

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**METABOLISMO DE CARBONO EN GENOTIPOS
DE FRIJOL (*Phaseolus vulgaris* L.)
CONTRASTANTES EN ADAPTACIÓN A LA
DEFICIENCIA DE FOSFATO**

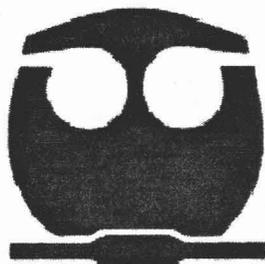
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

LILIA ANGÉLICA BERNAL GRACIDA

Tutor: DR. ELEAZAR MARTÍNEZ BARAJAS



México, D. F.

Marzo 2005

m342589



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 de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Eleazar Martínez Barajas, en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Eleazar Martínez Barajas	Facultad de Química, UNAM
Dra. Marina Gavilanes Ruíz	Facultad de Química, UNAM
Dr. Miguel Lara Flores	Centro de Fijación de Nitrógeno, UNAM

Agradezco al Dr. Jorge Acosta las semillas de frijol proporcionadas para la elaboración de este estudio y la asesoría técnica del M en C Raúl Lugo, coordinador de la Especialidad en Calidad de la Universidad La Salle, para la realización del análisis estadístico.

Este proyecto fue apoyado parcialmente por PAIP 6290-14 y por DGAPA IN201101.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Estela Sánchez de Jiménez	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Diego González Halphen	Instituto de Fisiología, UNAM
Secretario	Dra. Marina Gavilanes Ruíz	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dra. Patricia León Mejía	Instituto de Biotecnología, UNAM
Suplente	Dr. Felipe Cruz García	Facultad de Química, UNAM

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente al Dr. Eleazar Martínez por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su asesoría y por su apoyo cordial durante el transcurso de los estudios de la maestría.

A la Dra. Marina Gavilanes y al Dr. Miguel Lara por sus sugerencias y orientación que contribuyeron con su actitud siempre profesional y amable, a estimular mi entusiasmo en esta investigación.

A los miembros del Jurado por la revisión de la tesis.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM, por las facilidades otorgadas para realizar las tareas y actividades que ha demandado este proyecto.

Al Dr. Felipe Cruz por su disposición, apoyo, su crítica desinteresada y claro, por su amistad.

A Félix por su colaboración amistosa en la realización de todas las tareas relacionadas con el cultivo de las plantas de frijol.

A Daniel, mi compañero de laboratorio y amigo, gracias por mostrarme que siempre puedo contar contigo, por compartir los momentos divertidos y hacer más ligeros los que fueron difíciles.

A Javier Andrés, por tu gran calor humano y por la alegría que has compartido conmigo a cada momento, gracias por tu amistad.

A Selene por su cálida amistad y a Ruth por su apoyo y entusiasmo.

Por su apoyo a Paty Coello, Carlos Mújica, Lilia, Fátima, Caty, Martín, Andrea, Gretel y Carmen.

A Lety García porque con su buena disposición hace más sencillos los innumerables trámites.

A CONACYT por la beca otorgada.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. ANTECEDENTES	
II.1 Frijol	5
II.2 Fósforo	6
II.3 Deficiencia de fosfato	7
II.3.1 Cambios morfológicos y estructurales asociados a la deficiencia en fosfato	8
II.3.2 Cambios asociados a la deficiencia de fosfato que podrían ayudar a mejorar la eficiencia de la incorporación de fosfato	11
II.3.3 Cambios asociados a la deficiencia de fosfato dirigidos a incrementar la eficiencia en el uso del fosfato	14
II.3.4 Otros cambios	17
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
III.1 Hipótesis	19
III.2 Objetivo general	19
III.3 Objetivos particulares	19
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	
IV.1 Material biológico	20
IV.2 Determinación de biomasa	21
IV.3 Ensayos enzimáticos	22
IV.4 Determinación de proteína	24
IV.5 Determinación de fosfato	24
IV.6 Determinación de carbohidratos	25
IV.7 Asimilación de carbono y distribución de fotosintatos	26
IV.8 Síntesis y degradación de almidón	26
IV.8 Purificación de gránulos de almidón	27
IV.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS	27

IV.11 Análisis estadístico	28
V. RESULTADOS	
V.1 Selección de genotipos contrastantes	29
V.2 Cuantificación de fosfato en semillas de frijol	31
V.3 Cuantificación de fosfato soluble y total en plantas de frijol	32
V.4 Acumulación de fotosintatos	33
V.5 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la asimilación de carbono y distribución de fotosintatos	36
V.6 Acumulación de almidón en hojas maduras del genotipo C60	37
V.7 Efecto del fosfato sobre la actividad enzimática involucrada en la degradación de sacarosa	40
V.8 Mecanismos adaptativos: enzimas del metabolismo de fosfoenolpiruvato en hojas y raíces	42
VI DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
VI.1 Selección de genotipos contrastantes	45
VI.2 Contenido de fósforo total y fósforo soluble	46
VI.3 Acumulación de fotosintatos	47
VI.4 Degradación de sacarosa	49
VI.5 Recirculación de fosfato	50
VII. CONCLUSIONES	52
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regulación de la arquitectura radical por la disponibilidad de fósforo	10
Figura 2. Esquema del mecanismo de liberación de Pi mediado por ácidos orgánicos	13
Figura 3. Glicólisis en plantas	19
Figura 4. Planta de frijol de tres semanas	22
Figura 5. Plantas de frijol genotipos C60 y MAR1	30
Figura 6. Comparación de peso seco	30
Figura 7. Comparación de la relación raíz:parte aérea de plantas de tres semanas	31
Figura 8. Comparación del peso seco de dos genotipos de frijol	31
Figura 9. Contenido de carbohidratos en hojas maduras	34
Figura 10. Contenido de carbohidratos en hojas jóvenes	35
Figura 11. Contenido de carbohidratos en raíces	36
Figura 12. Distribución de ^{14}C en carbohidratos de hojas maduras de frijol, genotipo C60	38
Figura 13. Contenido de ^{14}C en almidón	38
Figura 14. Proteínas asociadas a gránulos de almidón	39
Figura 15. Actividad de la enzima sacarosa sintasa en diferentes tejidos	40
Figura 16. Cambios en la actividad de las enzimas invertasa soluble ácida (ISA), Invertasa neutra (IN), invertasa de pared (IP)	41
Figura 17. Cambios en el metabolismo del piruvato en deficiencia de fosfato	42
Figura 18. Actividad enzimática en hojas maduras	43
Figura 19. Actividad enzimática en raíces	44

RESUMEN

Las plantas cultivadas en suelos con bajos niveles de fosfato (Pi) generan adaptaciones que les permiten continuar desarrollándose, a través de cambios dirigidos a mejorar su habilidad para incrementar la toma de Pi y/o su capacidad para ser más eficientes en el uso del fósforo (P). La manera en que las plantas responden es variable y el éxito para sobrevivir a esta deficiencia dependerá de su capacidad para utilizar alguna o varias adaptaciones metabólicas. Los objetivos de este trabajo fueron (1) identificar genotipos de frijol que diferían en el grado de susceptibilidad a la deficiencia de Pi y (2) comparar el comportamiento de su metabolismo de carbono en escasez de Pi. Todos los genotipos estudiados fueron afectados por la deficiencia de Pi; sin embargo, el nivel de afectación fue variable y se seleccionaron los genotipos Canario 60 (C60) y MAR1 con mayor y menor susceptibilidad a la deficiencia de Pi, respectivamente.

Se cuantificó el contenido de P soluble y total en hojas y raíces en los genotipos seleccionados y cultivados por tres semanas en condiciones de deficiencia de Pi. En las hojas la cantidad de P total se redujo en aproximadamente 50%, mientras que el Pi soluble presentó una disminución variable dependiendo del genotipo. En las raíces el P total se redujo entre 50-70%, siendo mucho menor la reducción en el Pi soluble (15-40%). Lo cual hizo que, la relación de P soluble/P total se viera incrementada de manera relevante en los genotipos estudiados.

El efecto de la deficiencia de Pi sobre los niveles de sacarosa, almidón, fructosa y glucosa en hojas maduras, hojas jóvenes y raíces también fue analizado. Los resultados indican que en condiciones de deficiencia, las hojas maduras de los genotipos C60 y MAR1 acumularon glucosa, fructosa y almidón. Las hojas jóvenes de las plantas C60 presentaron cambios poco relevantes en la acumulación de fotosintatos, mientras que el genotipo MAR1 acumuló almidón. En las raíces del genotipo C60 se incrementaron los niveles de sacarosa, glucosa y fructosa, mientras que en el genotipo MAR1 se observaron pocos cambios.

Con el objeto de definir si la acumulación de almidón en hojas maduras era el resultado de su mayor síntesis o de su menor degradación, se realizaron experimentos en los que se encontró que la deficiencia de Pi no afectaba la capacidad de asimilación de CO₂ ni modificaba la distribución del CO₂ fijado entre azúcares solubles y almidón. Estos resultados sugieren que la acumulación de almidón que se observó en condiciones de deficiencia de Pi es el resultado de una menor degradación.

Para estudiar el efecto de la deficiencia de Pi sobre el reciclamiento de Pi, se midió la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo de piruvato: fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), fosfoenol piruvato fosfatasa (PEPP) y piruvato cinasa (PK). La actividad de PEPC en hojas de las plantas C60 disminuyó en 60% y en el genotipo MAR1 se incrementó en un 71.4%, en raíces los incrementos fueron de 46% y 120% respectivamente. La actividad de PEPP en hojas de frijol se vio disminuida y en raíces no presentó cambio. En las hojas de plantas C60 y MAR1, la actividad de PK no mostró cambios atribuibles a la deficiencia de Pi; en raíces del genotipo C60, la actividad se mantuvo constante, sufriendo una disminución considerable las raíces del genotipo MAR1 (77%).

También se realizaron experimentos tendientes a definir el efecto de la deficiencia de Pi sobre la exportación de fotosintatos y la distribución del carbono en los tejidos de demanda. No fue posible definir con exactitud la cantidad de carbono translocado a los tejidos de demanda, sin embargo, para evaluar desde otro ángulo el efecto de la deficiencia de Pi sobre la distribución de fotosintatos, se midió la actividad de las enzimas sacarosa sintasa (SuSy) e invertasas solubles y de pared, por considerarse factores determinantes de la fuerza de demanda. La actividad de SuSy en las hojas maduras, no se vio afectada por la deficiencia de Pi, sin embargo se encontró que en las hojas jóvenes su actividad se incrementó 5.8 veces en el genotipo MAR1 y 9 veces en las plantas C60. Las raíces de las plantas que crecieron en escasez de Pi sufrieron un decremento en la actividad de la enzima SuSy (66% en MAR1 y 24% en C60).

La actividad de la invertasa soluble ácida prácticamente no presentó cambios en las plantas de frijol cultivadas en deficiencia de Pi. Por otro lado, se encontró que en respuesta a la deficiencia de Pi, la actividad de la invertasa neutra se duplicó en las hojas jóvenes del genotipo C60 y se incrementó en un 30% en las hojas de la variedad MAR1. La actividad en hojas maduras y raíces no presentó cambios relevantes. De manera similar la actividad de la invertasa de pared se incrementó 10 veces en las hojas jóvenes de las plantas C60 y 3 veces en MAR1, sin presentar cambios relevantes en los otros tejidos.

I. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el crecimiento y metabolismo de las plantas. Su importancia radica en que es un componente clave de moléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos, ATP, y regula la actividad de diversas enzimas en diferentes vías metabólicas (Theodorou y Plaxton, 1993).

La cantidad de P total en el suelo puede llegar a ser muy alta; sin embargo, el fosfato inorgánico (Pi), la forma de P asimilable por las plantas, es con frecuencia limitante. La concentración de fosfato en el suelo rara vez excede 10 μM , por lo que las plantas tienen que desarrollar mecanismos alternativos para hacer disponibles otras fuentes de P (Bieliski, 1973).

En México uno de los grandes problemas de las tierras cultivables es la baja proporción de P asimilable y uno de los cultivos que se ve fuertemente afectado es el del frijol, el cual forma parte esencial de la dieta de la población mexicana. La producción de frijol en países en desarrollo normalmente se lleva a cabo en tierras poco productivas. En nuestro país incrementar la superficie cultivable no es una alternativa y tampoco parece probable que este cultivo pueda competir con otros para ocupar tierras de mayor calidad. Por lo que la única forma de aumentar su producción es incrementar el rendimiento por planta. Se ha estimado que el promedio del rendimiento de los cultivos en países en desarrollo es de menos del 20% de su potencial (Yan *et al.*, 1995). Lo cual sugiere que hay amplias posibilidades de lograr mejoras sustanciales en este aspecto.

En lo que a la nutrición con P se refiere, la solución más utilizada en muchos sistemas agrícolas es el uso de fertilizantes. Sin embargo, dada la naturaleza química del Pi, éste inmediatamente reacciona con los componentes del suelo y se convierte en formas orgánicas e inorgánicas no asimilables. Además de que por su alto costo, el uso de fertilizantes no es una práctica que esté al alcance de todos los agricultores (Yan *et al.*, 1995).

Las plantas han desarrollado adaptaciones morfológicas y enzimáticas para desarrollarse en suelos con bajos niveles de fosfato y el éxito que tengan para sobrevivir a esta deficiencia, depende de su capacidad para utilizar alguna o varias de estas adaptaciones metabólicas.

En el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se ha reportado que la variabilidad genética está involucrada en la respuesta a la deficiencia de fosfato (Lynch y Beebe, 1995); sin embargo, se conoce poco acerca de las bases moleculares y bioquímicas de esas

diferencias. La selección de genotipos de frijol más eficientes para crecer en suelos con deficiencia de Pi puede ser una alternativa para incrementar la producción evitando el uso de fertilizantes. México es uno de los centros de origen de frijol con una diversidad genética muy grande (Beebe *et al.*, 2000), la búsqueda de genotipos con bajo grado de susceptibilidad a la deficiencia de Pi sería una buena manera de hacer uso de este valioso recurso.

La respuesta a la deficiencia de Pi es un problema complejo en el que participan diferentes mecanismos. En este trabajo se evaluó una colección amplia de genotipos de frijol, con respecto a su respuesta a la deficiencia de P, analizando distintos parámetros a partir de los cuales se hicieron algunos estudios para poner de manifiesto las estrategias bioquímicas y fisiológicas que pudieran estar utilizando los genotipos más contrastantes de los que fueron analizados.

II. ANTECEDENTES

II.1 FRIJOL

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L) es miembro de la familia Fabaceae, tribu Phaseoleae, subfamilia Papilionoideae. Es una planta anual de crecimiento tanto determinado como indeterminado. Las plantas de crecimiento determinado pueden tener de 3 a 7 hojas trifoliadas en el tallo principal antes del doble racimo terminal. Las plantas de hábito de crecimiento indeterminado pueden presentar crecimiento vertical con tallo erecto y ramas, frecuentemente sin guía; crecimiento en arbusto con tallo débil y postrado, numerosas ramas, con guía y habilidad variable para trepar.

La germinación de *P. vulgaris* es epigea y requiere de 5 a 7 días a 29 °C. El tiempo de floración depende del cultivar, temperatura y fotoperíodo, normalmente se inicia de 28 a 42 días después del transplante; sin embargo, las variedades trepadoras pueden florecer mucho después. El período de floración en las plantas de crecimiento determinado está concentrado en un corto período (5-6 días), mientras que los cultivares indeterminados producen nodos adicionales después de la floración inicial, extendiéndose el tiempo a 15-30 días (Graham, 1997).

Una nutrición adecuada de fósforo es esencial para un crecimiento vigoroso y una buena fijación de nitrógeno (Graham y Rosas, 1979). Aunque estudios recientes han mostrado líneas de *P. vulgaris* que presentan tolerancia a bajos niveles de fósforo en el suelo y que tienen alta capacidad para fijar nitrógeno (Graham, 2002).

Los nutriólogos califican a la semilla de frijol como un alimento de buena calidad nutricional debido a su alto contenido proteínico y a los elevados niveles de fibra y carbohidratos complejos, además de que una taza de frijol provee de por lo menos la mitad de la dosis de ácido fólico recomendada por el Departamento de Agricultura de EEUU y proporciona 25-30% de los niveles recomendados de hierro, 25% de los requerimientos diarios de magnesio y cobre, así como 15% de potasio y zinc (CIAT, 2001).

La cosecha global anual de frijol es de 18 millones de toneladas y tiene un valor estimado de 11 billones de dólares (CIAT, 2001).

II.2 FÓSFORO

El P es un macronutriente esencial para el crecimiento y el desarrollo de los organismos vivos. Participa en funciones biológicas diversas y una de ellas es como elemento estructural en los ácidos nucleicos y los fosfolípidos. De hecho su función más prominente es como componente estructural en los ácidos nucleicos. Tanto en el ácido desoxirribonucleico (DNA) como en el ácido ribonucleico (RNA), el Pi forma un puente entre las unidades de nucleósidos para así formar macromoléculas, es responsable del carácter ácido de estas moléculas así como de su alta concentración aniónica (Marschner, 1995). Como fosfolípido forma parte de las membranas celulares y por su carácter polar interacciona con la fase acuosa mientras que la parte hidrofóbica de las cadenas de los ácidos grasos se orienta hacia adentro y de esta manera se genera una estructura anfipática que evita la difusión de solutos entre compartimentos celulares y contribuye a la organización celular (Taiz y Zeiger, 1998). El P es también parte de la maquinaria metabólica de las células. Los ésteres de Pi y los enlaces P-P de alta energía (ATP, GTP), son esenciales en la transferencia de energía. Los primeros son intermediarios en vías metabólicas de biosíntesis y degradación; su función y formación están directamente relacionadas al metabolismo energético de las células. La fosforilación de enzimas es un mecanismo mediante el cual los ésteres de fosfato modulan la actividad de enzimas y la fosforilación de proteínas es considerada como un factor clave en la transducción de señales (Marschner, 1995).

El P es tomado por las plantas en su forma diprótica, $H_2PO_4^-$, llamada ortofosfato (Schachtman, *et al.*, 1998). La concentración de P asimilable en el suelo (fosfato), rara vez excede $10 \mu M$, por lo que las plantas tienen que buscar mecanismos alternativos para solubilizar el P y aumentar los niveles de Pi (Bielecki, 1973).

En el suelo, el ortofosfato se mueve por difusión hacia la raíz (Marschner, 1995) y es tomado por las raíces y por los pelos radicales por medio de las células rizodérmicas (Rausch y Bucher, 2002), de aquí el Pi tiene las siguientes opciones: (i) puede formar parte de la poza metabólica (citoplasma + organelos), donde su principal función es incorporarse en compuestos orgánicos a través de un enlace anhídrido éster como el del grupo Pi del ATP (Bieliski y Ferguson, 1983); (ii) una pequeña porción puede pasar a la biosíntesis de lípidos fosforilados, DNA y RNA (Bieliski y Ferguson, 1983); (iii) cantidades

variables de Pi se pierden a través del eflujo, especialmente en condiciones de alto Pi, actividad que se ve disminuida en deficiencia de Pi (Mimura, 1999); (iv) puede ser almacenado en la vacuola para regular la homeostasis de Pi en la célula (Bieliski y Ferguson, 1983; Mimura, 1999); o bien (v) ser transportado simplásmicamente a las células del parénquima y subsecuentemente secretado en el xilema para su translocación a larga distancia a los órganos de la parte aérea donde podría tener cualquiera de las opciones de uso anteriormente mencionadas (Bieliski y Ferguson, 1983).

