



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“APROVECHAMIENTO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE SOYA  
(*Glycine max*) PARA ENTENDER LA REGULACIÓN GENÉTICA DE  
SUS RESPUESTAS A LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

RODRÍGUEZ GUTIÉRREZ SARAHI

DIRECTOR DE TESIS:

DR. OSWALDO VALDÉS LÓPEZ



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO

2017



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.

**Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Genómica Funcional de Leguminosas en la Unidad de Morfofisiología y Función (UMF) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.**

**Durante la realización de este trabajo la alumna Sarahí Rodríguez Gutiérrez fue beneficiaria del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) del proyecto IA203815 que lleva como título “Determinación del papel de Argonauta 5 en la regulación de la respuesta inmune durante la interacción simbiótica entre leguminosa-rhizobio”.**

# DEDICATORIA

*A mí mamá Leticia*

*-Si yo parecía fuerte, era porque tú estabas  
conmigo.*

**John Katzenbach**

# AGRADECIMIENTOS

A mi abuelita Marí por regalarme los recuerdos más hermosos de mi niñez, por enseñarme que la vida puede ser hermosa de muchas formas, y lo único que se necesita es de una persona que te amé y se preocupe por ti.

A mis tíos Edmundo Rubio López y Luz María Gutiérrez Peralta porque gracias a ustedes tuve las mejores experiencias durante mi carrera, que fueron las maravillosas prácticas de campo. Gracias por quererme y ser los mejores tíos que pude haber tenido.

A mi padre Francisco por haberme adoptado como parte de su vida y haberme convertido en una persona de bien, por no rendirse en ningún momento, incluso cuando soy difícil de querer.

A mis amigos, Arturo, Gina, Edith Salas, Israel, Yeni, Edith Estrada por haberse convertido en las personas más especiales que conocí durante la carrera, puedo decir con toda seguridad que me llena de felicidad haberlos conocido.

A Antonio por ser mi compañero en las mejores aventuras. Siempre estaré agradecida de que nuestros caminos se hayan cruzado.

Gracias a todos por hacer que la única constante en mi vida sea el cariño de mis seres amados.

# ABREVIATURAS

**ACP – Fosfatasa ácida**

**ATP - Adenosina trifosfato**

**- Ión calcio**

**FA – Fosfatasa ácida**

**- Ion hidrógeno fosfato**

**- Ión dihidrógeno fosfato**

**- Ión de Magnesio**

**P - Fósforo**

**+P – Presencia de fósforo**

**- P – Deficiencia de fósforo**

**PAP – Fosfatasa ácida púrpura**

**Pht1 – Transportador de fósforo inorgánico**

**Pi - Fósforo inorgánico**

**PCA – Análisis de componentes principales**

**PHR1 - Respuesta a la inanición de fosfato 1**

**RT-qPCR – Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real**

**TP – Transportador de fosfato**

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1. Respuestas locales y sistémicas a la deficiencia de Pi**

**Figura 2. Adaptación de la arquitectura radical a la disponibilidad de fosfato del suelo en *Arabidopsis thaliana*.**

**Figura 3. Respuestas a nivel sistémico durante la baja disponibilidad de Pi.**

**Figura 4. Distribución mundial del cultivo de soya.**

**Figura 5. Diseño experimental.**

**Figura 6. Procedimiento para medir el área foliar (AF).**

**Figura 7. Efectos de la deficiencia de Pi sobre el crecimiento de los diferentes cultivares de Soya.**

**Figura 8. Efectos de la deficiencia de Pi sobre la morfología de las hojas.**

**Gráfica 1. Producción de área foliar, en condiciones +P y -P.**

**Gráfica 2. Crecimiento de la raíz principal.**

**Gráfica 3. Contenido de Pi soluble en las raíces.**

**Gráfica 4. Mapa de calor de la expresión de genes marcadores de la deficiencia Pi.**

**Gráfica 5. Análisis de Componentes Principales (PCA).**

**Tabla 1. Genes de respuesta a la deficiencia de Pi.**

**Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos de los genes de respuesta a la deficiencia de Pi.**

**Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos de los genes constitutivos.**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
1.1 EL FÓSFORO Y SU IMPORTANCIA.....	10
1.2 RESPUESTAS A LA DEFICIENCIA DE FOSFATO .....	11
1.2.1 RESPUESTAS A NIVEL LOCAL .....	13
1.2.2 RESPUESTAS A NIVEL SITÉMICO .....	15
1.3 LA SOYA Y EL IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN SUS CULTIVOS.....	18
1.4 APROVECHAMIENTO DE LA VARIBILIDAD GENÉTICA DE SOYA....	20
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
6.1 ÁREA FOLIAR .....	34
6.2 CRECIMIENTO DE LA RAÍZ PRINCIPAL .....	37
6.3 CONTENIDO DE PI SOLUBLE EN LAS RAÍCES.....	40
6.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE LA DEFICIENCIA Pi.....	42
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>



<b>8. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>9. APÉNDICE 1 .....</b>	<b>53</b>
<b>10. APÉNDICE 2 .....</b>	<b>54</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## RESUMEN

Las semillas de soya (*Glycine max*) son actualmente las semillas de oleaginosa de mayor importancia en el mundo. Sin embargo, la deficiencia de fosfato (Pi) limita el crecimiento y desarrollo de sus cultivos. Las plantas han desarrollado diferentes adaptaciones morfológicas y moleculares que maximizan la capacidad de las plantas para adquirir fosfato. La magnitud de estas respuestas de adaptación varía de una especie a otra, e inclusive pueden variar entre cultivares de la misma especie. Esta variación genotípica proporciona una excelente oportunidad para entender como una planta se adapta a un estrés, en este caso a la deficiencia de Pi. En este trabajo se aprovechó la variabilidad genética de cuatro cultivares de soya (Maverick, PI437169B, Prohio y LG941906) para entender sus respuestas a la deficiencia de fósforo. Se observaron modificaciones morfofisiológicas tanto en el área foliar, como en la elongación de la raíz principal, así como también adaptaciones moleculares en la expresión de genes marcadores de la deficiencia de Pi. Se concluyó que la respuesta a la deficiencia de fósforo es genotipo dependiente, esto debido a las variaciones observadas en los parámetros analizados de las cuatro variedades de soya.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 EL FÓSFORO Y SU IMPORTANCIA

El fósforo (P) es un macro-nutriente esencial para el crecimiento, desarrollo y productividad de las plantas, debido a que forma parte de diferentes biomoléculas como los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y el ATP, así como varias enzimas y coenzimas (Rausch y Bucher, 2002). Además, participa en varios procesos metabólicos esenciales como: transferencia de energía, fotosíntesis, glucólisis, respiración, síntesis de membranas y transducción de señales (Valdés-López *et al.*, 2008).

A pesar de que la concentración de P en el suelo es muy abundante, las concentraciones disponibles para la planta son reducidas (0.1 a 10  $\mu\text{M}$ ). Esto se debe a que las plantas absorben el fósforo del suelo en forma de iones ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) y ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) ( $\text{P}_i$ ) (Hinsinger, 2001; Schachtman *et al.*, 1998). Los cuales son muy reactivos y forman compuestos como sales, ésteres, fosfonatos y compuestos orgánicos como el fitato, los cuales no pueden ser absorbidos por las plantas, por lo que el P está relativamente inmóvil y su disponibilidad decrece con la profundidad del suelo (Lynch, 2007).

La presencia de cada una de las formas no asimilables de P depende del pH del suelo. En suelos ácidos, el P forma complejos poco solubles con cationes de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ), mientras que en suelos alcalinos el P se combina con cationes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) (Rausch y Bucher, 2002). Así, aunque el P abunda en el suelo, con frecuencia las concentraciones de las formas asimilables no son suficientes para satisfacer las necesidades de las plantas (Bates y Lynch, 2000).

En los países desarrollados la deficiencia de  $\text{P}_i$  ha llevado a la aplicación excesiva de fertilizantes químicos para poder mantener una producción agrícola rentable. Sin embargo, diversos estudios, han demostrado que aproximadamente el 80% del P aplicado como fertilizante queda insoluble en el suelo (Richardson *et al.*, 2011; Holford, 1997).

El uso excesivo de fertilizantes fosfatados tiene como consecuencia el aumento en los costos de producción de los cultivos, así como el enriquecimiento de los cuerpos de agua con nutrientes que provocan la eutrofización y la proliferación de algas tóxicas (Correl, 1998; Smith-Schindler, 2009).

Actualmente el consumo mundial de fertilizantes de P es de aproximadamente 50 millones de toneladas por año, sin embargo, se espera un aumento de 20 millones de toneladas anuales para el 2030 (Cakmak, 2002; Vance, 2003). Además, se estima que el tiempo de vida de los recursos totales de fosfato de roca dure unos pocos cientos de años, esto se debe a que los depósitos de más alta calidad se están agotando rápidamente con tiempos de vida previstos de 50-120 años (Yan *et al.*, 2009).

Puesto que los fertilizantes sintéticos impactan negativamente en el ambiente y en la agricultura, es de alta prioridad diseñar estrategias más amigables que permitan asegurar la producción de alimentos y al mismo tiempo proteger los recursos de suelo y agua (Solórzano *et al.*, 2005).

## **1.2 RESPUESTAS A LA DEFICIENCIA DE FOSFATO**

El mantener estable la concentración de Pi tiene un papel importante en las células vegetales ya que en el citoplasma dicha condición es esencial para que se lleven a cabo muchas reacciones enzimáticas. El mantenimiento del contenido de este nutrimento en varios compartimentos celulares como la vacuola, plástidos, mitocondrias y citoplasma es necesario para conservar su homeostasis (Schachtman *et al.*, 1998). Por lo anterior fue postulado primeramente por Goldstein y colaboradores (1988) que en las plantas existe un sistema de rescate que actúa de manera coordinada ante el estrés por Pi. Desde entonces diversos estudios han demostrado que cuando las plantas crecen en condiciones limitantes de Pi pueden presentar diversas respuestas que les permiten adaptarse (Raghothama, 1999; Rausch y Bucher, 2002; Valdés-López *et al.*, 2008; Péret, 2011).

En este contexto, las respuestas al estrés por Pi pueden iniciar cuando la planta censa el contenido de Pi interno y/o externo. En consecuencia, las plantas han desarrollado diversas adaptaciones morfológicas y moleculares que les permiten hacer frente a la deficiencia de Pi, reduciendo su uso e incrementando su captación y reciclaje (Raghothama, 1999).

Estas respuestas adaptativas pueden ser agrupadas de acuerdo a que nivel responden. En *Arabidopsis thaliana* la deficiencia de fósforo desencadena una serie de respuestas adaptativas que pueden agruparse en respuestas locales y sistémicas (a larga distancia). Este proceso comienza con la detección de Pi, resultando en un cambio en el programa de desarrollo de la planta para mejorar su capacidad de tolerar ambientes pobres en Pi. Las adaptaciones de desarrollo son controladas principalmente a nivel local, mientras que las respuestas sistémicas implican un aumento en la expresión de transportadores de Pi de alta afinidad, así como la secreción de fosfatasas para la recuperación intensa de Pi y el aumento en el reciclaje de Pi a través del catabolismo de los fosfolípidos (Péret, 2011) (Figura 1).

Las respuestas locales regulan las adaptaciones de desarrollo y dependen de la concentración de Pi interno. En cambio las respuestas sistémicas activan cascadas de transducción de señales encaminadas a regular transcripcional y postranscripcionalmente genes y proteínas que son necesarias para la adaptación a la baja disponibilidad de Pi (Raghothama, 1999; Raghothama y Karthikeyan, 2005; Péret; 2011) de tal forma que la planta modifica su fisiología, metabolismo y programa de desarrollo e incluso puede influir en su capacidad reproductiva para poder enfrentarse a este estrés.

Para coordinar las respuestas moleculares y morfológicas a la limitación de Pi, las plantas requieren sistemas de monitoreo que perciben e integran la información sobre el estado del Pi tanto a nivel local como a nivel sistémico (Chiou y Lin, 2011; Doerner, 2008). Aunque la naturaleza de la detección de Pi a nivel local y sistémico es aún desconocida, muchos componentes de la vía de señalización por deficiencia-Pi se han identificado durante la última década (Chiou y Lin, 2011).



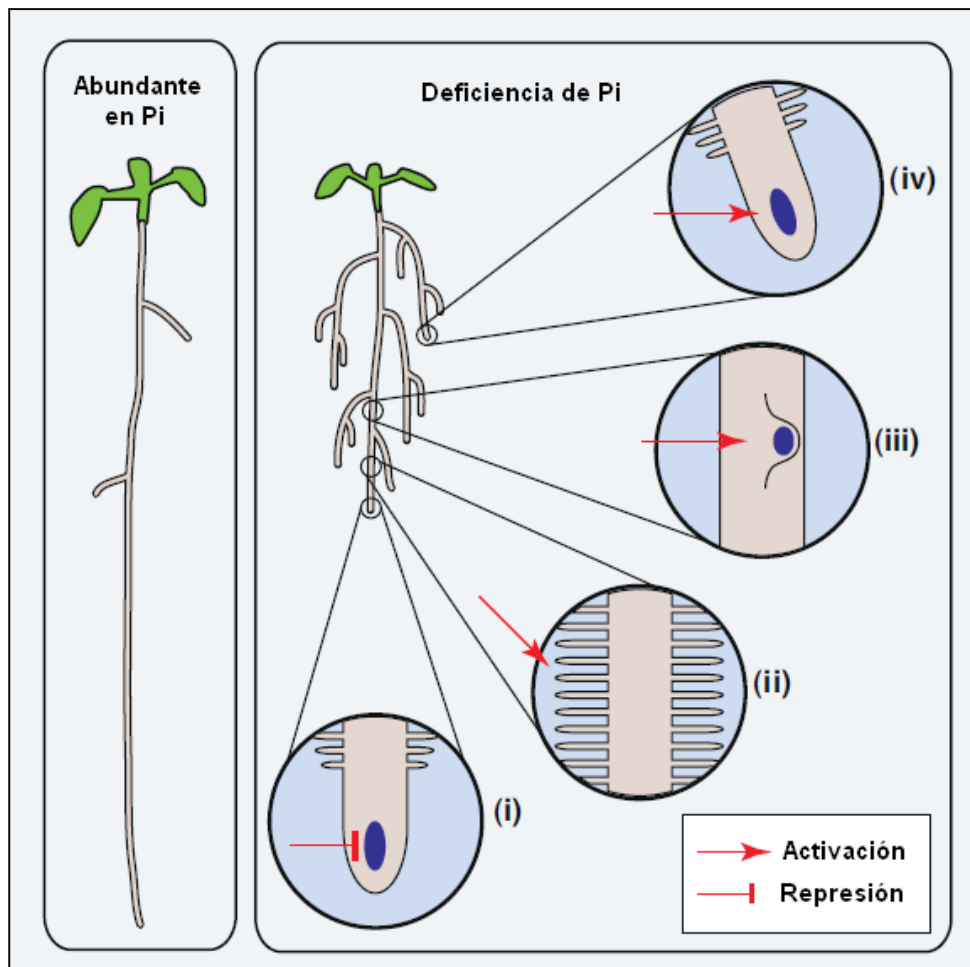
Estos cambios permiten que las raíces de las plantas exploren las partes superiores del suelo, lo que resulta en un sistema radical más superficial. Esto es particularmente útil debido a que el Pi tiende a acumularse en la capa superior, una estrategia que se describe como "forrajeo de la capa superficial" (Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002).

