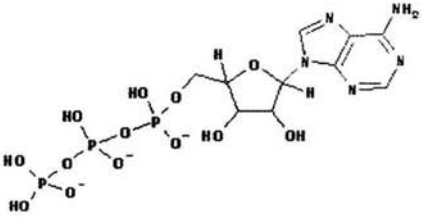
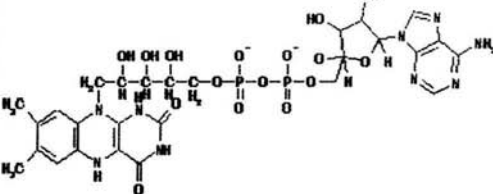
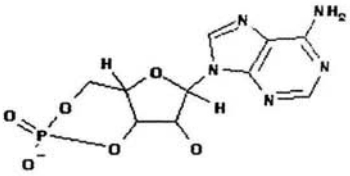
Molécula Fosforilada	Estructura
Trifosfato de adenosina (ATP)	
FADH ₂	
3',5'-AMPc	

Figura 3.3. Las moléculas fosforiladas más comunes en las células vegetales

El gradiente electroquímico puede servir para impulsar procesos de transporte a través de las membranas, o bien para la condensación de ácido fosfórico en anhídridos tales como los difosfatos y trifosfatos de nucleótidos (principalmente ATP, GTP, pero también otros como pirofosfato, TTP, CTP, UTP, ITP, etc). Todos estos compuestos fosforilados permiten la activación de muchas de las moléculas del metabolismo intermediario a través de la fosforilación de las mismas, al tiempo que proporcionan a la célula fosfatos disponibles para la síntesis de macromoléculas fosforiladas, o también para la fosforilación de proteínas que tiene casi siempre propósitos regulatorios (Siedow & Day, 2000).

3.1.4 EL FÓSFORO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA Y DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.

La necesidad de ensamblar una determinada proteína depende de las presiones del medio, de las fuentes de nutrientes y de los fenómenos vinculados a la multiplicación y crecimiento de las células, o a su diferenciación y a su interacción con otras células.

Por ello, la regulación de la expresión génica constituye un aspecto fundamental del mantenimiento de las diferencias estructurales y funciones que definen la vida y en el que cada gene se expresa y luego se silencia en forma oportuna (Sprenmulli, 2000). Durante su biosíntesis existen al menos cuatro etapas de regulación que determinan la cantidad de proteína:

- i) Síntesis de transcrito primario del RNA,
- ii) Procesamiento postranscripcional del mRNA,
- iii) Degradación del mRNA,
- iv) Lectura del mensaje para la síntesis proteica,

Y una vez sintetizada, su actividad, está sujeta a otros puntos de control como son:

- i) Modificación postraducciona de proteínas y
- ii) Degradación de la proteína.

Existen en el metabolismo celular miles de reacciones enzimáticas y de procesos de reconocimiento intermolecular específico y ambos son mediados por proteínas, incluida la interacción proteína-proteína.

Muchas de las proteínas encargadas de tales reacciones son susceptibles de fosforilación y desfosforilación, como método para inducir cambios en su comportamiento tendientes a regular su actividad.

Pero además, muchas proteínas responden con cambios en su actividad frente a las variaciones intracelulares de las concentraciones de ATP, GTP, AMP, ADP y otras moléculas fosforiladas. Los niveles de estos efectores, llamados alostéricos, forman también parte de los sistemas regulatorios de la células y en ellos aparece nuevamente la participación del fosfato (Sprenmulli, 2000).

3.2 LA FORMA DE DISPERSIÓN REPRODUCTIVA EN LAS PLANTAS SUPERIORES

Las plantas que evolucionaron más recientemente son las angiospermas, que en la actualidad son las plantas más abundantes sobre la tierra. Las angiospermas se caracterizan por tener estructuras reproductoras especializadas llamadas flores, en las cuales ocurre la reproducción sexual y se desarrolla el embrión que junto con otras estructuras asociadas se conocen como semilla. En las angiospermas el embrión posee una cantidad importante de reservas nutritivas acumuladas en tejidos extraembrionarios, principalmente el llamado endospermo.

Pero en algunas, las reservas pueden acumularse en tejidos embrionarios especializados llamados cotiledones, la presencia de uno o dos cotiledones ha sido la base para la separación de las angiospermas en dos grandes clases: las monocotiledóneas y las dicotiledóneas (Curtis, 2000). Además de las diferencias anatómicas, las semillas monocotiledóneas se caracterizan por acumular reservas tanto en el cotiledón como en el endospermo en tanto que en las dicotiledóneas el endospermo es digerido a medida que el embrión crece y las reservas se transfieren hacia los cotiledones carnosos.

El desarrollo final de las semillas de las angiospermas termina con el desarrollo de la cubierta de la semilla, la cual se desarrolla de la capa o las capas más externas del óvulo, en tanto que la flor se transforma en un envoltorio para las semillas que es lo que llamamos fruto. En las llamadas semillas ortodoxas, que incluyen a la mayoría de los cultivos de importancia económica, la maduración de la semilla culmina con la desecación que lleva a un estado de quiescencia, en el que las semillas secas permanecen inactivas por largos periodos, pero son capaces de germinar estimuladas por la absorción de agua y oxígeno, bajo condiciones ambientales adecuadas (Curtis, 2000).

En este trabajo, se eligió como modelo el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) que es una dicotiledónea, con semillas ortodoxas y frutos dehicentes, lo que quiere decir que los frutos maduros se abren y liberan las semillas cuando están todavía unidas a la planta materna (Curtis, 2000).

3.2.1 LAS SEMILLAS DE FRIJOL COMÚN *Phaseolus vulgaris*

3.2.1.1 ORIGEN DE LA ESPECIE Y SU DOMESTICACIÓN

El género *Phaseolus* pertenece a la familia Leguminosae, subfamilia Papilionoideae, tribu *Phaseolus* y subtribu *Phaseolinae*. Las investigaciones consideran que las especies que pertenecen al género *Phaseolus* podrían contener alrededor de 150 especies.

En México y Mesoamérica se conocen cerca de 50 especies, originarias de esta región, entre las que destacan: *Phaseolus vulgaris* L., el frijol común (vease figura 3.3); *Phaseolus coccinues* L., el frijol ayocote o “runner bean”; *Phaseolus lunatus* L. y *Phaseolus acutifolius* Gray (Miranda, 1991).

Phaseolus vulgaris es la especie más importante en la alimentación en México. Los centros de origen del frijol se han propuesto en la zona localizada entre las partes occidental y sur de México, en Guatemala y en Honduras (Miranda, 1991).

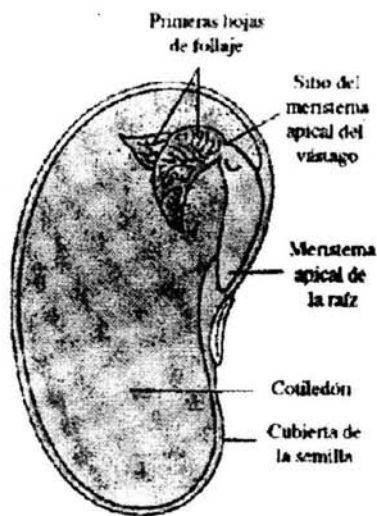


Figura 3.4
Corte Longitudinal de la semilla de Frijol común. Las partes que lo constituyen se presentan postgerminación: Hojas, Vástago y Radícula.
(Tomado de Curtis, 2000)

3.2.1.2 FISIOLÓGÍA Y MORFOLOGÍA DE LA SEMILLA DE FRIJOL COMÚN *Phaseolus vulgaris* EN RELACIÓN CON LA DOMESTICACIÓN.

La diversidad genética de las especies ha aumentado enormemente con la domesticación, ya que en las variedades cultivadas se han establecido numerosos caracteres que no son comunes en las variedades silvestres (Miranda, 1991). A continuación se citan algunas características de ésta especie, en su variedad silvestre y cultivada (tabla 1).

Tabla 1 Características Morfológicas y Fisiológicas del Frijol Común *Phaseolus vulgaris* y su relación con la domesticación.

Características	Variedad Silvestre	Variedad Cultivada
Ciclo Vegetativo	Anual, alrededor de 6 meses	De tres a nueve meses
Habito de Crecimiento	Crecimiento trepador	De trepador hasta mata
Tamaño de partes vegetativas entrenudos por inflorescencia	Tallos menores a 3 m 10 aproximadamente	Tallos mayores a 3 m Entre 1 y 10
Flores	Menos de 10	Más de 10
Vainas	Longitud superior a 20 cm. Mayor anchura Mayor grosor Mayor fibrosidad Se abren con la semilla seca	Longitud entre 4 y 20 cm. Menor anchura Menor grosor Menor fibrosidad Se abren aún inmaduras.
Semillas Longitud: 4 a 20 mm Ancho: 3 a 12 mm Grosor: 2 a 11 mm	Pequeñas Forma arriñonada Testa muy gruesa	Grandes Forma ovoide Testa delgada
Fotoperiodo	Adaptadas a día corto	Adaptadas a día neutro o largo
Habilidad para competir por luz, humedad y nutrimentos con la maleza	Bien adaptadas	Pobremente adaptadas
Resistencia a plagas y parásitos	Mayor resistencia	Menor resistencia

3.2.1.3 EL ALMACENAMIENTO DEL FÓSFORO EN LAS SEMILLAS

El Fósforo (P) es el macromineral encontrado en mayores cantidades en las semillas de todos los cereales y se encuentra en forma de ácido fitico (PA). El principal papel del PA es el de almacenar P e inositol para su uso posterior durante la de germinación y desarrollo de la planta (Othón 2001). En trigo, arroz y maíz, aproximadamente el 80% del P está en la capa de aleurona en forma de gránulos de fitina que son las sales combinadas de K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} del PA (Bewley & Black, 1994).

La síntesis de PA consiste en un proceso de fosforilación del inositol que se lleva a cabo en los tejidos en donde va a ser almacenado y nunca en el endospermo.

La evidencia indica que la síntesis de fitina se lleva a cabo en la cisterna del retículo endoplásmico con el movimiento del desarrollo de los cuerpos proteicos.

Las fitasas son las enzimas encargadas de la hidrólisis del PA, estas enzimas dan como producto de hidrólisis diversos fosfoinosítidos y fosfato inorgánico (Pi). Diversas fosfatasa completan la hidrólisis del PA para liberar al inositol, que es utilizado principalmente en la síntesis de paredes celulares y fosfoinosítidos, además de liberar el Pi para proveer de este mineral a las células (Murray, 1984).

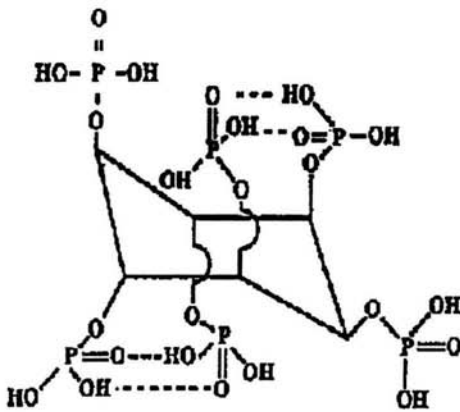


Figura 3.5
Estructura química del Ácido Fítico o Inositol hexakis fosfato.
(Tomado de Othón, 2001)

3.3 EL SUELO Y LOS NUTRIENTES

3.3.1 MACRONUTRIENTES LIMITANTES PARA EL CRECIMIENTO

Las plantas requieren únicamente nutrientes de naturaleza inorgánica para completar su ciclo de vida. Un macronutriente puede constituir típicamente entre el 0.3 y el 6.0 % del peso seco de una planta, en tanto que los micronutrientes se encuentran en cantidades menores a una parte por mil y muchos de ellos alcanzan escasamente una parte por millón (Curtis, 2000).

De entre los macronutrientes, son el N y el P los que más limitan el crecimiento de los cultivos (Schachtman et al, 1998). El N en su forma más abundante es un gas inerte (N_2) que constituye el 78% de la atmósfera terrestre; aunque esta forma no es asimilable para la mayoría de las plantas, muchas especies de leguminosas, como el frijol común y la soya, pueden establecer relaciones simbióticas con bacterias del género *Rhizobium*, que les facilitan la fijación del nitrógeno atmosférico (Vitousek et al, 1997).

Por otra parte, el P es relativamente abundante en la corteza terrestre, pero la mayoría del mismo se encuentra en forma de sales de muy escasa solubilidad. Además, el poco P que resulta soluble es con frecuencia lavado por las lluvias y arrastrado hacia el mar, en donde precipita como sales de calcio que se depositan en el fondo de los océanos (Schachtman et al., 1998).

3.3.2 QUÍMICA DEL FÓSFORO EN EL SUELO

Como el nitrógeno, el fósforo es un miembro de la familia 5A y en muchos aspectos la química del fósforo se parece a la del nitrógeno. El fósforo se encuentra sobre la naturaleza como rocas fosfóricas, que son fundamentalmente ortofosfato de tricalcio, $Ca_3(PO_4)_2$, y fluorapatita, $Ca_5(PO_4)_3F$ (Holford, 1997). Todo el P existente en la naturaleza procede de la descomposición de la llamada roca madre que se encuentra en los yacimientos de fosfatos.

Dichos yacimientos tienen su origen más probable en el fondo del mar, en donde se depositan los restos de organismos marinos formando capas de fosfatos calizos que se levantaron mediante movimientos tectónicos y, posteriormente, se lavaron de los carbonatos más solubles, quedando únicamente los fosfatos (Fuentes, 1989).

El P inorgánico comprende numerosos compuestos, que pueden clasificarse en dos grupos:

i) los fosfato de calcio, que son predominantes y

ii) los fosfatos de hierro y aluminio.

Los fosfatos monocálcico y bicálcico son solubles y asimilables, por lo que tienen mayor importancia desde el punto de vista agrícola. Pero están en menor cantidad y se vuelven fácilmente insolubles. El fosfato tricálcico es insoluble y, por tanto, no asimilable por las plantas (Fuentes, 1989).

Los fosfatos de hierro y aluminio son insolubles y muy estables, si toda esa reserva estuviese a disposición de las plantas, habría cantidades suficientes para satisfacer las necesidades de los cultivos durante muchos años, sin necesidad de hacer aportaciones (Fuentes, 1989).

Además de los minerales inorgánicos de P, el suelo contiene un 20 al 60% del llamado P orgánico que procede de los restos vegetales y animales y se acumula en las capas superficiales. La descomposición del P orgánico y su transformación en inorgánico depende de ciertas especies de bacterias, hongos y actinomicetos. Al igual que el nitrógeno, el P orgánico tienen sus ciclos de mineralización e inmovilización (Holford, 1997).

Las plantas sólo pueden asimilar el P bajo las formas de iones ortofosfatos monovalente (H_2PO_4^-) y divalente (HPO_4^{2-}), los que están presentes en las disoluciones del suelo en baja concentración, siendo su absorción proporcional a la concentración de iones en la disolución.

La solubilidad de estos dos iones depende fundamentalmente de la modificación del equilibrio dinámico existente entre las formas soluble e insoluble, siendo el pH del suelo el factor que condiciona esa modificación del equilibrio y su disponibilidad (Fuentes, 1989).

Con pH bajo aumenta la solubilidad del H_2PO_4^- , como éste es el que se absorbe con mayor facilidad, las plantas absorberían mayor cantidad de P con pH bajo, si no hubiera otros condicionantes.

Sin embargo, a medida que aumenta la acidez se incrementa la solubilidad de los hidróxidos de Ca, Fe, Al y Mg (Fuentes, 1989), dando cationes que pasan a la disolución y reaccionan con el H_2PO_4^- dando compuestos insolubles, en los que el P queda en estado no asimilable. Cuando el pH es muy bajo, la mayor parte de H_2PO_4^- se sale de la disolución, quedando muy poco P a disposición de las plantas.