Al P se le ha descrito como un elemento móvil y se ha sugerido que el Pi es la principal forma en que el fósforo se mueve en el floema (Rausch y Bucher, 2002); sin embargo, también han sido encontrados en el floema compuestos orgánicos como nucleótidos (incluyendo el ATP) y hexosas fosfato (Bieliski, 1969; Rausch y Bucher, 2002). En plantas que crecen en condiciones de suficiencia de Pi, la mayor parte del Pi absorbido por la raíz es transportada a las hojas jóvenes a través del floema. La movilización y retranslocación del Pi de las hojas viejas a la raíz vía el floema, excede los requerimientos de la raíz cuando hay suficiente Pi, por lo que en la raíz puede seguramente presentarse la transferencia de Pi del floema al xilema para mandar de regreso el Pi hacia la parte aérea (Jeschke *et al.*, 1997). En plantas que crecen en condiciones de deficiencia de Pi, el suministro restringido de Pi desde las raíces a los tallos vía el xilema, es suplementado con un incremento en su movilización de las hojas viejas a las hojas jóvenes y a las raíces en crecimiento (Jeschke *et al.*, 1997).

II.3 DEFICIENCIA DE FOSFATO

Después del nitrógeno, el P es el segundo macronutriente que limita el crecimiento de las plantas (Schachtman *et al.*, 1998). El requerimiento de P durante el crecimiento en estado vegetativo óptimo se encuentra en el rango de 0.2% a 0.5% (Schachtman *et al.*, 1998, Marschner, 1995) de la materia seca de la planta. En contenidos mayores al 1% de la materia seca, el Pi se vuelve tóxico.

Aunque es un macronutriente para las plantas, su disponibilidad en muchos suelos está muy limitada, aún más que algunos micronutrientes que son más abundantes (Bieliski, 1973). La cantidad de P en el suelo puede llegar a ser muy alta; sin embargo,

normalmente está presente en formas no disponibles para las plantas. En suelos ácidos el P inorgánico se encuentra preferentemente en forma de fosfatos de hierro y aluminio, mientras que en suelos alcalinos la principal forma es el fosfato de calcio (Narang *et al.*, 2000) y todos estos compuestos son escasamente solubles por lo que su disponibilidad es limitada. El P orgánico representa entre el 20 y el 80% del P que se encuentra en el suelo y debe mineralizarse a la forma inorgánica para ser asimilado por las plantas. En esta fracción el ácido fítico (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfato) es el componente que se encuentra en mayor cantidad (Jungk *et al.*, 1993, Bentsink *et al.*, 2003). El P es considerado como el nutrimento más limitante del crecimiento de las leguminosas en las regiones tropicales y subtropicales (Raghothama, 1999). Reportes del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), señalan que el 50% de las áreas destinadas al cultivo de frijol en Latinoamérica presentan niveles bajos de Pi y esta misma situación se presenta en Africa (CIAT, 1987).

Una solución parcial que se ha aplicado en muchos sistemas agrícolas para tratar de resolver el problema de la deficiencia de Pi es el uso de fertilizantes. Sin embargo, dada la naturaleza química del Pi, el fertilizante aplicado reacciona inmediatamente con los componentes del suelo y se convierte en formas orgánicas e inorgánicas no asimilables (Holford, 1997), por lo que los agricultores se ven obligados a aplicar cantidades muy altas de fertilizante. Con la velocidad de consumo actual, los recursos no renovables de roca Pi se verán agotados en 60-90 años (Runge-Metzger, 1995).

II.3.1 CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y ESTRUCTURALES ASOCIADOS A LA DEFICIENCIA EN Pi

La limitación en la disponibilidad de Pi genera una serie de cambios fisiológicos y genéticos algunos de los cuales probablemente ayuden a incrementar la supervivencia de las plantas bajo estas condiciones.

Cuando una planta sufre de deficiencia en Pi, una de las respuestas más notorias es la reducción en el crecimiento de la parte aérea (tallos, hojas, yemas axilares, etc.), se ve disminuido el número (Lynch *et al.*, 1991) y la expansión de las hojas (Marschner, 1995). No se sabe mucho en relación a los eventos fisiológicos responsables de este crecimiento restringido, una disminución en el número de hojas implica cambios en la

velocidad de emergencia de las hojas y en la actividad del meristemo apical de los tallos; mientras que la reducción en el tamaño de las hojas puede estar relacionada con cambios en la división celular ó en la expansión de las hojas, ó en ambas (Chiera *et al.*, 2002). El contenido de clorofila por unidad de área foliar no se ve afectado, por lo que aunado al hecho de que el crecimiento es inhibido da como resultado que las hojas de las plantas que crecieron en condiciones deficientes son de un color verde más oscuro (Chiera *et al.*, 2002).

A diferencia de la parte aérea de la planta, el crecimiento de la raíz se ve menos afectado en plantas con déficit de P; sin embargo, se observan cambios en su morfología y estructura (figura 1), se producen raíces basales más superficiales, se incrementa el número de raíces adventicias, disminuye la ramificación de raíces laterales y aumenta la densidad y el tamaño de los pelos radicales, en conjunto estas modificaciones pueden ser importantes para maximizar la exploración de las capas superiores del suelo, (Lynch, 1995; Schachtman *et al.*, 1998; Lynch y Brown 2001; Fragoso 2004). En el caso de *Arabidopsis* como en otras especies vegetales, la modificación más relevante es la multiplicación de pelos radicales, (Schachtman *et al.*, 1998; Schmidt, 2001). Estos son extensiones de las células epidérmicas y juegan un papel importante incrementando el contacto de la raíz con el suelo donde crece y por lo mismo, aumenta el volumen de suelo explorado. Se ha estimado que del P tomado por las raíces del suelo, el 63% es transportado vía los pelos radicales (Grotz y Guerinot, 2002). Es más fácil y rápido que un pelo radical crezca a que una raíz se ramifique, por lo tanto el crecimiento de los pelos radicales es la respuesta morfológica más inmediata que las raíces tienen ante las condiciones ambientales cambiantes (Bates y Lynch 2000a). Dentro de las diferentes especies vegetales existe una considerable variabilidad genética, presentándose diferencias en relación a la respuesta de los pelos radicales ante el estrés nutricional, característica que habla de una plasticidad en la raíz para adquirir nutrimentos esenciales. En otras especies como *Lupinus albus*, la morfología y anatomía de la raíz se modifica con otro patrón, se desarrollan raíces proteoides, las cuales son raíces laterales primarias con grupos de raíces secundarias y terciarias (Watt y Evans, 1999), especializadas en la exudación de ácidos orgánicos que pueden solubilizar el P de los iones metálicos que lo inmovilizan (Neumann *et al.*, 1999). En *Phaseolus vulgaris*, algunos cambios que han sido observados en respuesta a la deficiencia de Pi se ubican a nivel de las células corticales de la raíz, las cuales, después de estar sometidas a tratamientos deficientes en Pi

presentan alteraciones en sus organelos, como grandes vacuolas, invaginaciones del plasmalema y mitocondrias amorfas. Al estudiar la estructura de la zona meristemática se observó que la limitación de P en el medio inhibe la división celular (Wanke *et al.*, 1998). Los efectos de la deficiencia de P son dependientes de la etapa de desarrollo de las plantas. En etapas avanzadas la formación de órganos reproductivos se retarda, el número de flores disminuye, y se ve restringida la formación de semillas debido a la senescencia prematura de las hojas (Marschner, 1995). El resultado final es que las plantas crecen más lentamente y acumulan menos biomasa (Bates y Lynch, 2000b).

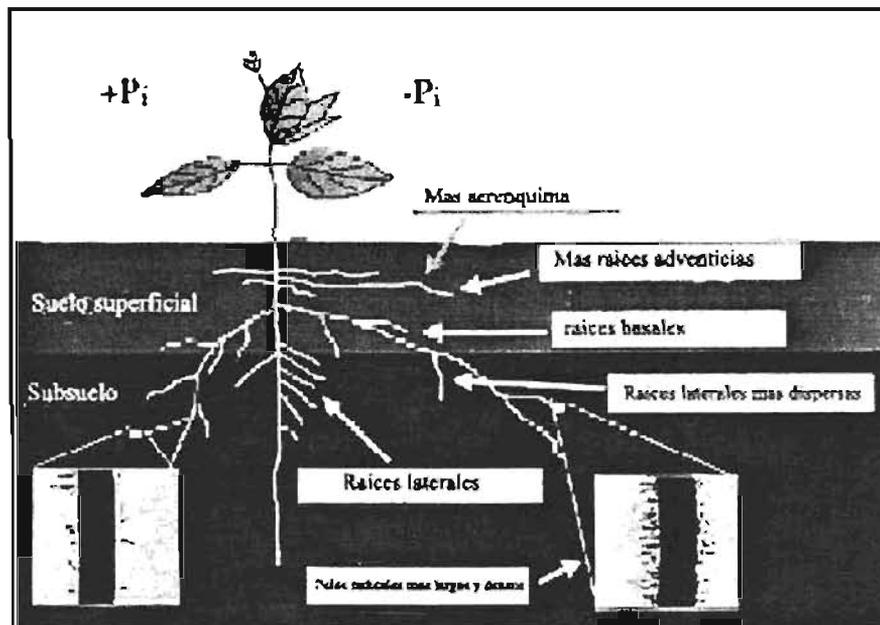


Figura 1. Regulación de la arquitectura radical por la disponibilidad de fósforo. Tomado de Lynch y Brown 2001.

II.3.2 CAMBIOS ASOCIADOS A LA DEFICIENCIA DE Pi QUE PODRÍAN AYUDAR A MEJORAR LA EFICIENCIA EN LA INCORPORACIÓN DE Pi

▪ TRANSPORTE

Debido a la baja velocidad de difusión del Pi en el suelo (10^{-12} a 10^{-15} $m^2 s^{-1}$), la alta velocidad de toma de Pi en las plantas superiores genera una zona agotada de Pi alrededor de las raíces (Marschner, 1995; Jungk, 2001). Por otro lado, la incorporación de Pi por las células representa un problema para las plantas: la concentración de Pi en el suelo rara vez excede los niveles de 10 μ M (Marschner, 1995), mientras que la concentración intracelular en muchas células vegetales es 10 000 veces superior (1-10 mM; Bielecki, 1973), por lo que en condiciones fisiológicas normales la planta tiene que adquirir el Pi en contra de un enorme gradiente de concentración (Bielecki y Ferguson, 1983). Además tiene que vencer el potencial de membrana negativo característico de las células vegetales (Rausch y Bucher, 2002). La combinación de estos factores ha seleccionado un transporte que requiere energía para que el Pi atraviese la membrana plasmática (Bielecki y Ferguson, 1983). Actualmente se tienen evidencias de que la incorporación de Pi por las plantas se realiza mediante transportadores que funcionan con un mecanismo de co-transporte y que la energía requerida es proporcionada por un gradiente de protones generado por la enzima ATPasa- H^+ de la membrana plasmática (Muchhal *et al.*, 1996; Ulrich-Eberius *et al.*, 1984). La caracterización cinética del sistema de incorporación de Pi tanto en plantas completas (Ulrich-Eberius *et al.*, 1984), como en cultivo de protoplastos (Furihata *et al.*, 1992), indica que existen transportadores de alta y baja afinidad. Los de alta afinidad operan cuando la concentración de Pi en el medio es baja (en el rango micromolar), mientras que los de baja afinidad operan a altas concentraciones de Pi (niveles milimolares). En cultivos celulares de *Catharantus roseus* los transportadores de baja afinidad se expresan constitutivamente, mientras que los de alta afinidad se regulan por los niveles de Pi. Cuando las células que están creciendo en un medio rico en Pi, son cambiadas a un medio sin Pi, la incorporación de alta afinidad se incrementa significativamente dentro de los dos días posteriores a la falta de Pi. Este aumento parece deberse en parte a la síntesis *de novo* de estos transportadores (Liu *et al.*, 1998). Respuestas similares se observaron en raíces de *Sesbania rostrata* (Aono *et al.*, 2001) y de cebada (Drew *et al.*, 1984). En *Arabidopsis thaliana* se han identificado nueve genes con alta similitud a aquéllos que codifican para transportadores de alta

afinidad. Este número tan grande refleja la complejidad del proceso, ya que el Pi debe movilizarse por toda la planta una vez que fue asimilado por la raíz. Algunas evidencias muestran que la mayoría de estos transportadores se expresan en los pelos radicales y en general en el sistema radical (Smith *et al.*, 2000). Sin embargo, estudios recientes muestran que en condiciones de deficiencia de Pi, por lo menos dos de estos genes se expresan en órganos florales, sugiriendo que podrían estar involucrados en la descarga de Pi en órganos reproductores (Karthikeyan *et al.*, 2002).

▪ FORMACIÓN DE RAÍCES PROTEOIDES Y SECRECIÓN DE ÁCIDOS ORGÁNICOS

Algunas plantas, especialmente las leguminosas, poseen una alta capacidad para extraer el P del suelo a través de exudados radicales. En respuesta a la deficiencia de Pi desarrollan raíces proteoides, que son órganos altamente especializados para la síntesis y secreción de ácidos orgánicos (Gardner *et al.*, 1983). Estos exudados contienen grandes cantidades de ácido cítrico y ácido málico (Jonson, 1996). La excreción de ácidos orgánicos se correlaciona con la eficiencia de estas plantas en la solubilización de P a partir de fuentes que presentan una baja disponibilidad como Al-P, Fe-P y Ca-P, presentes en suelos ácidos y alcalinos (López-Bucio *et al.*, 2000; Jonson, 1996). El mecanismo mediante el cual se libera Pi a partir de los compuestos fosfatados de hierro y aluminio por medio de ácidos orgánicos es a través del intercambio directo del ligando, es decir el citrato reemplaza al fosfato, o bien la movilización de Pi se da porque los ácidos cítrico y málico forman quelatos estables con el aluminio y el hierro, como se esquematiza en la figura 2, (Marschner, 1995). Al parecer, el mecanismo de excreción de ácidos orgánicos es una estrategia usada por diferentes especies para aumentar la disponibilidad de Pi; sin embargo, las dicotiledóneas, y particularmente las leguminosas, son más eficientes en producir ácidos orgánicos y excretarlos a la rizósfera.

El incremento en la secreción de ácidos orgánicos está correlacionada con un incremento en la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de estos compuestos, incluyendo a la fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), la citrato sintasa (CS) y la malato deshidrogenasa (MDH) (Raghothama, 1999). La PEPC cataliza la carboxilación del

fosfoenol piruvato para formar oxaloacetato, el cual es un intermediario en la síntesis de ácidos orgánicos; la MDH reduce al oxaloacetato para formar malato y la CS es la enzima que cataliza la condensación de la acetil-CoA y el oxaloacetato para producir citrato.

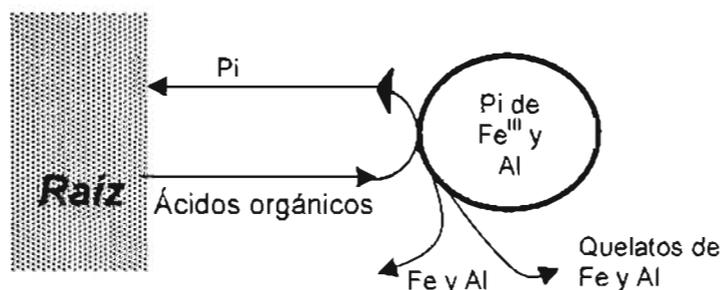


Figura 2. Esquema del mecanismo de liberación de Pi mediado por ácidos orgánicos. Tomado de Marschner 1995.

▪ SECRECIÓN DE FOSFATASAS

Debido a que entre el 20 y el 80% del fósforo en el suelo, se encuentra en forma de compuestos orgánicos y para que el Pi contenido en ellos pueda ser asimilado por las plantas, estos compuestos deben antes ser hidrolizados por fosfatasa que son secretadas al suelo (Barret *et al.*, 1998). Estas enzimas se han clasificado en ácidas y alcalinas dependiendo del pH óptimo de su actividad. Generalmente, las fosfatasa alcalinas muestran especificidad por el sustrato, mientras que las ácidas son inespecíficas. Se ha sugerido que es precisamente esta falta de especificidad lo que las convierte en buenos candidatos para actuar sobre una variedad de compuestos orgánicos presentes en el suelo y aumentar el nivel de Pi disponible para las plantas (Duff *et al.*, 1994). Aunque el P orgánico es dinámico y difícil de caracterizar, se sabe que se encuentra formando compuestos como el inositol hexafosfato (ácido fítico), glucosa-6-fosfato, glicerol fosfato, nucleósidos monofosfato y polinucleótidos (Dalal, 1977; Pant *et al.*, 1999).

Tarafdar y Jungk (1987) mostraron que el incremento en la actividad de fosfatasa en raíces de trigo y trébol correlacionaba con el decremento en los niveles de fosfato orgánico alrededor de la matriz radicular, mientras que Asmar *et al.*, (1995) encontraron resultados similares para diferentes genotipos de cebada. En frijol existen genotipos que pueden crecer muy bien en suelos suplementados con ácido fítico, lo que sugiere que una de las enzimas que secretan es una fitasa, que es un tipo particular de fosfatasa ácida con alta afinidad por el ácido fítico (Helal, 1990).

Algunas fosfatasas ácidas actúan intracelularmente, mientras que otras son secretadas; se ha observado que la deficiencia de Pi incrementa la actividad de ambas (Coello, 2002; Yun y Kaepler, 2001; Haran *et al.*, 2000; del Pozo *et al.*, 1999), por lo cual se ha sugerido que su actividad puede ser importante para aumentar la disponibilidad de Pi tanto dentro de la planta como a partir de compuestos orgánicos presentes en la rizósfera (Raghothama, 1999; Grotz y Guerinot, 2002).

II.3.3 CAMBIOS ASOCIADOS A LA DEFICIENCIA DE Pi DIRIGIDOS A INCREMENTAR LA EFICIENCIA EN EL USO DEL Pi

La escasez de Pi también favorece algunos procesos metabólicos que permiten hacer un uso más eficiente del P disponible (Theodorou y Plaxton, 1993; Rychter y Mikulska, 1990). Se ha observado que en condiciones de bajo Pi se utilizan reacciones metabólicas alternas en la glicólisis y/o en la respiración que reducen la demanda de fosfato o hacen uso del pirofosfato (PPi), compuesto que constituye un subproducto de diferentes vías biosintéticas.

▪ GLICÓLISIS

La vía de la glicólisis es una red de reacciones tendientes a generar ATP, poder reductor y piruvato, así como producir los compuestos base del anabolismo. La glicólisis contiene reacciones enzimáticas alternativas a nivel de la hidrólisis de la sacarosa, de la fructosa-6-fosfato (Fru-6-P), del gliceraldehído-3-fosfato y del fosfoenol piruvato (PEP) (Figura 3). Se

ha propuesto que el papel de estas reacciones es ayudar a la adaptación de las plantas en medios adversos tales como la anoxia y la deficiencia de Pi (Plaxton, 1996).

Durante la deficiencia de fosfato los niveles de ATP y en general los niveles de los nucleótidos di- y tri-fosfatados se reducen significativamente (Theodorou *et al.*, 1991; Fredeen *et al.*, 1990), mientras que el pirofosfato (PPi), se mantiene en niveles altos y puede funcionar como un donador de energía autónomo (Plaxton, 1996; Richter, 1994), observándose que bajo estas condiciones se activan enzimas que no requieren Pi o nucleótidos fosfato como sustratos. Estas enzimas permiten que la glicólisis proceda aún en deficiencia de Pi, pues catalizan reacciones en las que sustituyen a otras que lo requieren y de esta manera el metabolismo de carbono continúa (Duff *et al.*, 1989).