Los cambios en la arquitectura del sistema radical están regulados principalmente por la detección de la concentración local de Pi en la solución del suelo (Bates y Lynch, 2001). Morfológicamente, estas adaptaciones van desde cambios en la estructura de la raíz, hasta modificaciones en la cantidad, densidad y longitud de las raíces laterales, raíces adventicias y pelos radicales (Bates y Lynch, 2000).

Estas modificaciones en la arquitectura radical permiten que la planta explore un mayor volumen de suelo en busca de parches ricos en nutrientes. Los cambios en la arquitectura de la raíz juegan un papel central en la respuesta adaptativa de la planta a la inanición por Pi, ya que son también responsables de muchas otras funciones adaptativas esenciales, como la exudación de ácidos orgánicos, protones y fosfatasas ácidas, los cuales son importantes para llevar un eficiente intercambio catiónico y absorción del Pi (Liao *et al.*, 2001; Lynch y Brown, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002).

En los últimos años, esta respuesta adaptativa ha sido ampliamente estudiada y varios estudios han descrito los efectos de la deficiencia de Pi en la arquitectura de las raíces. Por ejemplo, en diversas especies vegetales, se ha observado que la deficiencia de Pi reduce el crecimiento de la raíz principal y favorece el crecimiento de raíces laterales y pelos radicales (Williamson *et al.*, 2001; Linkohr *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2002, 2005; Al-Ghazy *et al.*, 2003; Nacry *et al.*, 2005) (Figura 2).

Recientemente los científicos e ingenieros agrónomos han compartido un creciente interés en la comprensión de los sistemas de raíces, puesto que su estudio podría impulsar el desarrollo de genotipos eficientes en la captación de nutrientes (Fageria *et al.*, 2008; Pecina, 2005; Vance *et al.*, 2003; Barrios, 2014).



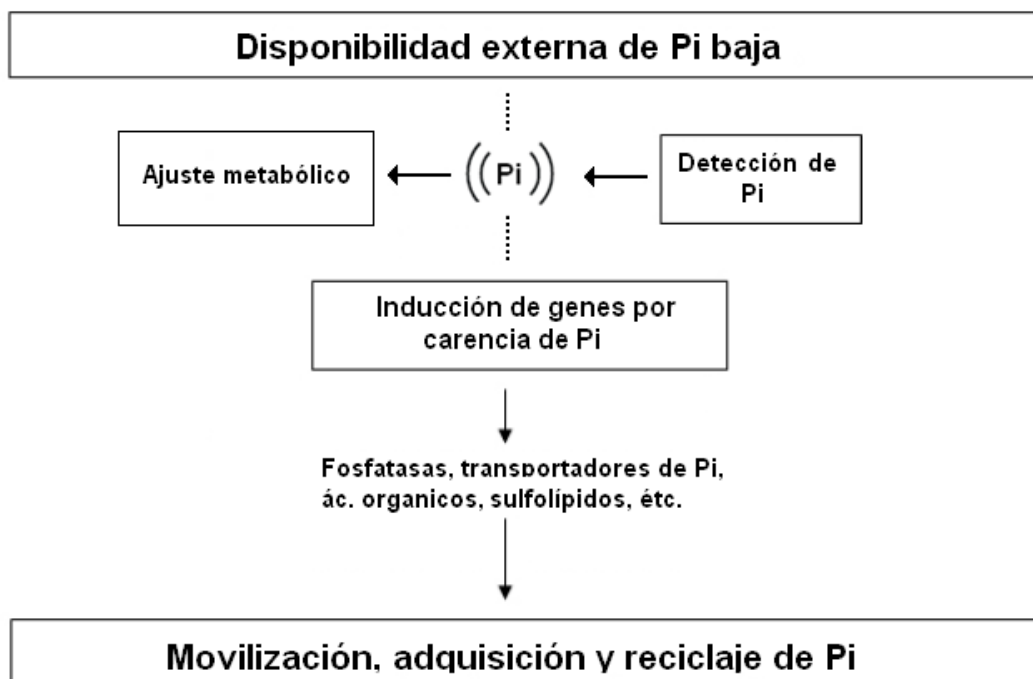
**Figura 2. Adaptación de la arquitectura radical a disponibilidad de fosfato del suelo en *Arabidopsis thaliana*. En condiciones de deficiencia de fosfato, (i) se inhibe fuertemente el crecimiento de la raíz primaria, (ii) la producción y longitud de pelos radicales incrementa y se favorece (iii) la formación de raíces laterales y (iv) su crecimiento (Péret, 2011).**

### 1.2.2 RESPUESTAS A NIVEL SITÉMICO

La deficiencia de Pi induce la señalización a larga distancia de respuestas bioquímicas. Estas respuestas bioquímicas tienen dos funciones principales: 1) el aumento en la disponibilidad de Pi endógeno y del suelo, a través de su movilización y reciclaje; y 2) adaptaciones metabólicas al estrés por Pi, que implican el evitar pasos metabólicos que requieren de Pi (Abel *et al.*, 2002) (Figura 3).



La raíz es el órgano de la planta encargado de aumentar la disponibilidad de Pi en el suelo a partir de su captación y absorción. Dentro de las respuestas bioquímicas que hacen más eficiente la disponibilidad de Pi presente en la rizósfera, se encuentran el incremento en la síntesis y exudación de aniones orgánicos como el citrato y el malato que ayudan a solubilizar el Pi de compuestos inorgánicos (Jones, 1998; Watt y Evans, 1999; Raghothama, 1999) así como de nucleasas y fosfatasas ácidas que pueden liberar el Pi de compuestos orgánicos presentes en el suelo (Nürnbergger *et al.*, 1990; Löffler *et al.*, 1992; Duff *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2000).



**Figura 3. Respuestas a nivel sistémico durante la baja disponibilidad de Pi. El estrés por P induce la expresión de genes que promueven la movilización, adquisición y el reciclaje de Pi. La inducción de estos genes está influenciada por el estatus de Pi en la planta. El Pi reprime las respuestas morfológicas y moleculares evocadas por su carencia. (Modificado de Abel *et al.*, 2002).**

Existen diversos mecanismos que se activan durante el estrés por Pi, entre ellos se encuentra la modificación del metabolismo, donde la planta usa rutas alternativas para glicólisis y el transporte de electrones en la mitocondria (Plaxton y Tran, 2011).

Un ejemplo de estos mecanismos, es la activación de varias ramas del metabolismo de los lípidos que resultan en un aumento en la acumulación de antocianinas (que pueden proteger a las hojas de la foto inhibición resultante de las limitadas reacciones fotoquímicas de la fotosíntesis) (Takahashi *et al.*, 1991; Trull *et al.*, 1997). De igual forma se presentan cambios en el metabolismo de carbohidratos (por ejemplo, incrementos en el contenido de almidón), y en la composición de lípidos de los tilacoides (la disminución del fosfatidilglicerol puede ser compensada por un aumento en sulfolípidos) que permite que las plantas exploten el contenido de Pi de los fosfolípidos, donde reside entre el 15-30% de Pi en la célula (Essigmann *et al.*, 1998; Poirier *et al.*, 1991; Nakamura, 2013).

Las respuestas a nivel sistémico se estudiaron a partir de experimentos con raíces divididas, donde una parte de la raíz fue expuesta a un medio rico en Pi, mientras que otra parte fue sometida a bajas concentraciones de Pi en el medio. En este experimento se observó que las respuestas a la deficiencia de Pi son reprimidas sistémicamente en la parte de la raíz que fue expuesta a un medio deficiente en Pi. Esto llevó a la propuesta de que el estado de Pi interno es el que controla las respuestas bioquímicas a la deficiencia en la raíz (Burleigh y Harrison, 1998; Liu *et al.*, 1997; Baldwin *et al.*, 2001).

Además de estas respuestas, durante la última década, se han logrado avances considerables en la comprensión de cómo las plantas se adaptan a la deficiencia de Pi. Se han estudiado diversos mecanismos encaminados a incrementar la captación y movilización del Pi dentro de la planta (Misson *et al.* 2005; Muller *et al.*, 2007).

Las respuestas adaptativas incluyen el aumento en la transcripción de genes que codifican para proteínas que ayudan a una redistribución diferencial de los fotosintatos en toda la planta. Estas proteínas forman parte de la llamada vía de captación directa del Pi que incluyen diversos genes de la familia Pht1 (Transportadores de fosfato), fosfatasas ácidas, entre otros (Muchhal, *et al.*, 1996; Raghothama, 1999; Karthikeyan *et al.*, 2002).

La mayoría de los transcritos de estos genes se han localizado en las células epidérmicas de la raíz, aunque también se han detectado en hojas, tallos, cotiledones y semillas, sugiriendo su participación no sólo en la absorción de Pi por las raíces, sino también en la distribución interna raíz-brote. Finalmente, hay además modificaciones en el programa de desarrollo postembrionario (Raghothama, 1999; Raghothama y Karthikeyan, 2005).

### **1.3 LA SOYA Y EL IMPACTO DE LA DEFICIENCIA DE FÓSFORO EN SUS CULTIVOS**

La soya (*Glycine max* L. Merril) es una especie de la familia de las leguminosas (Fabaceae), originaria del suroeste de Asia donde se cultivaba desde hace unos 5,000 años AC. Es la oleaginosa de mayor importancia en el mundo debido a su alto contenido proteico y a sus aceites de consumo humano e industrial (Ridner, 2006).

La proteína de soya es excepcional con respecto a otras de origen vegetal porque su calidad es igual o equivalente a la de origen animal. Esto ha sido de suma importancia tanto para los países desarrollados como para aquellos en vías de serlo (Rand *et al.*, 2003). Se estima que la soya se utiliza en el 60% de los alimentos procesados. Su composición es de aproximadamente 30-50% proteína, 20% grasas, 24% carbohidratos y 18 a 20% aceite, además contiene vitaminas (E, K, A, D y C), y minerales como: hierro, fósforo, magnesio, zinc, cobre y calcio (Ridner, 2006; Jain *et al.*, 2008; Radhakrishnan y Ranjitha Kumari, 2009).

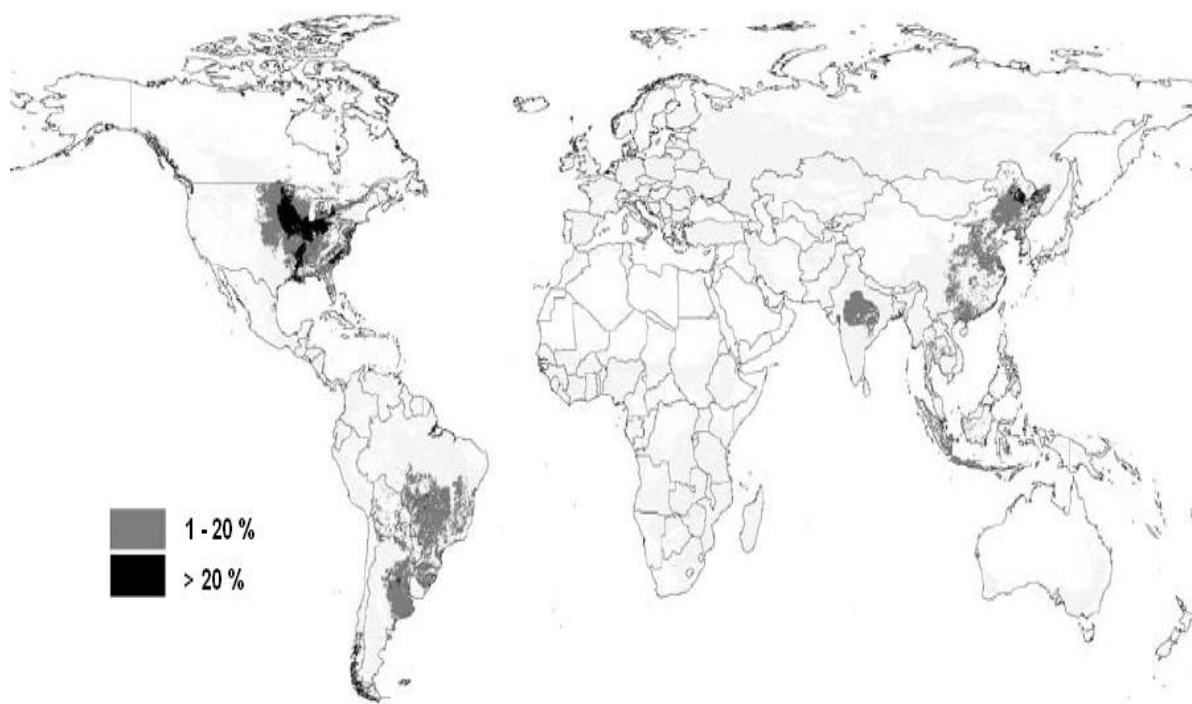
En la alimentación humana la proteína de soya representa una gran fuente de energía, ya que carece del aporte de grasas saturadas y colesterol que se encuentran en la proteína de origen animal. Además, los alimentos de soya son valiosas fuentes de ácidos grasos esenciales como: el  $\omega$ -6 (ácido graso linoleico) que reduce los niveles de colesterol en la sangre, y el  $\Omega$ -3 (ácido graso  $\omega$ -linolenico) que puede tener diversos beneficios coronarios (Brower *et al.*, 2004; Hayes, 2000).

En la industria, la extracción del aceite de soya, se utiliza para conformar diversos productos, como son: barnices, esmaltes, grasas industriales, lubricantes y tintas (Ortiz *et al.*, 2004). Es también utilizada por su concentración de proteína en la elaboración de alimentos balanceados para animales como aves y cerdos. Adicionalmente, en estos últimos años es también uno de los cultivos claves para la obtención de biocombustibles (Solorzano *et al.*, 2005).

La soya constituye uno de los diez cultivos de mayor importancia económica a nivel mundial, se cultiva en zonas tropicales, subtropicales y templadas (Stevenson, 1986). De las exportaciones agrícolas, el 75% corresponde a soya. Durante las tres primeras décadas del siglo XX, la producción de soya se limitaba en gran medida a Oriente (China, Indonesia y Japón). Sin embargo, a partir de la década de 1940, los Estados Unidos superó a todo el Oriente en la producción de soya (principalmente debido a que sus cultivos pasaron a estar completamente mecanizados). Por lo que actualmente los principales países productores y exportadores del mundo son: Estados Unidos y Argentina, estos países producen en conjunto 188 millones de toneladas (Guzmán, 2000) (Figura 4).

La producción agrícola mundial de soya para el año 2010 fue de 251.3 millones de toneladas, 8.4 millones de toneladas menos que el año anterior, representando una disminución de 3.3%; lo anterior se debe a la disminución de superficie sembrada y a la reducción de la productividad en países como Brasil y Argentina (SAGARPA, 2010).

Uno de los principales factores que limitan la producción de soya, son las diversas condiciones edáficas, especialmente la baja disponibilidad de Pi en los suelos, particularmente en los países donde el acceso al fertilizante es restringido (Lynch, 2007). Aproximadamente el 70% de la tierra cultivada mundial, incluyendo suelos calcáreos, ácidos y alcalinos, sufre de deficiencia de P. Esto se debe principalmente a que el fósforo que existe en el suelo frecuentemente se encuentra en formas complejas e insolubles (Raghothama, 1999; Oberson *et al.*, 2001).