Por otra parte, a pH alcalino el (H_2PO_4^-) reacciona con los hidróxidos de Fe y Al generando fosfatos hidroxilados insolubles. En una primera fase el (H_2PO_4^-) queda absorbido al hidróxido coloidal y posteriormente reacciona con él. En el suelo existen grandes cantidades de hidróxidos de Fe y Al, lo que origina que cantidades importantes de P soluble queden atrapadas en formas insolubles (Fuentes, 1989).

En general, los suelos alcalinos suelen contener gran cantidad de calcio intercambiable y, a veces, también carbonato de calcio capaces de insolubilizar el P_i . Si a estos suelos se aportan fertilizantes fosfatados los compuestos solubles de P reaccionan con la cal o el carbonato de calcio, dando productos insolubles.

En los suelos moderadamente ácidos los iones H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} contenidos en la disolución del suelo son absorbidos por las arcillas silíceas mediante dos procedimientos: reemplazo de aniones OH^- por aniones fosfato e intercambio de cationes Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} , que hacen de puentes de unión entre la arcilla y el anión fosfato.

Aún cuando existan en el suelo iones de P_i absorbidos, estos están disponibles para las plantas, ya que pueden pasar fácilmente a la disolución del suelo.

Sin embargo, bajo condiciones de baja humedad los iones libres o adsorbidos pueden quedar indisponibles para las plantas, atrapados entre capas de arcillas. La hidratación de estas arcillas, al separar las capas, puede producir la liberación de los iones P_i atrapados (Fuentes, 1989).

3.3.3 DINÁMICA DE LAS FUENTES DE FÓSFORO EN EL SUELO

El P que existe en el suelo llega a él de las siguientes fuentes:

- i) Los minerales del suelo,
- ii) La materia orgánica procedente de residuos animales y vegetales, y
- iii) Los abonos fosfóricos.

De estas fuentes, la adición de abonos fosfóricos es la más significativa en la agricultura intensiva. La materia prima que se utiliza para la fabricación de fertilizantes fosforados es el P natural o fosforita, mineral de muy baja solubilidad, cuyos yacimientos más importantes están en Marruecos, Túnez, Estados Unidos y Rusia. Uno de los fertilizantes fosfatados más empleados actualmente es el superfosfato triple que tiene 45% de P_2O_5 , lo que le da una solubilidad del 90% en agua y el resto es soluble en citrato (Fuentes, 1989).

A su vez, el P se pierde del suelo por las siguientes causas:

- i) Extracción por las plantas,
- ii) Arrastre por el exceso de agua que pasa a capas profundas,
- iii) Erosión de las capas superficiales con las que se pierde también al P asimilable que contienen.

Estas pérdidas pueden ser de bastante consideración en muchos casos (Fuentes, 1989).

3.4 LAS PLANTAS Y EL SUELO

3.4.1 FISIOLOGÍA DE LA NUTRICIÓN MINERAL

Además del agua y del dióxido de carbono que dan lugar a los azúcares ricos en energía a través de la fotosíntesis, las células vegetales requieren elementos químicos diferentes que se encuentran principalmente en el suelo en forma mineral y que son asimilados casi siempre en forma de iones (Curtis, 2000).

Las células de la epidermis y del parénquima cortical de la raíz, controlan la entrada de los iones, ya que las membranas de estas células disponen de sistemas de transporte capaces de seleccionar los iones presentes en la solución del suelo, permitiendo la entrada de unos y restringiendo la de otros. Estudios recientes indican que no menos de tres tipos distintos de proteínas transportadoras parecen estar involucradas en la entrada de iones al interior de las células de la raíz (Curtis, 2000). La existencia de mecanismos múltiples de transporte y la expresión regulada de los mismos permite a las plantas responder apropiadamente a un amplio espectro de condiciones del suelo que puede encontrar una semilla tras su germinación, la entrada de iones al citoplasma de las células periféricas de la raíz es sólo el primer paso de una larga cadena de procesos de transporte que, finalmente, permitirán la nutrición de los órganos aéreos.

Los iones minerales cumplen numerosas funciones en las células, comenzando por el balance de agua. Dado que el potencial osmótico es determinado por el número de partículas de solutos en solución, más que por su identidad química específica, varios tipos de iones pueden tomar parte en la regulación del balance osmótico de la planta. De manera paralela, el balance de cargas en el interior de las células vegetales, es influenciado de manera importante por los iones inorgánicos (Curtis, 2000).

3.4.2 ASPECTOS ECOFISIOLÓGICOS DE LA NUTRICIÓN MINERAL

La nutrición del P es única y la disponibilidad del P_i es uno de los factores más determinantes del crecimiento de las plantas y de la salud de un ecosistema natural.

Por ser un componente fundamental de las células, especialmente del material genético y su expresión, así como de las membranas biológicas, no puede haber división celular en ausencia de fósforo y, en consecuencia, las plantas han evolucionado varias estrategias para satisfacer sus necesidades de P. Dentro de estas estrategias las raíces exhiben una impresionante plasticidad en respuesta a la baja actividad de P y pueden modificar sus estructuras y funciones celulares (Kochian, 2000).

3.4.2.1 ANATOMÍA DE LAS RAÍCES

Las raíces son estructuras especializadas que fijan la planta al suelo e incorporan agua y minerales esenciales. La raíz embrionaria o radícula es la primera estructura que rompe la cubierta seminal y se elonga rápidamente. La epidermis, es la capa concéntrica interna de la raíz que cubre la totalidad de la superficie protegiendo los tejidos internos, la cual desarrolla las extensiones tubulares finas conocidas como pelos radiculares que fácilmente absorben agua y minerales del suelo. El parénquima de la raíz contiene plastidios especializados en el almacenamiento de nutrientes y en el metabolismo secundario, resultando ricas en almidón y otras sustancias orgánicas. El crecimiento de las raíces necesita de una gran inversión de energía, la cual, durante la germinación y el crecimiento temprano, es provista por la degradación de los nutrimentos movilizados desde los cotiledones (Curtis, 2000).

3.4.2.2 ASOCIACIÓN ENTRE RAÍCES Y MICROORGANISMOS PARA ADQUIRIR FÓSFORO DEL SUELO

Una de los aspectos ecológicos del crecimiento vegetal que han sido bastante estudiados es la de la asociación de las raíces con diversos microorganismos, particularmente hongos saprófitos. Los efectos benéficos de esta asociación con las plantas han sido bien documentados y, probablemente, el beneficio más importante ha sido el incremento de la toma de nutrientes de baja disponibilidad como es el Pi del suelo (Kochian, 2000).

La asociación entre los microorganismos y las raíces de las plantas se da a través de un envoltorio de las raíces llamado vesícula-arbuscular-micótica (VAM). La VAM es muy abundante y coloniza las raíces de un gran rango de especies de plantas en todo tipo de suelos. Forman una extensa red en el suelo y dentro del tejido de la raíz, en íntima asociación con el citoplasma, sin penetrar por completo las células de las raíces de la planta. La VAM se caracteriza por la formación de intrusiones toscas dentro de la corteza de los tejidos de las raíces que son los sitios de cambio de solutos entre los hongos y la planta. La VAM incrementa la captación de Pi del suelo gracias a una exploración minuciosa del suelo y a exudados que solubilizan activamente diversas fuentes de Pi, a cambio, el hongo recibe nutrientes orgánicos de la planta que soportan su crecimiento (Kochian, 2000).

3.4.2.3 MODIFICACIONES ESTRUCTURALES DE LAS RAÍCES

El sistema de raíces en las plantas varía tanto dentro de una misma especie de plantas, como entre especies. Este sistema se caracteriza por una gran adaptabilidad al medio ambiente, por lo que el crecimiento de las plantas y sus raíces es muy heterogéneo.

Los cambios en la arquitectura radicular y el incremento en la proporción raíz / tallo están entre las respuestas mejor estudiadas a las condiciones de bajo Pi.

Un sistema altamente ramificado y desarrollado es más eficiente en la toma de Pi, lo que sugiere que la arquitectura de la raíz es un factor notablemente importante para la adquisición de Pi del suelo. La deficiencia de fósforo en el suelo estimula el crecimiento de raíces llamadas proteoides, que ayudan a una mejor exploración del suelo en la búsqueda de P (Lynch, 1995).

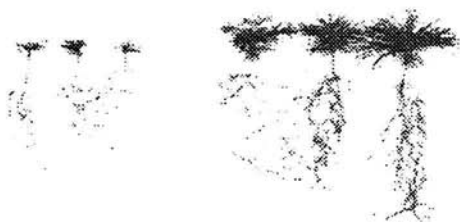


Figura 3.6
Variación en la arquitectura de las raíces de las dicotiledóneas.
(Tomado de Curtis, 2000)

3.4.2.3 TRANSPORTADORES DE FOSFATO

En base a los estudios de la fisiología de las plantas, realizados en los años de 1970 y 1980, algunas investigaciones propusieron que el Pi en las raíces es absorbido como otros aniones minerales de importancia, es decir NO_3^- y SO_4^{2-} , mediante un cotransporte de H^+ . Las evidencias que apoyan esta idea se resumen a continuación:

El Pi es tomado en las raíces a menudo acompañado de una alcalinización del medio externo, por medio de un transporte $\text{H}^+:\text{H}_2\text{PO}_4^-$ con un flujo estequiométrico de 2 y 4 H^+ por cada Pi y se ha observado que el Pi es tomado cuando hay una reducción del pH en la disolución de toma.

Las medidas de electrofisiología del Pi en las raíces han mostrado que el flujo se presenta con un proceso de despolarización seguido de una repolarización (Kochian, 2000), lo cual es consistente con la operación de un cotransporte de H⁺-Pi que conlleva a la despolarización por acidificación del citoplasma. Lo acidez estimula las H⁺ATPasas para producir los procesos subsecuentes de repolarización (Kochian, 2000).

En estudios que emplearon microelectrodos de pH o colorantes fluorescentes sensibles al pH se ha demostrado la acidificación del citoplasma que acompaña a la toma de Pi, al tiempo que los ensayos de absorción de radioisótopos como el ³²P por las raíces han permitido estimar que, para tomar 1 mol de Pi dentro de las células de la raíz, se emplean de 25 a 40 KJ, es decir la misma energía derivada de la hidrólisis de 1 mol de ATP (Kochian, 2000).

La cinética del sistema de toma de Pi en plantas completas y en cultivos de células ha permitido identificar un transporte de alta afinidad que opera en el rango micromolar de Pi, así como un transporte de baja afinidad que opera a altas concentraciones en rangos milimolares.

Estos dos sistemas de transportes se presentan en cultivos de células de *Catharantus roseus*, en las que el sistema de baja afinidad se expresa de manera constitutiva, pero en las células cultivadas sin Pi se expresa una actividad significativa del componente de alta afinidad (Liu et al, 1998). Los resultados anteriores sugieren que la disponibilidad de Pi es capaz de regular la expresión del componente de alta afinidad. Aunque el mecanismo de percepción de tal señal no ha sido aún claramente dilucidado (Raghothama, 2000; Wykoff, 1999) hay claras evidencias de que esta influencia reguladora incide en la expresión de los genes y sobre la actividad de los transportadores existentes (Raghotama, 2000; Kichian, 2000).

Se ha logrado identificar un gran número de genes que codifican para transportadores de Pi, en *Arabidopsis thaliana* existen 9 genes que codifican para transportadores de alta afinidad, lo que debe ser el reflejo de una compleja serie de mecanismos de respuesta asociados a la imperiosa necesidad de asegurar la adquisición de Pi por la planta (Raghotama, 1999).

3.4.2.4 SECRECIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS POR LAS RAÍCES, UN SISTEMA DE ADQUISICIÓN DE FOSFATO

Otra interesante estrategia de adquisición de P que se ha investigado recientemente es la proliferación de raíces con habilidad para exudar ácidos orgánicos, lo que les permite movilizar el Pi que se encuentra presente en el suelo (Kochian, 2000). Una de las especies en las que esta respuesta ha sido mejor caracterizada es *Lupinus albus*. En esta planta, en suelos alcalinos bajos en Pi, se presenta una proliferación de raíces laterales secundarias o terciarias con habilidad de secretar ácidos orgánicos que solubilizan el Pi de los abundantes complejos de Ca-Pi, Al-Pi y Fe-Pi. *Lupinus albus* puede secretar hasta el 25% de su carbono en forma de ácidos orgánicos al suelo, lo que demuestra que la necesidad de Pi sobrepasa a la economía energética y de captación de carbono de la planta (Kochian, 2000). En estudios detallados de la bioquímica del metabolismo del C en respuesta a la deficiencia de fósforo, se ha observado que las raíces presentan cambios en el ciclo del ácido cítrico que se explican por cambios en la abundancia de los mRNA y la actividad de las enzimas asociadas al ciclo de ácido cítrico (Kochian, 2000). Entre ellas, la clásica enzima anaplerótica de las células vegetales, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) responde al estrés de P con incrementos en su actividad para soportar la elevación en la síntesis de malato y citrato que puede ser entonces exudados por las raíces.

Simultáneamente, la actividad específica de las enzimas del ciclo del ácido cítrico, la citrato sintasa y malato deshidrogenasa se elevan también en respuesta a la deficiencia de Pi en el suelo (Kochian, 2000).

3.4.2.5 IMPOTANCIA DE LAS FOSFATASAS EN LA ADQUISICIÓN DE FOSFATO

Otra respuesta más al estrés de P es la secreción de fosfatasa por las raíces. Las plantas sintetizan una gran variedad de fosfatasa en respuesta al déficit de Pi en el suelo, las cuales se clasifican como alcalinas y ácidas, según su pH óptimo de actividad.

Las fosfatasa permiten la movilización de P que se encuentra en forma orgánica, el cual no es directamente asimilable y que puede representar hasta un 30-80% del fosfato presente en el suelo. La actividad de las fosfatasa alcalinas es selectiva por ciertos sustratos, mientras que las fosfatasa ácidas son capaces de hidrolizar un espectro de compuestos fosforilados más amplios.

Las fosfatasa ácidas pueden actuar sobre suelos ácidos hidrolizando en una gran cantidad de complejos fosfatados, liberando Pi aprovechable para las plantas (Kochian, 2000; Barret et al, 1998).

3.4.2.6 LA EXPRESIÓN DE GENES, UNA ESTRATEGIA EN LA DIFICIENCIA DE FOSFATO.

Las técnicas de biología molecular han permitido ampliar nuestra comprensión de la regulación genética en muchos aspectos y la adquisición de nutrientes por las plantas no es la excepción.

Muchas de las investigaciones en plantas se han beneficiado por los tempranos descubrimientos en microorganismos, como son las levaduras, ya que en dichos microorganismos ha sido posible obtener mutantes que facilitan la clonación y expresión de genes que juegan un papel crítico en diversos procesos, incluida la adquisición de Pi. Estos estudios sirven de base para la búsqueda de genes homólogos en modelos vegetales (Kochian, 2000)..

En la levadura *Saccharomyces cereviceae* la adquisición de Pi está controlada por el regulón PHO. La expresión de genes que codifican para proteínas como fosfatasas y transportadores de fosfato en la levadura está controlado a nivel transcripcional por una cascada de proteínas que actúan como reguladores positivos y negativos. El control de dichos genes involucra a proteínas asociadas a membranas, proteínas cinasas y factores de transcripción, los que a su vez regulan la expresión de las proteínas tendientes a mejorar la adquisición de Pi (Kochian, 2000; Oshima, 1982). Desafortunadamente, muchos de los aspectos regulatorios correspondientes no han sido elucidados con el mismo detalle en las plantas y se requieren aún muchos más estudios.

3.5 ADAPTACIONES METABÓLICAS

Dado el importante papel del P en la bioquímica de los seres vivos, no es de sorprender que cuando las plantas son sometidas a limitación de P, además de mecanismos para mejorar la captación, estos organismos desarrollen también estrategias metabólicas para usar de manera optima sus reservas de P. Algunas de las estrategias que se han explorado se describen en este apartado.