En 1979, se descubrió una enzima citosólica en plantas que convierte Fru-6-P a fructosa-1,6-bifosfato (Fru-1.6-P₂) utilizando PPi, la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (PFP). Su actividad es afectada por la especie, el tejido, las condiciones ambientales y el desarrollo. Se ha visto que en condiciones de carencia de Pi, la reacción de la PFP puede sustituir la reacción de la fosfofructocinasa (PFK), y así tener por un lado un ahorro de ATP y por el otro promover la recirculación del Pi. En estudios con cultivos de tejidos, se observó una inducción alta de la actividad de la PFP cuando las células se sometieron a estrés por deficiencia de fosfato (Duff *et al.*, 1989; Theodorou *et al.*, 1992). Sin embargo, Richter y Randall (1994), encontraron que la actividad de la PFP dependiente de PPi en plantas de frijol, no era afectada por la deficiencia de Pi, considerando que esta discrepancia podría atribuirse a las diferencias que existen entre cultivos celulares y organismos completos.

En 1989, Duff y colaboradores (1989a), reportaron la purificación y caracterización de la fosfoenol piruvato fosfatasa (PEPP), una enzima alterna a la piruvato cinasa (PK) y que se ubica en la vacuola. Sus resultados sugerían que esta enzima podía competir con la PK por el PEP de una poza intracelular común. Reportaron que la PEPP era inhibida por Pi y su actividad específica se incrementaba más de diez veces en condiciones de deficiencia de Pi (Duff *et al.*, 1989b). Las células vegetales pueden utilizar dos diferentes alternativas para evitar la ruta en la que está involucrada la enzima PK (figura 3). Una de ellas es la de la enzima PEPP, arriba mencionada y la otra es la de la enzima PEP carboxilasa (PEPC), que provee de intermediarios al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Además, junto con la

enzima malato deshidrogenasa y con la enzima málica mitocondrial (ME), la enzima PEPC puede funcionar como una enzima glicolítica y evitar la acción de la PK. Existen estudios en células de *Brassica nigra* y *Catharanthus roseus* en los que se observa que en medios reducidos de Pi se inducen estas rutas alternativas y las actividades de la PEPC y la PEPP se ven incrementadas (Duff *et al.*, 1991), este mismo comportamiento se observó en rálces de frijol en deficiencia de Pi (Richter y Randall, 1994). Este "bypass" es importante cuando hay deficiencia de Pi y la actividad de la PK se ve limitada por el ADP, pues este hecho podría constituir un ahorro en ATP y una contribución en Pi endógeno (Duff *et al.*, 1989; Kondracka y Rychter, 1997; Gaume *et al.*, 2001). Además, la actividad de PEPC está asociada con la producción de ácidos orgánicos, que modifican la disponibilidad de algunas formas de P (López-Bucio *et al.*, 2000).

▪ ACUMULACIÓN DE AZÚCARES

Una de las respuestas más evidentes a la deficiencia de fosfato es la acumulación de azúcares. Se ha reportado que algunas plantas responden a este estrés nutrimental con incrementos en los niveles de almidón (Rao *et al.*, 1993), mientras que otras acumulan sacarosa y almidón (Dietz y Helios, 1990; Cierezko *et al.*, 2000). Se ha sugerido que tales cambios podrían constituir temporalmente una fuente adicional de Pi; sin embargo algunos reportes muestran que ésto no es una respuesta general a la deficiencia de Pi, sino que depende de la especie (Foyer y Spencer, 1986; Rao *et al.*, 1993).

La acumulación de almidón podría deberse a un incremento en la síntesis de este metabolito, pues la relación triosa-P/Pi que estimula la actividad de la enzima ADP glucosa pirofosforilasa se ve incrementada durante la deficiencia de Pi (Preiss y Romeo, 1994). Sin embargo, también existe la posibilidad de que la acumulación de almidón sea el resultado de una disminución en la degradación como proponen Usuda y Shimogawara (1991); quienes observaron que la deficiencia de Pi disminuye la distribución de fotosintatos hacia almidón e inhibe la movilización del almidón durante la noche.

II.3.4 OTROS CAMBIOS

En el metabolismo de la sacarosa, el paso subsecuente a la hidrólisis en fructosa y glucosa, es la fosforilación a hexosas fosfato (Taiz y Zeiger, 1998). En condiciones de deficiencia de Pi se ha reportado acumulación de glucosa y fructosa en hojas y raíces de diferentes especies vegetales (Cierezko *et al.*, 1998), este hecho podría ser el resultado no sólo de una mayor hidrólisis de sacarosa, sino también de un decremento en la velocidad de fosforilación (Cierezko *et al.*, 1998). En las raíces de plantas desarrolladas en condiciones de deficiencia de Pi, la proporción de azúcares no fosforilados con relación a los fosforilados es de cinco a siete veces mayor que la de las raíces de plantas con suficiencia de Pi y los niveles de actividad de las enzimas hexocinasa y fructocinasa se reducen (Rychter y Randall, 1994). Se ha sugerido que la acumulación de azúcares en las raíces podría funcionar para incrementar la presión osmótica en este tejido y así aumentar su capacidad de toma de nutrimentos (Cierezko *et al.*, 1996; Rychter y Randall, 1994). Se ha propuesto que los factores más importantes en el reciclamiento de Pi durante la fotosíntesis en hojas de frijol deficientes de Pi son probablemente la vía del glicolato y las reacciones que utilizan PEP. En la fotorespiración se puede generar fosfato a partir del fosfoglicolato, observándose que la deficiencia en Pi induce el incremento en los niveles de los productos de esta vía (Kondracka y Rychter, 1997).

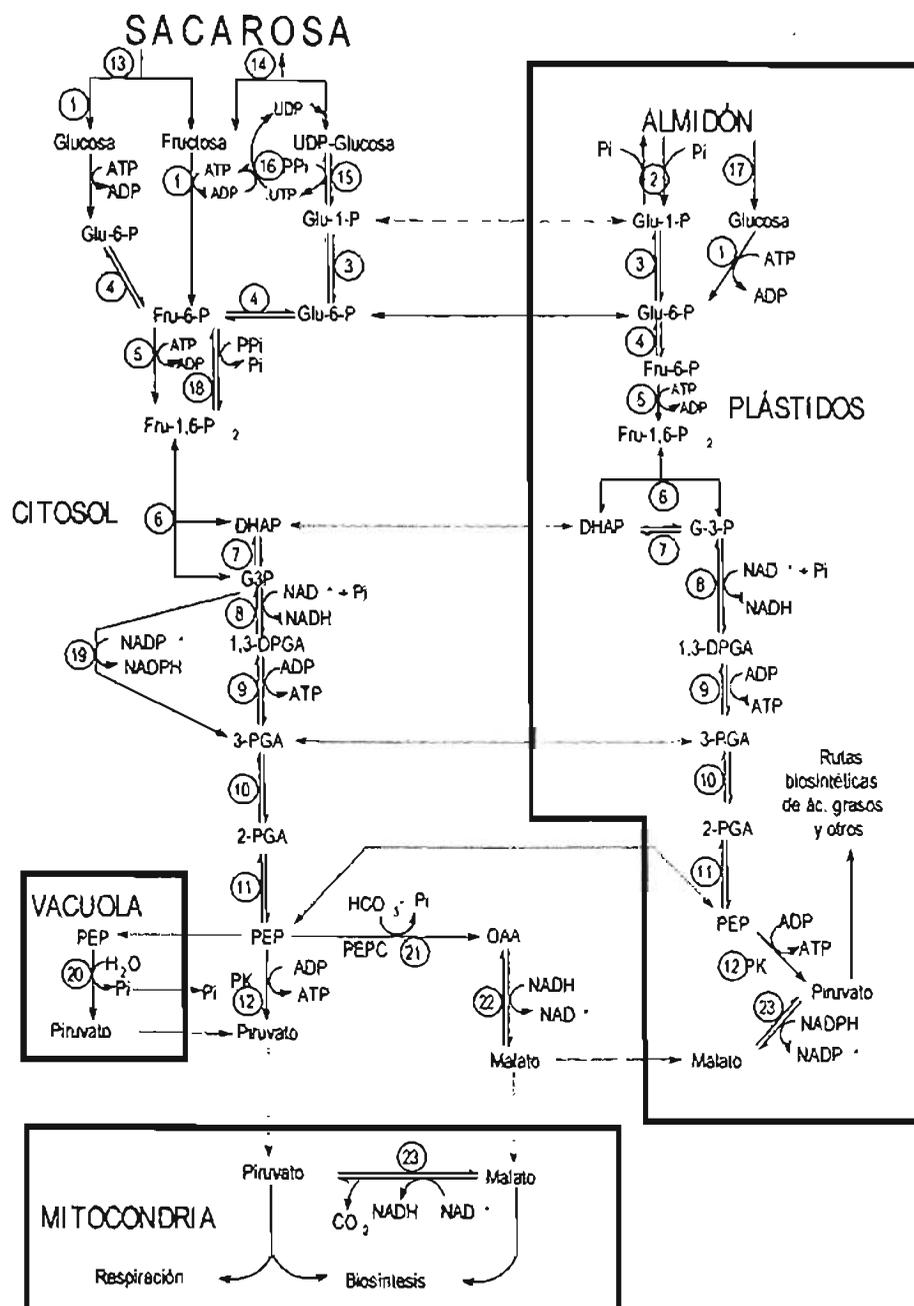


Figura 3. Glicólisis en plantas. Las enzimas que catalizan las reacciones numeradas son las siguientes: 1, hexocinasa; 2, fosforilasa; 3, fosfoglucomutasa; 4, fosfoglucosa isomerasa; 5, PFK; 6, ALD; 7, triosa fosfato isomerasa; 8, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD (fosforilante); 9, 3-fosfoglicerato cinasa; 10, fosfogliceromutasa; 11, enolasa; 12, piruvato cinasa; 13, invertasa; 14, sacarosa sintasa; 15, UDP-glucosa pirofosforilasa; 16, nucleósido difosfato cinasa; 17, α y β amilasa; 18, PFP; 19, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD (no fosforilante); 20, PEP fosfatasa; 21, PEPC; 22, malato deshidrogenasa; 23, enzima málica.

Tomada de Plaxton, 1996.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

III.1 HIPÓTESIS

La deficiencia de fósforo en frijol induce cambios metabólicos, algunos de los cuales son fundamentales para definir la capacidad de los genotipos tolerantes para adaptarse a esta condición.

III.2 OBJETIVO GENERAL

Analizar los cambios metabólicos que induce la deficiencia de fósforo e identificar aquéllos que podrían estar involucrados en definir el grado de susceptibilidad de las plantas de frijol a la carencia de este nutrimento.

III.3 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar una colección de variedades de frijol y seleccionar con base en la producción de biomasa de tallos y hojas a aquéllas que contrasten en el grado de susceptibilidad para enfrentar la deficiencia de Pi.
- Evaluar el efecto de la deficiencia de Pi sobre los niveles de P total y soluble en hojas y raíces de plantas de frijol.
- Investigar los cambios en los niveles de fotosintatos que la deficiencia de Pi induce en hojas maduras, hojas jóvenes y raíces.
- Evaluar el efecto de la deficiencia de Pi sobre la capacidad fotosintética de las hojas y sobre la distribución de los fotosintatos producidos.
- Analizar algunas actividades enzimáticas que podrían ayudar a incrementar la eficiencia con que se usa el Pi.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se trabajó inicialmente con 46 genotipos de frijol (*Phaseolus vulgaris* L), proporcionados por el Dr. Jorge Acosta del INIFAP. Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% (v/v) durante 12 minutos, se lavaron con agua desionizada y se germinaron en agrolita a temperatura ambiente (18-25°C). Después de su germinación las plántulas fueron transplantadas a recipientes con agrolita (350 cm³) y se regaron cada tercer día con 50 ml de solución Hoagland, constituida por 3mM KNO₃, 2mM Ca(NO₃)₂, 1mM MgSO₄, 0.004mM MnCl₂, 0.023mM H₃BO₃, 0.0004 mM ZnSO₄, 0.00015 mM CuSO₄, 0.00005 mM H₂MoO₄ y 5 g l⁻¹ de FeEDTA (Jones, 1982). La solución completa contiene 0.5 mmol/L de (NH₄)₂PO₄ y en la solución deficiente de Pi el (NH₄)₂PO₄ se reemplazó con (NH₄)₂SO₄. Las plantas crecieron en invernadero y fueron cosechadas después de tres semanas del transplante, tres horas después de iniciarse el período de luz. Como se indica en la figura 4, las plantas utilizadas poseen las hojas cotiledonares, una hoja madura y una hoja joven o en desarrollo.

Los genotipos proporcionados fueron los siguientes y el número entre paréntesis corresponde a la designación utilizada para este trabajo: CAP4 (1), DICTA17 (2), CNC2 (3), A774 (4), A752 (5), CARIOCA (6), A321 (7), G92 (8), G4540 (9), G3096 (10), G11640 (11), G4459 (12), G19227A (13), VAX1 (14), V8025 (15), G8424 (16), A195 (17), NG Medellín (18), A36 (19), SEA5 (20), SEA13 (21), MAR1 (22), G8454 (23), G2358 (24), G4637 (25), G17649 (26), G20003 (27), G15047 (28), FEB192 (29), MAM48 (30), G3513 (31), BAT447 (32), FEB190 (33), MAM46 (34), G18479 (35), G1977 (36), Río Tibagi (37), A493 (38), G13755 (39), NG INIFAP (40), G3593 (41), G22179 (42), G479 (43), A785 (44), NG Veracruz (45), NG Cotaxtla (46), G21212 (47), G983 (48), VAX2 (49), Canario 60 (C60) y Pinto Villa (PV).

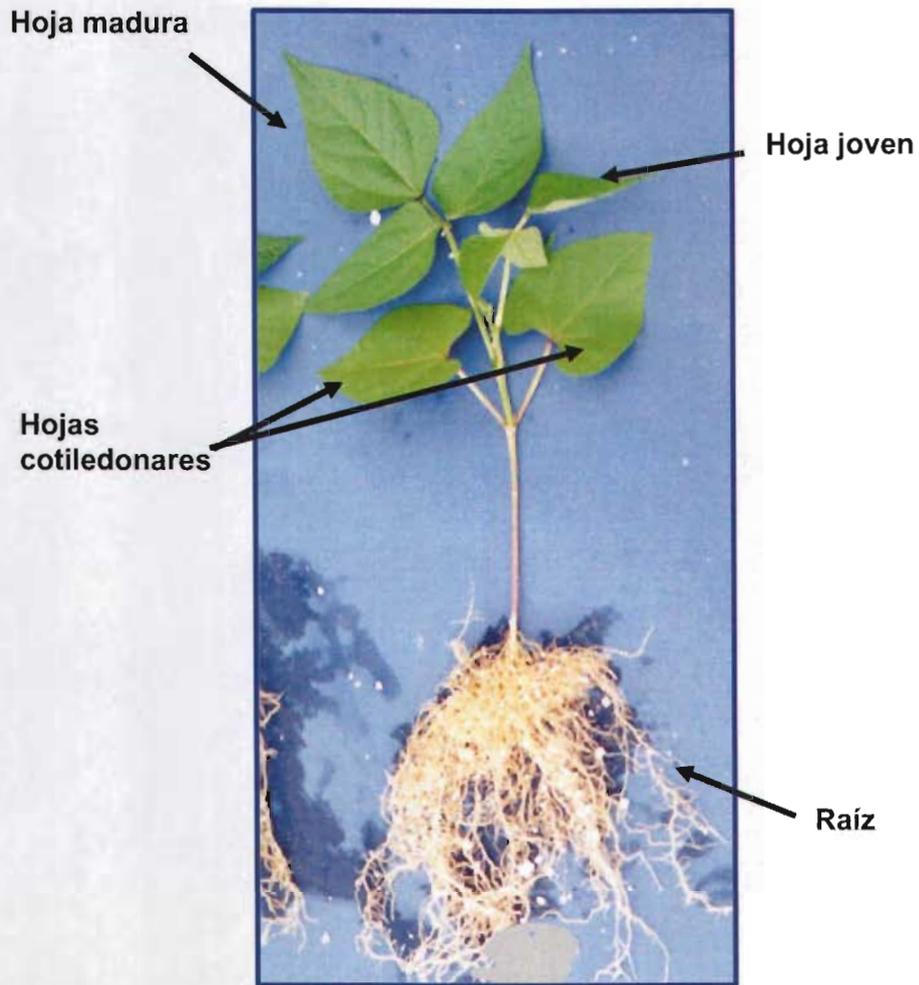


Figura 4. Planta de frijol de tres semanas.

IV.2 DETERMINACIÓN DE BIOMASA

Para las determinaciones de biomasa las plantas se dividieron en parte aérea (tallos y hojas) y raíz. El peso fresco se determinó inmediatamente después de cosechadas las plantas y el peso seco se cuantificó después de secar los tallos y raíces durante 72 h a 70 °C. Los experimentos que se reportan son el resultado de tres determinaciones independientes con 4 replicas cada uno.

IV.3 ENSAYOS ENZIMÁTICOS

Un gramo de tejido previamente congelado con nitrógeno líquido se homogenizó en mortero con 4 ml de solución amortiguadora (100 mM Tris-HCl pH 7.6, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 20 mM NaF, 10 mM tiourea, 1 mM DTT, 20% glicerol, 4% PEG 8000, 1% PVPP, 0.1% Tritón X-100, 1 mM PMSF y 1 tableta de una mezcla de inhibidores de proteasas, Complete, Böehringer por 50 ml de amortiguador). Los homogenados se centrifugaron a 25000 x g por 10 min, los sobrenadantes obtenidos se desalaron en una columna de Sephadex G-25 e inmediatamente se utilizaron para los ensayos de las enzimas piruvato cinasa, fosfoenol piruvato carboxilasa y fosfoglucosa isomerasa.

- **Piruvato cinasa (EC 2.7.1.40), PK**

La actividad de la enzima piruvato cinasa se ensayó de acuerdo con el método reportado por Smith *et al.*, (2000) usando un amortiguador que contenía 25 mM MES (pH 6.8), 2 mM PEP, 1 mM Mg-ADP, 1 mM DTT, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 5 % PEG 8000, 0.15 mM NADH y 2 U/ml de lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27). La actividad se siguió por los cambios de absorbencia a 340 nm y se corrigió considerando las actividades de las enzimas PEP fosfatasa (EC 3.1.3.2) y NADH oxidasa.

- **Fosfoenol piruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31), PEPC**

La actividad de la enzima PEPC se ensayó en una mezcla de reacción que contenía 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM NaHCO₃, 2 mM PEP, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH y 5 U/ml de malato deshidrogenasa (EC1.1.1.38) (Moraes y Plaxton, 2000). La actividad fue corregida considerando la actividad de la enzima NADH oxidasa.

- **Fosfoglucosa isomerasa (EC 5.3.1.9), PGI**

La actividad de la enzima PGI se midió siguiendo el método reportado por Doehlert *et al.*, (1988) usando una solución amortiguadora que contenía 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.2), 5 mM MgCl₂, 5 mM fructosa 6-P, 1 mM NAD⁺ y 1 U/ml de glucosa 6-P deshidrogenasa (EC 1.1.1.49).