**Figura 4. Distribución mundial del cultivo de soja. En color negro se observan los países que contribuyen con más del 20 % de la producción y exportación mundial de soja, como Estados Unidos y Argentina. En color gris, se observa el área de cultivo de países que contribuyen con el 1 - 20 % de la producción y exportación mundial de soja como Brasil y Oriente (Modificado de Leff, 2004).**

#### **1.4 APROVECHAMIENTO DE LA VARIBILIDAD GENÉTICA DE SOYA**

La soja es uno de los cultivos que poseen una gran variabilidad genética. Se ha observado que de acuerdo al ambiente distintas características agronómicas pueden variar considerablemente, como la altura de la planta, la duración de su ciclo de vida y el peso de las semillas. Por lo tanto, las diferentes variedades de soja pueden presentar distintos valores de producción en función del año y el lugar de cultivo (Rodríguez, 2009).

Esta variabilidad genética provoca que existan variedades con diferentes grados de tolerancia a la deficiencia de Pi. Los genotipos menos sensibles a la deficiencia de Pi generalmente expresan una o varias modificaciones morfo-fisiológicas y bioquímicas que les confieren una mejor respuesta de adaptación al estrés. Por lo tanto los daños derivados de la falta de Pi dependen del genotipo, de la etapa de desarrollo y del grado y duración del periodo de deficiencia (Marschner, 1995; Lynch, 2011; Péret, 2011).

Un ejemplo de esto, fue el estudio de Ude y colaboradores (2003) quienes con marcadores de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados observaron una clara diferenciación entre un grupo de variedades de soya de China, Japón y líneas ancestrales de Estados Unidos.

En otro trabajo llevado a cabo por Cui y colaboradores (2000) se indicó que los agrónomos especializados en el mejoramiento de soya en China, evitan el uso de progenitores emparentados para la producción de líneas segregantes, para ello realizan la introducción de nuevo germoplasma, inclusive con germoplasma de Estados Unidos, mismo que en la actualidad contribuye con el 7% de la base genética de soya en China. Por otro lado Robles (1985), declara que la introducción de germoplasma es lo que se recomienda para iniciar cualquier programa de fito-mejoramiento.

Diversos estudios realizados con soya apoyan la idea de que es necesario ampliar su base genética para poder encontrar patrones morfo-agronómicos de interés. Pecina y colaboradores (2005) encontraron una estrecha relación genética entre 24 líneas de soya generadas por el INIFAP en el sur de Tamaulipas, en ellas se incluían nueve variedades introducidas principalmente de Brasil.

León (2009), por su parte ha manifestado que entre más amplia sea la diversidad de especies, mayor es la posibilidad de encontrar plantas con un mayor potencial genético que les permita mejorar sus niveles de rendimiento y de resistencia a los diferentes tipos de suelo y clima (Guamán y Peralta, 1996).

El aprovechamiento de la variabilidad genética para el análisis y la selección de variedades, puede conducir al desarrollo de genotipos eficientes que mantengan o mejoren su rendimiento en condiciones donde la disponibilidad de P en el suelo es baja. Esta es una de las estrategias biológicas más atractivas para aumentar la productividad de los cultivos y limitar el uso de fertilizantes, lo que a su vez reduciría los costos de producción y la contaminación del medio ambiente (Richardson *et al.*, 2011; Lynch, 2011).

## 2. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran importancia agroeconómica de la soya, es de vital importancia entender los mecanismos fisiológicos, moleculares y bioquímicos que activan las diferentes variedades de soya cuando enfrentan una deficiencia nutricional como la baja disponibilidad de Pi. Una de las estrategias que se pueden usar para entender las respuestas de las plantas a la deficiencia de P es mediante el aprovechamiento de su diversidad genética. La soya posee una gran diversidad genética, a tal grado que hay cultivares que crecen en distintos tipos de climas y condiciones de suelo. Por lo que el objetivo de este trabajo es aprovechar la variabilidad genética de soya para entender sus respuestas a la deficiencia de P.



### **3. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL:**

Aprovechar la variabilidad genética de la soya para entender la regulación genética de sus respuestas a la deficiencia de fósforo.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1) Caracterizar las respuestas morfológicas a la deficiencia de fósforo (área foliar, longitud de la raíz principal y variabilidad en el contenido de fosfato) de los diferentes cultivares de soya.
- 2) Seleccionar genes que manifiesten una respuesta específica a la deficiencia de fósforo y evaluar su expresión diferencial entre las diferentes variedades de soya

## 4. HIPÓTESIS

- 1) Las distintas variedades de soya presentarán diferentes grados de resistencia a la deficiencia de fósforo.
- 2) La regulación genética de las variedades de soya podrán contribuir al entendimiento de sus respuestas a la deficiencia de fósforo.

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **MATERIAL VEGETAL**

El estudio de las respuestas a la deficiencia de Pi se llevó a cabo en cuatro cultivares de soya (Maverick, PI437169B, Prohio y LG941906). Entre ellas se incluyeron variedades características de Asia, Centro y Norte América. Estas semillas fueron proporcionadas por el Dr. Brian Diers de la Universidad de Illinois, Chicago.

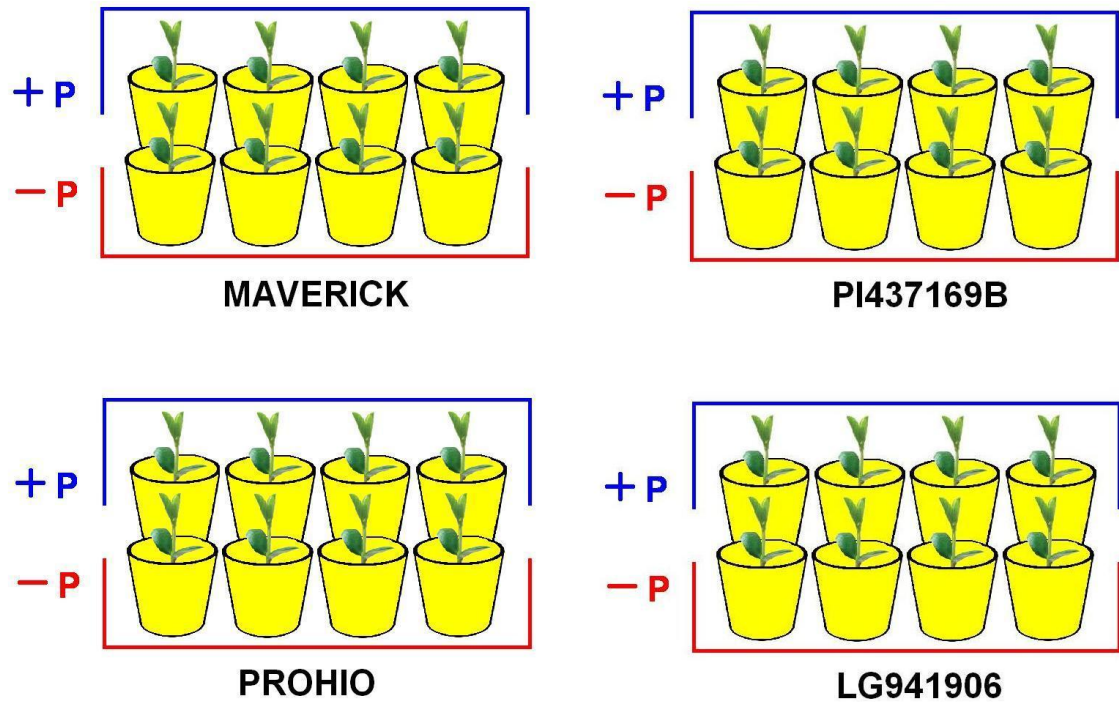
### **CONDICIONES DE CRECIMIENTO**

Las semillas se desinfectaron durante 10 minutos con hipoclorito de sodio comercial al 10% (v/v) y se lavaron cinco veces con agua destilada. Posteriormente se germinaron (durante siete días aproximadamente) en macetas con perlita, Durante la fase de germinación, las macetas se regaron con agua destilada y se mantuvieron en condiciones de humedad relativa al 100 %, para lo cual, durante este periodo se les colocó un plástico en la parte superior. Una vez que germinaron, se cortaron los cotiledones para evitar que los germinados obtuvieran nutrientes de ellos. Se mantuvieron en invernadero con una temperatura promedio de 25 durante el día y 20 durante la noche. Con un fotoperiodo de 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

### **DISEÑO EXPERIMENTAL**

La deficiencia de Pi se evaluó utilizando un diseño experimental de dos muestras independientes, donde se observó el efecto de dos tratamientos con diferente concentración de fósforo. Para cada muestra se utilizaron cuatro réplicas biológicas (Figura 5). Cada repetición (unidad experimental) contó con una semilla por maceta. Las macetas se regaron tres días por semana con la solución nutritiva reportada por Summerfield *et al.*, 1977.

Para la primera muestra se utilizó un tratamiento con condiciones +P con 1 mM de  $\text{P}_i$  (Control), mientras que para la segunda muestra se utilizó un tratamiento -P con 5  $\mu\text{M}$  de  $\text{P}_i$  (deficiente en  $\text{P}_i$ ) (Figura 5).



**Figura 5. Diseño experimental. La deficiencia de  $\text{P}_i$  se evaluó utilizando un diseño experimental de dos muestras independientes (Tratamientos +P y -P). Cada muestra contó con cuatro réplicas biológicas.**

## ANÁLISIS DE LAS RESPUESTAS A DEFICIENCIA DE Pi

Después de 21 días de tratamiento se midieron los siguientes parámetros en cada cultivar.

- 1) ÁREA FOLIAR (AF).** Para calcular el AF de cada cultivar se dibujó el contorno de cada hoja trifoliada sobre papel Bond. Posteriormente se recortaron, pesaron y guardaron en un sobre debidamente etiquetado. Por último, se obtuvo la relación entre el peso de las hojas de cada plántula y su área foliar tomando como referencia el peso de un área conocida de un cuadro de papel Bond de 1x1 cm, el cual se pesó por triplicado (Figura 6) (Arriaga *et al.*, 2013).

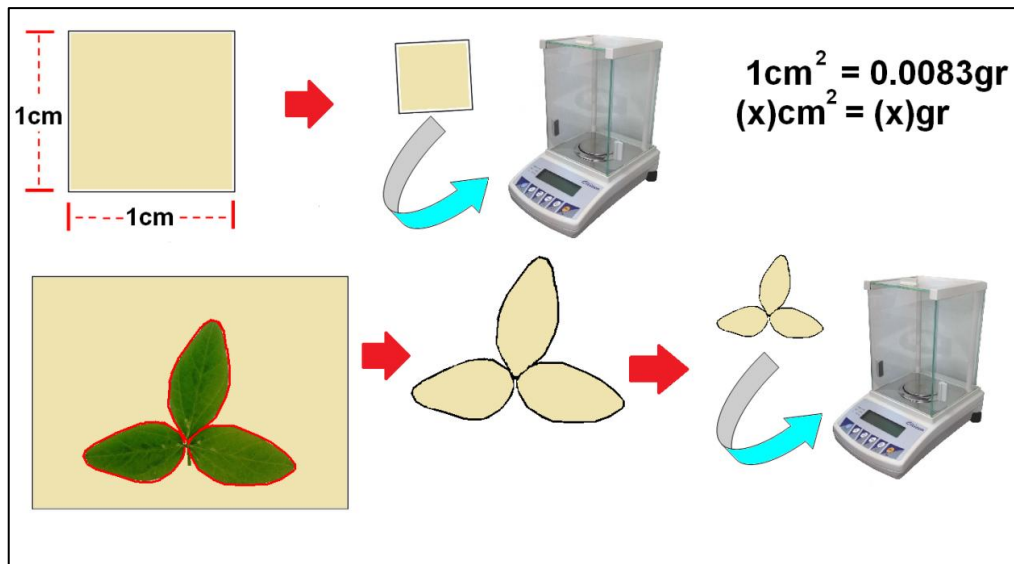


Figura 6. Procedimiento para medir el área foliar (AF).

- 2) CRECIMIENTO DE LA RAÍZ PRINCIPAL.** Se midió la elongación de la raíz principal en cada una de las plantas de cada cultivar tanto en tratamientos de +P y -P. Para ello se extendió la raíz principal y se utilizó un Vernier. La longitud de la raíz principal se tomó inmediatamente después de retirar la planta del sustrato y de haber retirado el exceso de perlita con agua.

**3) CONTENIDO DE Pi EN LAS RAÍCES.** Se midió el fósforo total presente en raíces por medio del ensayo colorimétrico reportado por Taussky y Shorr (1953). Para ello se cortaron y pesaron 2g de raíz de una planta de cada cultivar, posteriormente se maceraron en 1 ml de ácido tricloroacético al 3% y se centrifugaron 3 minutos a 13, 000 rpm a temperatura ambiente, a continuación se recuperaron 600 µl del sobrenadante y se incubaron durante 10 minutos con 1 ml de reactivo de color (Molibdeno de Amonio disuelto en ácido sulfúrico 10% y sulfato ferroso). La concentración de Pi total se midió con espectrofotómetro a 660nm.

#### **4) ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE LA DEFICIENCIA P.**

- **Extracción de ARN total.**

Para la extracción de ARN total se tomó una planta de ambos tratamientos (+P y -P) de cada cultivar. A cada planta se le cortaron las raíces y se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido, posteriormente se almacenaron a una temperatura de -80 para su posterior procesamiento.

El ARN total se aisló de las raíces congeladas utilizando el kit de aislamiento de ZYMO Research (ZR Plant RNA MiniPrep, No. Catálogo R2024) (Apéndice 1).

La pureza y la concentración del ARN fueron medidas en un NanoDrop 2000 UV VIS espectrofotómetro (NanoDrop Technologies) de THERMO SCIENTIFIC.

La integridad del ARN total se verificó por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

- **Síntesis de cDNA.**

Para sintetizar el ADN copia (cDNA) se utilizó el kit de THERMO SCIENTIFIC (DNase 1, RNase-free) (RevertAid Reverse Transcriptase, No. Catálogo k1622). La reacción se ajustó a 20 (Apéndice 2).

- **Diseño de oligonucleótidos.**

Primero se hizo una búsqueda de genes con expresión específica a la deficiencia de Pi en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, en la base de datos de **TAIR** (The Arabidopsis Information Resource) ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) (Tabla 1).

Una vez seleccionados los genes, se buscó la secuencia de transcripción homóloga a *Glycine max* en la base de datos de **Phytozome v11.0** (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) (Tabla 1).