A pesar de la habilidad fotosintética, la glucólisis es una de las principales vías metabólicas de generación de energía en las células vegetales, tanto en las hojas durante los periodos de oscuridad, como en todos los tejidos no fotosintéticos y durante la germinación, antes del establecimiento de la autotrofia. Esta vía está presente tanto en el citoplasma como en el estroma de los plastidios (los cuales son organelos celulares similares a los cloroplastos, pero que desarrollan un aparato fotosintético) y juega un papel importante en la generación de esqueletos carbonados para la biosíntesis y en la producción de ATP. El grupo de (Plaxton, 1996) ha demostrado que ante el déficit de Pi, el paso glucolítico de fosfoenolpiruvato a piruvato catalizado por la piruvato cinasa puede ocurrir por una vía alternativa que no requiere ADP y que es catalizado por la fosfoenolpiruvato carboxilasa y la malato deshidrogenasa para generar malato (Plaxton 1996), que puede ser metabolizado dentro de la mitocondria; alternativamente, la expresión de una fosfatasa vacuolar con especificidad para fosfoenolpiruvato podría también generar piruvato y liberar el fosfato (Plaxton, 1966).

La glicólisis citosólica de las células vegetales posee también una ruta alternativa para la fosforilación de fructosa-6-fosfato en la que el pirofosfato es un donador de energía, esta ruta podría ser de particular importancia cuando el fosfato es limitante o bajo condiciones de anoxia (Davies, 1993). Una estrategia que se identificó recientemente es la habilidad de la planta *Arabidopsis thaliana* para reducir el contenido de fosfolípidos de la membrana tilakoidal, dentro de los cloroplastos, con una elevación del contenidos de otras clases de lípidos, tales como gluco y, muy importantemente, sulfolípidos en la membrana tilacoidal de los cloroplastos, en respuesta a la carencia severa de P, tal cambio en la composición se acompaña de una expresión incrementada de la enzima sulfoquinovosil diacilglicerol transferasa (Essigmann, 1998).

El Azufre (S) es un elemento del grupo 6A, que constituye el 0.06% de la corteza terrestre en masa, se puede encontrar en la naturaleza en su forma elemental en depósitos sedimentarios o en yeso $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, así como en diversos sulfuros como FeS_2 , H_2S , SO_2 y otros. En su forma reducida, el S se presenta en las células como la cisteína y la metionina, así como en un gran número de metabolitos esenciales derivados de estos dos aminoácidos. En su estado oxidado el S se encuentra como SO_4^{2-} , el cual es abundante en el suelo y las plantas pueden asimilarlo por medio de transportadores específicos, de la misma forma que pueden asimilar dióxido de azufre a través de las hojas.

El sulfato inorgánico es químicamente muy estable requiere de su activación como una anhidrido mixto (Adenosín fosfosulfato) que es un intermediario en la reducción del SO_4^{2-} a S^{2-} , para su incorporación en aminoácidos. En su forma oxidada activada, el sulfato puede directamente incorporarse a diversos lípidos y carbohidratos, muchos de los cuales juegan papeles estructurales en células vegetales (Crawford et al 2000).

Hasta el momento, no se ha explorado si el sulfato pudiese reemplazar al fosfato en otras biomoléculas cuando existe limitación de P, pero, en virtud de lo descrito en los párrafos anteriores, tal posibilidad no puede descartarse.

4. JUSTIFICACIÓN

El P es uno de los macronutrientes cuya disponibilidad limita el crecimiento las plantas debido a que forma parte principal de las macromoléculas centrales de la vida. Su baja disponibilidad en el suelo hace que las plantas lo aprovechen insatisfactoriamente, debido a se encuentra en formas no asimilables. Las estrategias agrícolas para tratar de aliviar la baja disponibilidad de Pi se han basado mayoritariamente en el uso intensivo de fertilizantes fosfatados, lo que, lamentablemente, no ha resuelto por completo la baja productividad de los cultivos, pero si ha consumido las reservas de P y contaminado los ríos, mares y mantos freáticos.

La investigación de las estrategias y los mecanismos que las plantas han desarrollado para contrarrestar la deficiencia Pi, especialmente la realizada con especies de importancia agrícola y económica, como es el caso del frijol (*Phaseolus vulgaris*), puede conducir a la identificación de mecanismos bioquímicos y fisiológicos de tolerancia y adaptación a la limitación de P, que permitan el desarrollo de sistemas agrícolas de mayor sustentabilidad. En el presente estudio se consideraran una serie de semillas de frijol de variedades que previamente habían sido clasificadas de acuerdo por su grado de tolerancia a la escasez de Pi. En esta semillas se explorara la posibilidad de encontrar deferencias en el contenido de Pi almacenado, modificaciones en la rapidez y extensión del uso de tales reservas, así como alteraciones en la movilización de azufre que pudieran correlacionar con una menor requerimiento de fósforo, para finalmente, explorar si el recambio de una biomolécula fosforilada de gran importancia y presente en abundancia significativa, como es el RNA, correlaciona con la habilidad de las variedades durante la germinación y el crecimiento temprano.

Lo anterior puede contribuir a entender como las plantas logran crecer con menor disponibilidad de fósforo, lo que a más largo plazo podrá redundar en el desarrollo de esquemas agrícolas más responsable en términos ecológicos.

5. HIPÓTESIS

Las variedades de frijol que están mejor adaptadas a crecer en condiciones de limitación de Pi, siempre que no difieran en su contenido de Pi inicial, ni sustituyan más eficientemente este elemento en lípidos polares por SO_4 , mostrarán una mayor tasa de recambio del RNA, lo que les ayudaría a mantener una síntesis adecuada de proteínas con un contenido más bajo de RNA total y el consecuente ahorro de Pi.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar las diferencias en el nivel de recambio de RNA en las variedades de frijol estudiadas cuando son germinadas en presencia o ausencia de Pi, y determinar si hay o no diferencias endógenas en la cantidad de Pi y SO₄ acumulados, o bien, diferencias en la habilidad para sustituir P por S en los lípidos.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el contenido de fosfato y sulfato inicial en las semillas que difieren en su capacidad para crecer en condiciones de déficit de (Pi).
- Determinar si se manifiestan diferencias de movilización de fosfato y sulfato a los diversos tejidos durante el proceso de germinación temprana.
- Determinar si existen diferencias de movilización de fosfato y sulfato hacia los fosfolípidos en las diferentes variedades estudiadas.
- Cuantificar la velocidad de biosíntesis y degradación de RNA total en las semillas recién germinadas en las variedades contrastantes.
- Correlacionar los datos anteriores con la capacidad de las variedades para crecer con déficit de fosfato.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 MATERIALES

La [³H]-Uridina empleada en los ensayos de marcaje radiactivo se obtuvo de Amersham. Las sustancias químicas utilizadas para la preparación de las disoluciones y amortiguadores empleados, se obtuvieron de las compañías Sigma Chemical Co. (San Luis Missouri, USA) y Merck, las placas de silica gel fueron adquiridas de Aldrich (San Luis Missouri, USA). En el anexo-1 se presenta la relación del equipo, las sustancias y reactivos utilizados en el desarrollo del presente trabajo.

7.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Los experimentos que a continuación se describen se realizaron con semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) de cinco variedades que previamente fueron seleccionadas por el Dr. Eleazar Martínez Barajas (Dpto. Bioquímica Vegetal, FQ, UNAM). Las variedades progenitoras fueron la Pinto Villa (PV) y Canario, en tanto las otras son designadas como 22, 40 y 42, que se relaciona con el orden en que se seleccionaron en el Colegio de Post-Graduados (Chapingo, Edo. de México). La selección se realizó con base en un mejor desempeño agrícola en suelos con déficit de Pi.

Las semillas maduras y secas se almacenaron en bolsas de papel, en refrigeración, dentro de contenedores con baja humedad.

7.2 MÉTODOS

7.2.1 GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS

Las semillas se desinfectaron superficialmente mediante inmersión en una disolución de NaClO al 1.2% (v/v) por 15min con agitación suave, luego se enjuagaron con abundante agua desionizada estéril y, en una campana de flujo laminar, se depositaron sobre papel filtro Whatman 3MM humedecido con la solución de germinación, en cajas de petri estériles cerradas con parafilm M (American Can Co., Inc. USA).

Los medios de germinación utilizados en estos ensayos fueron 10 ml de agua desionizada y estéril, con 0.5 mg de CAPTAN (antifúngico), o 10 ml de una disolución de K_3PO_4 $1\mu M$, con 0.5 mg de CAPTAN. Las semillas se incubaron por 7 días a 25 °C, en condiciones de oscuridad.

7.2.2 CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO

Las determinaciones de fosfato se realizaron conforme a una modificación del método descrito por Ames (Leloir & Cardini, 1975). A una muestra de 300 μl se le agregaron 700 μl de una disolución compuesta por una parte de ácido ascórbico al 10% y 6 partes de molibdato de amonio al 0.42% (p/v) en 4.2% (v/v) H_2SO_4 . La mezcla se calentó en un baño seco a 45 °C por 20 min. Pasado el tiempo se leyó la absorbancia del complejo colorido de fosfomolibdato, en un espectrofotómetro BECKMAN DU 640 a una longitud de onda de 820 nm .

La concentración se determinó por interpolación en una curva patrón de K_3PO_4 conteniendo cantidades variables de fosfato en el rango de 10 a 100 nmolas de fósforo en 0.3 ml.

7.2.3 CALCINACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA A MINERALES SOLUBLES

Este procedimiento es una adaptación a muestras pequeñas y con baja humedad, del método de calcinación reportado por Patterson & Pappenhagen, (1978), para determinación de azufre en material vegetal. Aquí se empleó igualmente para la determinación de fósforo. Un mg del polvo de semilla se colocó en tubos de ensaye, libres de fosfatos a los que se les adicionaron 100 µL de una disolución al 10% (p/v) de $Mg(NO_3)_2$ en 95% (v/v) de ETOH y 1% $HClO_4$ (v/v) la cual se evaporó en un baño seco a 90 °C. Posteriormente, los tubos se calcinaron a la flama directa hasta la oxidación total del carbono orgánico. El residuo se disolvió en 300 µl de HCl 0.5 N en un baño seco a ebullición por 20 min y luego se dejó secar nuevamente por evaporación. Finalmente, se disolvieron en 300 µl de H₂O desionizada.

7.2.4 MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE FÓSFORO EN LOS MATERIALES BIOLÓGICOS INVESTIGADOS

El fósforo presente en los materiales biológicos se determinó como fósforo soluble en ácido o como fósforo total según el experimento realizado.

7.2.4.1 CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO INORGÁNICO EN SEMILLA SECA

Para esta cuantificación se tomaron 4 semillas de frijol de cada una de las variedades y se molieron por separado en un mortero libre de fosfatos, hasta la obtención de un polvo fino. Un mg del polvo de semilla se suspendió por agitación vigorosa (Vortex Genie) en 1 ml de HCl 1 N en un tubo Eppendorf, y se centrifugó a 13000 rpm en una microcentrifuga por 5 min y se recuperó el sobrenadante.

Se tomaron 0.5 ml de la solución centrifugada y se trato conforme a lo descrito en el apartado 7.2.3.

De la disolución obtenida se transfirieron 0.1 ml a un tubo de ensaye libre de fosfatos y se completaron con agua desionizada a 0.3 ml. La concentración de fosfato se determinó conforme a lo ya indicado (apartado 7.2.2).

7.2.4.2 CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO TOTAL EN SEMILLA SECA

Se tomaron 4 semillas de frijol de cada una de las variedades y se molieron en un mortero libre de fosfatos, hasta la obtención de un polvo fino. Se tomó 1 mg del polvo fino y se trató conforme a lo descrito en el apartado (7.2.3), excepto que la disolución final se realizó en sólo 0.15 ml y se tomaron 25 µl de la disolución anterior y se completaron a 0.3 ml para la determinación de fosfato (apartado 7.2.2).

7.2.4.3 CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO TOTAL EN SEMILLA GERMINADA

De las semillas germinadas por los 7 días se extrajeron los cotiledones, el hipocotilo y la raíz, registrando su peso como materia fresca. Se congelaron de inmediato a -70 oC y se liofilizaron a cerca de un 8% de humedad, su peso se registró como materia seca. Este material se molió en un mortero hasta obtener un polvo fino.

Se tomó 1 mg de cada una de los polvos recuperados de los diferentes tejidos y se calcinaron conforme a lo descrito en el apartado 7.2.3. Una alícuota de 0.1 ml se completó a 0.3 ml y se determinó la concentración de fosfato como se describió en 7.2.2.

7.2.4.4 CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO TOTAL EN LÍPIDOS EN SEMILLA SECA Y GERMINADA

La extracción de los lípidos se realizó según Rodríguez (Rodríguez-Sotres, & Black, 1993). Brevemente, 5 mg de polvo se suspendieron en 250 µl de cloroformo:metanol 1:1 y se agitaron vigorosamente en un (VORTEX Genie).

Se añadió 1 ml de solución NaCl al 1% (p/v) con 0.1% (p/v) de ZnSO₄, se agitó nuevamente y la suspensión se centrifugó a 1500 RPM por 5 min, en un rotor de columpio.

La fase acuosa y la nata sólida se eliminaron y se recuperó la fase clorofórmica.

Se tomaron 100 µl en un tubo de 13 x 100 mm y se evaporó el solvente hasta la sequedad.

El residuo se calcinó conforme a lo descrito en 7.2.3 y el contenido de fósforo se determinó conforme a lo descrito en 7.2.2.

7.2.5 CUANTIFICACIÓN DE SULFATO.

Las determinaciones de sulfato se realizaron modificando el método descrito por Patterson-Pappenhagen (Patterson & Pappenhagen, 1978; procedimiento estándar AOAC-920.10), adaptándolo a placas de ELISA de 96 pozos.

Se tomaron 50 µl de la muestra en estudio que se transfirieron a un pozo de 0.25 ml y se añadieron 200 µl de una disolución de BaCl₂ 0.05N en HCl 1N. Se permitió que se formara el precipitado de BaSO₄ durante 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se determinó la turbidez después de agitar por 30 segundos, midiendo la dispersión de la luz a 655 nm (como luz no transmitida), en un fotómetro de ELISA BIO-RAD BenchMark.

Dado que la lectura se realiza de manera inmediata a la agitación y en forma automatizada la lectura presenta mucha mayor reproducibilidad que la realizada en un espectrofotómetro o colorímetro convencional, ya que el haz es dirigido desde el fondo del pozo, por lo que la ligera deposición de polvo en el fondo de la placa de ELISA no afecta a las lecturas.

La concentración se estimó por interpolación en una curva patrón preparada conteniendo Na₂SO₄ en cantidades que variaron entre 50 y 300 nmol de sulfato en 0.05 ml de HCl 0.5 N.

En este caso la relación entre luz no transmitida y la concentración no es lineal, por lo que los datos se ajustaron a una polinomio de grado 2, conforme al programa Microplate Manager de BIO-RAD (La Jolla, CA., USA)

7.2.5.1 MEDICIÓN DEL CONTENIDO DE AZUFRE EN LOS MATERIALES BIOLÓGICOS INVESTIGADOS

El azufre presente en los materiales biológicos se determinó en forma de sulfato en los residuos calcinados.

7.2.5.2 CUANTIFICACIÓN DE SULFATO TOTAL EN SEMILLA SECA

Para esta cuantificación se tomaron 4 semillas de friol de cada una de las variedades y se molieron por separado en un mortero libre de sulfatos, hasta la obtención de un polvo fino. Se tomó 1 mg del polvo fino que se calcinó conforme a lo descrito en el apartado 7.2.3. excepto que la disolución final se realizó en 0.15 ml. Una alícuota de 50 µl se transfirió a un pozo de la placa de ELISA y el contenido de sulfato se determinó conforme a lo descrito en el apartado 7.2.5.

7.2.5.3 CUANTIFICACIÓN DE SULFATO TOTAL EN SEMILLA GERMINADA

Para esta cuantificación se procedió de manera semejante a lo descrito para la cuantificación de fósforo total en semilla germinada (7.2.4.2), excepto que la alícuota empleada fue de 0.05 ml para la determinación de sulfato conforme a lo descrito en 7.2.5.