- **Fosfoenol piruvato fosfatasa (EC 3.1.3.2), PEPP**

La actividad de la enzima PEPP se midió de acuerdo con el método de Duff et al., (1989). Las muestras congeladas fueron homogenizadas en una solución amortiguadora de extracción compuesta de 50 mM acetato de sodio (pH 5.6), 1 mM EDTA, 5 mM tiourea, 1 mM PMSF, 1% PVPP y 1 tableta de mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Boehringer) por 50 ml de solución. El homogenado se centrifugó a 25000 x g por 10 min, el sobrenadante se desaló en una columna de Sephadex G-25 e inmediatamente se utilizó en el ensayo enzimático en una mezcla de 50 mM acetato de sodio (pH 5.6), 1 mM PEP, 4 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH y 3 U/ml de lactato deshidrogenasa (EC 1.1.1.27). La actividad seguida por los cambios de absorción a 340 nm se corrigió restando la actividad de la enzima NADH oxidasa.

- **Sacarosa sintasa (EC 2.4.1.13), SS**

La actividad de la enzima sacarosa sintasa se midió en dirección de la síntesis del disacárido (Zhu *et al.*, 1997) y en dirección de degradación (Komina, 2002). La solución amortiguadora de extracción contenía 100 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 14 mM β-mercaptoetanol, 2 mM PMSF, 10% glicerol y 1% PVPP. El material homogenizado se centrifugó a 25000 g por 10 min y para la determinación de actividad en dirección de síntesis, 50 µl del sobrenadante se mezclaron con 50 µl de la siguiente mezcla de reacción: 50 mM Hepes (pH 7.5), 15 mM MgCl₂, 25 mM fructosa y 25 mM UDP-glucosa. Para el blanco, no se añadió UDP-glucosa en la mezcla de reacción. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 45 minutos y la reacción se detuvo calentando a ebullición por 5 minutos. La sacarosa producida se cuantificó por medio del método de la antrona (van Handel, 1968). La actividad de la enzima en dirección de la degradación de sacarosa, se ensayó espectrofotométricamente a 340 nm en una mezcla de 20 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 200 mM sacarosa, 1.5 mM UDP, 1.5 mM NAD, 5 mM MgCl₂ y 0.016 U/ml de UDP glucosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.22), midiendo la formación de UDP glucosa acoplada a la reducción de NAD⁺.

- **Invertasas (EC 3.2.1.26)**

La actividad se ensayó de acuerdo con Zhu, et al. (1997), los tejidos congelados en nitrógeno líquido se homogenizaron en una solución amortiguadora que contenía 100 mM Hepes-NaOH (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 14 mM β-mercaptoetanol, 2 mM PMSF, 10% glicerol y 1% PVPP. El material se centrifugó a 25000 g por 10 min. La actividad de

la enzima invertasa soluble ácida se ensayó en el sobrenadante a 37 °C, añadiendo 50 µl de extracto a 50 µl de 1M acetato de sodio (pH 4.5) y 100 µl de una solución 120 mM sacarosa, la reacción se detuvo después de 45 minutos, agregando 30 µl de 2.5 M Trizma base y calentando a 92 °C por 5 minutos. La actividad de la invertasa neutra se evaluó de manera similar, excepto que en la mezcla de reacción se utilizó 1M HEPES (pH 7.5) y no se adicionó solución amortiguadora de Tris para detener la reacción. En ambos ensayos se cuantificó la formación de glucosa por métodos enzimáticos, la actividad se calculó corrigiendo con los niveles de glucosa obtenidos en mezclas de reacción que se trataron de manera similar, pero en las que no se adicionó sacarosa. La actividad de la invertasa de la pared celular se midió en el sedimento obtenido después de homogenizar las muestras y centrifugarlas. El sedimento se lavó cinco veces resuspendiendo en agua en una relación 1:10 y centrifugando a 5000 g por 10 minutos en cada lavado. El sedimento final se resuspendió en 500 µl de solución de extracción, 500 µl de solución 240 mM sacarosa y 500 µl de amortiguador 1M acetato de sodio (pH 4.5), se incubó a 37 °C/45 min y la reacción se detuvo añadiendo 300 µl de 2.5 M Tris base y calentando 5 minutos a ebullición. Se centrifugó a 5000 x g por 10 minutos y se determinó glucosa en el sobrenadante.

IV.4 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína fue determinada siguiendo el método de Bradford (1976), utilizando albúmina bovina como estándar.

IV.5 DETERMINACIÓN DE FOSFATO

Para la determinación de Pi total se usó el método descrito por Ames (1966). A la muestra (3-5 mg) se le añadieron 20 µl de una solución de Mg(NO₃)₂ al 10% (p/v) en etanol y se incineró hasta cenizas blancas. Se agregaron 300 µl de HCl 0.5 M y se mantuvo en baño María en ebullición durante 15 min. Después de enfriar se agregaron 700 µl de una solución H₂SO₄ 0.5 M, 81.2 mM ácido L-ascórbico y 0.29 mM molibdato de amonio y la muestra se incubó 20 min a 45 °C. Se midió la absorbencia a 820 nm y el contenido de Pi fue calculado a partir de una curva patrón de KH₂PO₄. El contenido de P

soluble fue medido siguiendo el procedimiento de Pieters et al., (2001). A las muestras (10 mg) se les adicionaron 2 ml de agua desionizada, fueron sometidas a ebullición por 5 min e incubadas a 70 °C, durante toda la noche. Posteriormente se centrifugaron a 5000 x g por 10 min y el contenido de P fue determinado en 300 µl de sobrenadante, con la solución de ácido L-ascórbico-molibdato de amonio de acuerdo siguiendo el procedimiento para cuantificar P total arriba descrito.

IV.6 DETERMINACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Los azúcares fueron determinados en extractos etanólicos. Las muestras (150-300 mg del tejido) fueron homogenizadas en alcohol etílico al 80% (2 ml), y calentados por 30 minutos a 80 °C. Los extractos se centrifugaron a 5000 x g durante 10 minutos y los sobrenadantes se mezclaron. Glucosa y fructosa se cuantificaron mediante un ensayo enzimático con hexocinasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD). El extracto alcohólico se mezcló con 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl, 1 mM ATP, 3 mM MgCl₂, 0.3 mM NAD⁺ y 1 U/ml de enzima hexocinasa (EC 2.7.1.1). Se midió la absorbencia basal a 340 nm y se añadió 1 U/ml de G6PD (EC 1.1.1.49), se permitió que la reacción llegara al equilibrio (aproximadamente media hora), y se cuantificó la producción del NADH a 340 nm. El incremento de A₃₄₀ se utilizó para calcular la concentración de glucosa. La fructosa se midió adicionando además de 1 U/ml de G6PD, 1 U/ml de fosfoglucosa isomerasa (EC 5.3.1.9) y se cuantificó la formación de NADH a 340 nm.

La sacarosa se determinó por el método de la antrona (van Handel, 1968). Se mezclaron volúmenes iguales del extracto alcohólico con solución de KOH al 30%, la mezcla se calentó a ebullición por 10 minutos, se enfrió, se añadieron 2 ml del reactivo de antrona (150 mg de antrona/100 ml de H₂SO₄ al 70%, v/v), y se incubó a 37-40 °C por 15 minutos. Se leyó la absorbencia a 620 nm y se comparó contra las absorbencias obtenidas con una curva estándar de sacarosa.

Para cuantificar el almidón, se utilizó el material insoluble en alcohol. El sedimento obtenido después de la extracción alcohólica, se resuspendió en 1.5 ml de agua y se gelatinizó a 90°C, durante 4 horas. Después se hidrolizó con 220 U de amiloglucosidasa (EC 3.2.1.3) resuspendida en 1.5 ml de solución amortiguadora 200 mM de acetato de sodio (pH 4.5) y se incubó a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, el material se centrifugó a 5000 x g por 5 minutos y se cuantificó glucosa en el sobrenadante.

IV.7 ASIMILACIÓN DE CARBONO Y DISTRIBUCIÓN DE FOTOSINTATOS

Se utilizaron plantas de tres semanas, las cuales se marcaron con ^{14}C , (Viola *et al.*, 2001). El marcaje se hizo utilizando 50 μCi de ^{14}C (25 μl de $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$), que se colocaron en tubos Ependorff dentro de bolsas de plástico que cubrían la primera hoja de las plantas de frijol, el $^{14}\text{CO}_2$ se generó agregando 200 μl de ácido láctico 3M. Las plantas se marcaron durante una hora, al término de la cual la reacción se detuvo con 800 μl de una solución KOH 30%. Se retiró la bolsa y las plantas se cosecharon 4 horas después. Se fraccionaron en hojas marcadas (hoja madura), hojas jóvenes y raíces y se congelaron en nitrógeno líquido para su posterior análisis. El material congelado se homogenizó y extrajo en alcohol etílico al 80% en una relación 1:10 (p/v), durante 30 minutos a 80°C , se centrifugó a 5000 g por 10 minutos y se repitió esta operación usando una relación menor. Los sobrenadantes se mezclaron y se cuantificó la marca incorporada en azúcares solubles. La fracción insoluble se trató siguiendo la metodología descrita para la determinación de almidón. Después de la hidrólisis con amiloglucosidasa, se midió la presencia de marca en la glucosa liberada. Para la cuantificación de la marca incorporada, se usaron 50 μl de sobrenadante al que se le adicionaron 1.4 ml de líquido de centelleo ACSII de Amersham. Las muestras se guardaron en oscuridad 12 horas y la radiactividad se midió en un contador Beckman modelo LS6000IC.

IV.8 SÍNTESIS Y DEGRADACIÓN DE ALMIDÓN

Las plantas usadas en este experimento se marcaron con ^{14}C como se indica en la sección anterior. Un grupo de plantas se cosechó durante el período de luz y se midió la marca incorporada en almidón, utilizándose estos datos para estimar la síntesis de este metabolito. Otro grupo de plantas se cosechó al día siguiente (12 horas de oscuridad). Se midió la marca incorporada en almidón y se estimó la degradación por la diferencia con los valores de las plantas cosechadas durante el período luminoso.

IV.9 PURIFICACIÓN DE GRÁNULOS DE ALMIDÓN

Las hojas de frijol se molieron en un mortero con nitrógeno líquido y se homogenizaron con 3.3 volúmenes de solución amortiguadora que contenía 100 mM Hepes KOH pH 8.0, 1 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoetanol, 1 mM PMSF, 1mM benzamidina y 2 mM de ácido aminocaproico. El homogenado se filtró con dos capas de gasa y se centrifugó a 280 g por cuatro minutos, el sedimento se resuspendió en 10 ml de la misma solución y se centrifugó a la misma velocidad por 4 minutos. Esta operación se repitió otras dos veces y el paquete resultante se resuspendió en 2 ml de solución amortiguadora, se depositó sobre 5 ml de Percoll al 95% en solución amortiguadora 500 mM Tris (pH 7.5) y se centrifugó 4 minutos a 280 g. Los gránulos de almidón quedan en la fracción del fondo, de donde se recuperaron y se lavaron dos veces con solución amortiguadora centrifugando a 900 x g durante tres minutos.

IV.10 ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

Los gránulos de almidón se mezclaron con dos volúmenes de solución amortiguadora de muestra 3X: Tris 0.125 M, SDS 4% (p/v), glicerol 20% (v/v), mercaptoetanol 10% (v/v) y se calentaron 20 minutos a 80 °C. El material se centrifugó y 20 μ l de las muestras se aplicaron a geles de poliacrilamida al 10% en condiciones desnaturalizantes de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970). La solución amortiguadora para electrodos, pH 8.3 contenía Tris 0.025 M, glicina 0.192 M, SDS 0.1% (p/v).

La preparación del gel para la electroforesis SDS-PAGE se realizó de la siguiente manera:

	Gel separador (10% acrilamida)	Gel apilador (4% acrilamida)
Acrlamida 30% (p/v),bisacrilamida 2.7% (p/v)	3.33 ml	0.67
Tris 1.5M, ajustado pH 8.8 con HCl	2.50 ml	---
Tris 0.5 M, ajustado pH 6.8 con HCl	---	1.25 ml
Dodecil sulfato de sodio 10% (p/v)	0.10 ml	0.05 ml
Agua desionizada	4.00 ml	3.00 ml
Persulfato de amonio 10% (p/v)	0.10 ml	0.10 ml
TEMED	0.012 ml	0.012 ml
Volumen final	10 ml	5 ml

Las proteínas se visualizaron al teñirlas con azul de Coomassie.

IV.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el programa SPSS 11.0 para hacer el análisis estadístico. Los datos se evaluaron con el Modelo Lineal General a través de un análisis de varianza de uno ó dos criterios de clasificación.

V. RESULTADOS

V.1 SELECCIÓN DE GENOTIPOS CONTRASTANTES

El Dr. Acosta del INIFAP proporcionó una colección de 46 genotipos de frijol provenientes de diferentes regiones geográficas, algunos de México y otros de Sudamérica para estudiar la respuesta a la deficiencia de fósforo. Se estableció un sistema de cultivo a partir de semillas germinadas en el que las plántulas se sembraron en recipientes con agrolita y las plantas se regaron con solución nutritiva Hogland completa o carente de P_i , durante tres semanas. En general, las plantas de esta edad contaban con las hojas cotiledonares, una hoja completamente formada y fotosintéticamente activa a la que se denominó hoja madura y una hoja en desarrollo que se designó como hoja joven (figura 4).

En primer lugar se evaluó el efecto de la deficiencia de P_i sobre la producción de biomasa en raíces y parte aérea (tallos y hojas), pues el aumento en el tamaño de la raíz se considera como una característica importante de las plantas que toleran la deficiencia de P_i (Ermani *et al.*, 1994; Wissuwa, 2003). Se registraron los cambios morfológicos y se cuantificó el peso seco. Las plantas que crecieron en deficiencia de fósforo mostraron un tamaño menor en cuanto a tallos y hojas. Estas últimas en algunos casos presentaban un color verde más oscuro y las nervaduras en varios genotipos eran rojizas (figura 5). Se cuantificó el peso seco de raíces y parte aérea (tallos y hojas) y como puede observarse en la figura 6 en general los tallos y hojas de las plantas que crecieron carentes de fósforo tienen menos biomasa, mientras que en muchos de los casos pero no en todos, el peso de las raíces fue mayor, por lo que la relación raíz:parte aérea se incrementó en las plantas que sufrieron la deficiencia de fósforo (figura 7). Los genotipos que se seleccionaron fueron el genotipo MAR1 (22) y el Canario 60 (C60) debido a que su respuesta a la deficiencia de P_i en relación a la biomasa producida en tallos y raíces fue diferente (figura 8), el genotipo MAR1 presentó una mayor producción de biomasa que el genotipo C60 después de tres semanas de cultivo en condiciones de deficiencia de fósforo. Por otro lado estos dos genotipos presentaron una tasa de germinación alta.

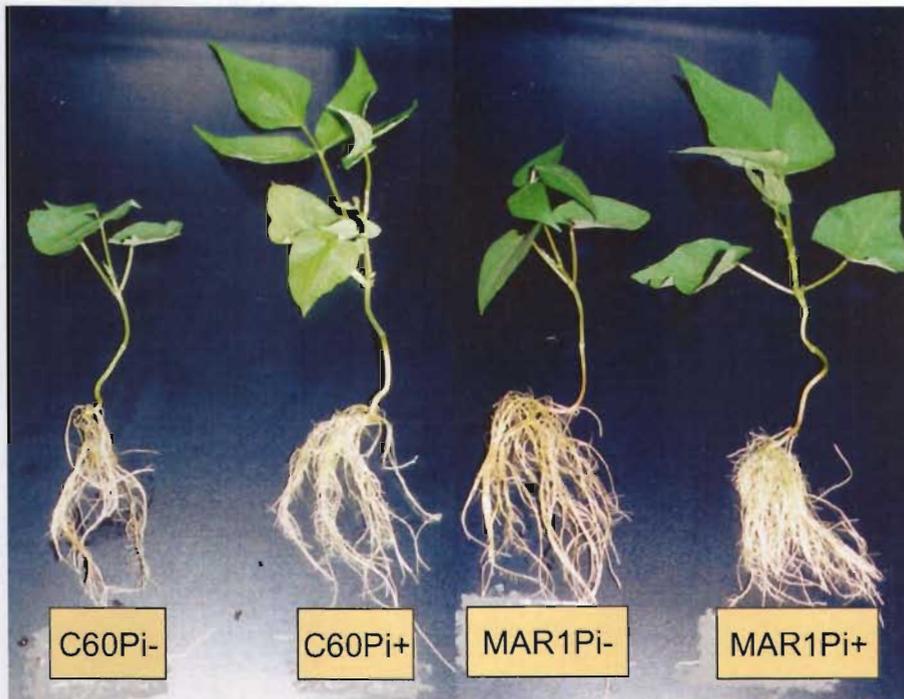


Figura 5. Plantas de frijol genotipos C60 y MAR1, de tres semanas regadas con solución Hoagland completa (Pi+) y regadas con solución Hoagland sin fosfato (Pi-).

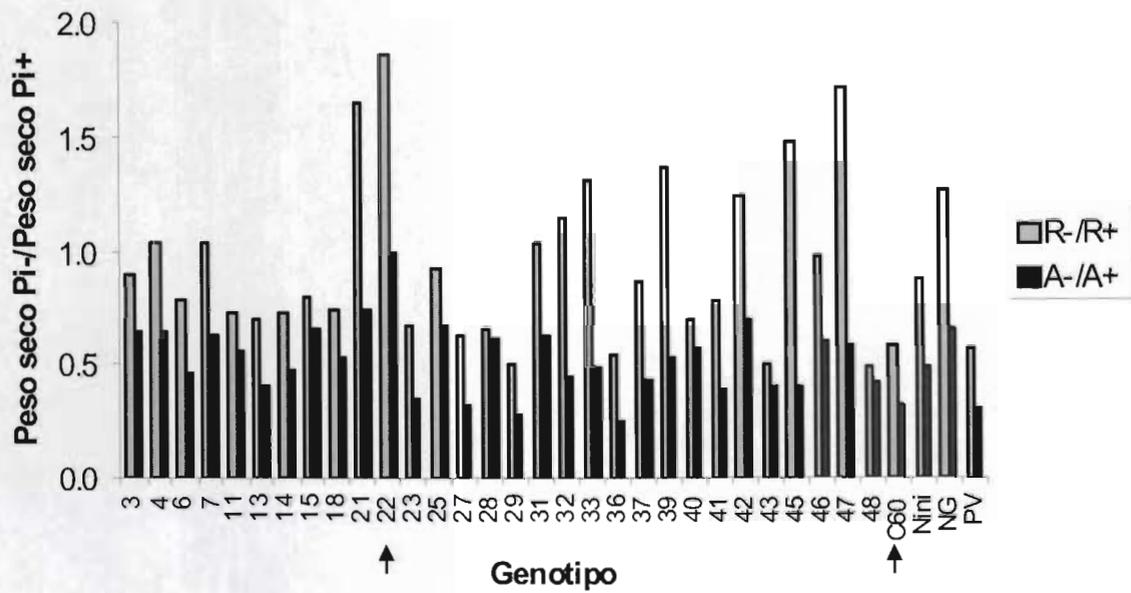


Figura 6. Comparación de peso seco. Cociente del peso seco de raíces (□) y parte aérea (■) de plantas que se cultivaron durante tres semanas en ausencia y presencia de Pi. ↑ Genotipos seleccionados para realizar los estudios posteriores.