**Tabla 1. Genes de respuesta a la deficiencia de Pi.**

Nombre del gen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Glycine max</i>	Descripción	Referencia
<i>PAP12</i>	At2g27190	Glyma06g028200	Fosfatasa ácida púrpura	Li <i>et al.</i> , 2002
<i>Pht1;4</i>	At2g38940	Glyma19g164300	Transportador de fosfato	Muchhal <i>et al.</i> , 1996
<i>ACP5</i>	At3g17790	Glyma 05g247900	Fosfatasa ácida	del Pozo <i>et al.</i> , 1999
<i>Pht1;1</i>	At5g43350	Glyma10g186500	Transportador de fosfato	Muchhal <i>et al.</i> , 1996
<i>PAP26</i>	At5g34850	Glyma17g11790	Fosfatasa ácida púrpura	Veljanovski <i>et al.</i> , 2006

Para el diseño de los oligonucleótidos se utilizó la secuencia 3' UTR de la secuencia homóloga y el programa **Primer3, v0.4.0** (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), se utilizaron los siguientes parámetros: el tamaño del amplicón fue de 120 pb, la longitud de los primers de 19-23 nt, el GC % del amplicon de 40-60 % y la Tm óptima de 60 . La secuencia de los oligonucleótidos se observa en la Tabla 2.

**Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos de los genes de respuesta a la deficiencia de Pi.**

Nombre del gen	Forward	Reverse
<i>PAP12</i>	CGAGGGTTGTTATTGAGATTTG	GGTGCAAACCACTTATGGTAA
<i>Ph1;4</i>	CGGTCCAATAGTTTAGGTGA	TGAGTTGCTAGAGACAAGGAGAA
<i>ACP5</i>	CTGCTCGGTTCACTCACTCG	TTTAGAAGTGACCCATTTGTGC
<i>Ph1;1</i>	AGTTTTGTCTCGAGTTCCTTTG	TTGTCCCTCGGTTGAAGTATG
<i>PAP26</i>	AGGATAAAAATGTGCCCTTG	AGAACCATTTCCAACGTCCTG

- **Medición de la expresión génica**

Se utilizó una PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) para amplificar el cDNA y simultáneamente cuantificar el producto de la reacción.

La PCR se realizó con el equipo de **Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System**. Para la reacción de cada muestra se utilizaron 4 µl de primer, 1 µl de cDNA y 5 µl de SYBR.

El programa de la PCR cuantitativa que se utilizó consistió en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 , seguida por 40 ciclos de 10 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. Los datos de amplificación fueron colectados cada ciclo a 60



Con los datos obtenidos de la RT-qPCR se determinaron los niveles de expresión de los genes marcadores de la deficiencia de fósforo a partir del método comparativo Ct ( ) (Livak y Schmittgen, 2001). Por medio de este método se normalizaron los datos con los niveles de Ct de los dos genes constitutivos.

Los genes constitutivos que se usaron de referencia para normalizar los niveles de expresión de los genes marcadores de la deficiencia de fósforo fueron Con6 y Con16, los cuales son genes que se expresan regularmente en soya y pertenecen a la proteína F-box y a la peptidasa S16, respectivamente (Tabla 3) (Libault *et al.*, 2008).

El cambio en los niveles de expresión, se calculó dividiendo el nivel de expresión de los tratamientos –P/+P y fueron presentados en log2.

**Tabla 3. Secuencia de los oligonucleótidos de los genes constitutivos.**

<b>Genes</b>	<b>ID</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
<b>Cons6</b>	CD397253	agatagggaaatggtgcaggt	ctaatggcaattgcagctctc
<b>Cons16</b>	AI938444	ttctggagttggaggacactg	ggcatcttaacagcagaagca

## 5) ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Para el análisis estadístico de los experimentos morfológicos de área foliar, análisis de la arquitectura radical y concentración de fósforo, los datos fueron analizados utilizando el programa **IBM SPSS Statistics v22.0**. Para verificar si había diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos (+P/-P) se hizo una prueba t de Student utilizando un valor de significancia de P<0.05.

Para realizar los diagramas de cajas se utilizó el lenguaje estadístico de “The R Project for Statistical Computing”.

Para el análisis de los productos de PCR se utilizó el programa **LinRegPCR v3.0.0**.

El PCA se realizó utilizando el programa “The R Project for Statistical Computing”. Para cada tratamiento de cada cultivar los datos se organizaron en cinco grupos: concentración de fósforo, área foliar, longitud de la raíz y expresión de los genes marcadores de la deficiencia de fósforo.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 ÁREA FOLIAR

La deficiencia de Pi afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas. Diversos estudios han demostrado que la deficiencia de Pi provoca una reducción del crecimiento de la parte aérea y por lo tanto su rendimiento es menor (Lynch *et al.*, 1991; Franco-Zorrilla, 2004). Si la deficiencia es mayor y se mantiene durante un tiempo prolongado, la planta puede detener su desarrollo y morir en etapas tempranas (Marschner, 1995). Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que la altura y la cobertura foliar de las plantas de los diferentes cultivares analizados disminuyeron en los tratamientos bajo deficiencia de fósforo (Figura 7).

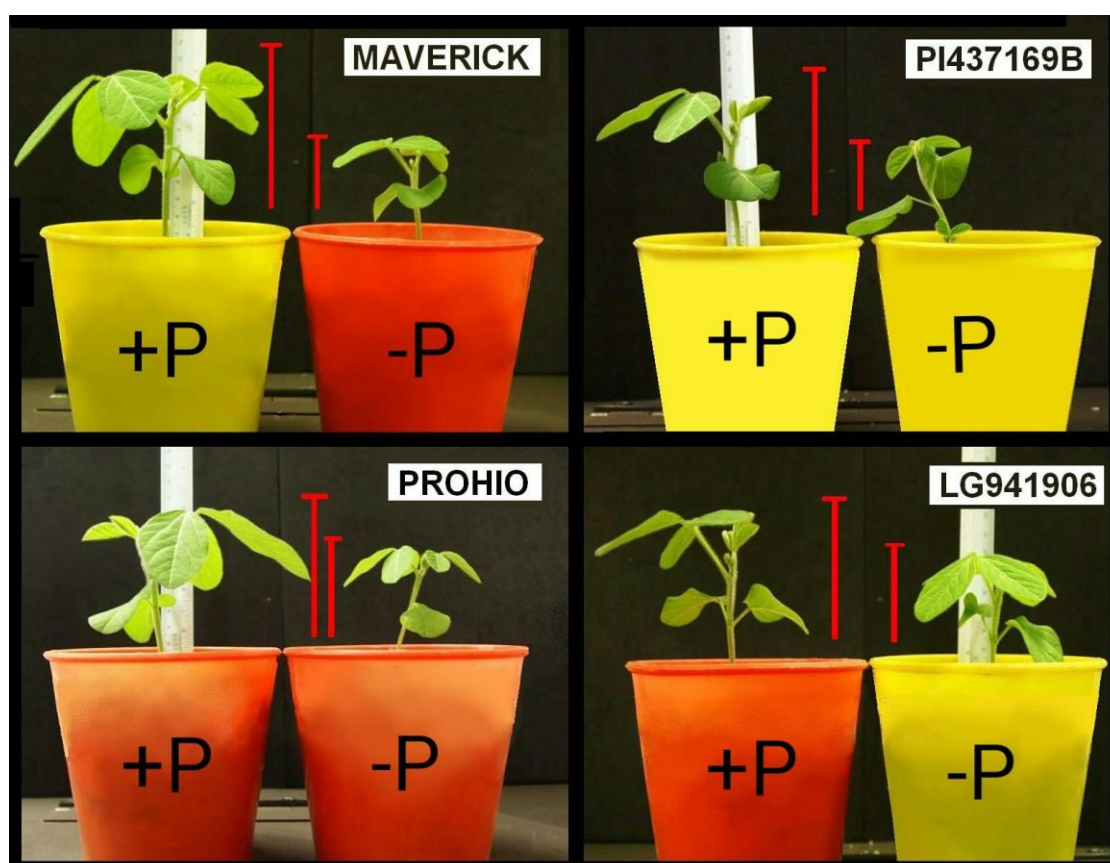
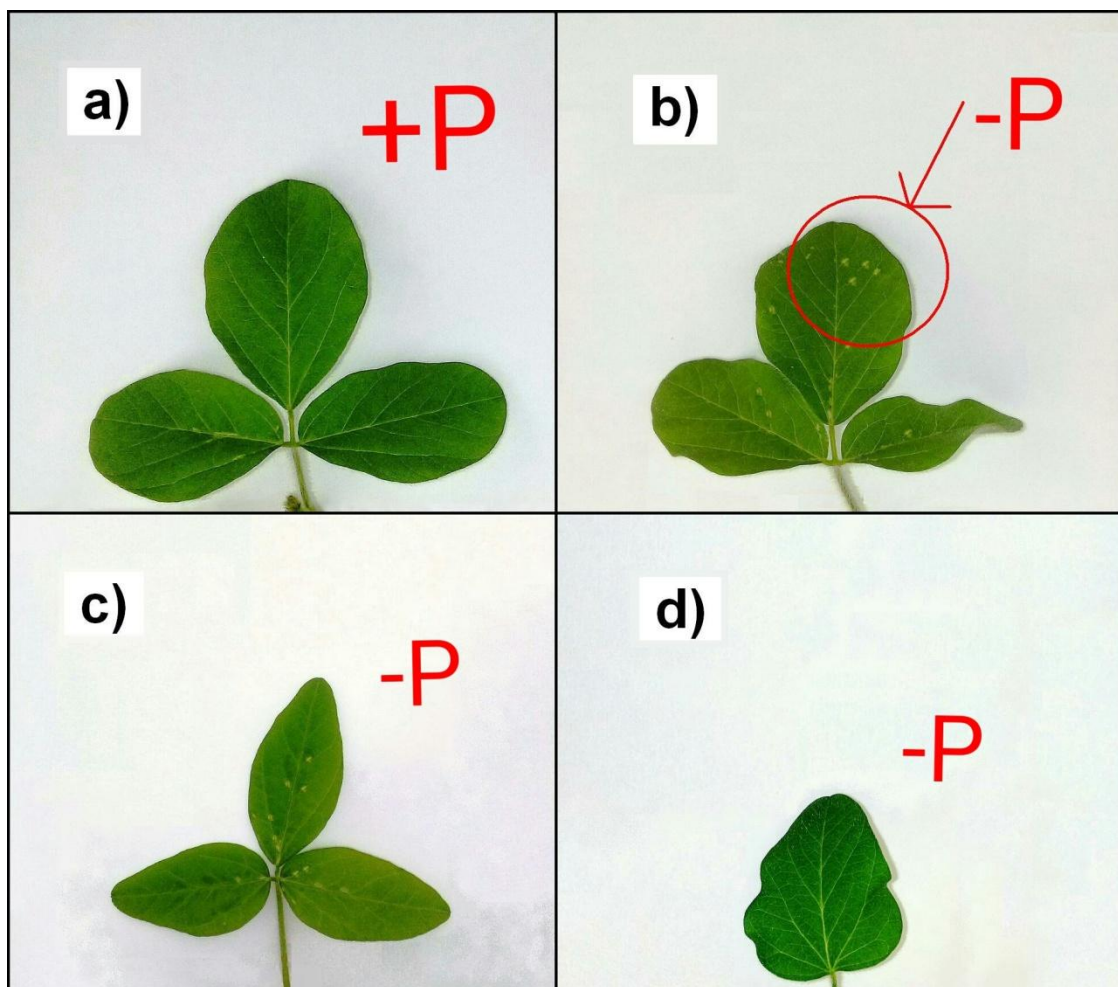


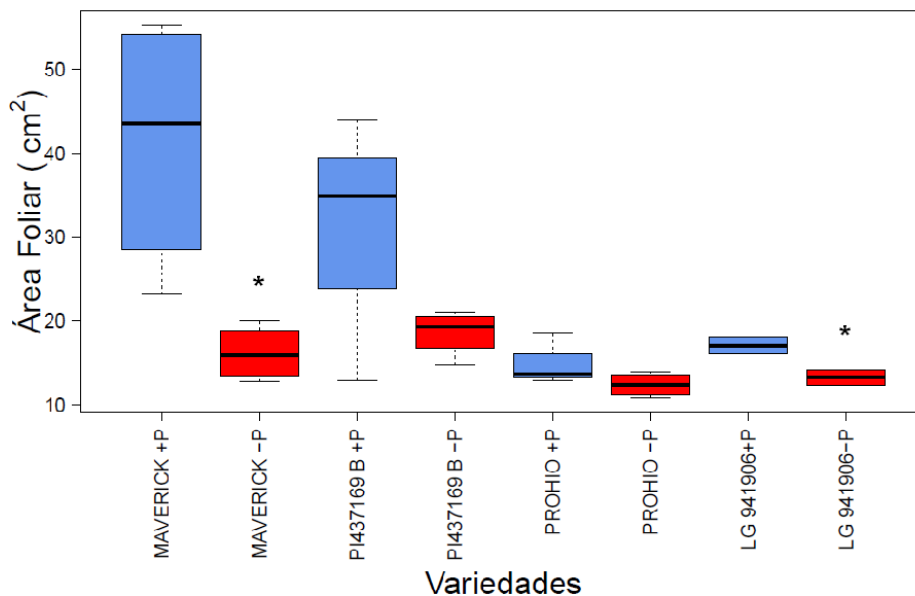
Figura 7. Efectos de la deficiencia de Pi sobre el crecimiento de los diferentes cultivares de Soya.

Dependiendo de la eficiencia de las plantas para crecer en un medio con bajo contenido de  $P_i$  y de la severidad de la deficiencia, las plantas pueden presentar hojas más oscuras o con manchas púrpuras, así como hojas cloróticas, (Lynch y Beebe, 1995; Marschner, 1995) (Figura 8). En los diferentes cultivares se observó que las hojas de las plantas que crecieron en presencia de  $P_i$  se caracterizaron por ser grandes, redondeadas y trifoliadas (Figura 8a). En contraste con las hojas de las plantas que crecieron bajo deficiencia de  $P_i$ , las cuales se caracterizaron por ser amarillentas (Figura 8b), pequeñas y ovaladas (Figura 8c), además de tener ondulaciones en el contorno de la hoja (Figura 8d).



**Figura 8. Efectos de la deficiencia de  $P_i$  sobre la morfología de las hojas.**

Para determinar los efectos negativos de la deficiencia de Pi sobre el crecimiento de los diferentes cultivares analizados se midió el área foliar. Como se puede observar en la Gráfica 1, el desarrollo y la cobertura de las hojas estuvo relacionado directamente con la disminución en la concentración de fosfatos entre los tratamientos +P y -P.