7.2.5.4 CUANTIFICACIÓN DE SULFATO TOTAL EN LÍPIDOS EN SEMILLA SECA Y GERMINADA

La extracción de lípidos y su conversión a formas minerales se describió en el apartado 7.2.4.4. El contenido de sulfato se cuantificó en 0.05 ml de la disolución final conforme a lo descrito en 7.2.5.

7.2.6 ANÁLISIS DE LAS CLASES DE LÍPIDOS

Los lípidos se extrajeron de las muestras en fase clorofórmica conforme a lo descrito en el apartado 7.2.4.4.

Esta vez la fase clorofórmica recuperada se evaporó con flujo de nitrógeno y se redisolvió en un pequeño volumen de cloroformo, el cual se aplicó a una placa de capa fina (0.2 mm) de sílica gel sobre vidrio (Aldrich Chemical Co., San Luis Missouri, USA). La placa se desarrolló conforme a lo descrito por Valencia (Valencia & Rodríguez, 2001). En una cámara de corrida saturada con cloroformo : MeOH : Ác. Acético : Agua 85:15:10:3.5, que se dejó correr hasta la mitad de la placa, con el fin de separar lípidos polares. La placa se secó y se introdujo en una cámara saturada con hexano : dietil éter : Ác. Acético 70:30:1, con el fin de separar lípidos neutros. Los lípidos se revelaron asperjando con vainillina al 1% en H₂SO₄ al 50%, seguido de calentamiento a 150 °C hasta la aparición de las manchas. Las clases de lípidos se identificaron por su migración en comparación con estándares.

7.2.7 MARCAJE DEL RNA TOTAL “IN VIVO”

Para cuantificar la síntesis y degradación del RNA total se tomaron 10 semillas y se germinaron conforme a lo descrito en el apartado 7.2.1. pero solo por 3 días, bajo las mismas condiciones.

La testa de las semillas se extrajo, en condiciones de esterilidad bajo una campana de flujo laminar, las semillas se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 50 ml, con 10 ml de un amortiguador HEPES KOH 25mM pH 7 conteniendo 5 μ l de uridina marcada (5-[³H]-uridina, 0.5 μ Ci/ μ l, 44.5 Ci/mmol, en etanol:agua al 50%, Perkin/Emer, Life sciences, Inc. ®).

Los matraces se incubaron por diferentes periodos de tiempo a 25 °C, en un incubador con agitación orbital a 50 RPM.

7.2.7.1 EXTRACCIÓN DEL RNA Y CUANTIFICACIÓN DE LA URIDINA INCORPORADA EN MACROMOLÉCULAS.

Las semillas se incubaron por 0, 3, 6, 9, 12 y 18 h en el medio que contenía la uridina marcada [5-³H]. A cada tiempo se tomaron alícuotas de 5 μ L del medio de incubación y se mezclaron con 3 ml de coctel de centelleo (para muestras acuosas) para cuantificar la radiactividad en un contador de centelleo líquido PACKARD 6200. A cada tiempo se retiraron 2 semillas, y se enjuagaron con una solución que contenía 200 μ g/mL de uridina fría en etanol al 80% (v/v) y el exceso de líquido se retiró con papel absorbente. Las semillas se molieron en 10 mL de Acetona fría, de donde se tomaron 50 μ L de la suspensión resultante para medir la radioactividad total incorporada.

El homogenado se centrifugó por 5 min a 3000 x g y se decantó el sobrenadante, la pastilla se resuspendió en 10 mL de un amortiguador de TRIS 100 mM, pH 7, con urea 7 M, EDTA 1 mM, 1% (p/v) de SDS, 1% (v/v) de 2-mercaptoetanol.

La suspensión se centrifugó por 5 min a 3000 x g, y se recuperó el sobrenadante, al cual se le añadieron 5 ml de TCA 10 % (p/v).

La suspensión se filtró a través de un papel de fibra de vidrio Whatman GF/A de 24 mm (diámetro), el filtro se lavó con una solución de TCA 5 % (p/v), luego con etanol al 100% (v/v) y se secó en una estufa a 60°C.

Los filtros se colocaron en viales de centelleo líquido con 5ml de un coctel de centelleo para muestras sólidas y se cuantificó la radiactividad incorporada.

7.2.7.2 CUANTIFICACIÓN DE LA ESTABILIDAD DEL RNA “IN VIVO”

Las semillas se incubaron como anteriormente se describió (7.2.8) por 18 h, al término de las cuales se retiraron del medio de incubación inicial, el cual se reemplazó por un medio equivalente (HEPES KOH 25 mM pH 7) medio que contenía uridina sin marca radiactiva a una concentración de 50 µg/mL en disolución de amortiguador. La incubación se prolongó por 12 h más, retirando 2 semillas a las 18, 21, 24 y 27 h. El procedimiento de extracción de RNA se realizó como se mencionó en el apartado anterior (7.2.7.1)

7.2.7.3 AJUSTE DE LOS DATOS DE ACUMULACIÓN Y DEGRADACIÓN DE RNA A UN MODELO EXPONENCIAL.

Los datos de la incorporación de [³H]-Uridina a lo largo del tiempo de incubación del hasta las 18 h se ajustaron a una curva de crecimiento exponencial (la fase del pulso de las primeras 18 horas), en tanto que, la pérdida de marca por degradación observada tras la dilución se ajustó a una curva de decaimiento exponencial (la fase de pérdida de la marca de las 12 horas finales). Para garantizar la coincidencia de los ajustes en el punto de transición de la fase de acumulación al decaimiento se empleó una función segmentada (ecuación 1) que coincidía a las 18 h. El ajuste numérico se realizó mediante regresión no lineal con el algoritmo de Marquard-Levenberg incorporado en el programa SigmaStat. (Jandel Corporation, SigmaStat for Windows versión 2, San Rafael California, USA 1995)

Ecuación 1

$$\text{Incorporación} = \begin{cases} \text{Amplitud}_1 e^{-\frac{0.6931 \text{ tiempo}}{g_{0.5}}} & \text{si el tiempo} \leq 18h \\ \text{Amplitud}_2 e^{-\frac{0.6931 \text{ tiempo}}{d_{0.5}}} & \text{si el tiempo} > 18h \end{cases}$$

En la ecuación anterior 0.6931 es el valor del logaritmo natural de 2, $g_{0.5}$ y $d_{0.5}$ son el tiempo de duplicación de la fases de acumulación y la vida media de la fase de decaimiento, respectivamente. Las amplitudes 1 y 2 son constantes que dependen de la magnitud de la señal analizada (^3H incorporado como fracción porcentual de la captación total de marca).

En éste análisis se asume que la síntesis *de novo* de RNA es igualmente eficiente con Uridina sin marca (proveniente de la poza interna de la semillas) y con Uridina- ^3H], que es captada por el tejido durante la incubación. Como el RNA previamente presente en el tejido no es radiactivo, la marca se incorporará a esta biomolécula con una rapidez proporcional a la disponibilidad de Uridina, que se asume constante durante el experimento, resultando en un aumento exponencial de ^3H]-RNA. Aunque la degradación de ^3H]-RNA ocurre simultáneamente durante el proceso, se presume que dicho proceso debe ser considerablemente más lento que la síntesis, porque de otro modo no se observaría aumento en la cantidad de marca en RNA. Cuando la marca es retirada (debido a la enorme dilución que sufre la Uridina), el ^3H]-RNA ya acumulado continúa siendo degradado lentamente, pero ante la ausencia de nueva síntesis, su cantidad disminuye en un proceso que, de nuevo es proporcional a la cantidad presente, lo que se refleja en una caída de tipo exponencial de la marca recobrada.

8. RESULTADOS

En este trabajo se buscó caracterizar a un conjunto de variedades de frijol que presentaron diferencias en su habilidad para germinar y establecerse en condiciones de deficiencia de fósforo. En un estudio preliminar realizado por el Dr. Eleazar Martínez Barajas (Departamento de Bioquímica, Facultad de Química UNAM) se estudiaron 50 diferentes variedades seleccionadas por el Dr. Jorge Acosta (Colegio de Posgraduados, Montesillos, Texconoc, Estado de México). En dicho estudio las variedades originales Pinto Villa y Canario demostraron ser poco tolerantes a la deficiencia de fósforo, en comparación con las variedades 22, 40 y 42 (E. Martínez Barajas, comunicación personal).

Una primera posibilidad que decidimos explorar fue la de que las semillas mismas contuviesen diferente cantidad de fósforo desde su estado seco, siendo esta la razón que les permitiera a las más aventajadas establecerse con mayor vigor.

8.1 FOSFATO EN SEMILLA SECA

La cantidad de fosfato inorgánico en las variedades de frijol estudiadas se determinó en semillas previamente pulverizadas en mortero, con un mg de harina de las semillas, que se mezcló vigorosamente con HCl 1 N, con la finalidad de extraer todo el fosfato inorgánico posible presente en la muestra.

Los resultados presentados en la figura 8.1 muestran que hay diferencia entre las variedades de frijol estudiadas, en su contenido de fósforo soluble. La prueba estadística de ANOVA de una vía indicó que las variedades 22, 42 y Canario contienen una cantidad de fosfato inorgánico similar entre ellas (*i.e.* no hay entre éstas diferencias estadísticamente significativas, *c.a.* 60 nmol/mg de semilla).

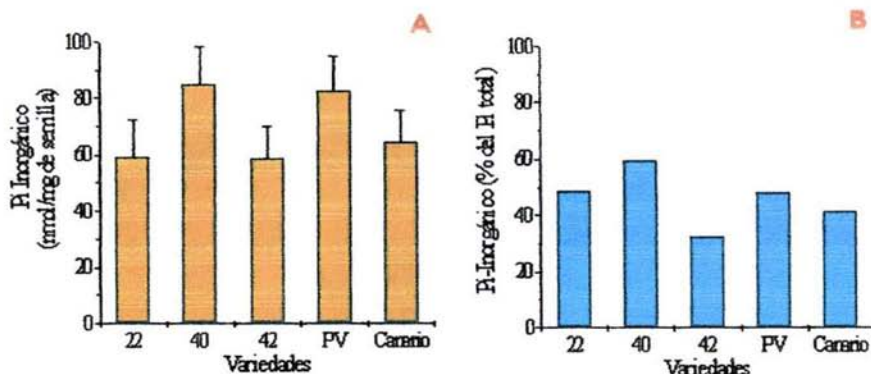


Figura 8.1. (A) Contenido de fosfato inorgánico en semilla seca de las variedades estudiadas. El contenido de fosfato se cuantificó como se describió en materiales y métodos. El fosfato se expresa como nmol por mg de tejido seco. (B) Fosfato inorgánico como fracción porcentual del contenido total de fósforo de la semilla seca.

En tanto que las variedades 40 y PV presentan mayor contenido de fosfato inorgánico que las tres anteriores (estadísticamente significativo, $p = 0.05$), pero son semejantes entre ellas (*c.a.* 80 nmol/mg de semilla).

La cuantificación del fósforo total se realizó en muestras de harina calcinadas con $Mg(NO_3)_2$ e hidrolizadas con HCl. En la figura 8.2 se muestran los datos obtenidos de la cuantificación de fosfato total, los que no presentan diferencias significativas (ANOVA, 1 vía, $p = 0.05$).

Cuando los datos mostrados en las figuras 8.1 y 8.2 se relacionan para expresar el contenido de fosfato inorgánico como fracción porcentual del fósforo total, las diferencias que se observaron en la (figura 8.1), pierden su significancia estadística (ANOVA, 2 vías, $p = 0.05$) figura 8.1, panel B. Lo anterior es atribuible a la mayor dispersión introducida al involucrar conjuntamente a dos variables.

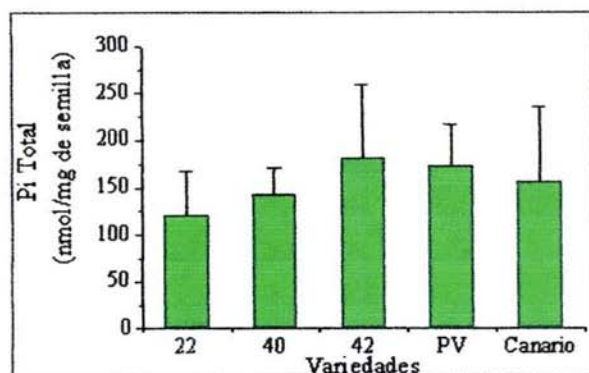


Figura 8.2. Contenido de fosfato total en semilla seca de las variedades estudiadas. El contenido de fosfato se cuantificó como se describió en materiales y métodos. El fosfato se expresa como nmol por mg de tejido seco.

8.2 FOSFATO EN LÍPIDOS EN SEMILLA SECA

Un punto más en la exploración del contenido de (Pi) en las semillas secas lo constituyen aquellas moléculas altamente fosforiladas de gran importancia y cantidad en las células vegetales. Ya se ha comentado reiteradamente el papel de los fosfolípidos y sulfolípidos en las respuestas adaptativas, por lo que se midió el contenido de fosfato y sulfato en la fracción lipídica, tanto de las semillas secas como de las plántulas etioladas de 7 días.

Los lípidos se extrajeron en la fracción soluble en cloroformo, el solvente se evaporó y los lípidos se calcinaron para cuantificar los minerales como fosfato y sulfato, como se describió en materiales y métodos.

En la figura 8.3, panel A se observan los contenidos de Pi en lípidos, en las semillas de frijol de las variedades estudiadas. El análisis estadístico permitió separar dos grupos, las variedades 42, Pinto Villa y Canario con un contenido medio de 40 nmol/mg de semilla y las variedades 22 y 40, con un contenido medio de 30 nmol/mg de semilla.

Sin embargo, en la figura 8.3, panel B, se observa que cuando el contenido (Pi) en lípidos en las semillas estudiadas se expresa como fracción del contenido de (Pi) total tal diferencia no es ya evidente y el análisis estadístico (ANOVA, 2 vías, $\rho = 0.05$) reveló que no existe diferencia significativa entre las semillas estudiadas.

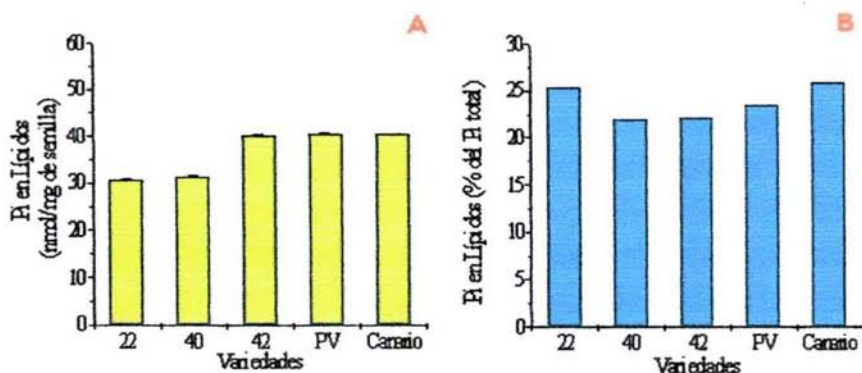


Figura 8.3. (A) Contenido de fósforo en lípidos en semilla seca de las variedades estudiadas. El contenido de fósforo se cuantificó como se describió en materiales y métodos. El fósforo se expresa como nmol por mg de tejido seco. (B) Fósforo en lípidos como fracción porcentual del contenido total de fósforo de la semilla seca

8.3 FOSFATO EN LAS PLÁNTULAS ETIOLADAS A LOS 7 DÍAS.

Por otro lado, también es factible que aún conteniendo cantidades semejantes de fósforo en las semillas, este se encontrara en formas diferentes, o bien, que se metabolizara con diferente eficiencia, de manera que al final de varios días de germinación, las variedades más tolerantes a la deficiencia habrían aprovechado mejor su reserva de fósforo.