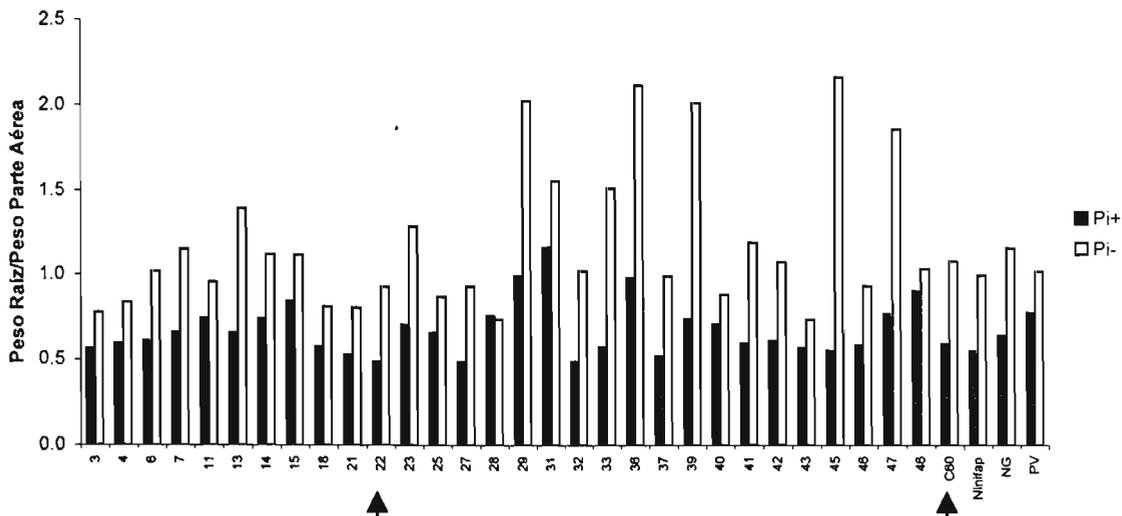


Figura 7. Comparación de la relación raíz:parte aérea de plantas de tres semanas regadas con solución Hoagland completa (■) y con solución Hoagland sin fósforo (□). ▲ Genotipos seleccionados para realizar los estudios posteriores.

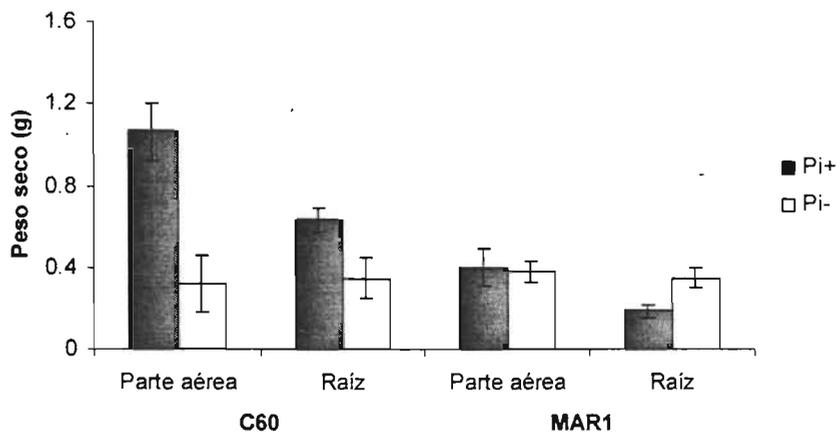


Figura 8. Comparación del peso seco de dos genotipos de frijol cultivados con y sin fósforo. Peso seco de plantas que se cultivaron durante tres semanas en presencia (■) y ausencia (□) de Pi. Las medias de los valores obtenidos son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$), entre genotipos.

V. 2 CUANTIFICACIÓN DE FOSFATO EN SEMILLAS DE FRIJOL

Las plántulas de frijol que crecieron en condiciones de deficiencia de Pi tenían como única fuente de P, el que se encontraba en las semillas. Para investigar si la producción de

biomasa estaba correlacionada con el P almacenado, se midió el contenido de P total en las semillas de los genotipos seleccionados. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 1, donde puede observarse que el genotipo C60 tiene reservas mayores y sin embargo, su crecimiento fue más afectado por la falta de fósforo (figura 8).

Tabla 1. Contenido de fósforo total en semillas de frijol.

Genotipo	P Total ($\mu\text{mol mg}^{-1}$)	Peso de la semilla (mg)	P Total/semilla (mmoles)
C60	61.3 \pm 3.5 ^a	343 \pm 37 ^b	21.0
MAR1	63.0 \pm 6.6 ^a	256 \pm 28 ^a	16.1

La media de los valores con diferente superíndice en la misma columna son diferentes significativamente ($p < 0.05$). Los valores que se presentan son el promedio \pm DE.

V.3 CUANTIFICACIÓN DE Pi SOLUBLE Y TOTAL EN PLANTAS DE FRIJOL

Para estimar el efecto de la deficiencia sobre los niveles de Pi en plantas de tres semanas de edad se determinaron los niveles de P total y Pi soluble en hojas maduras, hojas jóvenes y raíces de las plantas de frijol, estos resultados se reportan en la tabla 2.

Tabla 2. Contenido de fósforo soluble y total ($\mu\text{mol PO}_4\text{g}^{-1}$) en hojas y raíces.

Genotipo	Hoja Madura		Hoja Joven		Raíz	
	Pi Total	Pi soluble	Pi Total	Pi soluble	Pi Total	Pi soluble
C60-Pi	8.4 \pm 0.2 ^a	3.1 \pm 0.5 ^a	30.5 \pm 3.7 ^a	12.0 \pm 3.7 ^b	7.5 \pm 2.1 ^a	3.0 \pm 0.5 ^a
C60+Pi	16.6 \pm 1.7 ^b	6.2 \pm 0.2 ^b	42.2 \pm 10.2 ^b	21.4 \pm 0.2 ^d	14.1 \pm 2.7 ^b	3.5 \pm 0.1 ^b
MAR1-Pi	7.8 \pm 0.3 ^a	3.3 \pm 0.04 ^a	20.2 \pm 0.4 ^a	10.5 \pm 0.8 ^a	4.2 \pm 0.6 ^a	2.6 \pm 0.04 ^a
MAR1+Pi	13.5 \pm 0.1 ^b	4.9 \pm 0.2 ^b	37.1 \pm 1.7 ^b	16.5 \pm 1.8 ^c	12.9 \pm 1.4 ^b	4.2 \pm 0.03 ^b

La media de los valores con diferente superíndice en la misma columna son diferentes significativamente ($p < 0.05$). Los valores que se presentan son el promedio \pm DE ($n=4$).

Al comparar los resultados obtenidos se encontró que en las hojas maduras la deficiencia de Pi reduce el contenido de P total aproximadamente 50% en ambos genotipos, mientras que la disminución del P soluble fue de 50% para el C60 y 32.6% para el MAR1. El contenido de P total en las hojas jóvenes del genotipo C60 presentó una reducción de

28% mientras que en el MAR1 la disminución fue de 46%. En lo que se refiere al P soluble, ambos genotipos presentaron disminuciones similares (44 y 37% respectivamente).

En las raíces, el P total se redujo en 47% en C60 y 68% en MAR1. La disminución en P soluble fue 15% en C60 y en MAR1 39%.

Los cambios en P soluble respecto al P total en los tres tejidos estudiados se muestran en la tabla 3, donde se aprecia que la deficiencia de Pi produce cambios significativos en el contenido de Pi soluble respecto al contenido de P total en la raíz de ambos genotipos.

Tabla 3. Comparación de la relación de niveles de fósforo soluble:total en hojas y raíces.

	P sol/P total		
	Hoja madura	Hoja joven	Raíz
C60-Pi	0.36±0.02 ^a	0.39±0.07 ^a	0.40±0.10 ^c
C60+Pi	0.38±0.05 ^b	0.50±0.10 ^b	0.25±0.04 ^a
MAR1-Pi	0.42±0.10 ^a	0.53±0.04 ^a	0.61±0.10 ^d
MAR1+Pi	0.36±0.01 ^b	0.44±0.04 ^b	0.32±0.01 ^b

La media de los valores con diferente superíndice en la misma columna son diferentes significativamente ($p < 0.05$). Los valores que se presentan son el promedio±DE (n=4).

V. 4 ACUMULACIÓN DE FOTOSINTATOS

Una de las respuestas más evidentes en el estrés por deficiencia de Pi es la acumulación de azúcares. Se ha reportado que algunas plantas responden a este estrés nutricional con incrementos en los niveles de almidón (Rao *et al.*, 1993), mientras que otras plantas acumulan sacarosa y almidón (Dietz y Helios, 1990; Cierezko *et al.*, 2000). Por lo tanto se midió el contenido de azúcares solubles (sacarosa, glucosa, fructosa) y almidón en hojas maduras (figura 9), hojas jóvenes (figura 10) y raíces (figura 11), de los genotipos C60 y MAR1.

En las hojas maduras se encontró que en respuesta a la deficiencia de fósforo los dos genotipos acumulan almidón, glucosa y fructosa. Los niveles de almidón se incrementaron 3.2 y 1.7 veces en C60 y MAR1 respectivamente, la glucosa aumentó 6.6 y 3.5 veces y la fructosa en deficiencia de fósforo se elevó en 3.2 y 2.6 veces respectivamente.

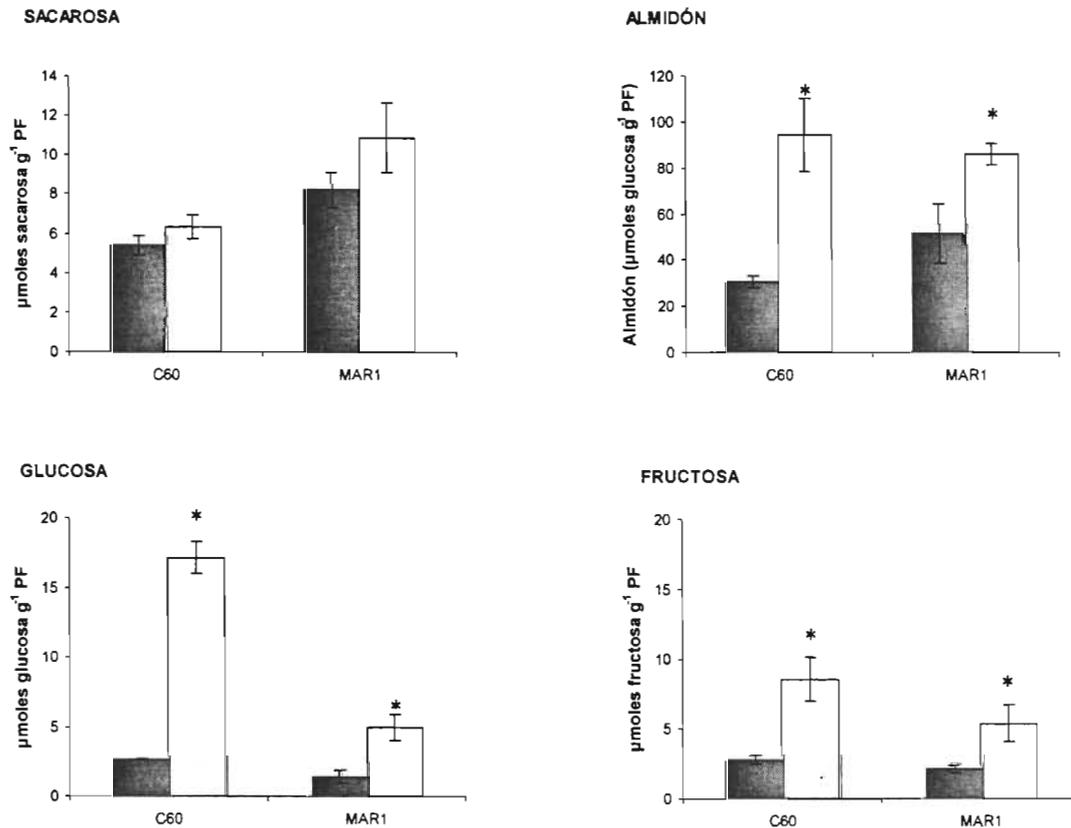


Figura 9. Contenido de carbohidratos en hojas maduras de dos genotipos de frijol cultivados en agrolita durante tres semanas. Plantas regadas con solución Hoagland completa (■) y plantas regadas con solución Hoagland sin Pi (□). El * indica que la diferencia es significativa respecto al control ($p < 0.05$), $n = 4$.

Las hojas jóvenes de las plantas C60 presentaron cambios poco relevantes en la acumulación de fotosintatos. El cambio más evidente fue en el genotipo MAR1, donde la deficiencia de fósforo indujo un aumento de 2.7 veces en la cantidad de almidón, mientras que los niveles de glucosa se duplicaron.

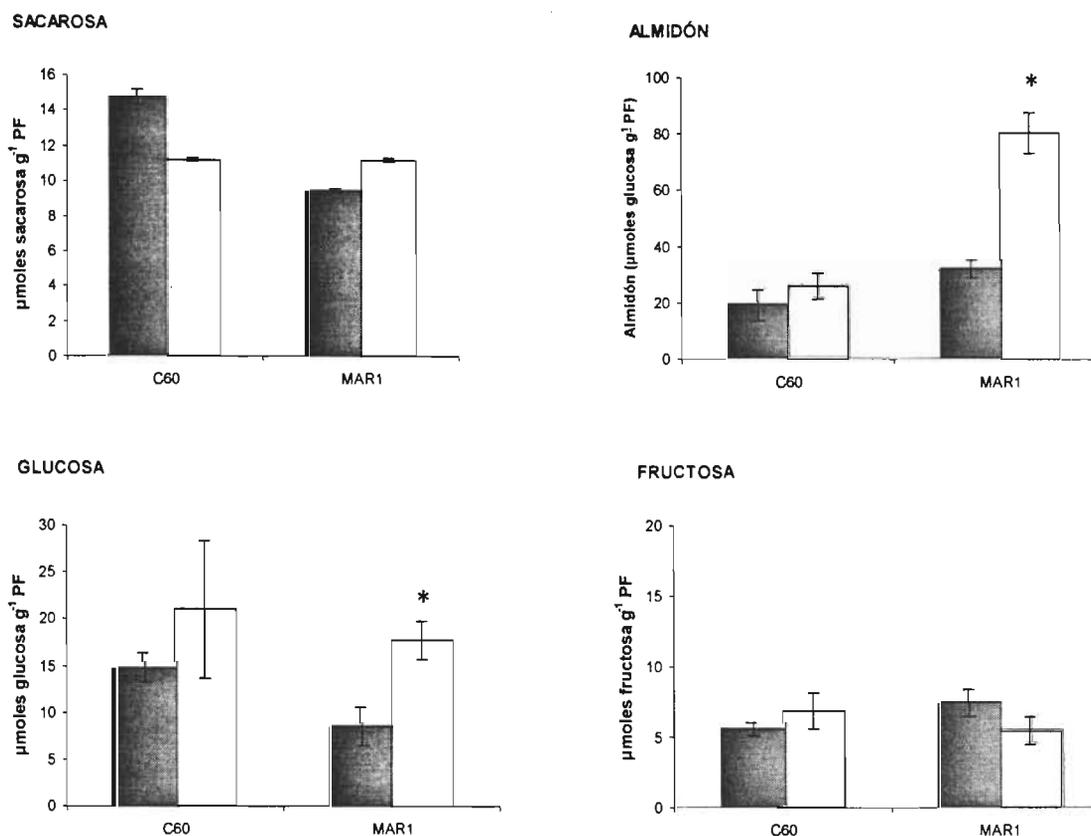


Figura 10. Contenido de carbohidratos en hojas jóvenes de dos genotipos de frijol cultivados en agrolita durante tres semanas. Plantas regadas con solución Hoagland completa (■) y plantas regadas con solución Hoagland sin Pi (□). El * indica que la diferencia es significativa respecto al control ($p < 0.05$), $n=4$.

En las raíces se observó que en las plantas C60 que crecieron sin fósforo los niveles de sacarosa se triplicaron, los de glucosa aumentaron 1.8 veces y 2.4 veces los de fructosa, registrándose pocos cambios en el genotipo MAR1.

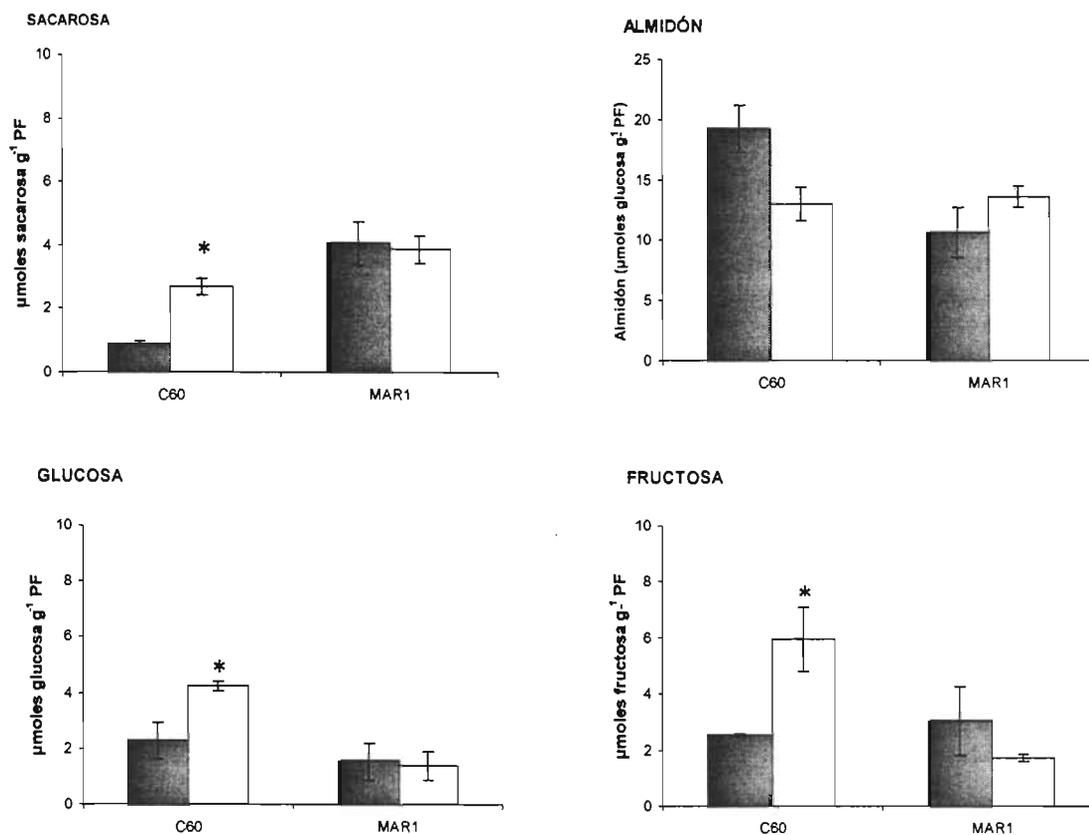


Figura 11. Contenido de carbohidratos en raíces de dos genotipos de frijol cultivados en agrolita durante tres semanas. Plantas regadas con solución Hoagland completa (■) y plantas regadas con solución Hoagland sin Pi (□). El * indica que la diferencia es significativa respecto al control ($p < 0.05$), $n=4$.

V.5 EFECTO DE LA DEFICIENCIA DE FOSFATO SOBRE LA ASIMILACIÓN DE CARBONO Y DISTRIBUCIÓN DE FOTOSINTATOS.