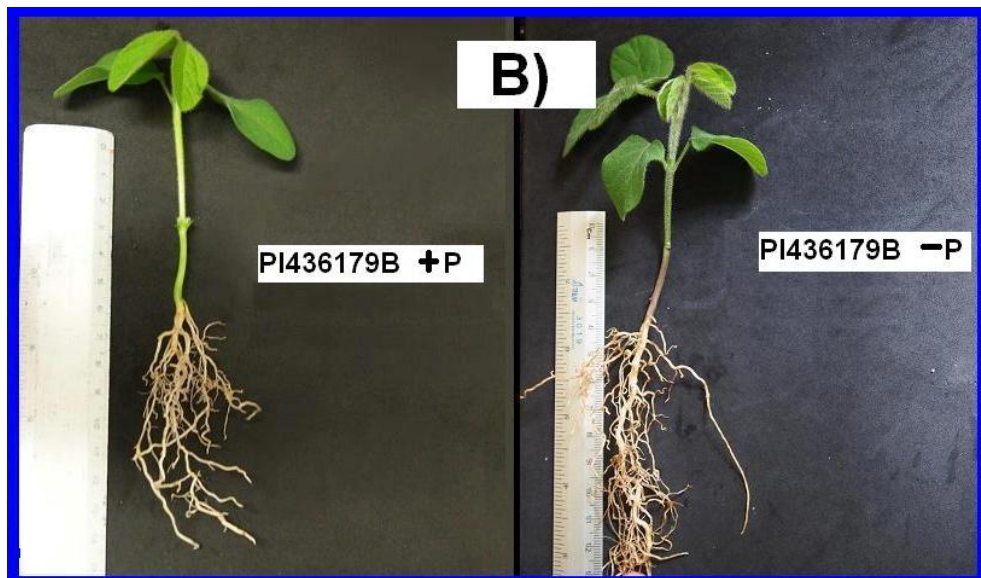
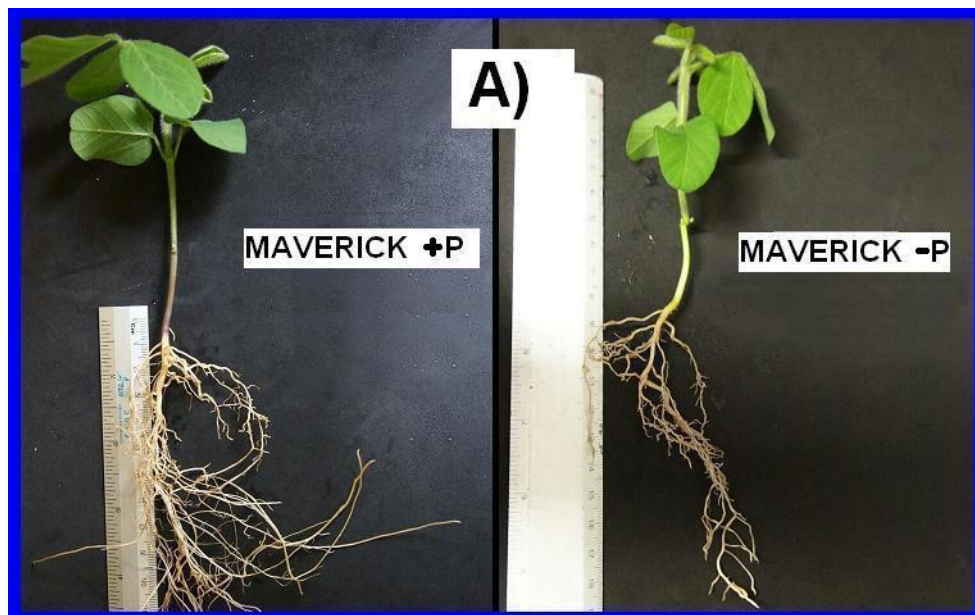


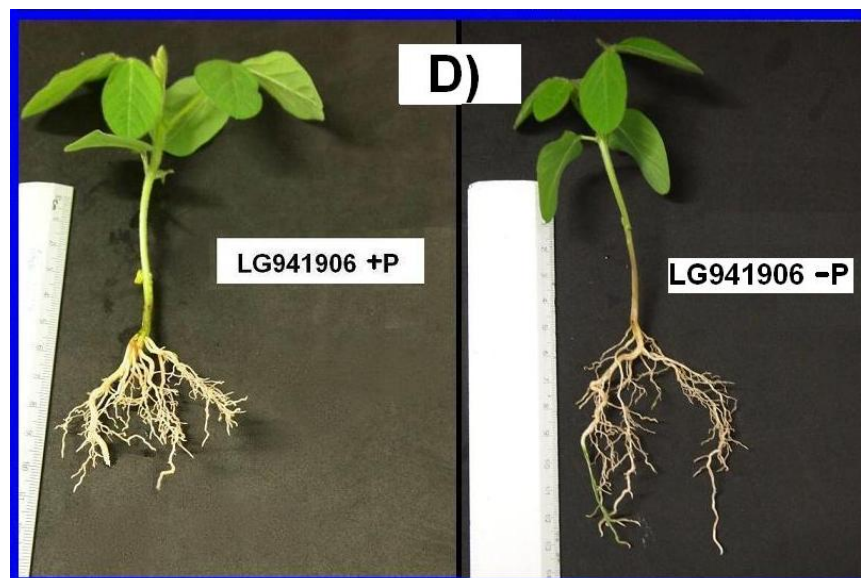
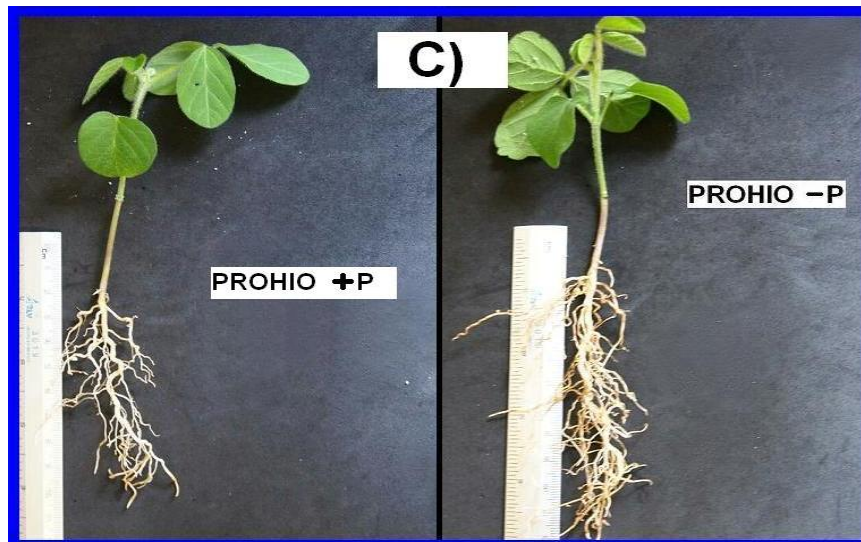
**Gráfica 1. Producción de área foliar, en condiciones +P y -P. Para cada cultivar se utilizaron 4 réplicas biológicas tanto para tratamientos +P y -P. Después de 21 días de tratamiento, Maverick y LG941906 presentaron diferencias significativas \*(p<0.05) en cuanto a la disminución del área foliar provocada por la deficiencia de Pi.**

Las variedades que presentaron una mayor área foliar fueron Maverick y PI437169B tanto en tratamientos +P y -P. Sin embargo, los cultivares que presentaron diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) en cuanto a la disminución del área foliar provocada por la deficiencia de fósforo, fueron Maverick y LG941906, esto debido a que los resultados de área foliar de la variedad de PI437169B en presencia de fósforo fueron muy variables e incluso hubo datos de cobertura foliar menores a los resultados obtenidos en deficiencia de Pi. Por último los resultados de la variedad de Prohio fueron muy similares entre tratamientos +P y -P, por lo que no hubo diferencias estadísticamente significativas, esto podría deberse a que esta variedad podría no censar de manera eficiente las concentraciones de fósforo.

## 6.2 CRECIMIENTO DE LA RAÍZ PRINCIPAL

La alteración de la arquitectura radical es una respuesta adaptativa general de las plantas a los cambios en la disponibilidad de nutrientes. En soja, la deficiencia de Pi resulta en un cambio en el reparto de materia seca en favor del crecimiento de las raíces (Bates and Lynch, 1996; López-Bucio *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2001). Las variedades analizadas en este trabajo modificaron su arquitectura radical con respecto a la disminución en la concentración de fosfatos entre tratamientos +P y -P.

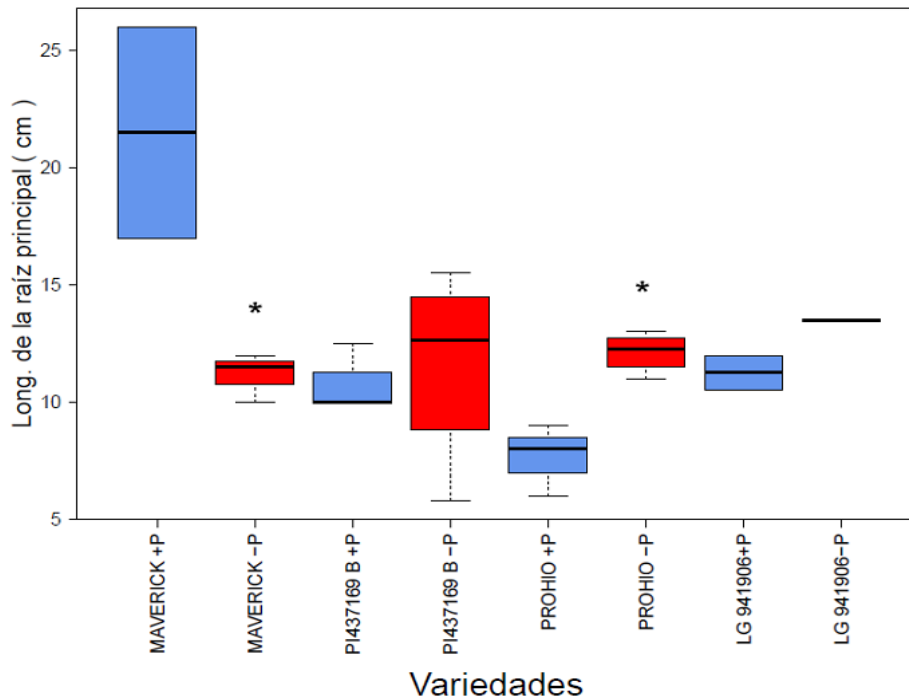




**Figura 9. Efectos de la deficiencia de Pi sobre el crecimiento de la raíz principal. A) En la variedad de Maverick se aprecia como la longitud de la raíz principal es mayor en condiciones +P. En comparación con las variedades de B) PI436179B, C) Prohio y D) LG941906, donde la longitud de la raíz principal aumenta en condiciones de deficiencia de P.**

En la Figura 6, se observa como la deficiencia de Pi influye en el crecimiento de la raíz principal, provocando la inhibición (Figura 9A) o el aumento en su crecimiento (Figura 9B, 9C Y 9D). Esta discrepancia en la capacidad de las plantas para modificar su arquitectura radical y adquirir fósforo, podría sugerir que estas respuestas dependen del genotipo (Pecina, 2005; Vance *et al.*, 2003; Barrios, 2014).

En la Gráfica 2, se observa como las variedades sometidas a un estrés por deficiencia de Pi aumentaron la longitud de su raíz principal. Debido a que el crecimiento de las raíces depende del suministro de nutrientes del suelo, en condiciones de deficiencia de Pi la raíz se expande para buscar la absorción del nutriente de una forma más eficiente (Macklon *et al.*, 1994).



**Gráfica 2. Crecimiento de la raíz principal. Longitud de la raíz principal, en condiciones +P y -P. Para cada cultivar se utilizaron 4 réplicas biológicas tanto para tratamientos +P y -P. Después de 21 de tratamiento, Maverick y Prohio presentaron diferencias significativas  $(p > 0.05)$  en cuanto a la longitud de la raíz principal entre tratamientos +P y -P.**

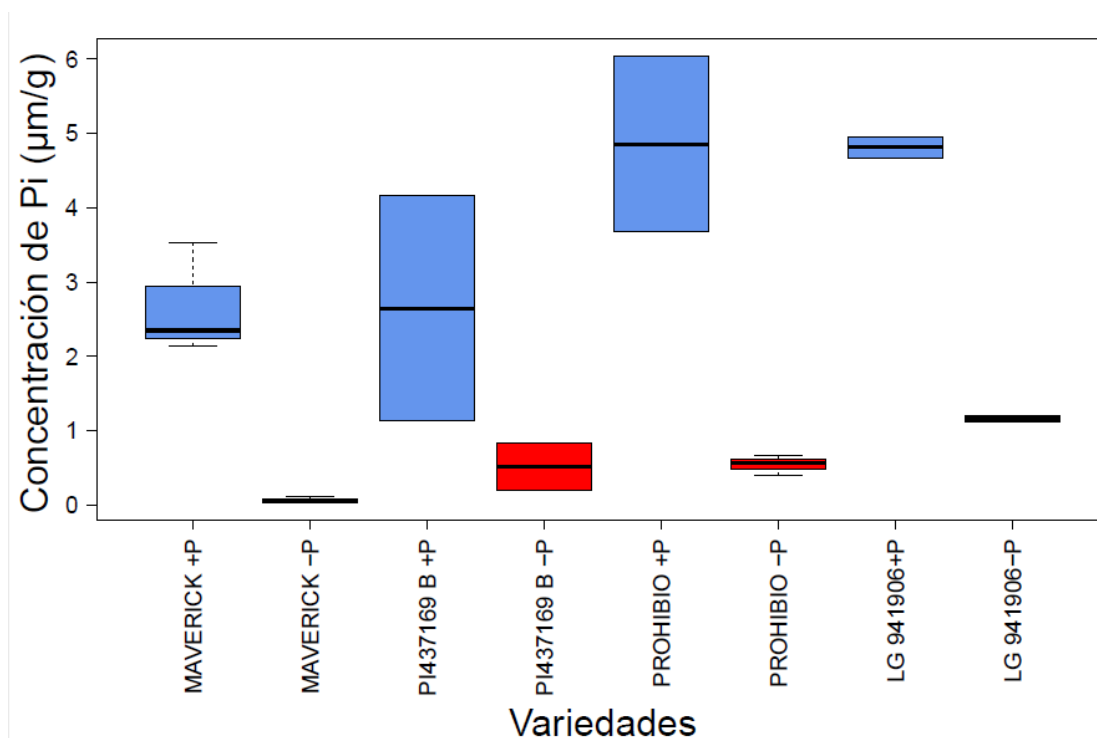
Maverick y Prohio presentaron diferencias significativas  $(p > 0.05)$  en cuanto a la longitud de la raíz principal entre tratamientos +P y -P. Este comportamiento es característico en leguminosas como el frijol, donde la deficiencia en Pi, provoca que la energía asimilada se utilice para el crecimiento de la raíz y existe una disminución selectiva del crecimiento del vástago y por ende en la producción de área foliar (Yun y Kaepler, 2001). Esto contrasta con los resultados obtenidos en estudios de deficiencia de fósforo en *Arabidopsis thaliana*, donde se sabe que la inanición de Pi provoca la disminución del crecimiento en la raíz principal (Péret, 2011).



### 6.3 CONTENIDO DE Pi SOLUBLE EN LAS RAÍCES

La concentración de Pi en las raíces depende por su parte de la eficiencia de la planta para captar y competir por la adquisición de iones inmóviles de Pi (Péret, 2011). Aunado a lo anterior las plantas han desarrollado diversas adaptaciones fisiológicas que hacen frente a la deficiencia de Pi, entre las que se incluyen la removilización y el reciclaje de Pi interno, así como la modificación de rutas metabólicas que implican el consumo de Pi (Raghothama 1999; López-Bucio, 2002; Vance *et al.*, 2003).

Como se puede observar en la Gráfica 3, la concentración de Pi soluble en las raíces, disminuyó como respuesta a la deficiencia de Pi. Las variedades que disminuyeron en mayor medida su concentración de fósforo en cuanto a tratamientos +P y -P fueron Maverick, Prohio y LG94190, las cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ).