Para explorar este segundo aspecto, se determinó la cantidad de fósforo presente en las plántulas en su periodo postgerminativo temprano. Se eligieron 7 días, en condiciones de oscuridad y con agua destilada ya que a ese este tiempo las hojas primarias no se han expandido ni separado claramente del cotiledón. La movilización se analizó cuantificando el fósforo total en el cotiledón, el hipocotilo y en la raíz.

Para identificar respuestas asociadas a la deficiencia de fósforo, se incubaron las semillas con fósforo ($1 \mu\text{M}$ de K_3PO_4) y en ausencia de éste en el medio de germinación.

Los resultados mostrados en la figura 8.4, panel A y B, muestran que aún después de 7 días de crecimiento en la oscuridad, una gran proporción del fósforo disponible para la plántula se mantiene en el cotiledón.

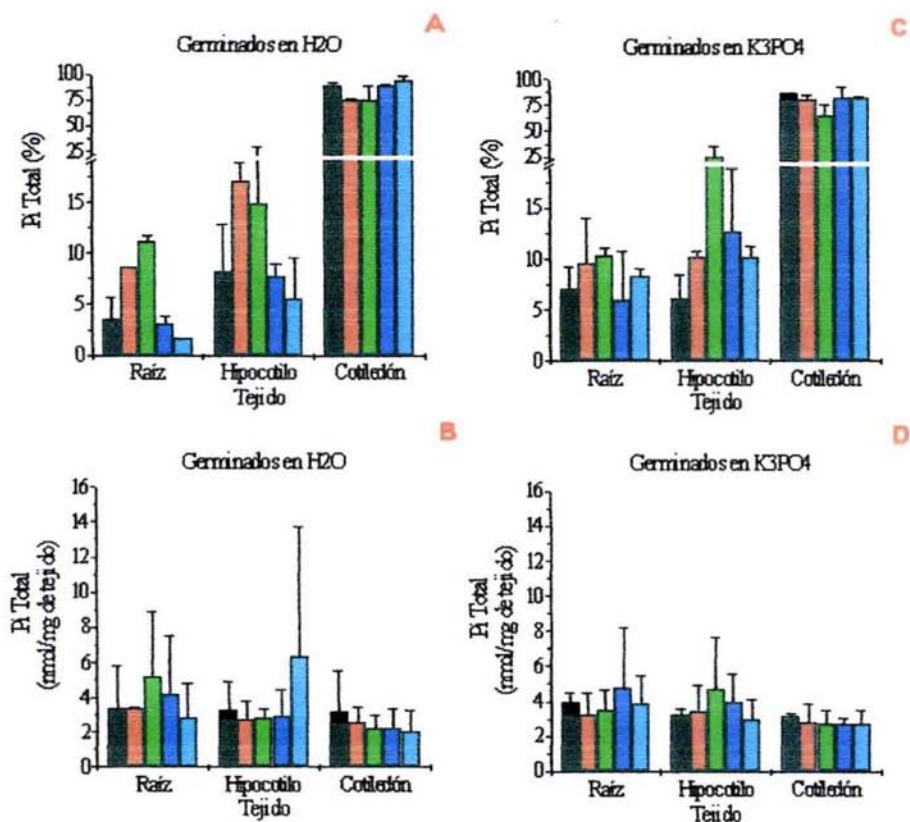


Figura 8.4. Contenido total de fósforo en raíz, hipocotilo y cotiledón en las plántulas a los 7 días, en las variedades estudiadas, 22 (barras negras ■), 40 (barras rojas ■), 42 (barras verdes ■), Pinto villa (barras azules ■) y Canario (barras cian ■). Las semillas se germinaron por 7 días a 25°C en la oscuridad sobre papel filtro humedecido con agua (A y B), o en disolución de K_3PO_4 $1 \mu\text{M}$ (C y D). La extracción y cuantificación del fósforo se realizó según lo indicado en materiales y métodos. El fósforo se expresa como porcentaje del total en cada plántula (A y C) o en nmol por mg de tejido seco (B y D).

Aunque dos de las variedades más tolerantes 40 y 42 han transferido mayor cantidad de fósforo hacia las raíces (en promedio), los datos presentan dispersión y las diferencias no son estadísticamente significativas. Las diferencias en la distribución de fósforo (como fracción porcentual) están muy relacionadas con la biomasa de cada parte de la planta, ya que el contenido de fósforo por mg de tejido seco muestra una diferencia mucho menores, que no es estadísticamente significativa.

La única diferencia estadísticamente significativa (ANOVA 2 vías, con tejido y variedad como factores) está en el contenido de fósforo del cotiledón que es inferior al de raíz e hipocotilo figura 8.4 paneles B y D, contrario a lo observado en la figura 8.4 paneles A y C, lo que indica que el fósforo del cotiledón, se está movilizandohacia los otros tejidos, aunque a los 7 días aún representa una cantidad de biomasa figura 8.5 panel A y de fósforo total, mucho mayor que el resto de la plántula.

En las semillas crecidas en presencia de fósforo, las plántulas presentan contenidos de fósforo ligeramente superiores en raíz e hipocotilo, figura 8.4 paneles A y C, y un mayor crecimiento de las plántulas, figura 8.5 panel B, lo que relega en promedio una menor proporción de fósforo en el cotiledón, en comparación con las plántulas deficientes, sin que en general, las variedades muestran diferencias significativas (ANOVA, 1 vía, $p = 0.05$). Nótese que la variedad 40 (posiblemente la más tolerante), presenta una tendencia en ambos experimentos a contener menor proporción de fósforo en el cotiledón y más en el hipocotilo, lo que representa un reflejo de una mayor crecimiento de esta variedad, por lo que la biomasa del hipocotilo tiende a ser mayor y representa más fosfato.

Aunque en nuestro estudio no se puso tal énfasis, experimentos a tiempos mucho más largos (con plantas ya totalmente autotróficas) sí demuestran diferencias estadísticas en el crecimiento de las variedades (E. Martínez, comunicación personal).

8.4 PESO DE LOS TEJIDOS DE LAS PLÁNTULAS ETIOLADAS A LOS 7 DÍAS.

En la figura 8.5 panel A, se observa el peso de los tejidos estudiados a los 7 días de germinación. El cotiledón fue el más pesado, seguido del hipocotilo y luego la raíz de todas las variedades estudiadas; lo cual es claro que en este momento, ya que la plántula aún depende en gran medida de los cotiledones y éste sigue siendo un tejido mayoritario.

En el análisis estadístico (ANOVA, 1 vía, $\rho = 0.05$), no se observó diferencia significativa alguna, lo que indica que el crecimiento de las semillas sin fósforo exógeno es similar en todas las variedades. En este momento de su desarrollo, cuando las plantas no son aún totalmente autotrófas, las diferencia en el crecimiento no son aún evidentes.

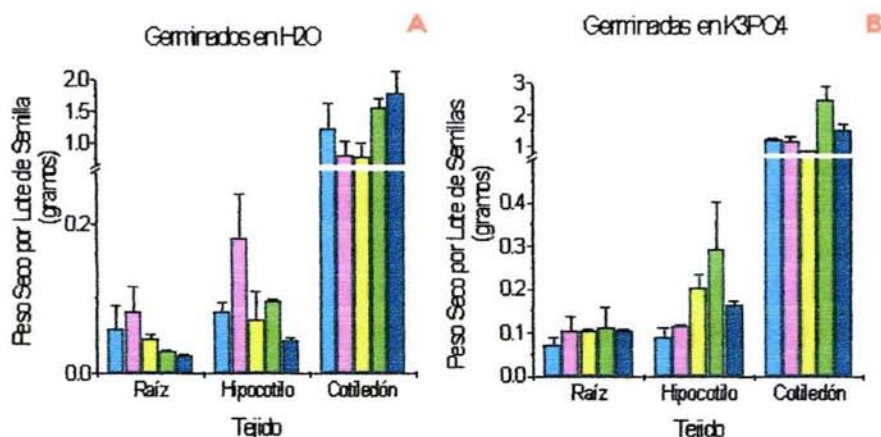


Figura 8.5 Peso seco de las partes de las plántulas a los 7 días de incubación, en la fase de crecimiento postgerminativo. 22 (barras cian), 40 (barras rojas), 42 (barras verdes), Pinto villa (barras azules) y Canario (barras cian). (A) Peso seco de las partes de las plántulas germinadas y crecidas en ausencia de Pi (B) Peso seco de las partes de las plántulas germinadas y crecidas en presencia de K₃PO₄ 1 μM.

En el caso de la figura 8.5, panel B, se observa también que en crecimiento de las semillas en los distintos tejidos estudiados es similar, ya que en el análisis estadístico (ANOVA, 1 vía, $p = 0.5$) no se observó diferencia significativa alguna.

Sin embargo, al comparar el crecimiento entre los lotes germinados con o sin fosfato, es posible observar que sí existe diferencia significativa entre ambos, siendo mayor el crecimiento cuando se añade fosfato al medio de germinación, lo cual se comprobó después del análisis estadístico de (ANOVA, 2 vías, $p = 0.05$). Dicha diferencia refleja que el fósforo exógeno sí resulta limitante para el crecimiento en esta etapa de desarrollo.

8.5 FOSFATO EN LÍPIDOS EN LAS PLÁNTULAS ETIOLADAS A LOS 7 DÍAS

Al igual que como se determinó el contenido de (Pi) en lípidos en semillas seca, se realizó también la determinación de la cantidad de Pi en lípidos en los diversos tejidos de las plántulas etioladas de 7 días.

En la figura 8.6 se presentan los contenidos de Pi en las fracciones solubles en cloroformo de cada parte de la plántula, como fracción porcentual del Pi en lípidos en toda la planta figura. 8.6, paneles A y C o como contenido en nmol/mg de peso seco figura. 8.6, paneles B y D. Los resultados no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las variedades (ANOVA 2 vías, $p = 0.05$), pero se encontró que, nuevamente, el contenido de fósforo en lípidos de la raíz e hipocotilo (un promedio de 5 nmol/mg tejido) es ligeramente superior al que presentan los cotiledones. Esta diferencia muestra la misma tendencia que los contenidos de fósforo total, pero aquí las diferencias son menores, lo que seguramente tiene relación con la relevancia del contenido de fosfolípidos en las membranas biológicas.

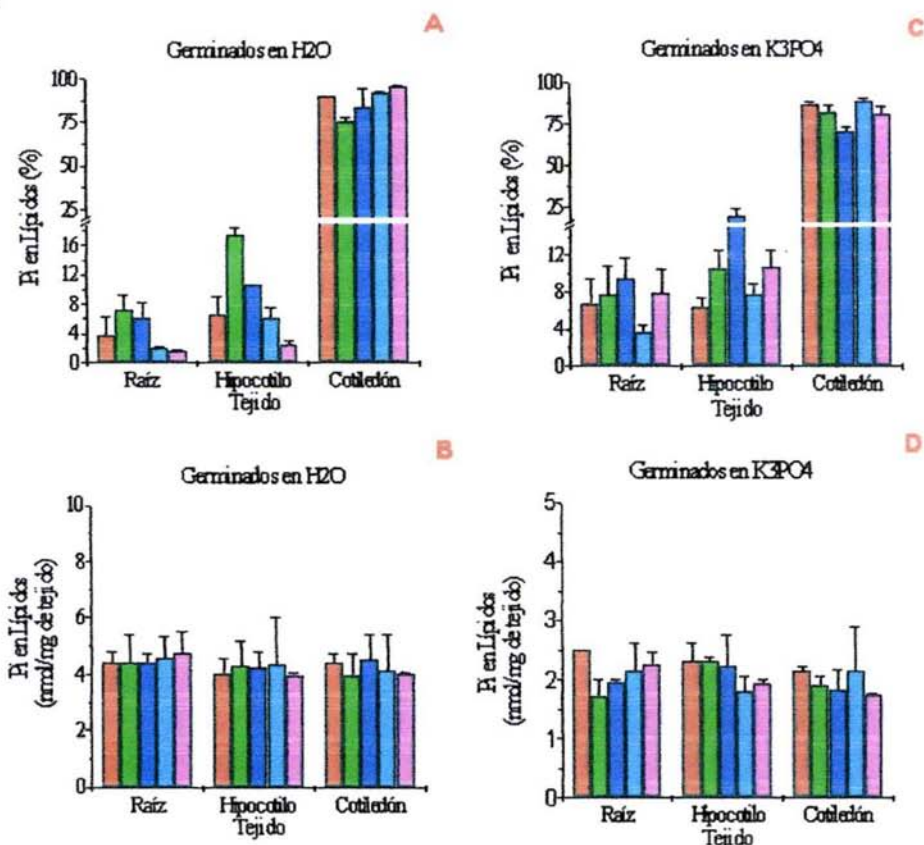


Figura 8.6. Contenido de fósforo en lípidos, en raíz hipocotilo y cotiledón en las plántulas a los 7 días, en las variedades estudiadas, 22 (barras rojas ■), 40 (barras verdes ■), 42 (barras azules ■), Pinto villa (barras cian ■) y Canario (barras rosa ■). Las semillas se germinaron por 7 días a 25°C en la oscuridad sobre papel filtro humedecidos con agua (A y B), o en disolución de K₃PO₄ 1μM (C y D). La extracción y cuantificación del fósforo se realizó según lo indicado en materiales y métodos. El fósforo se expresa como porcentaje del total en cada plántula (A y C) o en nmol por mg de tejido seco (B y D).

8.6 SULFATO TOTAL Y EN LÍPIDOS EN SEMILLA SECA Y PLÁNTULAS ETIOLADAS

Ya se discutió el papel del sulfato como reemplazo del fósforo en los sulfolípidos del cloroplasto, como una mecanismo de adaptación. (Essigmann et al, 1998). Por tal razón, se exploró la posibilidad de encontrar diferencias en el manejo de este nutriente durante la germinación y el crecimiento temprano de las variedades de frijol estudiadas.

Para ver si existían diferencias en las reservas de azufre entre las variedades se calcinaron las muestras y el sulfato se precipitó con BaCl_2 , en medio ácido para cuantificar la cantidad de BaSO_4 por medio de turbidimetría, en placas multipozo. El método brevemente mencionado anteriormente, es una adaptación novedosa de una técnica antigua, que aprovecha los equipos modernos para mejorar la reproducibilidad y la sensibilidad, reduciendo al tiempo el consumo de reactivos y muestra.

Los resultados encontrados (figura 12.1 del Anexo 1) revelan una concentración de SO_4^{2-} de 90 nmol/ mg de tejido, en promedio en las variedades analizadas, con poca variación entre los valores individuales. También, se determinó el contenido de sulfato en lípidos en la semilla seca (figura 12.2 panel A del Anexo 1), para el cual, se observaron variaciones un poco mayores entre variedades. El análisis estadístico de los datos anteriores (ANOVA, 1 vía, $\rho = 0.05$) reveló que tanto el contenido de sulfato total, como el contenido de sulfato en lípidos no presentan diferencias que alcancen significancia estadística (ANOVA, 1 vía, $\rho = 0.05$). Con el fin de observar diferencias en el manejo del sulfato, se midió el contenido de azufre total así como el presente en lípidos, en semilla seca como en el cotiledón, hipocotilo y la raíz, de plántulas etioladas crecidas por 7 días, en ausencia o en presencia de K_3PO_4 ($1\mu\text{M}$). Aunque el contenido total del sulfato en las diferentes partes de la planta (figura 12.3 del Anexo 1) no alcanzan diferencias estadísticamente significativas en términos absolutos (ANOVA, 1 vía, $\rho = 0.05$), sin embargo si los resultados se analizan como fracción porcentual de sulfato transferido hacia la raíz, las diferencias resultan significativas en las variedades más sensibles a la deficiencia de fósforo, es decir, PV y Canario (ANOVA, 2 vías, $\rho = 0.05$, comparación mediante la prueba de TUCKEY, figura 12.3 del Anexo 1, panel A).