Con el objeto de evaluar si la deficiencia de fósforo modificaba la distribución de fotosintatos, se hicieron experimentos para investigar en que medida se afectó la fijación de carbono y la distribución de fotosintatos. Se evaluó la capacidad de asimilación de CO_2 de dos genotipos de frijol (C60 y MAR1) y se encontró que la fijación de ^{14}C realizada por la hoja madura no se modifica en condiciones de deficiencia de fósforo en ninguno de los genotipos estudiados (tabla 4).

Tabla 4. Fijación y distribución de carbono en diferentes tejidos de dos genotipos de frijol, cultivados en suficiencia (+Pi) y deficiencia (-Pi) de fosfato.

GENOTIPO	Hoja madura	MARCA (μCi) ^a	
		Hoja Joven	Raíz
C60+Pi	12.43 \pm 1.48	0.24 \pm 0.14	0.62 \pm 0.11
C60-Pi	9.63 \pm 1.49	0.30 \pm 0.08	0.64 \pm 0.35
MAR1+Pi	13.73 \pm 5.13	1.76 \pm 1.44	1.28 \pm 0.46
MAR1-Pi	15.97 \pm 0.69	0.27 \pm 0.30	1.24 \pm 0.35

Las plantas de tres semanas regadas con solución Hoagland completa (+Pi) y con solución Hoagland sin fosfato (-Pi), se marcaron durante una hora con $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ y se cosecharon 4 horas después. Se cuantificó la marca incorporada en azúcares solubles y almidón de hojas maduras, hojas jóvenes y raíces. ^a Valores promedio \pm DE (n=4).

Se realizaron experimentos tendientes a definir el efecto de la deficiencia de Pi sobre la exportación de fotosintatos y la distribución del carbono en los tejidos de demanda. Dada la variación experimental en algunos casos no fue posible estimar adecuadamente la cantidad de carbono exportado a hojas jóvenes y raíces, como puede observarse en la tabla 4, sin embargo, se aprecia que los genotipos estudiados envían a la raíz cantidades diferentes de carbono y que esa distribución no fue afectada por la deficiencia de Pi.

V. 6 ACUMULACIÓN DE ALMIDÓN EN HOJAS MADURAS DEL GENOTIPO C60.

Para definir si la acumulación de almidón era el resultado de una mayor síntesis o de una menor degradación, se realizaron experimentos en los que se encontró que la distribución del CO_2 fijado entre azúcares solubles y almidón, no mostraba cambio en las hojas de las plantas sometidas a estrés por carencia de fosfato (figura 12).

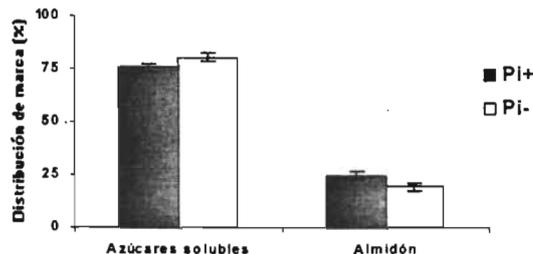


Figura 12. Distribución de ^{14}C en carbohidratos de hojas maduras de frijol, genotipo C60. Las plantas se marcaron durante una hora con $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$ y se cosecharon 4 horas después. Se cuantificó la marca incorporada en azúcares solubles y almidón. El * indica que la diferencia es significativa respecto al control ($p < 0.05$).

Dado que la distribución de carbono hacia la síntesis de almidón no se vio modificada por la deficiencia de fósforo, la acumulación de este metabolito observada en las hojas maduras de frijol podría atribuirse a una menor degradación. Considerando que esta molécula se sintetiza y acumula en el día y se degrada durante la noche, se realizó un experimento consistente en marcar con ^{14}C el almidón sintetizado por plantas que crecieron en presencia y ausencia de fósforo, durante tres semanas. Un grupo de plantas se cosechó cuatro horas después del marcaje, mientras que otras fueron analizadas al día siguiente después de un período de oscuridad. Se observó que las plantas no mostraron diferencia en la síntesis de almidón, pero al comparar la marca de ^{14}C en almidón después del período de degradación (12 horas), se encontró que las hojas de las plantas sometidas a estrés nutricional presentaban un nivel mayor (figura 13). Estos resultados sugieren que la acumulación de almidón observada es el resultado de una menor degradación.

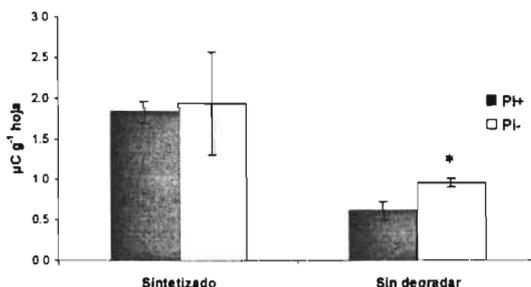


Figura 13. Contenido de ^{14}C en almidón durante el período de luz (sintetizado) y después de un período de oscuridad de 12 horas (sin degradar) en plantas de frijol C60. Plantas regadas con solución Hoagland completa (■) y con solución Hoagland sin Pi (□), durante tres semanas. El * indica que la diferencia es significativa respecto al control ($p < 0.05$).

La degradación del almidón es un proceso complejo y aun no bien comprendido, que requiere la acción conjunta de diversas enzimas. Se ha propuesto que la asociación de proteínas al gránulo de almidón es determinante en la regulación de su metabolismo y algunos estudios sugieren que las propiedades del gránulo quizá constituyan un factor importante en la asociación de proteínas y en la susceptibilidad del almidón a ser degradado (Blennow *et al.*, 2002; Ritte *et al.*, 2000). Dado que el grado de fosforilación es una de las características de los gránulos de almidón que se han propuesto como decisivas para la hidrólisis del almidón de hojas, se midió el contenido de fosfato en los gránulos de almidón de hojas de plantas de frijol cultivadas con y sin fosfato, observándose un nivel de $13.4 \pm 0.1 \mu\text{mol Pi g}^{-1}$ almidón en las primeras y de $8.9 \pm 0.6 \mu\text{mol Pi}$ en las últimas.

Por otro lado, como puede observarse en la figura 14 se encontraron diferencias en el patrón de proteínas asociadas a los gránulos, algunas de las cuales podrían ser importantes en el proceso de degradación.

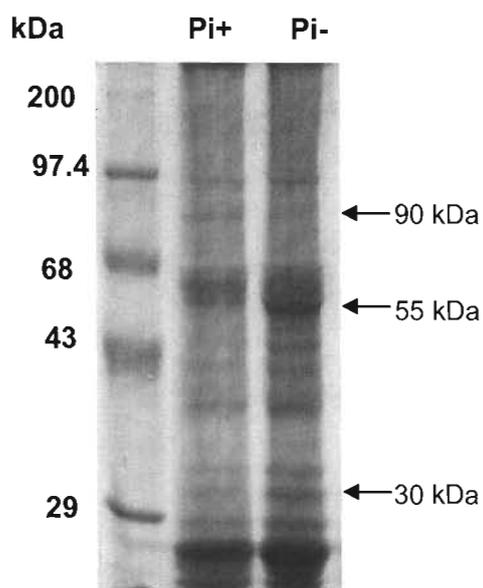


Figura 14. Proteínas asociadas a gránulos de almidón de hojas de plantas de frijol cultivadas sin fosfato (Pi-) y con fosfato (Pi+) durante tres semanas.

V.7 EFECTO DEL Pi SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA INVOLUCRADA EN LA DEGRADACIÓN DE SACAROSA.

La sacarosa es un metabolito que en la mayoría de las plantas es translocada de las hojas fuente a los órganos de demanda donde se utiliza ó se almacena (Ciereszko y Barbachowska, 2000). La degradación de la sacarosa es catalizada por invertasas (β -D-fructofuranósido fructohidrolasa, EC 3.2.1.26) y por la sacarosa sintasa (SuSy; UDP-glucosa: D-fructosa-2-glucosil transferasa, EC 2.4.1.13). La deficiencia de Pi modifica radicalmente el patrón de crecimiento de las plantas y es probable que también altere la forma en que se distribuyen los fotosintatos. Otra forma de evaluar los efectos de la deficiencia de Pi sobre la distribución de fotosintatos fue cuantificar la actividad de las enzimas sacarosa sintasa (SuSy) e invertasas solubles y de pared, por considerarse factores determinantes de la fuerza de demanda (Nguyen-Quoc y Foyer, 2001). La actividad de SuSy en las hojas maduras como puede observarse en la figura 15 no se ve afectada por la deficiencia de Pi; sin embargo, se encontró que en las hojas jóvenes la actividad se incrementa 5.8 veces en el genotipo MAR1 y 9.0 en las plantas C60, mientras que las raíces de las plantas que crecieron en escasez sufrieron un decremento en la actividad (66.1% en MAR1 y 24.0% en C60).

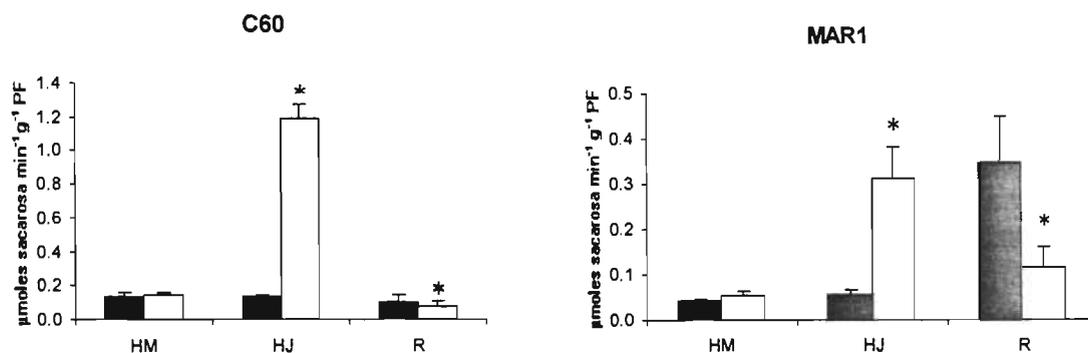


Figura 15. Actividad de la enzima sacarosa sintasa (dirección de síntesis), en diferentes tejidos de plantas de frijol. HM: hoja madura; HJ: hoja joven; R: raíz. Plantas regadas con solución Hoagland completa (■) y plantas regadas con solución Hoagland sin Pi (□). El * indica que la diferencia es significativa respecto al control ($p < 0.05$), $n=4$.

La actividad de la invertasa soluble ácida prácticamente no presentó cambios en las plantas de frijol desarrolladas en carencia de Pi (figura 16). Por otro lado, se encontró que en deficiencia de Pi la actividad de la invertasa neutra se duplica en las hojas jóvenes del genotipo C60 y se incrementa en un 30% en las hojas de la variedad MAR1, no se observaron cambios relevantes en la actividad de las hojas maduras y las raíces. De manera similar la actividad de la invertasa de pared se incrementó 10 veces en las hojas jóvenes de las plantas C60 y 3 veces en MAR1, tampoco se observaron cambios relevantes en los otros tejidos (figura 16).

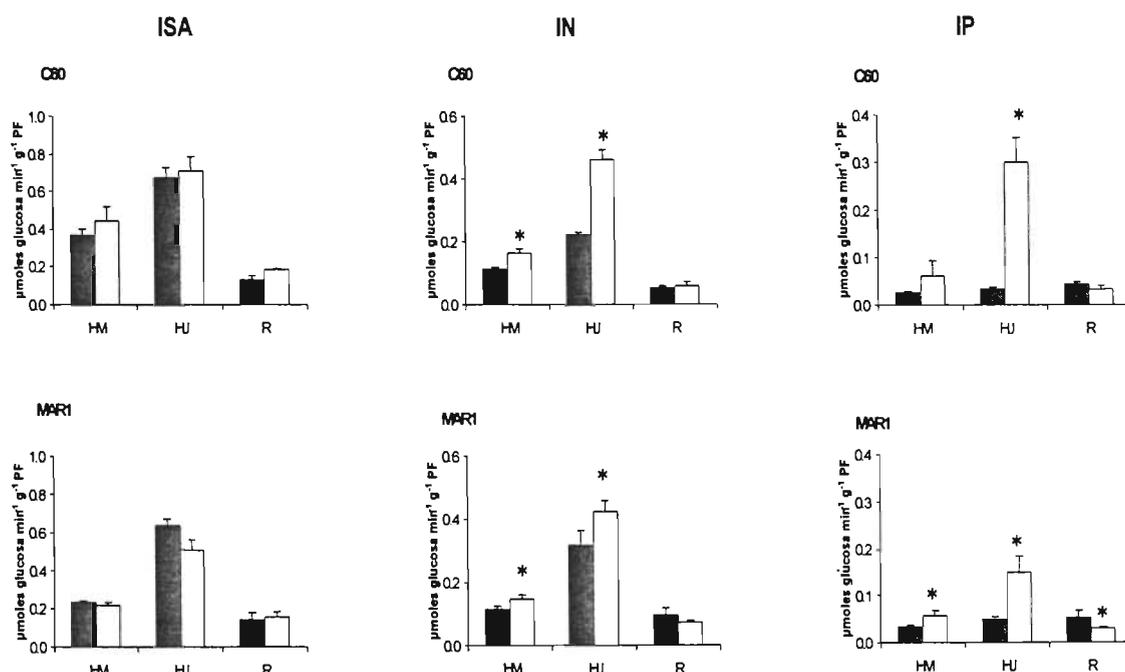


Figura 16. Cambios en actividad de las enzimas invertasa soluble ácida (ISA), invertasa neutra (IN) e invertasa de pared (IP) en dos genotipos de frijol. Plantas regadas con solución Hoagland completa (■) y plantas regadas con solución Hoagland sin Pi (□). El * indica que la diferencia es significativa respecto al control ($p < 0.05$), $n = 4$.

V.8 MECANISMOS ADAPTATIVOS: ENZIMAS DEL METABOLISMO DE FOSFOENOLPIRUVATO EN HOJAS Y RAÍCES

Durante la deficiencia de Pi se activan enzimas que no requieren nucleótidos-P ó fosfato, de tal manera que los pasos que emplean estos metabolitos se sustituyen por otros y eso ayuda a que el metabolismo de carbono proceda durante estas condiciones (Raghothama, 1999). Se ha propuesto que un punto muy importante en el reciclamiento de Pi esta relacionado con el metabolismo del fosfoenolpiruvato (PEP, Figura 17), donde tanto la PEP carboxilasa como la PEP fosfatasa podrían ser de gran utilidad (Kondracka y Rychter, 1997).

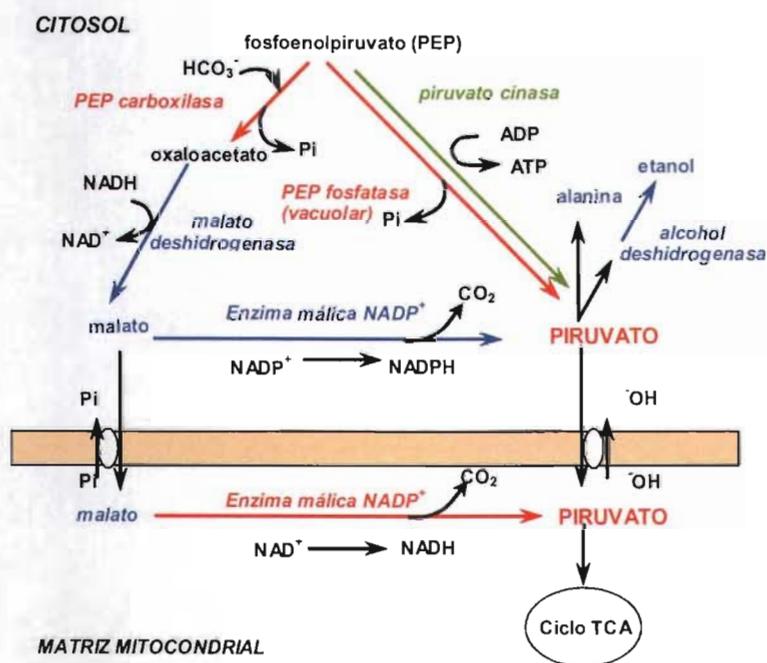


Figura 17. Cambios en el metabolismo del piruvato en deficiencia de fosfato. Tomado de Juszczuk y Richter, 2002.

Con el fin de investigar si adaptaciones de este tipo podrían contribuir a mejorar la respuesta de las plantas de frijol a la deficiencia de Pi, se midió la actividad de las enzimas PEPC (PEP carboxilasa), PEPP (PEP fosfatasa), PK (piruvato cinasa) y PGI

(fosfoglucosa isomerasa) en hojas maduras (figura 18) y raíces de plantas de frijol (figura 19).

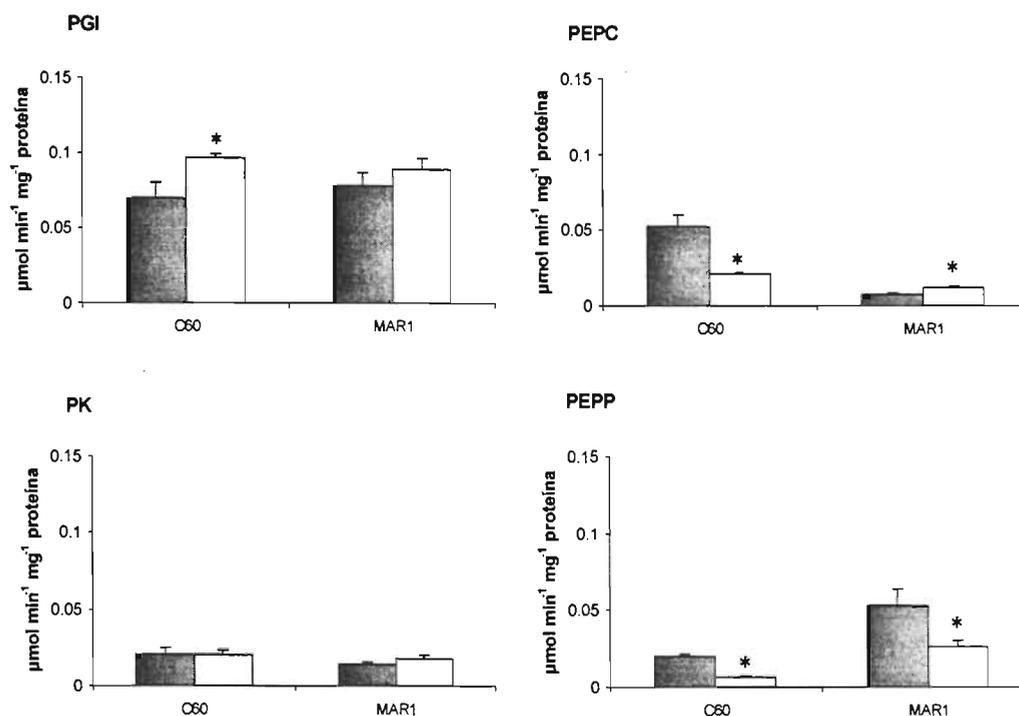


Figura 18. Actividad enzimática en hojas maduras de dos genotipos de frijol cultivadas en agrolita durante tres semanas. Plantas irrigadas con solución Hoagland completa (■) y plantas irrigadas con solución Hoagland sin Pi (□). El * indica que la diferencia es significativa respecto al control ($p < 0.05$), $n=4$.