**Gráfica 3. Contenido de Pi soluble en las raíces. Para cada cultivar se utilizaron 4 replicas biológicas tanto para tratamientos +P y -P. Después de 21 días de tratamiento +P y -P se midió la concentración de P presente en 2 g de tejido de la raíz. Maverick, Prohio y LG 941906 presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ )**

Es importante mencionar que las variedades de Prohio y LG941906 presentaron una mayor acumulación de fósforo en condiciones de deficiencia, esto es relevante puesto que el estudio de variedades que pueden llegar a acumular más Pi en suelos donde no está disponible puede ayudar a seleccionar genotipos eficientes en la toma de nutrientes (Richardson *et al.*, 2011; Lynch, 2011).

Sin embargo, es importante tomar en cuenta que un genotipo eficiente en cuanto a la toma de nutrientes, es aquel que puede producir un mayor rendimiento con una menor concentración del nutriente aplicado o absorbido, en comparación con otras plantas que crecen bajo condiciones agroecológicas similares (Fageria *et al.*, 2008). Por esta razón es que las variedades de Maverick y PI437169B a pesar de tener una concentración menor de Pi (Gráfica3), presentan una mayor elongación foliar y un mayor crecimiento de la raíz principal (Gráfica 1 y 2).

El análisis y la selección de variedades tolerantes a la deficiencia en Pi a través del estudio de sus respuestas morfológicas como área foliar, crecimiento de la raíz y contenido de fósforo, pueden conducir al desarrollo de genotipos eficientes que mantengan o mejoren su rendimiento en condiciones de baja disponibilidad de P en el suelo. Esta es una de las estrategias biológicas más atractivas para aumentar la productividad y disminuir los costos de producción provocados por el uso de fertilizantes (Richardson *et al.*, 2011; Lynch, 2011; Holford, 1997).

#### **6.4 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MARCADORES DE LA DEFICIENCIA Pi.**

Cuando las plantas crecen en condiciones limitantes de Pi presentan diversas respuestas bioquímicas que les permiten aclimatarse. Estas respuestas, tienen dos funciones principales: el aumento de la disponibilidad de Pi endógeno y del suelo, involucrando la inducción de genes que ayudan a las plantas a adaptarse al estrés por deficiencia de Pi (Péret, 2011).

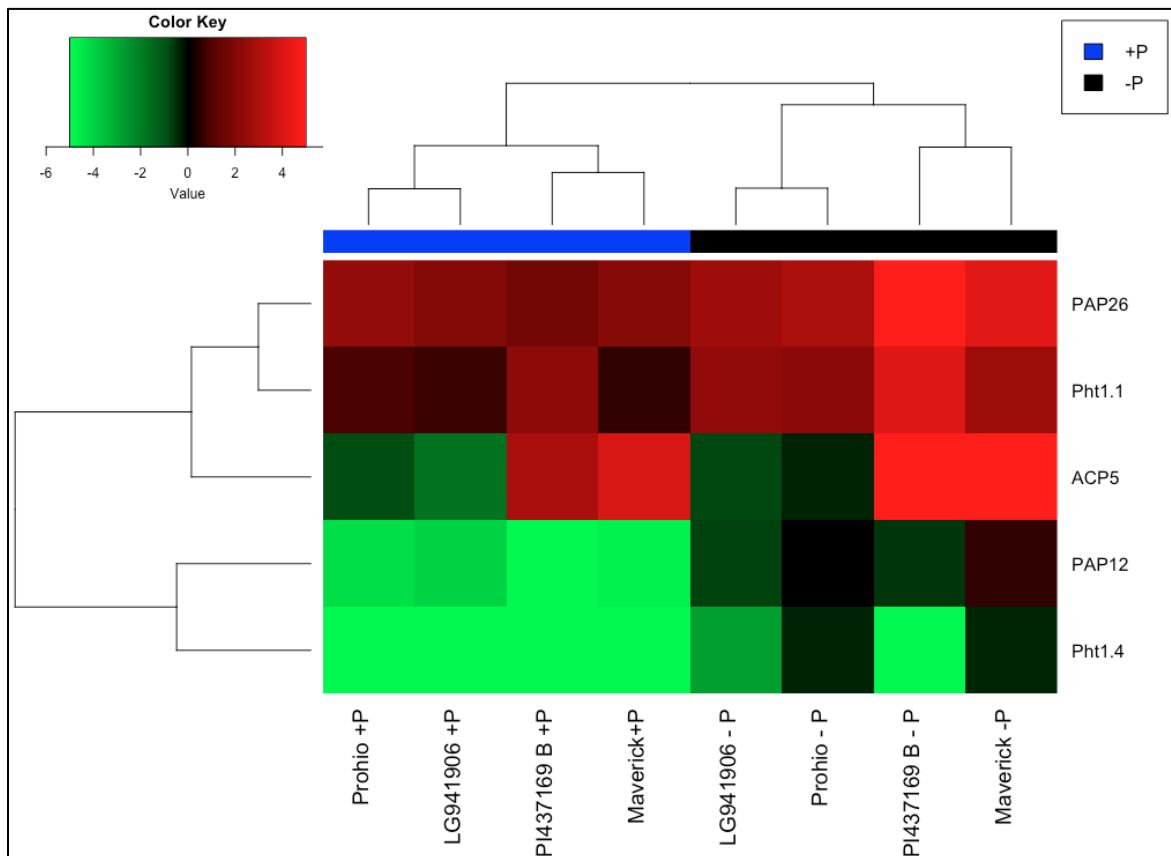
Durante la última década se han caracterizado diversos genes que aumentan su expresión durante la deficiencia de Pi, entre ellos se encuentran genes que codifican para transportadores de Pi, fosfatasas, RNAsas, y otros de función desconocida. También es cada vez más claro que la adquisición, la distribución y el metabolismo del Pi son procesos altamente regulados que afectan directamente al rendimiento de la planta (Franco-Zorrilla *et al.*, 2004).

Para los ensayos moleculares se seleccionaron cinco genes marcadores de la deficiencia de Pi (Tabla 1). Estos genes codifican para transportadores de Pi de alta afinidad y fosfatasas ácidas, los cuales pueden ayudar a promover la movilización y el reciclaje de Pi cuando este se encuentra disponible en bajas concentraciones (Raghothama, 1999; Vance *et al.*, 2003). La transcripción de estos genes se detecta desde antes de que las plantas estén privadas de Pi, pero el cambio en sus niveles de expresión aumentan significativamente con la aparición del estrés (Hammond, 2003).

En la Gráfica 4 se muestra un mapa de calor en el que se observa la expresión de los cinco genes antes y después de que las plantas estuvieran sometidas a la deficiencia de Pi. El cambio en el nivel de expresión de los genes marcadores de la deficiencia de Pi entre los tratamientos +P y -P, fue notable en todas las variedades. Cada gen se expresó de manera particular en cada variedad, mostrando perfiles de expresión similares entre las variedades Maverick y PI437169B, así como entre Prohio y LG941906. Así mismo, las variedades en donde se observó una mayor respuesta en el cambio del nivel de expresión de los genes marcadores de la deficiencia de Pi fueron Maverick y PI437169B.

Como se puede observar, Maverick y PI437169B a pesar de tener una menor concentración de Pi (Gráfica 3), presentan una mayor regulación genética en la expresión de genes como las fosfatasa ácidas PAP26 y ACP5, así como del transportador de fosfato Pht1;1. Además también se observa que la variedad de Maverick también presenta un cambio en la expresión diferencial de PAP12 Y Pht1;4.

Estos genes aumentan sustancialmente su expresión bajo el estrés por Pi. Se sabe que las fosfatasa ácidas como ACP5 hidrolizan monoésteres de P orgánico e incrementan los niveles de Pi disponibles para las plantas (Miller *et al.*, 2001).



**Gráfica 4. Mapa de calor de la expresión de genes marcadores de la deficiencia Pi. Después de 21 días de tratamiento, se incrementó la expresión de los genes en condiciones de deficiencia de P. Los datos se graficaron en Log2. \*PAP (fosfatasa ácida púrpura), \*ACP(fosfatasa ácida), \*Pht (transportador de fosfato).**

La expresión de genes que codifican para fosfatasa ácida púrpura como PAP26, al ser fosfatasa vacuolares, pueden ayudar a usar la reserva no metabólica de la vacuola para satisfacer la necesidad de Pi (Lee y Ratcliffe, 1993; Veljanovski, 2006).

La familia de genes del transportador de fosfato 1 (PHT1) codifican proteínas de membrana, que contienen 12 dominios transmembranales. Las proteínas PHT1 están funcionalmente involucradas en la captación de Pi, de su translocación a través de los tejidos vegetales, de la removilización del Pi de los órganos senescentes y de la optimización de los procesos metabólicos dependientes de Pi. Los genes homólogos de PHT1 se han identificado en una amplia gama de especies, y comparten funciones conservadas en la captación de Pi (López-Arredondo, 2014).

La captación de Pi disponible está relacionada directamente con la expresión de transportadores de Pi y por la capacidad de exploración de las raíces. En variedades como Maverick y PI437169B se observó un incremento en la elongación de la raíz principal, a su vez se observa como los niveles de expresión de Pht1;1 aumentaron en condiciones de deficiencia de fósforo. En Maverick además de Pht1;1, también aumento la expresión de Pht1;4, lo que sugiere que estos genes están relacionados con la regulación del transporte de Pi cuando estas plantas se encuentran bajo condiciones de deficiencia. Particularmente los transportadores Pht1;1 se expresan predominantemente en células de la epidermis y en la corteza exterior de la raíz, lo que sugiere su participación en la captación de Pi por las raíces (Mudge, 2002; Schünmann *et al.*, 2004).

Además, la eficiencia en la captación de Pi se ve afectada por otros rasgos radicales que aumentan la disponibilidad de Pi en la solución del suelo, incluyendo el tipo de fosfatasa presentes en la raíz (López-Arredondo, 2014). Este tipo de adaptaciones moleculares incrementan las capacidades de estas plantas para mejorar su tolerancia a las bajas concentraciones de Pi en el medio donde crecen.

Estos resultados demuestran que no todos los genotipos son afectados en la misma proporción y que la falta de Pi ocasiona el incremento en la expresión de genes que regulan la deficiencia de fósforo en las plantas. En este caso particular, el genotipo que se vio menos afectado por la deficiencia de fósforo (Maverick) se caracterizó por presentar una mayor expresión de genes como Pht1;1, ACP5 y PAP12 (Gráfica 4 ).

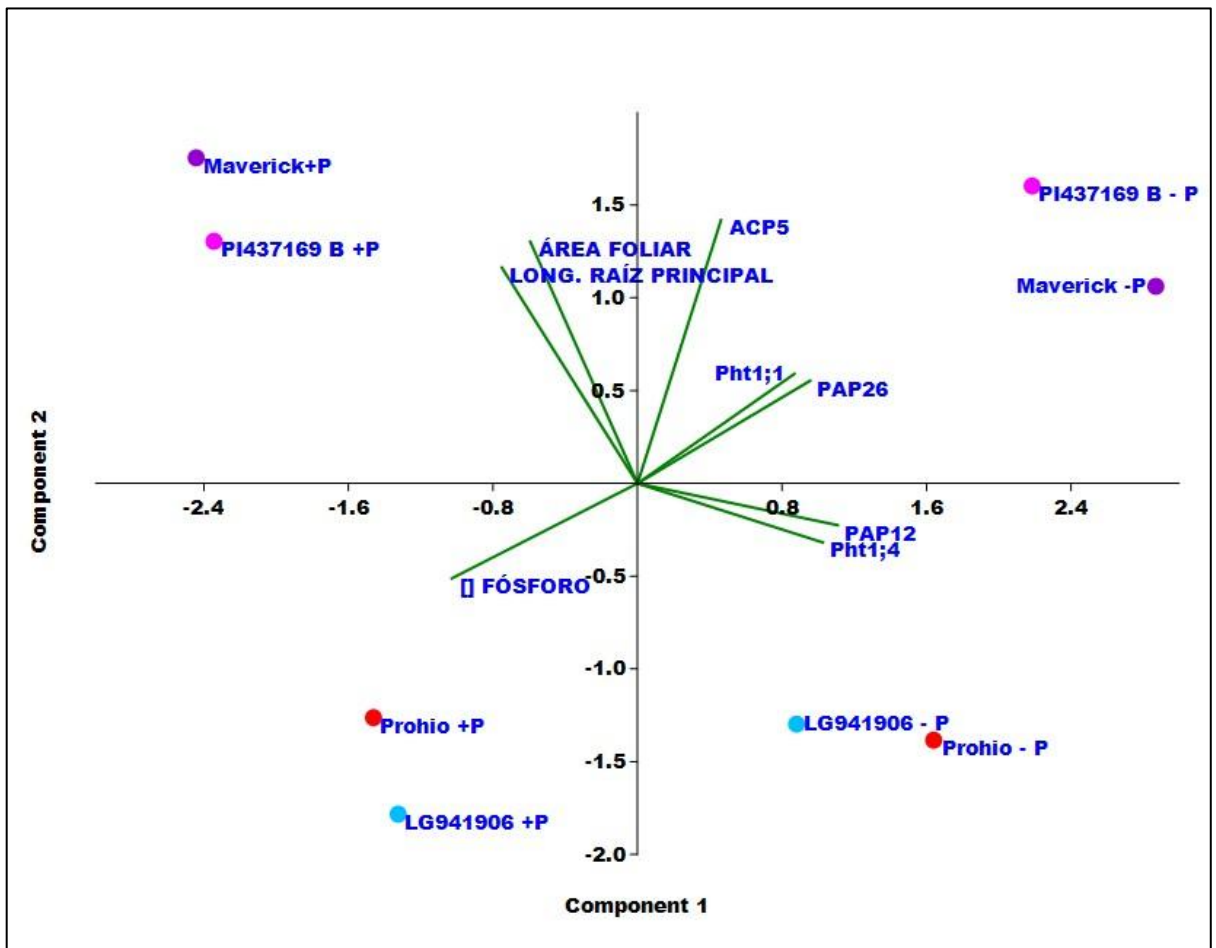
Los mecanismos por los cuales la variedad de Maverick regula la deficiencia de Pi podría explicar porque a pesar de tener una menor concentración de Pi, esta variedad presentó en comparación con las demás variedades una mayor área foliar, así como una modificación de su arquitectura radical que le permitió disminuir la elongación de su raíz principal y de esta manera optimizar la captación y el uso de Pi. El estudio de estas diferencias en los mecanismos de respuesta para su adaptación al estrés puede utilizarse para el aprovechamiento de la diversidad genética e incrementar de esta forma la productividad agrícola (Pecina, 2005).

Por último, se hizo la integración de los resultados tanto de área foliar, como longitud de la raíz principal, concentración de fósforo y expresión genética, para ello se utilizó un análisis de componentes principales (PCA). Esto debido a que comúnmente la caracterización de un genotipo se da con base a un solo carácter de eficiencia que puede involucrar la comparación directa del peso seco del vástago, el incremento de la concentración de fósforo endógeno o la arquitectura radical (Fageria *et al.*, 2008; Lynch, 2007). Sin embargo para la selección de genotipos eficientes es necesario integrar la contribución relativa de los diferentes parámetros analizados, ya que el PCA muestra las múltiples dimensiones de la distribución de los genotipos en un gráfico bidimensional (Keim *et al.*, 1992) y así se pueden identificar relaciones multidimensionales que describen las porciones de la varianza de un grupo de datos (Ude *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2008). Este estudio en soya (*Glycine max* L.) demuestra la conveniencia del uso de este método.