Estas diferencias desaparecen cuando las plántulas han sido crecidas en presencia de fosfato (figura 12.3 del Anexo 1, panel B), lo que es relevante, ya que la adición de fosfato está teniendo un efecto sobre el manejo del sulfato en las variedades sensibles.

Es muy interesante notar que el contenido de sulfato en los diferentes tejidos es, independientemente de la variedad, mayor en los cotiledones tanto en las plántulas crecidas con como sin fosfato. El hecho de que las diferencias entre variedades se den a nivel de fracción porcentual y no a nivel de contenido absoluto entre hipocotilo y raíz cuando las plántulas se crecen en ausencia de fosfato, es reflejo de la actividad proliferativa y de histodiferenciación (*i.e.* el crecimiento) y de la actividad metabólica de los tejidos (*i.e.* fisiológicamente, su vigor). Finalmente, el sulfato en lípidos en las plántulas etioladas a los 7 días (figura 12.4 del Anexo 1) no reveló diferencias significativas en las semillas germinadas en agua, ni en las germinadas en K_3PO_4 , por tejido entre las variedades estudiadas.

8.10 CLASES DE LÍPIDOS

Con el fin de identificar si se presentaban diferencias en la composición de clases de lípido que correlacionaran con la mayor o menor habilidad de las plántulas para crecer en condiciones de deficiencia de fósforo, se aislaron los lípidos de semillas y de plántulas etioladas de 7 días en presencia o ausencia de K_3PO_4 ($1\mu M$), los cuales se separaron en capa fina y se identificaron como se describe en materiales y métodos, figura 12.5 del Anexo 1.

El patrón obtenido fue semejante en todas las variedades, indicando entonces que no hay cambios significativos en el tipo de lípidos principales que están presentes en las semillas germinadas de las variedades estudiadas.

8.11 RECAMBIO DE RNA EN LAS SEMILLAS GERMINADAS

En todos los análisis anteriores no se encontró un indicador claro de diferencia entre una variedad y la otra. Sin embargo, es evidente que algunas variedades crecen menos que otras cuando se germinan y se dejan crecer en solución sin fósforo. Como se vio, los fosfolípidos, una de las macromoléculas ricas en fósforo no presentaron diferencias.

Lo cual, por otro lado, no es tan sorprendente, si se considera que las propiedades de las membranas biológicas son esenciales para la supervivencia de las células. Pero una de las macromoléculas que contienen cantidades importantes de Pi es el RNA, en este caso, a diferencia del DNA, o los fosfolípidos, la célula cuenta con un mayor margen de maniobra para regular sus "inventarios" de RNA, ya que haciendo más eficiente al aparato de traducción, podría sintetizar la cantidad requerida de las proteínas necesarias para los diversos procesos celulares, empleando una cantidad más reducida de mensajes y de ribosomas. En esta parte se determinó la síntesis de RNA y su degradación empleando [³H]-Uridina, la cual se incorpora selectivamente en el RNA. Los experimentos en este caso se hicieron con semillas germinadas a los 2 días de imbibición en agua desionizada, o en disolución de K₃PO₄ 1μM. Lo anterior se propuso, puesto que de haber diferencias, éstas podrían tener significado siempre que se establecieran tempranamente. A las variedades germinadas se les dio un pulso de 18 h en presencia de [³H]-Uridina para seguir la acumulación de marca (que es función de la tasa de síntesis), que luego se diluyó con Uridina sin marca, por un tiempo de 12 h. para seguir el decaimiento de la marca (que es función de la tasa de degradación). Las líneas que se muestran en las figuras 8.7 y 8.8 son resultado del ajuste de los datos a ecuación 1 (7.2.7.3) y los valores numéricos de los parámetros resultantes de tales ajustes se muestran en las (Tablas 2 y 3).

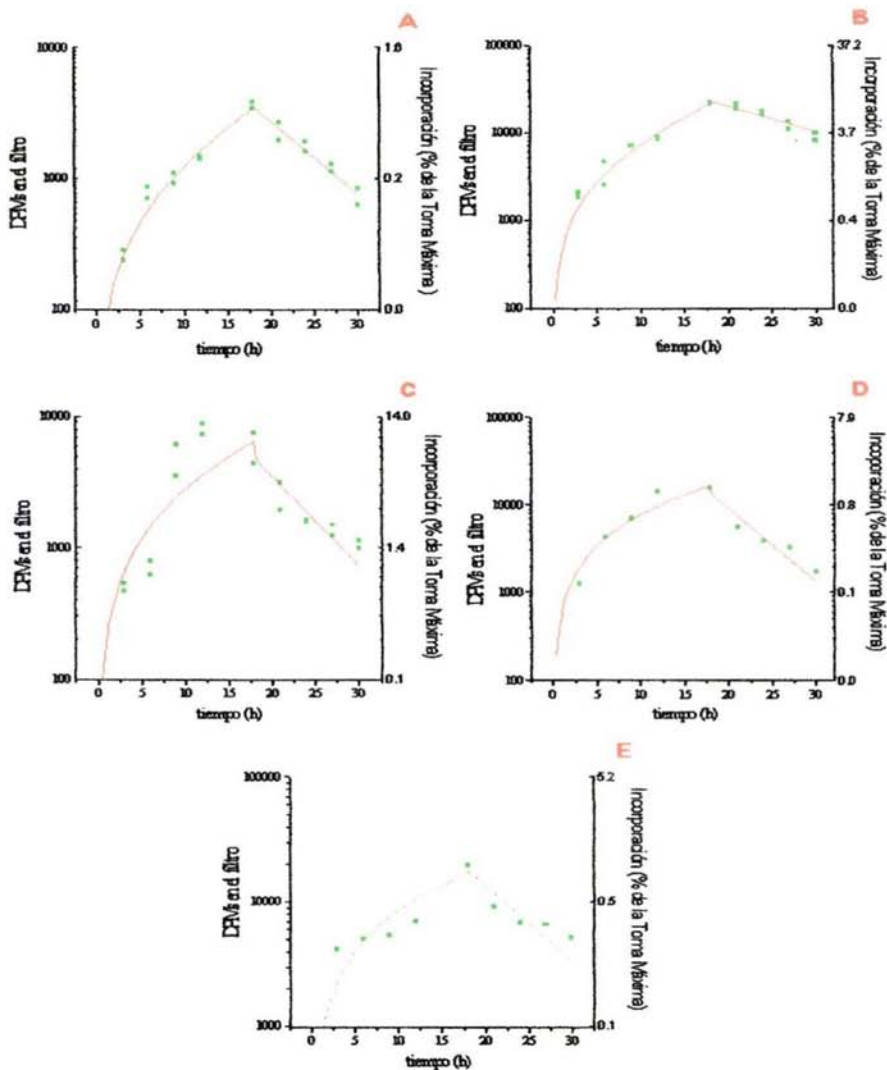


Figura 8.7. Gráficas similogarítmicas de las DPMs en el filtro de incorporación de $[^3\text{H}]$ -Uridina en el RNA a las 18 horas de incubación, y degradación de la marca radioactiva por la incubación de las semillas con Uridina sin marca por 12 horas más después del pulso de marca inicial en las variedades estudiadas, 22 (A), 40 (B), 42 (C), Pinto villa (D) y Canario (E). La escala de la derecha muestra las DPMs relacionadas a la toma máxima. Las semillas se germinaron por 2 días a 25 °C en la oscuridad con agua destilada. La extracción y cuantificación del RNA se realizó según lo indicado en Materiales y Métodos.

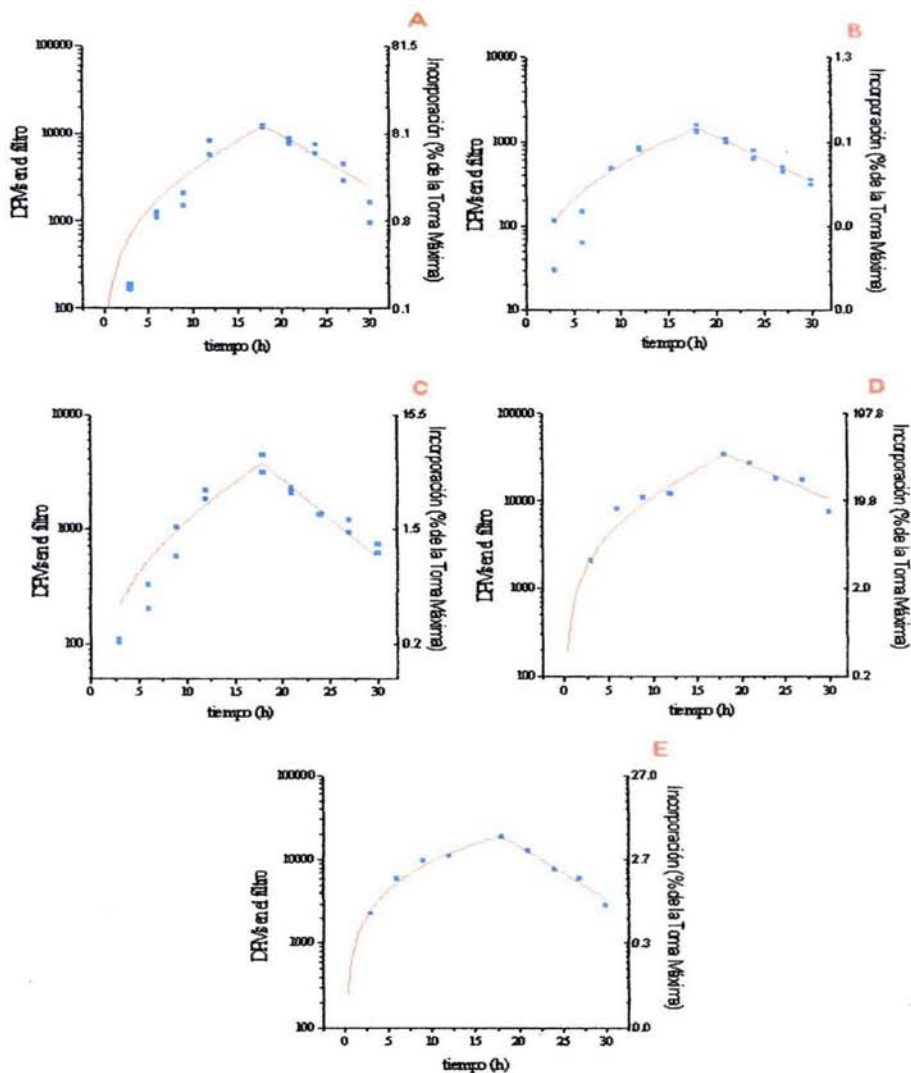


Figura 8.8. Gráficas similogarítmicas de las DPMs en el filtro de incorporación de $[^3\text{H}]$ -Uridina en el RNA a las 18 horas de incubación, y degradación de la marca radioactiva por la incubación de las semillas con Uridina sin marca por 12 horas más después del pulso de marca inicial en las variedades estudiadas, 22 (A), 40 (B), 42 (C), Pinto villa (D) y Canario (E). La escala de la derecha muestra las DPMs relacionadas a la toma máxima. Las semillas se germinaron por 2 días a 25 °C en la oscuridad con disolución de K_3PO_4 1 μM . La extracción y cuantificación del RNA se realizó según lo indicado en Materiales y Métodos.

TABLA 2. Amplitud y tiempo de duplicación de síntesis (Amplitud 1 y $g_{0.5}$), y amplitud y vida media de degradación (Amplitud 2 y $d_{0.5}$) de RNA en las plántulas etioladas de frijol de las variedades estudiadas crecidas en agua.

Variedad	Amplitud 1 (%) ^b	$g_{0.5}$ (h ⁻¹)	Amplitud 2 (%) ^b	$d_{0.5}$ (h ⁻¹)
22	0.259 ± 0.128	5.8 ± 1.3	21.8 ± 7.3	5.18 ± 0.64
40	0.530 ± 0.207	7.8 ± 1.6	18.3 ± 4.5	5.70 ± 0.55
42	0.185 ± 0.105	5.8 ± 1.4	23.1 ± 10.5	4.40 ± 0.63
PV	0.485 ± 0.259	6.7 ± 1.7	16.4 ± 4.8	6.91 ± 0.94
Canario	*1.53	25.0 ± 1.0	12.8 ± 2.6	4.83 ± 0.34

* su valor no pudo ser determinado con precisión debido a lo bajo de las incorporaciones, la cifra presentada es una estimación obtenida a partir del ajuste.

^b La ecuación empleada fue la (ecuación 1), pero las amplitudes se normalizaron como fracción porcentual relativa a la máxima cantidad de radiactividad incorporada por la semilla a las 18 h.

TABLA 3. Amplitud y tiempo de duplicación de síntesis (Amplitud 1 y $g_{0.5}$), y amplitud y vida media de degradación (Amplitud 2 y $d_{0.5}$) de RNA en las plántulas etioladas de frijol de las variedades estudiadas crecidas en K_3PO_4 1 μ M.

Variedad	Amplitud 1 (%) ^b	$g_{0.5}$ (h ⁻¹)	Amplitud 2 (%) ^b	$d_{0.5}$ (h ⁻¹)
22	0.619 ± 0.032	7.23 ± 0.21	28.5 ± 1.2	5.5 ± 0.08
40	0.400 ± 0.127	6.68 ± 1.02	7.61 ± 1.08	10.5 ± 1.02
42	3.11 ± 0.13	11.2 ± 0.3	77.5 ± 3.3	4.41 ± 0.05
PV	2.66 ± 0.09	16.1 ± 0.5	76.4 ± 3.0	3.62 ± 0.03
Canario	*8.91	*27.7 ± 56.1	73.5 ± 54.2	4.80 ± 1.21

* su valor no pudo ser determinado con precisión debido a lo bajo de las incorporaciones, la cifra presentada es una estimación.

^b La ecuación empleada fue la (ecuación 1), pero las amplitudes se normalizaron como fracción porcentual relativa a la máxima cantidad de radiactividad incorporada por la semilla a las 18 h.

Los resultados obtenidos muestran que las variedades germinadas en agua realizan la síntesis de RNA con un tiempo de duplicación que oscila entre las 4.5 y las 7.5 h., con excepción de la variedad Canario, que presentó una síntesis con un tiempo de duplicación muy largo (tabla 2, $d_{0.5}$), lo que indica que esta variedad se encuentra menos activa en la síntesis de RNA.

Cuando las mismas variedades se germinaron en solución de fosfato, el tiempo de duplicación de la síntesis de RNA se incrementó un poco para las variedades PV y 42, manteniéndose sin cambios para las demás variedades. Las diferencias entre los valores de $d_{0.5}$ en condiciones de ausencia o presencia de fosfato para las variedades PV y 42, si resultaron estadísticamente significativas (t de Student, $p < 0.05$).

Entre variedades el tiempo de duplicación para la síntesis fue significativamente más larga para la variedad Canario, que para todas las demás (tablas 2 y 4) y la presencia de fosfato no redujo este parámetro de manera importante (tabla 3). La vida media de degradación del RNA, sin embargo, no fue tan diferente de las demás y sólo difiere de la Pinto Villa, que fue mayor y de la variedad 42 que fue menor (tabla 4). Esto se interpretaría como una síntesis de RNA muy lenta, con una degradación no tan lenta, es decir un nivel de RNA de estado estacionario más bajo que para las otras variedades. Por otro lado, la Variedad Pinto Villa mostró un tiempo de duplicación de síntesis parecida a la de las otras 3 variedades (22, 40 y 42), pero su vida media de degradación fue mayor a las de las cuatro variedades restantes (Tabla 2 y 4). En esta variedad, el nivel de estado estacionario de RNA sería mayor, esta vez por una degradación más lenta del RNA producido, pero sólo cuando se crece en ausencia de fosfato ya que a diferencia de la variedad Canario, la variedad Pinto Villa sí mostró una respuesta muy importante a la presencia de Pi, aumentando la vida media de la síntesis de RNA y reduciendo la vida media de su degradación (Tablas 2 y 3), es decir bajando su nivel de estado estacionario de RNA. La variedad 22 se parece a la Pinto Villa en que la vida media de síntesis y la de la degradación son semejantes en ausencia de fosfato, pero a diferencia de la Pinto Villa, la presencia de fosfato no resulta en cambios tan dramáticos. Igualmente, en las variedades 40 y 42 las diferencias entre la presencia o ausencia de fosfato entre el medio de crecimiento son de menor magnitud y el cambio, si lo hay, es en una de las dos vidas medias, pero no en ambas.