Como puede observarse en la figura 18, en respuesta a la deficiencia de Pi, la actividad de PEPC en hojas de las plantas C60 disminuyó en 59.6% y en el genotipo MAR1 se incrementó en 71.4%. En raíces los incrementos de actividad fueron de 46% y 120% para C60 y MAR1 respectivamente (figura 19). A diferencia de lo reportado por Duff *et al.* (1989), la actividad de PEPP no se incrementó en respuesta a la deficiencia de Pi en hojas, sino que se vio disminuida y en raíces no presentó cambios (figuras 18 y 19). La actividad de PK no mostró cambios atribuibles a la falta de Pi en las hojas de plantas C60 y MAR1 (figura 18). En raíces su actividad se mantuvo constante en el genotipo C60, sufriendo una disminución del considerable en el MAR1 (77%). La actividad de PGI se

midió como control y como era de esperarse la deficiencia de fosfato produjo efectos mínimos.

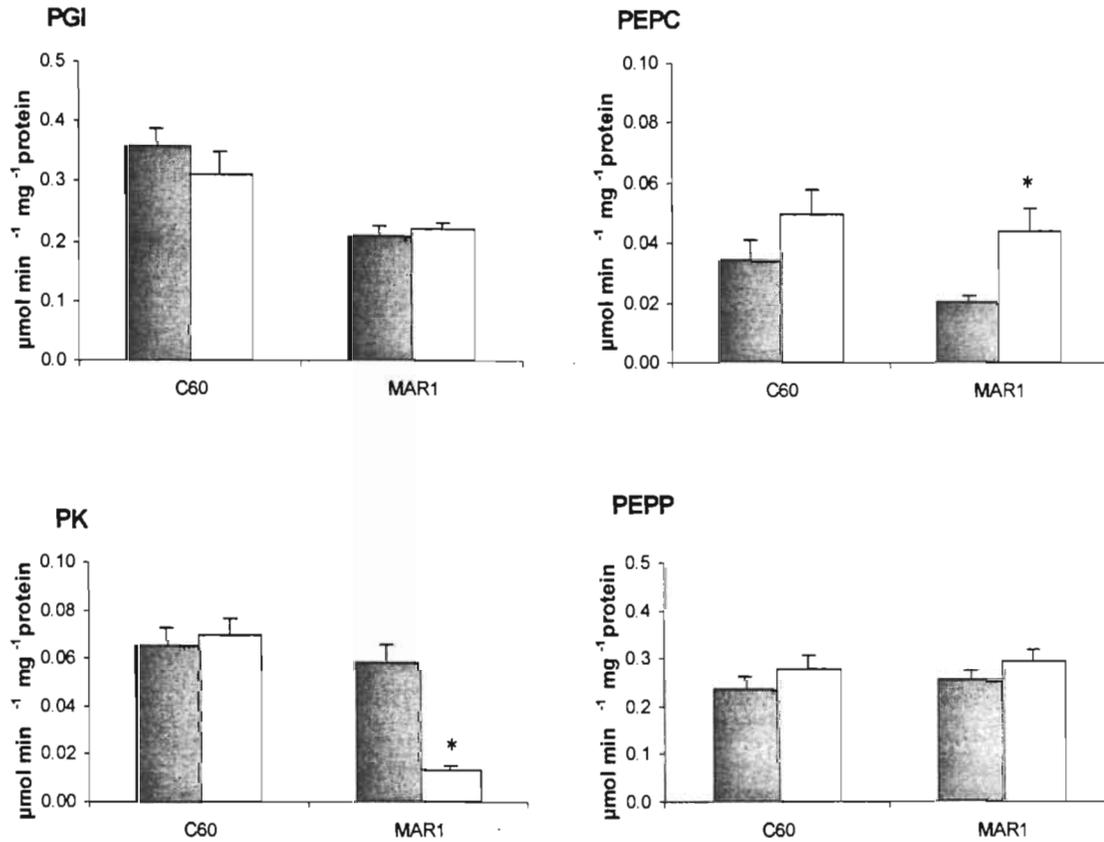


Figura 19. Actividad enzimática en raíces de dos genotipos de frijol cultivadas en agrolita durante tres semanas. Plantas irrigadas con solución Hoagland completa (■) y plantas irrigadas con solución Hoagland sin Pi (□). El * indica que la diferencia es significativa respecto al control ($p < 0.05$), $n=4$.

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

VI.1 SELECCIÓN DE GENOTIPOS CONTRASTANTES

El problema de la baja disponibilidad de P en los suelos se debe fundamentalmente a la gran reactividad del P_i , lo que provoca que en el suelo este elemento se combine con diferentes compuestos y se convierta en formas que no son asimilables por las plantas (Rausch y Bucher, 2002; Raghothama, 2000). La poca disponibilidad de P ha estado presente durante la evolución de las plantas y muchas especies han perfeccionado mecanismos que les confieren algún grado de adaptación a esta carencia. En frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) se ha reportado la existencia de variabilidad genética asociada a la respuesta a la deficiencia de P (Lynch y Beebe, 1995), sin embargo, se conoce poco acerca de las bases moleculares y bioquímicas de esas diferencias. Uno de los objetivos de este trabajo fue seleccionar genotipos contrastantes en susceptibilidad a la deficiencia de P_i y esta selección se realizó considerando como el criterio más importante la producción de biomasa. Inicialmente se observó que en general todos los genotipos evaluados fueron susceptibles a la deficiencia de P_i , (figura 6) lo cual es lógico dada la importancia de este nutrimento. Todos los genotipos presentaron un incremento en la relación raíz/parte aérea (figura 7), lo que puede constituir una ventaja para la planta, pues el incrementar el área de exploración y absorción puede traducirse en una mayor toma de P_i (Wissuwa, 2003). Los genotipos que se seleccionaron fueron el MAR1 y C60. El genotipo MAR1 en condiciones de deficiencia presentó un desarrollo de raíz mayor, mientras que la producción de biomasa en la parte aérea permaneció prácticamente sin cambio con respecto a las plantas testigo, por lo que se seleccionó como genotipo poco susceptible. Dentro de los genotipos estudiados varios presentaron características de alta susceptibilidad, sin embargo, se seleccionó al genotipo Canario 60 (C60), que mostró una reducción significativa en producción de biomasa de raíces y parte aérea (figura 8). Cabe mencionar que por la forma en que se hizo la selección (nada de P_i en el tratamiento P-), las diferencias entre las plantas de los tratamientos con y sin P_i se incrementan a medida que avanza el tiempo, es decir, todas las plantas son susceptibles. El hecho de que los síntomas se retardaran se interpretó como una manifestación de la presencia de mecanismos que mejoran la eficiencia con que se utiliza el P disponible. Esta suposición parece congruente con el hecho de que no obstante el mayor contenido de P en las semillas del genotipo C60, su desempeño fue más pobre que el genotipo MAR1.

Finalmente, los resultados muestran que en frijol puede haber más de un mecanismo que ayude a mejorar la producción de biomasa en condiciones limitantes de Pi y cuya importancia aparentemente es dependiente del genotipo.

VI.2 CONTENIDO DE P TOTAL Y P SOLUBLE

La deficiencia de Pi en la solución de riego, redujo el nivel de P total y soluble en los tejidos (tabla 2), lo cual coincide con lo que reportan Ciereszko *et al.*, (1996) y Aono *et al.*, (2001).

Por otro lado, se ha reportado que las plantas tienen por lo menos dos diferentes mecanismos para mantener la homeostasis de Pi, uno que actúa a nivel celular, mediante el cual los niveles de Pi citosólico se mantienen a expensas del Pi de la vacuola y otro más complejo que se establece a través de toda la planta e involucra diferentes órganos (Raghothama, 1999). Cuando el suministro de Pi de las raíces hacia los tallos es reducido, el Pi almacenado en las hojas maduras es removilizado hacia los tejidos de demanda y se modifica la función de tejido fuente ó tejido demanda, de tal manera que las raíces que normalmente se consideran como un órgano fuente de Pi para otras partes de la planta se convierten en un tejido de demanda (Raghothama, 1999). Adicionalmente, en condiciones de deficiencia de Pi una proporción alta del Pi absorbido es retenido en las raíces, lo que parece ser una respuesta adaptativa de la planta para promover su desarrollo para aumentar el área de exploración en el suelo y como consecuencia incrementar la toma de Pi, (Cogliatti y Clarkson, 1983 en Raghothama, 1999). En este trabajo se comparó el contenido de Pi en hojas y raíces de plantas que crecieron en suficiencia y deficiencia de Pi y se encontró que la deficiencia de P produjo disminuciones muy importantes en los contenidos de P total y soluble en hojas jóvenes, hojas maduras y raíces, sin embargo, se aprecian diferencias notables entre órganos y genotipos, las cuales tal vez estén relacionadas con su grado de susceptibilidad a la deficiencia de Pi.

Llama la atención que en respuesta a la deficiencia de Pi, las hojas maduras de ambos genotipos presentaron una disminución de aproximadamente el 50% en el P total. El P soluble en el genotipo C60 se vio afectado en la misma proporción, sin embargo, en el genotipo MAR1, la disminución fue de 32%, lo que significa que en este genotipo se logró mantener un nivel relativamente elevado de Pi disponible para los procesos fisiológicos.

La hoja joven, tanto en presencia como en deficiencia de Pi presenta los contenidos más altos de P total y soluble, lo cual puede ser un buen indicador de la prioridad con que se distribuye este nutrimento. La deficiencia produjo mayor disminución en el P total del genotipo MAR1 (45% contra 27% en C60), mientras que el Pi soluble disminuyó 56% en C60 y sólo 36% en MAR1. Esto sugiere que el genotipo MAR1 tiene como estrategia disminuir significativamente el contenido total de P en la hoja joven y compensar al menos en parte los efectos negativos al mantener elevados los niveles de P soluble.

En la raíz se apreciaron también diferencias notables entre los genotipos, el P total disminuyó más en MAR1 (67%) que en C60 (46%), mientras que el P soluble disminuyó 15% en C60 y 38% en MAR1. Es decir, ambos genotipos respondieron a la deficiencia de Pi aumentando la relación P soluble/P total; en C60 cambió de 0.24 en suficiencia de Pi a 0.40 en deficiencia de Pi, mientras que en el genotipo MAR1 aumentó de 0.32 a 0.62.

El aumento en la proporción P soluble/P total puede involucrar la participación activa de fosfatasas, cuya actividad es estimulada por la carencia de P (Duff *et al.*, 1994). El hecho de que se aumente la proporción de P soluble/P total también puede ayudar a que los eventos fisiológicos donde participa este nutrimento se vean menos afectados.

Por otro lado, una parte muy importante de P absorbido por la raíz, es transportado hacia otros órganos, los resultados sugieren que el genotipo MAR1 lleva a cabo esta distribución más eficientemente: en deficiencia de Pi el P total disminuye un 67%, mientras que en el genotipo C60 la disminución es de 46%. Es probable que esta mayor capacidad de distribución de P y la de aumentar significativamente la proporción de P soluble respecto al P total, estén relacionadas.

VI.3 ACUMULACION DE FOTOSINTATOS

Los niveles de azúcares se midieron con el objeto de analizar el efecto de la deficiencia de Pi sobre el metabolismo de carbono y se encontró que la respuesta es dependiente del genotipo y del tejido en estudio. En las hojas maduras de los genotipos evaluados la deficiencia de Pi produjo acumulación de glucosa, fructosa y almidón pero no de sacarosa. Se ha sugerido que la síntesis de sacarosa en el citosol y la de almidón en el cloroplasto contribuyen a la recirculación de Pi (Kondracka y Rychter, 1997), sin embargo, ésta no es una respuesta universal, sino que depende de la capacidad de las diferentes especies vegetales a sintetizar sacarosa y almidón (Kondracka y Rychter, 1997). Dado

que son reacciones que ayudan a recircular el P, se ha sugerido que la acumulación de sacarosa y almidón pueden ser una respuesta adaptativa, sin embargo se ha observado que en algunos casos la acumulación se da a pesar de que la deficiencia de Pi disminuye la síntesis (Kondracka y Rychter, 1997).

En este trabajo se encontró que durante el período en que las plantas estuvieron sometidas a la deficiencia de Pi no se modificó la fijación de CO₂ y tampoco cambió la distribución de fotosintatos en azúcares solubles y almidón (figura 10). Sin embargo, las hojas maduras de los dos genotipos estudiados acumularon almidón, glucosa y fructosa. La acumulación de glucosa y fructosa puede atribuirse a que al disminuir los niveles de Pi y por lo tanto de ADP y ATP (Theodorou *et al.*, 1991; Fredeen *et al.*, 1990), se reduce la fosforilación de azúcares y su utilización, mientras que la acumulación de almidón puede ser el resultado de una mayor síntesis ó de una disminución en la degradación, como proponen Usuda y Shimogawara (1991) y Rao (2000). Los experimentos de incorporación de ¹⁴CO₂ apoyan esta última sugerencia, pues se encontró que las hojas maduras de las plantas que crecieron con deficiencia de Pi tenían menor capacidad para degradar el almidón. Es importante resaltar que las plantas cultivadas en deficiencia de Pi son capaces de degradar durante la noche gran parte del almidón producido, sin embargo, la acumulación de la fracción que no se degrada después de varias semanas, puede explicar los altos niveles de almidón que caracterizan a las plantas cultivadas en deficiencia de Pi. Se ha sugerido que el proceso de degradación de almidón involucra la interacción entre diferentes proteínas con la superficie de los gránulos (Ritte *et al.*, 2000), la menor degradación del almidón en plantas cultivadas en deficiencia de Pi podría ser resultado de un efecto negativo de esta condición sobre las enzimas que lo degradan y/o sobre las propiedades del mismo almidón, las cuales podrían limitar la interacción de los gránulos con las enzimas responsables de su degradación. Se ha señalado que el grado de fosforilación del almidón afecta la capacidad de hidratación de los gránulos y por lo mismo es un elemento importante para permitir la interacción con enzimas amilolíticas (Yu *et al.*, 2001; Ritte *et al.*, 2002).

El análisis de las proteínas asociadas a los gránulos de almidón (figura 14) muestra efecto de la deficiencia de Pi y refuerza la necesidad de retomar esta investigación. Por otra parte, en las hojas jóvenes, el genotipo MAR1 acumuló almidón y glucosa; sin embargo, estos cambios no se pueden explicar con los resultados obtenidos pues no se investigó si en ese órgano la distribución de carbono hacia azúcares solubles y almidón era modificada por la deficiencia de Pi.

Como podría esperarse, el metabolismo de la raíz es diferente; por un lado el genotipo MAR1 no presenta cambios y las raíces del C60 acumulan sacarosa, glucosa y fructosa. Si se comparan estos resultados con los niveles de Pi, se observa que aún cuando en ambos genotipos se reduce el Pi total, la proporción de P soluble es mayor en el genotipo MAR1. Esto podría permitir que los azúcares se sigan metabolizando, mientras que en el otro genotipo (C60) el Pi soluble se encuentra en menor cantidad restringiendo la fosforilación y utilización de fotosintatos. Lo anterior se traduciría en un desarrollo de raíz diferente en cada genotipo.

VI.4 DEGRADACIÓN DE SACAROSA

Los datos obtenidos con el análisis de la distribución del $^{14}\text{CO}_2$ fijado por la planta no permitieron saber en que medida la deficiencia de Pi modificó la distribución de fotosintatos, sin embargo cuando se midieron las actividades de las enzimas responsables de la hidrólisis de la sacarosa, se observó claramente que algunos tejidos (hojas jóvenes) modificaron su capacidad de demanda, lo cual no necesariamente indica que los fotosintatos se dirijan hacia ellos. Se ha reportado que en los tejidos de demanda en crecimiento acelerado, la sacarosa que ingresa se hidroliza principalmente por medio de la enzima sacarosa sintasa (SuSy). En este trabajo se encontró que en condiciones de deficiencia de Pi la actividad de esta enzima se incrementó en las hojas jóvenes. En comparación con la invertasa, la participación de la enzima SuSy reduce a la mitad la energía que se requiere para transformar una molécula de sacarosa en dos moléculas de Fru-6-P (Black *et al.*, 1987). Por otro lado, se ha reportado que el nivel de P_{PPi} no cambia en condiciones de deficiencia de Pi (Rychter, 1994), lo cual plantea que *in vivo* la enzima SuSy acoplada a la UDP glucosa pirofosforilasa puede ser muy importante para economizar energía en condiciones donde los niveles de ATP se encuentran reducidos.

Las actividades de las invertasas neutra y ácida prácticamente permanecieron sin cambio en todos los tejidos de los dos genotipos evaluados. En contraste, la invertasa de pared celular, aumentó su actividad en hojas jóvenes carentes de Pi. Estos resultados podrían estar indicando que las plantas que crecen en deficiencia de Pi incrementan la fuerza de demanda a través del aumento de actividad de las enzimas SuSy e invertasa insoluble, para de esta manera asegurar el suministro de carbono y el desarrollo de este tejido.

Ambas enzimas (SuSy e invertasa insoluble), seguramente tienen papeles claves en la importación de fotosintatos, sobretodo en las plantas que se desarrollan con niveles bajos de Pi.

VI.5 RECIRCULACIÓN DE FOSFATO

El fosfoenol piruvato (PEP) es un efector alostérico de numerosas enzimas y puede ser utilizado en diversas vías metabólicas primarias y secundarias (Plaxton, 1996). El piruvato citosólico es producido a partir de PEP durante la conversión glicolítica de ADP a ATP catalizada por la enzima piruvato cinasa (PK). La concentración de piruvato en la célula es el resultado de un proceso dinámico de síntesis y utilización de piruvato en citosol y mitocondria (Juszczuk y Rychter, 2002). Se ha observado que en ambientes con reducción de Pi y/o adenilatos, la glicólisis se flexibiliza y la actividad de algunas enzimas dependientes de estos metabolitos se modifica (Plaxton, 1996). Debido a que la actividad de la enzima PK puede estar limitada durante la deficiencia de Pi, rutas alternativas del catabolismo del PEP y producción de piruvato pueden adquirir importancia bajo esta circunstancia. La vía de la enzima fosfoenol piruvato fosfatasa (PEPP) en la vacuola y la acción de las enzimas fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC), malato deshidrogenasa (MDH) y la enzima málica, pueden ser buenas alternativas para sustituir la baja actividad de la PK.

Los resultados obtenidos en relación a los niveles de actividad de las enzimas PK, PEPC y PEPP en hojas no presentan cambios en las plantas que crecieron sin Pi, lo cual parecería indicar que en este tejido la estrategia utilizada por las plantas para recircular el Pi y hacer frente a este estrés nutricional debe ser otra. Sin embargo, es importante considerar que al medir la actividad de las enzimas se incluyen los sustratos fosfatados como el ADP, que *in vivo* se encuentran en bajas concentraciones (Plaxton, 1996), por lo que los resultados obtenidos *in vitro* no necesariamente reflejan lo que está sucediendo en estos tejidos. En raíces del genotipo C60, la actividad de PK no sufre cambios en condiciones de deficiencia de Pi, sin embargo se observaron incrementos ligeros en las actividades de la enzima PEPC, mientras que en las raíces del genotipo MAR1 el decremento en actividad de la enzima PK va acompañado de un incremento significativo en la actividad de la enzima PEPC, lo cual posiblemente esté relacionado con una mayor

capacidad de este último genotipo para recircular y economizar el Pi en condiciones de bajo Pi.