De acuerdo con el análisis de PCA (Gráfica5), las distintas variables analizadas presentaron respuestas genotipo dependiente. En cuanto al área foliar y el crecimiento de la raíz principal, los resultados indican que

variedades como Maverick y PI437169B crecen en buenas condiciones cuando se les proporciona Pi, por lo que el área foliar y la elongación de su raíz principal se ven favorecidas, en contraste con variedades como Prohio y LG941906 donde a pesar de crecer en condiciones de suficiencia de Pi su área foliar y la elongación de su raíz principal es más pequeña.

Así mismo, observamos que las variedades de Prohio y LG941906 están explicadas por la concentración de Pi en sus raíces, esto se debe principalmente a que probablemente estas variedades no cuentan con la maquinaria adecuada para su utilización y por lo tanto aunque captan una gran cantidad de Pi, solo lo acumulan sin poder utilizarlo a su favor.



Gráfica 5. Análisis de Componentes Principales (PCA).

Durante la deficiencia de Pi, observamos que Maverick y PI437169B expresan genes como ACP5, PAP26 y PHT1;1 y por lo tanto, a pesar de no ser variedades que acumulen una gran cantidad de PI en sus raíces como Prohio y LG941906, cuentan con un sistema que les permite optimizar su uso y movilización. De esta manera estas variedades pueden tolerar con mayor eficiencia las bajas concentraciones de Pi en el medio donde crecen (Lynch y Brown, 2001; Abel *et al.*, 2002).

Por otro lado, variedades como Prohio y LG941906 en condiciones de deficiencia de Pi, presentaron una mayor regulación de genes como PAP26 y Pht1;4, los cuales no aumentaron considerablemente su expresión durante la deficiencia de fósforo, por lo que la optimización para el uso y movilización de Pi en estas variedades fue menor. En consecuencia, la absorción y movilización de Pi en las plantas requiere de múltiples sistemas de transporte que deben funcionar en conjunto para mantener la homeostasis durante el crecimiento y desarrollo (Versaw y Harrison, 2002).

Es importante mencionar que las plantas de mayor tamaño como Maverick y PI437169B aparentemente fueron menos susceptibles a la baja disponibilidad de Pi, en contraste con variedades con fenotipos más pequeños como Prohio y LG941906, las cuales fueron más afectadas por la deficiencia de Pi.



## 7. DISCUSIÓN

La soya (*Glycine max* L.) es considerada una de las fabáceas más importantes en el mundo por su alto contenido de proteína y aceite vegetal. Sin embargo, durante las últimas décadas el crecimiento exponencial de la población ha provocado un incremento en la demanda de alimentos. Así mismo, la productividad de los cultivos, se ha visto severamente disminuida por la baja fertilidad de las tierras arables, lo que ha provocado que las semillas que se producen tengan un bajo contenido proteico y mineral (Solórzano *et al.*, 2005).

El P es uno de los elementos más importantes para el crecimiento y desarrollo de las plantas, sin embargo, también es uno de los macronutrientes que más limitan la productividad vegetal. Por ello, el análisis y selección de variedades es importante para identificar características estrechamente asociadas o responsables de la tolerancia a los bajos niveles de Pi en el suelo (Bates y Lynch, 2000).

En los últimos años, se ha hecho un progreso significativo en la comprensión de las respuestas a la deficiencia de Pi en las plantas y su regulación. El conocimiento actual incluye: (1) evidencia de una compleja respuesta transcripcional durante la deficiencia de Pi, a partir de la identificación de diferentes grupos de genes cuya activación máxima o represión, se produce en diferentes puntos de tiempo después de producirse el estrés por Pi en diferentes partes de la planta; (2) la identificación de algunos factores de transcripción asociados a la inanición de Pi; (3) la participación hormonal en la transducción de señales para el control de las respuestas durante la deficiencia de Pi, y (4) la existencia de dos estados dependientes de la concentración de Pi, uno a larga distancia o respuestas controladas por vía sistémica y otro de respuestas locales (Franco-Zorrilla *et al.*, 2004).

En el presente trabajo se determinó la respuesta de cuatro cultivares de soya a la deficiencia de fósforo, para ello se midió el área foliar, el crecimiento de la raíz principal, la concentración de fósforo soluble en las raíces, así como la expresión de genes marcadores de la deficiencia de fósforo. Existen diversos estudios donde la caracterización de un genotipo se da con base a un solo carácter de eficiencia, sin embargo para la selección de genotipos eficientes es necesario integrar la contribución relativa de los diferentes parámetros analizados (Fageria *et al.*, 2008; Lynch, 2007; Keim *et al.*, 1992). En conjunto los resultados obtenidos pueden ayudar a entender los mecanismos fisiológicos, moleculares y bioquímicos que activan diferentes variedades de soya cuando enfrentan una deficiencia nutricional como la baja disponibilidad de Pi.

Diversos estudios han demostrado que la deficiencia de Pi reduce el crecimiento de la parte aérea en una planta (Lynch *et al.*, 1991; Franco-Zorrilla, 2004). Estudios realizados en frijol demuestran que hay genotipos más afectados que otros, pero en general la deficiencia de fósforo provoca una disminución en la biomasa del vástago (Parra *et al.*, 2004). En este estudio se observó que en soya la deficiencia de fósforo provocó una disminución en la elongación foliar en todas las variedades.

A la fecha se han utilizado diferentes especies vegetales para estudiar el efecto de la disponibilidad de Pi sobre la arquitectura radical, tales como el lupino, el frijol, el maíz, el arroz y la soya (López-Bucio *et al.*, 2005). Así como en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, en la cual la deficiencia de fósforo altera el crecimiento de la raíz primaria, así como la formación y elongación de las raíces laterales y de los pelos radicales (Bates y Lynch, 1996; Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002). En soya, estudios previos demuestran que el crecimiento de la longitud de la raíz principal aumenta en condiciones de deficiencia de fósforo (Bates and Lynch, 1996; López-Bucio *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2001).

Este comportamiento es característico en soya, donde se supone que la mayor parte de la energía asimilada se utiliza para el crecimiento de la raíz y existe una disminución selectiva del crecimiento de la parte aérea (Yun y Kaepler, 2001). Además, estos estudios demuestran que las raíces responden bioquímicamente con la expresión y secreción de enzimas como fosfatasas ácidas y ARNsas, así como con la síntesis y exudación de ácidos orgánicos y con un aumento en la síntesis de transportadores de Pi (Raghothama, 2000).

La concentración de Pi en las raíces depende por su parte de la eficiencia de la planta para captar y competir por la adquisición de iones inmóviles de Pi (Péret, 2011). En el suelo la disponibilidad del P disminuye conforme se aleja la raíz de la superficie y además se presentan zonas muy localizadas (parches) ricas en este nutriente (Lynch, 1995).

En este estudio, se observó que había cultivares de soya más eficientes en la captación de Pi, como Prohio y LG941906, sin embargo, su producción foliar era menor que en variedades como Maverick y PI437169b donde las concentraciones de fósforo eran menores. Se propone que el uso eficiente del P, a través de su movilización de la raíz a las hojas, y del mantenimiento en la capacidad para exportar fotosintatos, son cualidades de la planta que pueden mejorar el desempeño del cultivo cuando la cantidad de P asimilable no es suficiente. Algunos estudios han demostrado con éxito que plantas obtenidas por ingeniería genética, adquieren Pi de manera más eficiente debido a la expresión ectópica de citrato sintetasas y a la secreción de fitasas, por lo que requieren menos fertilizante (López-Bucio *et al.*, 2000; Richardson *et al.*, 2011).

Si bien el crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas está a expensas de los nutrientes presentes en su entorno, los mecanismos por los cuales las plantas perciben la disponibilidad de estos nutrientes y los programas de desarrollo que traducen estas señales aún no han sido completamente descritos. La mayoría de los estudios sobre los cambios en la expresión de genes que siguen después de la deficiencia de Pi han implicado el análisis de genes que se presume tienen un papel en el sistema de rescate de Pi, tales como RNAsas, fosfatasas y transportadores de alta afinidad de Pi (Franco-Zorrilla *et al.*, 2004). La inducción de la expresión de los genes sensibles a la deficiencia de Pi que se midieron en este trabajo, se lleva de manera coordinada por el factor de transcripción PHR1 que tiene un papel muy importante en el sistema de rescate de Pi (Rubio *et al.*, 2001). Estos genes forman parte del regulón PHO (Grupo de genes regulados por el mismo factor de transcripción), bajo un sistema de regulación común (Goldstein *et al.*, 1988). La mayoría de estos genes cuya expresión aumenta durante el estrés por Pi, comparten una secuencia común en el promotor, la secuencia GNATATNC, la cual es reconocida por el FT de RESPUESTA A LA INANICION DE FOSFATO 1 (PHR1) (Rubio *et al.*, 2001; Bustos *et al.* 2010).

Por último es importante mencionar que la tolerancia a la deficiencia de P es una característica multigenética (Posada *et al.*, 1995). Donde las respuestas a la deficiencia de fósforo no se relacionan sólo con los genes medidos en este trabajo, si no que involucran una serie de respuestas coordinadas, como lo son la inducción de los factores de transcripción PHR de la familia MYB que promueven la expresión de RNAsas, fosfatasas, transportadores de fosfato, etc.; así como respuestas a nivel hormonal como es el caso del etileno, las giberelinas, las auxinas, el ácido abscísico, etc. (Raghothama, 1999; Mudge *et al.*, 2002; Franco-Zorrilla *et al.*, 2004; Schünmann *et al.*, 2004; Bustos *et al.* 2010; Péret, 2011 Richardson *et al.*, 2011).

## 8. CONCLUSIÓN

Las respuestas a la deficiencia de fósforo (área foliar, concentración de Pi, crecimiento de la raíz principal y expresión de genes marcadores de la deficiencia de Pi) fueron genotipo dependiente.

La deficiencia de fósforo está relacionada con el incremento en la expresión de genes que regulan las concentraciones de Pi interno en las plantas.

Maverick fue la variedad que mostró una mejor respuesta a la deficiencia de fósforo, debido a que fue la variedad que presentó una mayor regulación de la expresión de genes marcadores de la deficiencia de fósforo, así como mejores características morfológicas, como plantas de mayor tamaño, una mayor área foliar y una raíz mejor adaptada a la deficiencia de fósforo.

## 9. APÉNDICE 1

### EXTRACCIÓN DE ARN:

El ARNm se aisló de las raíces congeladas utilizando el kit de aislamiento de ZYMO REARCH (ZR Plant RNA MiniPrep).

- 1.- La muestra se macera con nitrógeno líquido para evitar que se desnaturalice.
- 2.- La muestra se deposita en los tubos “ZR BashingBead™ Lysis Tube” y se les agregan 800µl de “RNA Lysis Buffer”
- 3.- Posteriormente se les dará un spin en un vórtex durante 2 min.
- 4.- Se centrifugan a 11, 500rpm por 1min.
- 5.- Se toman 500 l del sobrenadante y se depositaran en el tubo de colección de los “Zymo-Spin™ IIC Column”.
- 6.- Se centrifugan a 7, 500rpm por 1min.
- 7.- Posteriormente se depositaran 400µl de alcohol al 96% y se mezclaran con el sobrenadante.
- 8.- De esta mezcla se toman 400µl y se transferirán al tubo de colección de los “Zymo-Spin™ IIC Column”.
- 9.- Se centrifugan a 11, 500rpm durante 1min.
- 10.- Posteriormente se tira el sobrenadante y se agregan en el mismo tubo “RNA prep buffer”.
- 11.- Se centrifugan a 11, 500rpm durante 1min.
- 12.- Se agregan 800µl de “RNA wash buffer”.
- 13.- Se centrifugan a 11, 500rpm durante 1min.
- 14.- Se agregan 400µl de “RNA wash buffer”.
- 15.- Se centrifugan a 11, 500rpm durante 1min.
- 16.- Se tira el sobrenadante.
- 17.- Se centrifuga en seco a 11, 500rpm durante 2min.
- 18.- Agregar 25 µl de “DNase/RNase-Free Water” y poner a colectar en un tubo etiquetado.
- 19.- se centrifugan a 8, 000rpm durante 2min.
- 20.- Guardar a -60 .

## 10. APÉNDICE 2

### SÍNTESIS DE cDNA:

El ADN copia (cDNA) se sintetizó utilizando el kit de THERMO SCIENTIFIC (DNase 1, RNase-free) (RevertAid Reverse Transcriptase).

1.- Cada reacción se ajustó a 20  $\mu$ l. A continuación se muestra un cuadro con el volumen de las concentraciones que deben añadirse de cada reactivo:

[RNA]	*Buffer	*Enzima	*H <sub>2</sub> O
2000/[RNA]	2	2	-

\*Buffer: 10x reaction buffer with MgCl<sub>2</sub>

\*Enzima: DNase 1, RNase-free

\* H<sub>2</sub>O: DEPC-treated Water

2.- Posteriormente se les dio un spin y se incubaron a 37  $^{\circ}$ C durante 70min.

3.- Una vez transcurrido el tiempo, se retiraron del termociclador y se les agregaron 2  $\mu$ l de EDTA 50mM.

4.- Se incubaron a 65  $^{\circ}$ C durante 10min.

5.- Una vez transcurrido el tiempo, se colocaron inmediatamente en hielo y se incubaron durante 2min.

6.- De cada reacción se tomaron 11.5  $\mu$ l y se depositaron en tubos nuevos, a los cuales se les agregó también 1  $\mu$ l de Oligo (dT).

7.- se agitaron y se incubaron a 65  $^{\circ}$ C durante 5min.

8.- A continuación se les agregó a cada reacción:

<b>Buffer: 5x Reaction Buffer</b>	5
<b>Thermo Scientific Ribolock RNase inhibitor</b>	0.5
<b>dNTP Mix 10mM each</b>	2
<b>RevertAid Reverse Transcriptase</b>	1

9.- Por último se meten a incubar al termociclador con el siguiente orden de temperaturas:

<b>25</b>	10min.
<b>42</b>	110min.
<b>70</b>	10min.



## 11. BIBLIOGRAFÍA

Abel S., Ticconi A., Delatorre A. (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiol Plant* 115, 1-8.

Al-Ghazi Y., Muller B., Pinloche S., Tranbarger T.J., Nacry P., Rossignol M., Tardieu F., Doumas P. (2003) Temporal response of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signalling. *Plant Cell Environ* 26:1053–1066.

Baldwin J. C., Karthikeyan A.S., Raghothama K.G. (2001) LEPS2, a phosphorus starvation- induced novel acid phosphatase from tomato. *Plant Physiol* 125,728–737.

Barrios B. M., Buján A., Debelis S. P., Sokolowski A. C., Blasón A. D., Rodríguez H. A., López S. C., De Grazia J., Mazo C. R., Gagey M. C. (2014) Root Biomass/Total Ratio in Soybean (*Glycine max*) Under Two Tillage Systems. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Buenos Aires, Argentina.

Bates, T. R., and J. P. Lynch. (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorous availability. *Plant, Cell and Environment* 19, 529-538.