TABLA 4. Comparación estadística de los valores obtenidos de tiempo de duplicación de la síntesis ($g_{0.5}$) y vida media de gradación ($d_{0.5}$) de RNA, para las variedades germinadas y crecidas en agua. Las comparaciones se realizaron mediante el análisis de varianza de las vidas medias con los valores de media y desviación estándar mostrados en la tabla 2 y con los grados de libertad reportados por los ajustes (número de valores experimentales- número de parámetros en el ajuste-1; $p<0.001$). Las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Tuckey ($p<0.05$).

$g_{0.5}$		ANOVA ($p<0.001$)			
Tuckey	22				
40	$p<0.05$	40			
42	'--	$p<0.05$	42		
PV	'--	'--	'--	PV	
Canario	$p<0.05$	$p<0.05$	$P<0.05$	$p<0.05$	

$d_{0.5}$		ANOVA ($p<0.001$)			
Tuckey	22				
40	'--	40			
42	$p<0.05$	$p<0.05$	42		
PV	$p<0.05$	$p<0.05$	$P<0.05$	PV	
Canario	'--	$p<0.05$	'--	$p<0.05$	

$g_{0.5}/d_{0.5}$		ANOVA ($p<0.001$)			
Tuckey	22				
40	$p<0.05$	40			
42	'--	'--	42		
PV	'--	$p<0.05$	$P<0.05$	PV	
Canario	$p<0.05$	$p<0.05$	$P<0.05$	$p<0.05$	

9. DISCUSIÓN

A pesar de que las semillas de las diferentes variedades muestran diferencias en su contenido de fosfato libre (figura 8.1), su contenido de fósforo total no es significativamente distinto (figura 8.2) y no permite explicar su diferente tolerancia a la deficiencia de fósforo; especialmente, ya que las variedades con más fosfato libre son una sensible (Pinto Villa) y una tolerante (40).

A los 7 días, las plántulas etioladas siguen siendo mayoritariamente cotiledón (medido como biomasa, (figura 8.5). A pesar de que el contenido de fósforo del cotiledón resultó inferior al de raíz e hipocotilo (figura 8.4, panel B y panel D), la biomasa cotiledonaria es aún lo suficientemente importante como para que el contenido de fósforo total en dicho tejido sea mayor a la presente en otros tejidos (figura 8.4, panel A y panel C). En este caso, la presencia de fosfato en los medios de germinación se tradujo en una reducción en la proporción del fósforo contenido en el cotiledón, excepto para las variedades 40 y 42, que son las más tolerantes a la deficiencia. El significado de tal observación podría relacionarse con una mayor habilidad de estas variedades para redistribuir el fósforo desde el cotiledón hacia otros tejidos, lo que a su vez, podría ser un reflejo de diferencias en el metabolismo del fosfato, en su transporte, o en ambos.

Los contenidos de sulfato en las semillas son semejantes (figura 12.1 Anexo 1), pero cuando este mineral se distribuye, se encuentran diferencias en la capacidad de las variedades para distribuir azufre hacia la raíz (figura 12.3 Anexo 1, panel A y panel C), lo que no sólo es reflejo de un menor crecimiento ya que de serlo afectaría al fósforo y al azufre por igual sino de un crecimiento con tejidos de diferente vigor y características metabólicas.

Resulta muy interesante que el contenido de sulfato en los tejidos sea diferente y, sobre todo, que estas diferencias se acentúen cuando se añade fosfato, lo que claramente refleja que los tejidos de las diferentes variedades cambian (se vuelven más vigorosos, a juzgar por su mayor crecimiento) y tal vigor se manifiesta con una mayor demanda de minerales esenciales, no sólo fósforo (figura 12.3 Anexo 1, panel B y panel D).

Las semillas de las diferentes variedades sí presentan diferencias en el contenido de fósforo en los lípidos. Estas diferencias no son resultado de diferencias en el envejecimiento de los lotes, ya que los datos se generaron con lotes cuya edad en almacén no superaba los dos meses, su viabilidad media como capacidad de germinación, superaba el 90 % en todos los casos y, finalmente, el almacenamiento se realizó a 4°C en un frasco de vidrio con desecante. Sin embargo, las diferencias no parecen explicar la tolerancia a la deficiencia de fósforo, ya que la variedad 42, tolerante, se agrupó con las variedades sensibles Canario y Pinto Villa respecto a su contenido de fósforo en lípidos (figura 8.3 panel A). No se observaron diferencias en la relación fósforo en lípidos/fósforo total (figura 8.3 panel B), lo que apoya la observación anterior. En apoyo de lo anterior, el contenido de azufre de las fracciones lipídicas de las semillas secas no fue significativamente distinto entre variedades cuando se considera como fracción porcentual del contenido total (figura 12.2 Anexo 1, panel B), pero sí se presentaron diferencias significativas entre todas las variedades (figura 12.2 Anexo 1, panel A). En las plántulas de 7 días se observa un contenido de fosfolípidos relativamente constante entre los tejidos y entre las variedades (figura 8.6). Este resultado puede explicarse en función de la relevancia de la composición de fosfolípidos en las membranas biológicas; es decir, los cambios en la composición de fosfolípidos que podrían esperarse estarían en clases de lípidos, más que en el contenido total.

Es posible que sí existan cambios en el contenido de algunas clases de fosfolípidos en compartimentos específicos, pero, de haberlos, el análisis grueso practicado aquí no resultó lo suficientemente sensible para detectarlos.

Finalmente, en relación al recambio de RNA, los resultados muestran que la variedad Canario es sensiblemente distinta a las demás en su comportamiento, lo que sí correlaciona con su baja tolerancia a las condiciones de carencia de Pi. Por otro lado, aunque la variedad Pinto Villa se parece más a la 22, 40 y 42, a juzgar por los tiempos de duplicación de la síntesis y degradación de RNA, las diferencias entre el comportamiento con o sin fosfato evidencia también una sensibilidad a esta condición, lo que explicaría el importante cambio de comportamiento. Esta variedad es también poco tolerante a la deficiencia, lo que podría explicarse si se considera que cuando se hace crecer en medio sin fosfato, su nivel de estado estacionario de RNA aumenta, lo que significa que consume más fosfato para esta actividad, posiblemente dejando a otros procesos con poco fosfato.

Las variedades 22, 40 y 42 resultan menos responsivas a la deficiencia de fosfato desde el punto de vista de la síntesis de RNA, lo que podría reflejar que en estas variedades el balance entre la síntesis y degradación de RNA estaba mejor adaptado para las condiciones de deficiencia y, por lo tanto, cuando las plantas se crecen bajo dicha condición los cambios que la planta requiere para poder crecer son menores en magnitud. En todos los casos, la ausencia de Pi se traduce en una reducción en el tiempo de duplicación de las síntesis, es decir, la síntesis es más rápida, mientras que la degradación se mantiene o aumenta.

Desafortunadamente, es posible que los cambios que sean de mayor significado se observen haciendo el análisis de mRNAs específicos, aspecto que no se trató en este trabajo, por lo que los resultados no son completamente concluyentes, aunque sí señalan que el comportamiento de las variedades es distinto en lo referente a la síntesis de RNA.

Desde luego, es claro que la adaptación a la deficiencia de Pi tiene que comprender varios aspectos y será la combinación adecuada de estas respuestas individuales la que permita a la planta sobrevivir.

10. CONCLUSIONES

A pesar de que el contenido de P del cotiledón no se ha movilizadado por completo a los 7 días de crecimiento de las plántulas de frijol, la adición de Pi a la solución de imbibición sí se traduce en mayor contenido de P en raíces e hipocotilos, lo que refleja que el P almacenado en la semilla no es suficiente para garantizar que el crecimiento temprano de la plántula alcance su máxima expresión.

La adición de Pi a la solución de imbibición de las semillas también afectó la redistribución del sulfato, lo que sólo puede explicarse en términos de diferencias en el crecimiento de los tejidos o en la manera en que el sulfato está siendo aprovechado, ya que la disponibilidad de azufre no fue modificada en estos tratamientos.

Las diferentes respuestas observadas en los tiempos de duplicación de síntesis y degradación de RNA en las variedades estudiadas frente a la presencia o ausencia de P en los medios de imbibición de las semillas, evidencia que estas variedades no son iguales en su comportamiento. Sin embargo, las medidas realizadas con la síntesis total de RNA son demasiado gruesas para revelar los cambios finos, lo que plantea la necesidad de continuar los experimentos a futuro para entender mejor el significado de los cambios aquí observados.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abelson P. H. (1999)**, Phosphate crisis, *Science*, 283: 2015.
- Allard, R.W. (1999)**, History of plant population genetics, *Ann. Rev. Genet.*, 33:1-27.
- Barrett, D.J., Richardson, A.E., Gifford, R.M. (1998)**, Elevated atmospheric CO₂ concentrations increase wheat root phosphatase from tomato. *Plant Physiol*, 125:728-737.
- Bewley, J.D., Black, M., (1994)**, Mobilization of Store Seed Reserves in: *Seed: Physiology of Development and Germination*, Plenum Press, New York, London. 7:338-341.
- Crawford N. M., Kahn M. L., Leustek T. Long S. R. (2000)**, Molecular Physiology of Mineral Nutrient Acquisition, Transport, and Utilization : Buchanan, B., Grusissem, W., Jones, R., Eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, 16: 824-829.
- Curtis H.(2000)**, *Biología Ediciones Médica Panamericana, España*, 35: 941-954, 36: 955-981, 37: 983-1006, 38: 1007-1036.
- Cruz F., Garcia L., Jimenez F., Moreno J., Gonzalez V.A. and Vázquez J.M. (1993)**, Natural and artificial, seed ageing in maize: germination an DNA synthesis, *Science Research*, 3 : 279-285.
- Davies JM, Poole RJ, Sanders D. (1993)**, The computed free energy change of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance of inorganic-pyrophosphate-driven reactions of inter-mediary metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1141: 29-36)
- Doetsch, R.N. Cook, T.M. (1973)**, *Introduction to Bacteria and their Ecobiology*, University Park Press, Baltimore.
- Essigmann, B., Guler, S., Narang, R.A., Linke, D., and Benning, C. (1998)**, Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(4): 1950-1995.
- Fuentes, J.L. (1989)**, *El Fósforo: El Suelo y Los Fertilizantes*, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 11:149-161.
- Holford, I.C.R. (1997)**, Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants, *Aust J. Soil Res.*, 35:227-239.
- Horst, W.J., Kamh, M., Jibrin, J.M. and Chud, V.O. (2001)**, Agronomic measures for increasing p availability to crops, *Plant and Soil*, 273 : 211-223.
- INEGI (2003)**, *El Sector Alimentario en México, Anuarios de datos estadísticos (1998 a 2003)*, Instituto Nacional de Geografía, estadística e informática-México. pp80-85 y 275. México D.F: 2003.

- INEGI (2003)**, Recursos Agrícolas del Trópico y Subtrópico Mexicano, Anuarios de datos estadísticos (1997 a 2003), Instituto Nacional de Geografía, estadística e informática-México. pp. 29-36. México D.F: 2003.
- Junk, A., Seeling, B., Gerke, J., (1993)**, Mobilization of different phosphate fractions in rhizosphere. *Plant Soil*, 155/156 : 91-94.
- Kochian, L. V. (2000)**, Molecular Physiology of Mineral Nutrient Acquisition, Transport, and Utilization : Buchanan, B., Grusissem, W., Jones, R., Eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, 23: 1205-1231.
- Leloir LF Cardini CE (1975)**, Characterization of phosphorous compounds by acid liability. IN : *Methods in enzymology Vol III section 155 pp 841-850* (colowick SP, Kapla NO eds) Academic Press Inc. Publisher, New York, US.
- Lenburg, M.E., O'Shea, E.K. (1996)**, Signaling phosphate starvation. *TIBS* 21:383-387.
- Liu, C., Muchhal, U.S., Uthappa, M., Kononowicz, A.K. Roghothama, K.G. (1998)**, Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol.* 116:91-99.
- Lynch J.P., Beebe S.E. (1995)**, Adaptations of beans (*Phaseolus vulgaris L*) to low phosphorus availability. *HortScience* 30:1165-71.
- Lynch J.P., (1997)**, Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol*, 109:7-13.
- Maddison, A. (1988)**, ¿Se ha descuidado a la agricultura? : Progreso y Política Económica en los Países en Vías de Desarrollo, V:128-162.
- Marschner H (1995)**, Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, San Diego, C.A.
- Miranda, C.S. Evolución de *Phaseolus vulgaris* y *Phaseolus coccineus* : Engleman H. (1991)**, Contribuciones al Conocimiento del Frijol (*Phaseolus*) en México, Colegio de Postgraduados, IEICA, Chapingo, México, 83-99.
- Morrison, R.T., and Boyd, R.N. (1990)**, Química Orgánica, Addison Wesley Longman, México.
- Murley, V.R., Theodorou, M.E., Plaxton, W.C. (1998)**, Phosphate starvation-inducible pyrophosphate-dependent phosphofructokinase occurs in plants whose roots do not form symbiotic associations with mycorrhizal fungi, *Physiology Plantarum*, 103(3) : 405-414.
- Murray D.R. (1984)**, Seed Physiology Vol. I, Academic Press, Australia, (4):139-163.
- Oshima Y. (1982)**, Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate. In: *The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: Metabolism and gene expression*. Strathern J, Jones EW, Broach JR(ed) CSHL Press. Pp 159-80.
- Othón, S.S. (2001)**, Composición Química : Química Almacenamiento e Industrialización de los Cereales. AGT Editor, México, 3: 68-73.

- Patterson, G.D., and Pappenhagen, J.M. (1978)**, Sulfur in: Colorimetric determination of Nonmetals. Procedimiento estándar AOAC-920.10 (Bolfz, D.F. and Howell, J.N. eds), Chemical analysis series vol. 8 (Elving, P.J. Winefordner, J.P., Kohhoff, I.M., series eds), John Wiley and Sons, New York, 12: 463-527.
- Plaxon, W.C. (1996)**, The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:185-214.
- Podestá, F.E. & Plaxon, W.C. (1994a)**, Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. I Developmental profiles for the activity concentration, and molecular structure of the pyrophosphate and ATP dependent phosphofructokinases, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta* 194:374-380.
- Podestá, F.E. & Plaxon, W.C. (1994a)**, Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. II. Properties of phosphoenolpyruvate carboxylase and cytosolic pyruvate kinase associated with the regulation of glycolysis and nitrogen assimilation. *Planta* 194:381-387.
- Raghothama, K.G. (1999)**, Phosphate acquisition, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50 : 665-695.
- Raghothama, K.G. (2000)**, Phosphate transport and signaling *Current Opinion in Plant Biology*, 3:182-187.
- Raghothama, K.G. (2001)**, Backseat driving?. Accessing phosphate beyond the rhizosphere depletion zone, *Trends in Plant Science*, 6(5) : 154-155.
- Rodríguez, R. and Black, M. (1993)**, Quantitative determination of triacylglycerols in plant tissues, *Photochemical Analysis*, 4 : 68-71.
- SAGAR (2003)**, Programas y Proyectos en Apoyo al Campo, Anuario de Programas de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (1997-2003)- México pp.233. México D.F. 2003.
- Schantzman, D.P., Reid, R.J., and Ayling, S.M. (1998)**, Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell, *Plant Physiol.*, 116: 477-473.
- Schlesinger, W.H., Tilman, D.G. (1997)**, Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences, *Ecol. Apply*, 7:737-720
- Siedow, J.N., and Day, D.A., (2000)**, Respiration and Photorespiration : Buchanan, B., Grusissem, W., Jones, R., Eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, 14: 676-728.
- Somerville, C., Browse, J., Joworski, J.G., Ohlrogge, J.B., (2000)**, Lipids: Buchanan, B., Grusissem, W., Jones, R., Eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, 10 : 456-526.
- Spremulli, L., (2000)**, Protein, Synthesis Assembly, and Degradation : Buchanan, B., Grusissem, W., Jones, R., Eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (2000), American Society of Plant Physiologists, 9: 412-454.