VII. CONCLUSIONES

1. Todos los genotipos de frijol evaluados fueron susceptibles a la carencia de Pi, sin embargo, el grado con el que fueron afectados fue variable.
2. La producción de biomasa de plantas de frijol MAR1 y C60 que crecieron en deficiencia y suficiencia de fósforo durante tres semanas es independiente del contenido de fósforo en la semilla.
3. En los genotipos estudiados se reduce el contenido de P total cuando son cultivados en condiciones de deficiencia de Pi; sin embargo, en comparación con el genotipo C60, el genotipo MAR1 posee mecanismos que permiten mantener elevado el nivel de fósforo soluble en hojas. Adicionalmente, los niveles de P total y soluble se reducen más en las raíces del genotipo MAR1, lo cual sugiere que una mayor proporción del P disponible se distribuye en otros órganos.
4. La fijación de $^{14}\text{CO}_2$ no se modifica en condiciones de deficiencia de fósforo en ninguno de los genotipos estudiados.
5. La distribución entre almidón y azúcares solubles es prácticamente la misma en las hojas maduras de las plantas cultivadas con y sin Pi.
6. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la acumulación de almidón observada en las hojas maduras de las plantas de frijol es el resultado de una menor degradación de este carbohidrato.
7. En respuesta a la deficiencia de Pi, parece que la actividad de demanda de las hojas jóvenes se incrementa.
8. No se encontraron evidencias claras de cambios en las actividades de algunas enzimas responsables del metabolismo de PEP, como la PEPC, PEPP y PK, con excepción de la raíz de las plantas MAR1, en las que la deficiencia de Pi disminuye la actividad de la enzima PK y aumenta la de la enzima PEPC.

PERSPECTIVAS

Este proyecto constituyó el inicio de un trabajo que busca conocer que atributos son los que determinan la menor susceptibilidad a la deficiencia de Pi en algunos genotipos de frijol. Como punto de partida se decidió estudiar las alteraciones en el metabolismo de carbono de genotipos de frijol con respuestas contrastantes y como resultado se han identificado algunos aspectos que pueden ser retomados en investigaciones posteriores:

1. Estudiar los factores que en plantas cultivadas en deficiencia de Pi son responsables de incrementar los niveles de P soluble.
2. Investigar el origen y el posible significado fisiológico de los incrementos que la deficiencia de Pi induce en las actividades de las enzimas SuSy e invertasa de pared.
3. Estudiar por qué la deficiencia de Pi reduce la capacidad para degradar almidón durante la noche.
4. Investigar si la disminución en la actividad de la enzima PK y el aumento en PEPC que se observó en las raíces de plantas del genotipo MAR1 cultivadas en condiciones de deficiencia de Pi promueven cambios metabólicos que pudieran ser favorables para enfrentar la carencia de Pi.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ames BN (1966). Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatase. In: Methods in Enzymology Vol VIII. Neufeld EF, Ginsburg V eds. Academic Press.
- Aono T, Kanada N, Ijima A and Oyaizu H (2001). The response of the phosphate uptake system and the organic acid exudation system to phosphate starvation in *Sesbania rostrata*. Plant Cell Physiol 42(11): 1253-1264.
- Asmar F, Agonía T, Nielsen N (1995). Barley genotypes differ in activity of soluble extracelular phosphatase and depletion of organic phosphorus in the rhizosphere soil. Plant Soil 172:117-122.
- Barret DJ, Richardson AE, Gifford RM (1998). Elevated atmospheric CO₂ concentrations increase wheat root phosphatase activity when growth is limited by phosphorus. Aust J Plant Physiol 25:87-93.
- Bates TR, Lynch JP (2000a). Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutants of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). Am J Bot 87:958-963.
- Bates TR, Lynch JP (2000b). The efficiency of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition. Am J Bot 87: 964-970.
- Beebe S, Lynch JP, Galway NW, Tohme J, Ochoa I (1997). A geographical approach to identify phosphorus-efficient genotypes among landraces and wild ancestors of common bean. Euphytyca 95:325-336.
- Beebe SE (1995). Adaptations of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. Hort Sci 30: 1165-1171.
- Bentsink L, Yuan K, Koornneef M, Vreugdenhil D (2003). The genetics of phytate and phosphate accumulation in seeds and leaves of *Arabidopsis thaliana*, using natural variation. Theor Appl Genet 106:1234-1243.
- Bieliski RL Ferguson IB (1983). Physiology and metabolism of phosphate and its compounds. In: Rausch C y Bucher M (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. Planta 216:23-37.
- Bieliski RL (1973). Phosphate pools, phosphate transport and phosphate availability. Annu Rev Plant Physiol 24: 225-252.
- Black CC, Mustardy, L, SPNG SS, Kormanik, PP, Xu DP, Paz N (1987). Regulation and roles for alternative pathways of hexose metabolism in plants. Physiol Plant 69:387-394.

- Blennow A, Engelsen SB, Nielsen TH, Baunsgaard L, Mikkelsen R (2002). Starch phosphorylation: new front line in starch research. *Trends Plant Sci* 7:445-450.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- CIAT (International Center for Tropical Agriculture) (2001). *Common Bean: The nearly perfect food*. Cali, Colombia:CIAT.
- CIAT (International Center for Tropical Agriculture) (1987). *CIAT Annual Report 1987*. Cali, Colombia:CIAT.
- Cierieszko I, Johanson H, Hurry V (2001). Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and *pho* mutants of *Arabidopsis*. *Planta* 212:598-605.
- Cierieszko I, Barbachowska A (2000). Sucrose metabolism in leaves and roots of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *J Plant Physiol* 156: 640-644.
- Cierieszko I, Zambrzycka A, Rychter AM (1998). Sucrose hydrolysis in bean roots (*Phaseolus vulgaris* L.) under phosphate deficiency. *Plant Sci* 133:139-144.
- Cierieszko I, Gniazdowska A, Mikulska M, Rychter AM (1996). Assimilate translocation in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) during phosphate deficiency. *Plant Physiol* 149: 343-348.
- Coello P (2002). Purification and characterization of secreted acid phosphatases in phosphorus-deficient *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* 116:293-298.
- Chiera J, Thomas J, Ruffy T (2002). Leaf initiation and development in soybean under phosphorus stress. *J Exp Bot* 53:473-481.
- Dalal RC (1977). Soil organic phosphorus. *Adv Agron* 29:83-117.
- del Pozo JC, Allona I, Rubio V, Leyva A, de la Pena A, Aragoncillo C, Paz-Ares J (1999). A type 5 acid phosphatase gene from *Arabidopsis thaliana* is induced by phosphate starvation and by some other types of phosphate mobilizing/oxidative stress conditions. *Plant J* 19:579-589.
- Dietz K, Heilos L (1990). Carbon metabolism in spinach leaves as affected by leaf age and phosphorus and sulfur metabolism. *Plant Physiol* 93:1219-1225.
- Doehlert DC, Kuo TM, Felker FC (1988). Enzymes of sucrose and hexose metabolism in developing kernels of two inbreds of maize. *Plant Physiol* 86:1013-1019.

- Drew MC, Saker LR, Barber SA and Jenkins W (1984). Changes in the kinetics of phosphate and potassium absorption in nutrient deficient barley roots measured by a solution-depletion technique. *Planta* 160:490-499.
- Duff SMG, Sarath G, Plaxton WC (1994). The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plant* 90:791-800.
- Duff SMG, Lefebvre DD, Plaxton WC (1991). Purification, characterization and subcellular localization of an acid phosphatase from black mustard cell-suspension cultures; comparison with phosphoenolpyruvate phosphatase. *Arch Biochem Biophys* 286: 226-232.
- Duff SMG, Lefebvre DD, Plaxton WC (1989). Purification and characterization of a phosphoenolpyruvate phosphatase from *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol* 90:734-741.
- Duff SMG, Lefebvre DD, Plaxton WC (1989). Phosphate starvation inducible 'bypasses' of adenilate and phosphate-dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol* 90:1275-1278.
- Ermani PR, Santos JCP, Kaminski J, Rheinheimer DS (1994). Prediction of phosphorus uptake by a mechanistic model in a low phosphorus highly weathered soil as affected by mycorrhizae inoculation. *J Plant Nutr* 17:1067-1078.
- Foyer C, Spencer C (1986). The relationship between phosphate status and photosynthesis in leaves. *Planta* 167:369-375.
- Fragoso IS (2004). Respuesta de soya a la deficiencia de fosfato y sobreexpresión de fitasa en plantas transgénicas. Facultad de Química. UNAM.
- Fredeen AL, Raab TK, Rao M, Terry N (1990). Effects of phosphorus nutrition on photosynthesis in *Glicine max* (L.) Merr. *Planta* 181:399-405.
- Furihata T, Suzuki M, Sakurai H (1992). Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharantus roseus* protoplasts. *Plant Cell Physiol* 33:1151-1157.
- Gardner WK, Parberry DG, Barber DA (1983). The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. I. Some characteristics of the soil/root interphase. *Plant Soil* 68:19-32.
- Gaume A, Mächler F, Frossard E (2001). Aluminum resistance in two cultivars of *Zea mays* L. Root exudation of organic acids and influence of phosphorus nutrition. *Plant soil* 234:73-81.

- Graham PH (2002). Variation in di-nitrogen fixation among Andean bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes grown at low and high levels of phosphorous supply. *Field Crops Res* 73:133-142.
- Graham PH, Ranalli P (1997). Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *Field Crops Res* 53:131-146.
- Graham PH, Rosas JC (1979). Phosphorus fertilization and symbiotic nitrogen fixation in common bean. *Agron J* 71:925-926.
- Grotz N, Guerinot ML (2002). Limiting nutrients: and old problem with new solutions? *Curr Op Plant Biol* 5:158-163.
- Haran S, Logendra S, Seskar M, Bratanova M, and Raskin I (2000). Characterization of an *Arabidopsis* acid phosphatase promoter and regulation of acid phosphatase expression. *Plant Physiol* 124:615-626.
- Helal HM (1990). Varietal differences in root phosphatase activity as related to the utilization of organic phosphatases. *Plant Soil* 123:161-163.
- Holford ICR (1997). Soil phosphorus: its measurement and its uptake by plants. *Aust J Soil Res* 35:227-239.
- Jeschke W, Kirkby E, Peuke A, Pate J, Hartung W (1997). Effects of P deficiency on assimilation and transport of nitrate and phosphate in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.). *J Exp Bot* 48:75-91.
- Johnson JF, Vance CP, Allan DL (1996). Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. *Plant Physiol* 112:31-41.
- Jones (1982). Hydroponics: its history and use in plant nutrition studies. *J Plant Nutr* 5:1003-1030.
- Jungk A, Seeling B, Gerke J (1993). Mobilization of different phosphate fractions in the rhizosphere. *Plant Soil* 155/156: 91-94.
- Juszczuk IM, Rychter AM (2002). Pyruvate accumulation during phosphate deficiency stress of bean roots. *Plant Physiol Biochem* 40:783-788.
- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, D'Urzo MP, Damsz B and Raghotama KG (2002). Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol* 130:221-233.
- Kerr MW, Groves D (1975). Purification and properties of glycolate oxidase from *Pisum sativum* leaves. *Phytochem* 14:359-362.
- King RW, Zeevaart JAD (1974). Enhancement of phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiol* 53:96-103.

- Koßmann J, Sonnewald U, Willmitzer L (1994). Reduction of the chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase in transgenic plants impairs photosynthesis and plant growth. *Plant J* 6:637-650.
- Komina O, Zhou Y, Sarath G, Chollet R (2002). *In vivo* and *in vitro* phosphorylation of membrane and soluble forms of soybean nodule sucrose synthase. *Plant Physiol* 129:1664-1673.
- Kondracka A, Rychter AM (1997). The role of Pi recycling processes during photosynthesis in phosphate deficient bean plants. *J Exp Bot* 48:1461-1468.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227:680-685.
- Lauer MJ, Pallardy SG, Blevins DG, Randall DD (1989). Whole leaf carbon exchange characteristics of phosphate deficient soybeans (*Glycine max* L.). *Plant Physiol* 91:848-854.
- Liu C, Muchhal US, Uthappa M, Kononowicz AK, Raghothama KG (1998). Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* 116:91-99.
- López-Bucio J, Herrera-Estrella L (2000). Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci* 160:1-13.
- Lynch JP, Brown KM (2001). Topsoil foraging-an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil* 237:225-237.
- Lynch JP, Lauchli A, Epstein E (1991). Vegetative growth of tile common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Sci* 31:380-387.
- Lynch JP (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol.* 109:7-13.
- Lynch JP, Beebe SE (1995). Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. *Hort Sci* 30:1165-1171.
- Marschner H (1995). Mineral nutrition of higher plants. pp 537-555. New York, Academic Press.
- Martinez-Barajas E, Randall DD (1996) Purification and characterization of recombinant tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill) fructokinase expressed in *E coli*. *Protein Expression and Purif* 11:41-46.
- Martinez-Barajas E, Randall DD (1998) Purification and characterization of a glucokinase from young tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill) fruit. *Planta* 205:567-573.

- Mimura T (1999). Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *Int Rev Cytol* 191:149-200.
- Moraes TF, Plaxton WC (2000). Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from *Brassica napus* (rapeseed) suspension cultures: implications for phosphoenolpyruvate carboxylase regulation during phosphate starvation, and the integration of glycolysis with nitrogen assimilation. *Eur J Biochem* 267:4465-4476.
- Muchhal US, Pardo JM, Raghothama KG (1996). Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10519-10523.
- Narang R, Bruene A, Altmann T (2000) Analysis of phosphate acquisition efficiency in different *Arabidopsis* accessions. *Plant Physiol* 124:1786-1799.
- Neumann G, Massonneau A, Martinoia E, Romheld V (1999). Physiological adaptations to phosphorus deficiency during proteoid root development in white lupin. *Planta* 208:373-382.
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH (2001). A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *J Exp Bot* 52:881-889.
- Nielsen KL, Eshel A, Lynch JP (2001). The effect of phosphorus availability on the carbon economy of contrasting common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes. *J of Exp Bot* 52:329-339.
- Pant H, Warman P, Nowak J (1999). Identification of soil organic phosphorus by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 30:757-772.
- Pieters AJ, Paul MJ, Lawlor DW (2001). Low sink demand limits photosynthesis under Pi deficiency. *J of Exp Bot* 52:1083-1091.
- Plaxton WC (1996). The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:185-214.
- Preiss J, Romeo T (1994). Molecular biology and regulatory aspects of glycogen synthesis in bacteria. In: Cohen WE, Molden KE, eds. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Vol 47. San Diego. Academic Press, 112-138.
- Radin J W, Harting W, Kimbal BA (1988). Correlation of stomatal conductance with photosynthetic capacity of cotton only in a CO_2 enriched atmosphere: mediation by abscisic acid. *Plant Physiol* 88: 1058-1062.
- Raghothama KG (1999). Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:665-693.
- Raghothama KG (2000). Phosphate transport and signaling. *Curr Op Plant Biol* 3:182-187.

- Rao IM, Freeden AL, Terry N (1993). Influence of phosphorus limitation on photosynthesis, carbon allocation and partitioning in sugar beet and soybean grown with a short photoperiod. *Plant Physiol Biochem* 31:223-231.
- Rausch C y Bucher M (2002). Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216:23-37.
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M (2002). The starch-related R1 protein is an α -glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:7166-7171.
- Ritte G, Loberth R, Steup M (2000). Reversible binding of the starch-related R1 protein to the surface of transitory starch granules. *Plant J.* 21:387-391.
- Runge-Metzger A (1995). Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global food security. In: Raghotama 1999. Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:665-693.
- Robinson NL, Hewitt JD, Bennett AB (1988). Sink metabolism in tomato fruits. Developmental changes in carbohydrate metabolizing enzymes. *Plant Physiol* 87: 727-730.
- Rychter AM, Mikulska M (1990). The relationship between phosphate status and cyanide-resistant respiration in bean roots. *Physiol Plant* 79:663-667.
- Rychter AM, Randall DD (1994). The effect of phosphate deficiency on carbohydrate metabolism in bean roots. *Physiol Plant* 91:383-388.
- Schachtman DP, Reid RJ and Ayling SM (1998). Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* 116:447-453.
- Schmidt W (2001). From faith to fate: ethylene signaling in morphogenic responses to P and Fe deficiency. *J Plant Nutr Soil Sci.* 164:147-154.
- Smith FW, Mudge SR, Rae AL y Glassop D (2003). Phosphate transport in plants. *Plant Soil* 248:71-83.
- Smith FW, Rae AL, Hawkesford MJ (2000). Molecular mechanism of phosphate and sulphate transport in plants. *Biochem Biophys Acta* 1465:236-245.
- Taiz L, Zeiger E (1998). *Plant Physiology*. pp 287-293. Sunderland, Massachusetts. Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Tarafdar JC, Jungk A (1987). Phosphatase activity in the rhizosphere and its relation to the depletion of soil organic phosphorus. *Biol fertility soils* 3:199-204.
- Theodorou ME, Plaxton WC (1993). Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol* 99:1680-1685.

- Theodorou ME, Cornel FA, Duff SMG, Plaxton WC (1992). Phosphate starvation inducible synthesis of the α -subunit of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *J Biol Chem* 267:21901-21905.
- Theodorou ME, Elrifi IR, Turpin DH, Plaxton WC (1991). Effects of phosphorus limitation on respiratory metabolism in the green alga *Selenastrum minutum* *Plant Physiol* 95:1089-1095.
- Ulrich-Eberius CI, Novacky A, van Bel AJE (1984). Phosphate uptake in *Lemna gibba* G1: energetics and kinetics. *Planta* 161:46-52.
- Usuda H, Shimogawara K (1991). Phosphate deficiency in Maize. I. Leaf phosphate status, growth, photosynthesis and carbon partitioning. *Plant Cell Physiol.* 32:497-504.
- Vance CP, Stade S, Maxwell CA (1983). Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation. *Plant Physiol* 72:469-473.
- van Handel E (1968). Direct microdetermination of sucrose. *Anal Biochem* 22:280-283.
- Viola R, Roberts AG, Haupt S, Gazzani S, Hancock RD, Marmioli N, Machray GC, Oparka KJ (2001). Tuberization in potato involves a switch from apoplastic to simplastic phloem unloading. *Plant Cell* 13:385-398.
- Wanke M, Cierieszko I, Podbielkowska M, Rychter AM (1998). Response to phosphate deficiency in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) roots. Respiratory metabolism, sugar localization and changes in ultrastructure of bean root cells. *Ann Bot* 82:809-819.
- Watt M, Evans JR. (1999). Linking development and determinacy with organic acid efflux from proteoid roots of white lupin grown with low phosphorus and ambient or elevated atmospheric CO₂ concentration. *Plant Physiol* 120:705-716.
- Wissuwa M (2003). How do plants achieve tolerance to phosphorus deficiency? Small causes with big effects. *Plant Physiol* 133:19947-1958.
- Yan X, Stephen E B, Lynch J (1995). Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types. II. Yield response. *Crop Sci* 35:1086-1093.
- Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge U, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G, Steup M, Lue WL, Chen J, Weber A (2001). The Arabidopsis *sex1* mutant defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell* 13:1907-1918.
- Yun SJ, Kaeppeler SW (2001). Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. *Plant and Soil* 237:109-115.

- Zeeman SC, Tiessen A, Pilling E, Kato KL, Donald AM, Smith A (2002). Starch synthesis in *Arabidopsis*. Granule synthesis, composition and structure. *Plant Physiol* 129:516-529.
- Zhu Y T, Komor E, Moore PH (1997). Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and sucrose phosphate synthase. *Plant Physiol* 115: 609-616.