Bates, T. R., and J. P. Lynch. (2000) The efficiency of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) root hairs in phosphorus acquisition. *Am. J. Bot.* 87: 964-970.

Bates T. R., Lynch J. P. (2001) Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. *Plant Soil* 236:243–50.

Brower I.A., Katan M. B. Zock P. L. (2004) Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis. *British Journal of nutrition*; 134 (4):919-22.

Bucher M., Rausch C., Daram P. (2001) Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants. *J Plant Nutr Soil Sci* 164: 209–217.

Burleigh S. H., Harrison M. J. (1999) The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant Physiol* 119, 241–248.

Bustos R., Castrillo G., Linhares F. (2010) A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 6: e1001102.

Cakmak I. (2002) Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable ways. *Plant Soil* 247:3–24.

Chen D. L., Delatorre C. A., Bakker A., Abel S. (2000) Conditional identification of phosphate starvation response mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211, 13–22.

- Chiou T. J., Lin S. I. (2011) Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 62:185–206.
- Correl D. L. (1998) The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters. *J. Environ. Qual.* 27:261–66.
- Cui Z., Carter, T. E., Burton, J. W. and Wells, R. (2001) Phenotypic diversity of modern Chinese and North American soybean cultivars. *Crop Sci.* 41:1954-1967.
- del Pozo J. C. , Allona I. , Rubio V., Leyva A., de la PenÄa 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. *The Plant Journal* 19, 579-589.
- Doerner P. (2008) Phosphate starvation signaling: A threesome controls systemic *Pi* homeostasis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:536–40.
- Duff S. M. G., Sarath G., Plaxton W. C. (1994) The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Physiol Plant* 90,791–800.
- Essigmann B., Guler S., Narang R. A., Linke D., Benning C. (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQD1*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 95, 1950-1955.
- Fageria N K, V C Baligar, Y C Li (2008) The role of nutrient efficient plants in improving crop yields in the twenty first century. *J. Plant Nutr.* 31:1121-1157.
- Franco-Zorrilla J. M., Martín A. C., Solano R., Rubio V., Leyva A., Paz-Ares J (2002) Mutations at *CRE1* impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 32, 353–360.
- Goldstein A. H., Beartlein D. A., McDaniel R. G. (1988) Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. I. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension cultured cells. *Plant Physiol* 87,711–715.
- Guamán, R; Peralta, S. (1996) Requerimientos ecológicos: manual del cultivo de soya. INIAP. Guayas, EE-Bolíche. Manual N° 32. p. 27-30.
- Guzmán Díaz, C. A. (2000) Evaluación de tres distanciamientos de siembra y dos posturas diferentes de semilla en el cultivo de soya (*Glycine max L*), en dos comunidades de San Juan Ermita, Chiquimula. Informe Tec. Prod. Agr. Chiquimula, GT, CUNORI-USAC. 36 p.
- Hayes K. C. (2000) Dietary fatty acids, cholesterol, and the lipoprotein profile. *British Journal of Nutrition*; 84 (4): 397-9.
- Hammond J. P., Bennett M. J., Bowen H. C., Broadley M. R., Eastwood D. C., May S. T., Rahn C., Swarup R., Woolaway K. E., White P. J. (2003) Changes in genes expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiology* 132, 1-19.

- Hinsinger P. (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rizosphere as affected by root-induced chemical changes: A review. *Plant Soil* 237,173-195.
- Holford C. R., (1997) Soil phosphorous: its measurements and its uptake by plants. *Aust Jour Soil Res* 240,1448-1453.
- Jain, A., Punia M. S., Behl R. K. (2008) Effect of genotype and medium on callus induction and plant regeneration in soybean (*Glycine max* L.). *National Journal Plant Improvement* 10 (1): 53-57.
- Jones D. L. (1998) Organic acids in the rhizosphere: a critical review. *Plant Soil* 205,25– 44.
- Karthikeyan A. S., Varadarajan D. K., Mukatira U. T., D’Urzo M. P., Damsz B., Raghothama K. G. (2002) Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol* 130:221-233.
- Keim P., Beavis W., Schupp J. and Freestone R. (1992) Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 85:205- 212.
- Li D., Zhu H., Liu K., Liu X., Leggewie G, Udvardi M, Wang D. (2002) Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *Journal of Biological Chemistry* 277, 27772-27781.
- Lee R. B., Ratcliffe R. G. (1993) Subcellular distribution of inorganic phosphate, and levels of nucleoside triphosphate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: measurements with <sup>31</sup>P NMR. *J Exp Bot* 44,587–598.
- Leff B., Ramankutty N., Foley J. A. (2004) Geographic distribution of major crops across the world. Center for Sustainability and the Global Environment (SAGE), Gaylord Nelson Institute for Environmental Studies, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA.
- León, M. (2009) “evaluación de quince líneas de soya procedentes de hibridaciones nacionales en la zona de San Juan de Pueblo Viejo, Los Ríos”. Tesis Ing. Agr. Pueblo Viejo, Ec, Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias. P 31.
- Liao, H., Rubio G., Yan X., Cao A., Brown K. M., Lynch J. P. (2001) Effect of phosphorus availability on basal root shallowness in common bean. *Plant Soil* 232: 69-79.
- Libault, M., S. Thibivilliers, D. D. Bilgin, O. Radwan, M. Benitez, S. J. Clough, and G. Stacey. 2008. Identification of Four Soybean Reference Genes for Gene Expression Normalization. *Plant Genome* 1:44-54. doi:10.3835/plantgenome2008.02.0091
- Linkohr B. I., Williamson L. C., Fitter A. H., Leyser H. M. (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J* 29:751–760
- Liu C., Muchhal U. S., Raghothama K. G. (1997) Differential expression of TPS11, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Mol Biol* 33,867–874.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25(4): 402–408.

Löffler A., Abel S., Jost W., Beintema J. J., Glund K (1992) Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiol* 98,1472–1478.

López-Arredondo D.L., Leyva-Gonzalez M.A., Gonzalez-Morales S.I. Lopez-Bucio J., Herrera-Estrella L.. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Annu Rev Plant Biol.* 2014; 65: 95-123. doi:10.1146/annurev-arplant-052013-035949.

López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M. F., Simpson J., Herrera-Estrella L. (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol* 129:244-256.

López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Pérez-Torres A., Rampey R. A., Bartel B., Herrera-Estrella L. (2005) An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol* 137:681–691.

Lynch J. P. (2007) Roots of the second Green Revolution. *Aust. J. Bot.* 55:493-512.

Lynch J. P., Root phenes for enhanced soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. (2011) *Plant Physiol.* 156:1041-1049.

Lynch J. P., Lauchli A., and Epstein E. (1991) Vegetative growth of tile common bean in response to phosphorus nutrition. *Crop Sci.* 30: 1165-1171.

Lynch J. P., Brown K. M. (2001) Topsoil foraging an architectural adaptation of plants to low phosphorous. *Plant Soil* 237,225-237.

Lynch, J. P., and S. E. Beebe. 1995. Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. *HortSci.* 30: 1165-1170.

Ma Z., Bielenberg D., Brown K. M., Lynch J. P. (2001) Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* 24, 459-467.

Macklon A. E. S., Mackie Dawson L. A., Sin A., Shand C. A., and Lylli A. (1994) Soil P resources, plant growth and rooting characteristics in nutrient poor upland grasslands. *Plant Soil* 163: 257- 266.

Marschner H. (1995) *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press. San Diego, CA. 889 p.

Miller S. S., Liu J., Allan D. L., Menzhuber C. J., Fedorova M., and Vance C. P. (2001) Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin. *Plant Physiol.* 127: 594-606.

- Misson J., Raghothama K. G., Jain A., Jouhet J., Block M. A., Bligny R., Ortet P., Creff A., Somerville S., Rolland N., Doumas P., Nacry P., Herrerra-Estrella L., Nussaume L., Thibaud M. C. (2005) Genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* AVymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:11934–11939.
- Muchhal U. S., Pardo J. M., Raghothama K. G. (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Nat Acad Sci USA* 93, 10519-10523.
- Mudge S. R., Rae A. L., Diatloff E., Smith F. W. (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J*:31:341–53.
- Muller R., Morant M., Jarmer H., Nilsson L., Nielsen T. H. (2007) Genome-wide analysis of the *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiol* 143:156–171.
- Nacry P., Canivenc G., Muller B., Azmi A., Onckelen H., Rossignol M., Doumas P. (2005) A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138, 2061-2074.
- Nakamura Y. (2013) Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Progress in Lipid Research* 52, 43–50.
- Nürnberg T., Abel S., Jost W., Glund K. (1990) Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation. *Plant Physiol* 92, 970–976.
- Oberson A., Friesen D. K., Rao I. M., Bühler S., Frossard E. (2001) Phosphorus transformations in an Oxisol under contrasting land-use systems: The role of soil microbial biomass. *Plant Soil* 237,197-210 .
- Ortiz R., de la Fé C., Ponce M. (2004) Evaluación de métodos de almacenaje de semilla de soya (*Glycine max.* (L.) Merrill) en condiciones de bajos insumos. *Cultivos Tropicales* 25 (3): 49–58.
- Pan X. W., Li W. B., Zhang Q. Y., Li Y. H., Liu M. S. (2008) Assessment on phosphorus efficiency characteristics of soybean genotypes in phosphorus-deficient soils. *Agric. Sci. China* 7:958-969.
- Pecina Q. V., Hernández M. L., Moreno M. N., Simpson J., Martínez V. O. and Gil V. K. C. (2005) Diversidad genética en soya del trópico húmedo de México determinada con marcadores AFLP. *Rev. Fitotec. Mex.* 28:63-69.
- Péret B., Clément M., Nussaume L., Desnos T. (2011) Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science* 16: 442–450.
- Plaxton W. C., Tran H. T. (2011) Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiol* 156: 1006–1015
- Poirier Y., Thoma S., Somerville C., Schiefelbein J., (1991) Amutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol.* 97:1087–93.

Posada, H., J. Kornegay, y D. Beck. (1995). Estudios de herencia y mecanismos de tolerancia en líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) andinas y mesoamericanas a bajo fósforo en el suelo. *In: Taller Internacional sobre Bajo fósforo en frijol común*. Araya R. y D. Beck (eds). San José, Costa Rica. pp: 41-57.

Radhakrishnan R., Ranjitha Kumari B. D. (2009) Changes in Protein Content in Micropropagated and Conventional Soybean Plants (*Glycine max* (L.) Merr.). *World Journal of Agricultural Sciences* 5 (2): 186-189.

Raghothama K. G. (1999) Phosphate acquisition. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:665-693.

Raghothama K. G., Karthikeyan AS (2005) Phosphate acquisition. *Plant Soil* 274: 37–49.

Rand W. M., Pellett P. L., & Young V. R. (2003). Meta-analysis of nitrogen balance studies for estimating protein requirements in healthy adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*; 77 (1): 109-27.

Rausch C., Bucher M. (2002) Molecular mechanism of phosphate transport in plants. *Planta* 216:23-37

Richardson E., Lynch J., Ryan P. R., Dehaize E., Smith F. F. A., Smith S. E., Harvey P. R., Ryan M. H. (2011) Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency in agriculture. *Plant Soil* 349:121-156.

Ridner E. (2006) Soya, propiedades nutricionales y su impacto en la salud. 1ra. ed. - Buenos Aires. Grupo Q S.A.: Sociedad Argentina de Nutrición. 99 p.

Robles R. (1985) Producción moderna oleaginosas y textiles, segunda Edición. Limusa Mexico pp.307-308.

Rodríguez G. (2009) “Comportamiento agronómico de trece líneas de soya derivadas de las variedades INIAP-JUPITER en la zona de Pueblo Nuevo, los Ríos”. Tesis Ing. Agr. Babahoyo -Los Ríos- Ecuador, Universidad Técnica de Babahoyo Facultad de Ciencias Agropecuarias, Escuela de Ingeniería Agronómica. Pg. 4, pdf.

Rubio V., Linhares F., Solano R., Martín A. C., Iglesias J., Leyva A., y Paz-Ares J. (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Gene Dev* 15,2122–2133.

SAGARPA (2010). La importancia del frijol de soya. (En línea) consultada el 25 de Julio de 2016, disponible en: <http://www.infoserca.gob.mx/fichas/ficha30-soya201007.pdf>

Schachtman D. P., Reid R. J., Ayling S. M. (1998) Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol* 116:447-453.

Schünmann P. H. D., Richardson A. E., Smith F. W., Delhaize E. (2004) Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* 55:855–65.

- Smith V. H., Schindler D. W. (2009) Eutrophication science: Where do we go from here? *Trends Ecol. Evol.* 24:201–207.
- Solorzano P. R., Munoz J. A., Gamboa M. A. (2005) El Cultivo de la Soya en Venezuela. Agroislena. Maracay, Venezuela. 188 pp.
- Stevenson F. J. (1986) Cycles of soil: carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. New York: John Wiley & Sons, 350–400.
- Takahashi A., Takeda K., Ohnishi T. (1991) Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UVirradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant and Cell Physiology* 32, 541-547.
- Taussky H. H., Shorr E. (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 202: 675–685
- Ude G. N., Kenworthy W. J., Costa J. M., Cregan P. B. and Alvernaz J. (2003) Genetic diversity of soybean cultivars from China, Japan, North America, and North American Ancestral Lines determined by amplified fragment length polymorphism. *Crop Sci.* 43:1858-1867.
- Valdés-López O., Hernández G. (2008). Transcriptional regulation and signaling in phosphorus starvation: what about legumes? *J. Integr. Plant Biol.* 50(10), 1213–1222.
- Vance C. P., Uhde-Stone C., Allan D. L. (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* 157, 423-447.
- Veljanovski V., Vanderbeld B., Knowles V. L., Snedden W. A., Plaxton W. C. (2006) Biochemical and molecular characterization of AtPAP26, a vacuolar purple acid phosphatase up-regulated in phosphate-deprived *Arabidopsis* suspension cells and seedlings. *Plant Physiol* 142: 1282–1293.
- Versaw W. K., Harrison M. J. (2002) A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* 14: 1751–1766.
- Watt M., Evans J. (1999) Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiol* 121,317-324.
- Wasaki J., Shimano T., Onishi K., Yonetani R., Yazaki J., Fujii F., Shimbo K., Ishikawa M., Shimatani Z., Nagata Y., Hashimoto A., Ohta T., Sato Y., Miyamoto C., Honda S., Kojima K., Sasaki T., Kishimoto N., Kikuchi S., Osaki M. (2006) Transcriptomic analysis indicates putative metabolic changes caused by manipulation of phosphorus availability in rice leaves. *J Exp Bot* 57:2049–2059.
- Williamson L., Ribrioux S., Fitter A., Leyser O. (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126, 875-882.
- Wu P., Ma L., Hou X., Wang M., Wu Y., Liu F., Deng XW (2003) Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol* 132:1260–1271.

**Yan, X., J. P. Lynch, and S. E. Beebe. (1996) Utilization of phosphorus substrates by contrasting common bean genotypes. *Crop Sci.* 36: 936-941.**

**Yun, S. J, and Kaepler S. M. (2001) Induction of maize acid phosphatase activities under phosphorus starvation. *Plant Soil* 237: 109-115.**