- Sugiura, M., Tekeda, Y., (2000)**, Nucleid Acids : Buchanan, B., Grusissem, W., Jones, R., Eds. Biochemistry and Molecular Biology of Plants (2000), American Society of Plant Physiologists, 6: 260-300.
- Thoedorou, M.E., Plaxton, W.C. (1993)**, Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation, *Plant Physiol*, 1.1:339-344.
- Valencia-Turcotte, L., y Rodríguez-Sotres, R. (2001)**, The treatment of purified maize oil bodies with organic solvents and exogenous diacylglycerol allows the detection and solubilization of diacylglycerol acyltransferase *Biochem. Biophys. Acta*. 1534(1):14-26
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A. Schindler D.W., Wiren V., Gazzarini S., Fromer W.R., (1997)**, Regulation on mineral nitrogen uptake in plants, *Plant Soil*, 196:194-199.
- Wrkoff, D.D., Grossman, A.R., Weeks, D.P., Usuda, H., Shimogawara, K. (1999)**, Psr 1, a nuclear localized protein that regulates phosphorus metabolism in *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:15336-185341.

12. ANEXOS

12.1 ANEXO 1

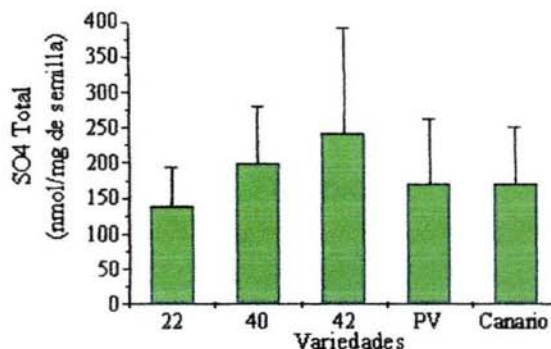


Figura 12.1 Contenido de sulfato total en semilla seca de las variedades estudiadas. El contenido de sulfato se cuantificó como se describió en materiales y métodos. El sulfato se expresa como nmol por mg de tejido seco.

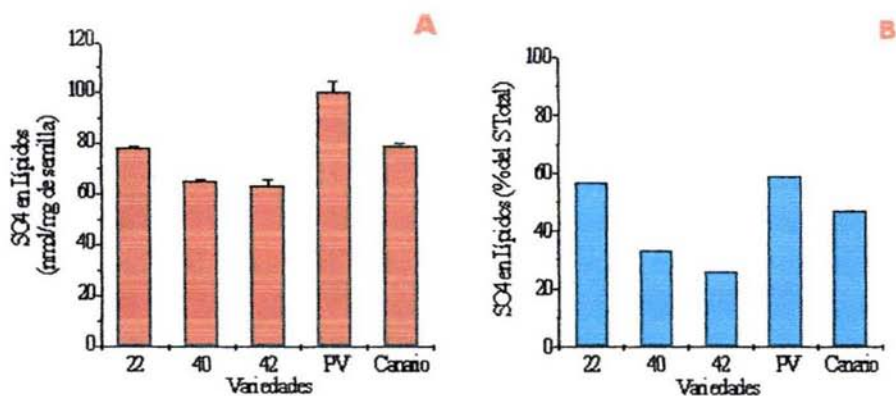


Figura 12.2. Contenido de sulfato en lípidos en semilla seca de las variedades estudiadas. El contenido de sulfato se cuantificó en la fracción soluble en cloroformo, como se describió en materiales y métodos y se expresa en nmol por mg de tejido seco (A), o como fracción porcentual del contenido de azufre total de las semillas (B).

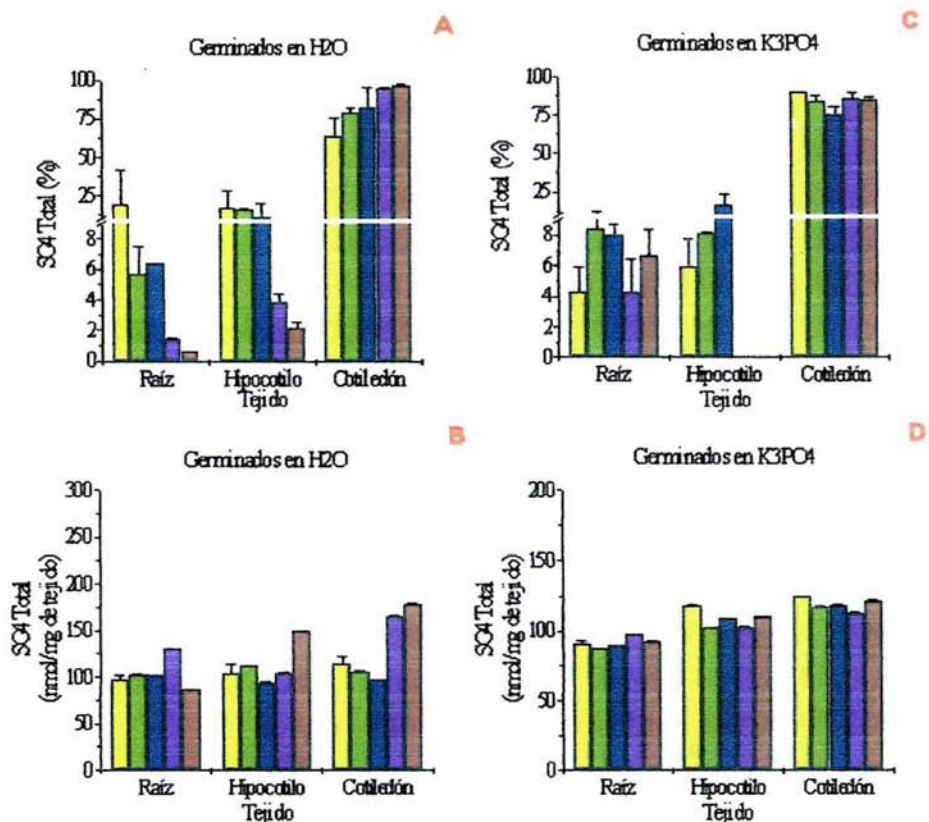


Figura 12.3 . Contenido total de sulfato, en raíz hipocotilo y cotiledón en las plántulas a los 7 días, en las variedades estudiadas, 22 (barras amarillas), 40 (barras amarillos oscuro), 42 (barras azules oscuro), Pinto villa (barras púrpura) y Canario (barras marrón). Las semillas se germinaron por 7 días a 25°C en la oscuridad sobre papel filtro humedecidos con agua (A y B), o en disolución de K_3PO_4 1 μ M (C y D). La extracción y cuantificación del sulfato se realizó según lo indicado en materiales y métodos. El sulfato se expresa como porcentaje del total en cada plántula (A y C) o en nmol por mg de tejido seco (B y D).

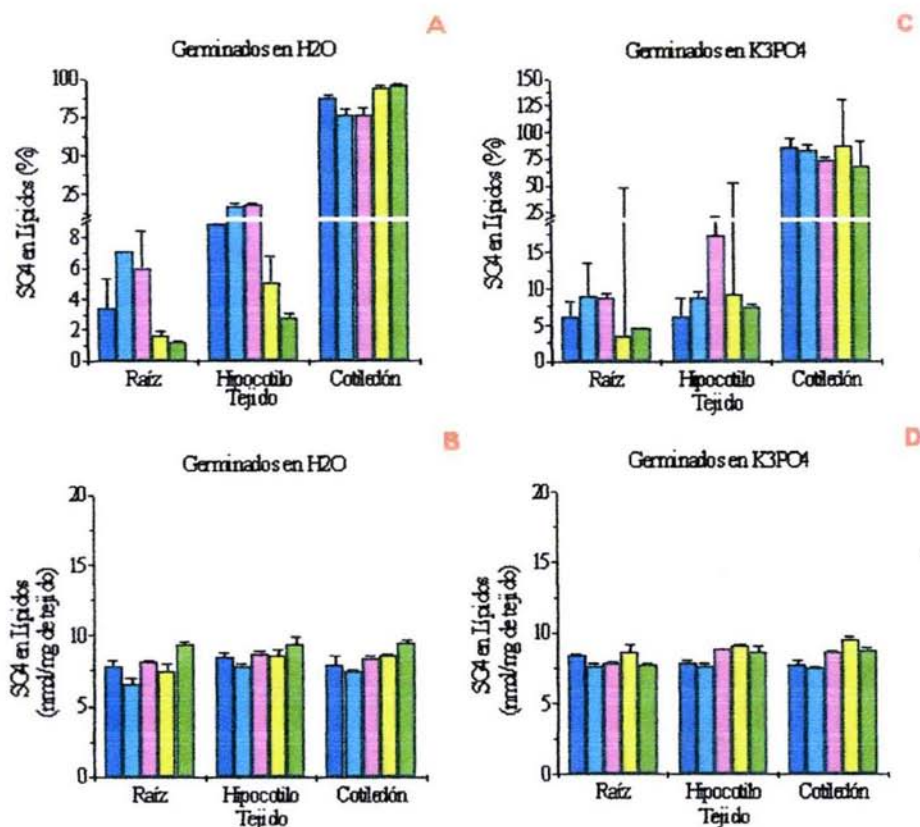


Figura 12.4. Contenido de sulfato en lípidos, en raíz hipocotilo y cotiledón en las plántulas a los 7 días, en las variedades estudiadas, 22 (barras azules ■), 40 (barras cian ■), 42 (barras rosas ■), Pinto villa (barras amarillas ■) y Canario (barras amarillas oscuras ■). Las semillas se germinaron por 7 días a 25°C en la oscuridad sobre papel filtro humedecidos con agua (A y B), o en disolución de K₃PO₄ 1μM (C y D). La extracción y cuantificación del sulfato se realizó según lo indicado en materiales y métodos. El sulfato se expresa como porcentaje del total en cada plántula (A y C) o en nmol por mg de tejido seco (B y D).

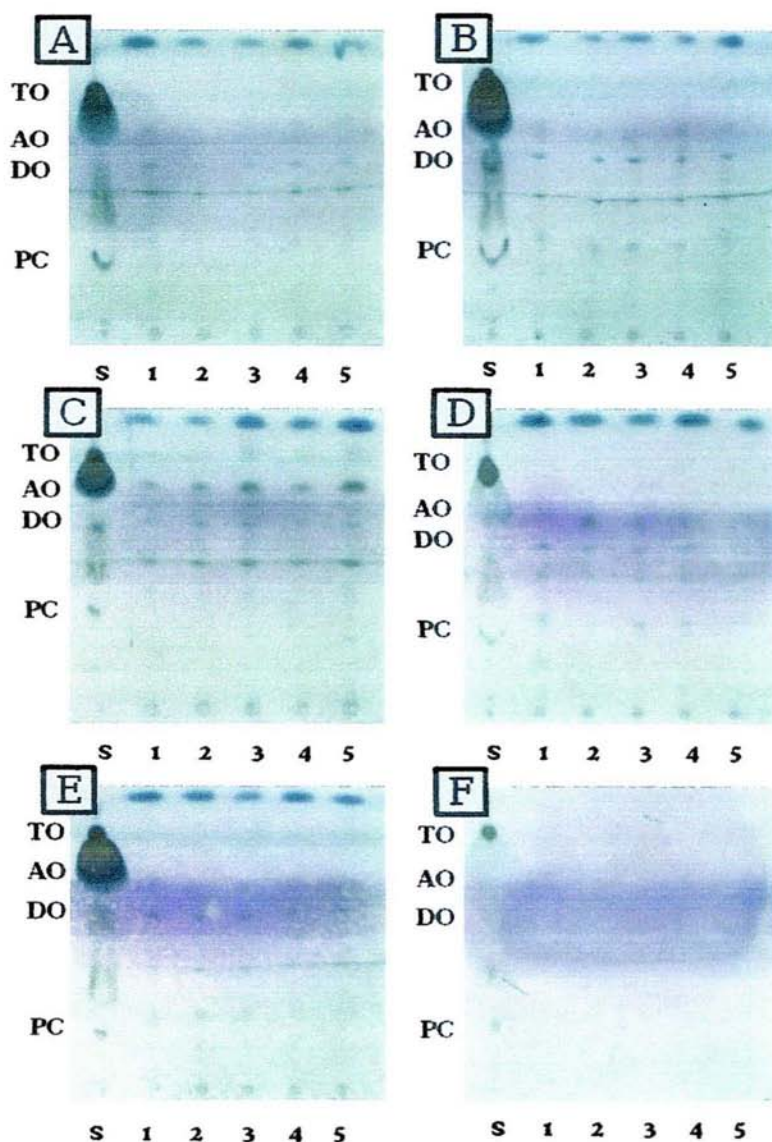


Figura 12.5. Separación de las diferentes clases de lípidos mediante cromatografía en capa fina de plántulas etioladas de frijol de la variedad estudiadas, 22 (1), 40 (2), 42 (3), PV (4) y Canario (5). Los lípidos se revelaron con Vanilina al 1% en H_2SO_4 (1:1). Lípidos extraídos de plántulas crecidas en agua son: raíz (panel B), hipocotilo (panel A) y el cotiledón (panel C); y los lípidos extraídos de plántulas crecidas con solución de fosfato $1 \mu M$ son: raíz (panel D), hipocotilo (panel E) y el cotiledón (panel D). Los estándares de referencia (S), fueron: Fosfatilcolina (PC), Dioléina (DO), Ácido Oleico (AO) y Trioleína (TO).

12.2 ANEXO 2

Equipo

Cajas petri
Papel filtro whatman 3MM
Papel parafil M
Campana de flujo laminar
Encubadora Lab-line
Tubos de ensayo de 13x100
Leofilizador
Pinzas de disección
Bisturí
Morteros
Balanza analítica Sartorius
Autoclave
Platos calientes Lab-line
Mecheros de buncen
Termómetro -10 a 150 °C
Pipetas graduadas
Espátulas
Espectrofotómetros Dupon
Tubos ependorff
Microfuga Herqueus
Placas de Silica Gel Aldrich
Plato caliente Nuova
Densitometro Bio-Rad
Matras Erlenmeyer Kimax
Centrífuga Becman J2-21
Tubos falcon
Filtros de vidrio Whatman 2.4 6HA
Estufa
Contador de Centello

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

12.3 ANEXO 3

Reactivos

Hipoclorito de sodio
Agua esteril y destilada
K₃PO₄ J.T. Baker
HNO₃ J.T. Baker
Alcohol anhidro grado absoluto J.T. Baker
HCl J.T. Baker
H₂SO₄ J.T. Baker
Cloroformo J.T. Baker
NaCl J.T. Baker
ZnSO₄ J.T. Baker
Ácido Acetido J.T. Baker
Hexano J.T. Baker
Dietil eter J.T. Baker
TCA Ácido tricloroacetico J.T. Baker
Molibdato de amonio Sigma
Aceite de oliva Sigma
Fosfatidilcolina Sigma
Ácido oleico Sigma
Dioloina Sigma
Metanol Sigma
Vainillina Sigma
Uridina Sigma
Urea Sigma
Tris (Hidroximetil-aminometano) Sigma
Ácido ascórbico Merck
HEPES (N-{2-Hidroximetil}piperi-zina-N-‘{ácido 2-etanosulfonico}) Merck
Acetona Merck
EDTA (ácido dinitrotetraacetico) Merck
SDS Merck
B-ME
Mg(NO₃)₂ Mallinckrodt
Ácido perclorico Mallinckrodt
Uridina 5-[H³⁺] Perkin Elmer