



Instituto de Fisiología Vegetal
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Universidad Nacional de La Plata

Trabajo Final de Carrera
Modalidad Dúo

**EVALUACION DE SOLUBILIZACION DE FOSFORO NO DISPONIBLE EN EL SUELO
POR ACCION DEL LUPINO BLANCO (*Lupinus albus*) EN CONDICIONES DE
SUFICIENCIA DEL NUTRIENTE**

Alumno: Calandrelli Augusto

Legajo: 25600/6

DNI: 33.522.081

Correo electrónico: calandrelli2@hotmail.com

Alumno: Hernández Diego Martin

Legajo: 24726/5

DNI: 31.216.763

Correo electrónico: dieggohernandez@gmail.com

Director: Ing. Agr. Ramos Facundo

Co-directora: Dra. Simontacchi Marcela

Área: Fisiología Vegetal

INDICE

Resumen.....	3
Introducción	
• El fósforo y la seguridad alimentaria.....	4
• El fósforo en la planta.....	4
• El lupino: los cultivos de cobertura y el fósforo.....	6
Hipótesis.....	8
Objetivos generales.....	8
Materiales y métodos.....	9
• Diseño Experimental.....	9
• Determinación de disponibilidad de fósforo – Bray-Kurtz.....	11
• Determinación de pH actual del suelo.....	11
• Determinación de fosfatasas acidas en suelo.....	12
• Determinación de fosfatasas acidas en tejidos de raíces.....	13
• Análisis del contenido de fosfatasas en solución nutritiva.....	14
Resultados.....	15
Discusión.....	20
Conclusión.....	22
Bibliografía.....	22
Anexo I (imágenes).....	27

Resumen

El presente trabajo tiene como objetivo determinar la capacidad del Lupino Blanco (*Lupinus albus* L.) para solubilizar y poner disponible para las plantas el stock de fósforo indisponible del suelo, en situación de suficiencia del nutriente, mediante dos ensayos. En el primero, en macetas de 62 Lts., cultivadas durante 4 meses y pulverizadas con herbicida glifosato para su secado, posteriormente se tomaron muestras de suelo a diferentes profundidades (5, 20, 40 y 60 cm.) en situación de suficiencia de fósforo. Se analizaron a diferentes profundidades y a distintos tiempos de extracción (cada tres semanas), las variaciones de fósforo disponible (método Bray-Kurtz), de pH actual (dilución 1:2,5) y de concentraciones de fosfatasas ácidas en suelo (LeBansky et al., 1992). Así mismo se analizó en los tejidos de la raíz la variación de contenidos de fosfatasas a diferentes tiempos.

El segundo ensayo consistió en un cultivo hidropónico en recipientes de 0,8 Lts. en solución nutritiva Hoagland con y sin el agregado de fósforo durante una semana.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Statistica, mediante la herramienta ANOVA para detectar la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos.

Al cultivar el Lupino en condiciones de suficiencia no se encontraron evidencias que demuestren el aumento de disponibilidad de fósforo. Al colocar el Lupino en condiciones de déficit del nutriente encontramos una activación de las estrategias para solubilizar el fósforo, aumentando la exudación de fosfatasas al medio. La activación de tales estrategias no sucede en condiciones de suficiencia, pero en déficit han sido evidenciadas; concluyendo que dicha capacidad para aumentar la disponibilidad del fósforo es de tipo facultativa.

INTRODUCCION

El fósforo y la seguridad alimentaria

El fósforo (P) y el nitrógeno (N) son, con 53,5 y 179 millones de toneladas aplicadas por año respectivamente, los elementos más ampliamente utilizados en la fertilización de cultivos agrícolas de todo el mundo (Nussaume et al., 2011). El P a diferencia del N es un macronutriente de ciclo sedimentario, no puede obtenerse de la atmósfera y la producción de fertilizantes obliga a extraerlo de yacimientos minerales; la ubicación geográfica de estos yacimientos, el carácter finito de los mismos y la disputa por su explotación implican un riesgo para la seguridad alimentaria (Cordell et al., 2008), sobre todo en los países como Argentina, que no cuentan con yacimientos propios y tienen gran parte de su economía fundada en la explotación agrícola dependiente de la fertilización.

El fósforo en la planta

Es conocido, desde hace ya más de 150 años, que el fósforo (P) es un nutriente esencial requerido para el crecimiento y normal desarrollo de las plantas, donde forma parte de moléculas tales como ADN, ARN y fosfolípidos de membranas. Por otro lado, participa en numerosas reacciones de intercambio, actuando como transductor de energía química, así como en procesos de señalización celular (Epstein y Bloom, 2005). La disponibilidad de HPO_4^{2-} en la solución del suelo que baña las raíces suele ser baja por lo que se estima que entre el 40 y el 60 % del rendimiento de los cultivos se encuentra condicionado por este nutriente (Uexküll y Mutert, 1995). En numerosas situaciones la reducción de rendimientos asociados a déficit de P no está explicado por una carencia del nutriente en términos totales, sino solo en su forma disponible (Hinsinger, 2001). El proceso de formación de nódulos en raíces de leguminosas también se ve afectado en plantas cultivadas en suelos pobres en P, debido a la alta demanda de P de los nódulos (Cassman et al., 1980).

Las plantas absorben P principalmente en la forma de ion fosfato, este ion se vuelve indisponible cuando reacciona con cationes del suelo formando complejos o precipitados insolubles, en suelos ácidos los cationes más abundantes son Fe^{+3} y Al^{+3} , mientras que en suelos alcalinos predominan el Ca^{+2} y Mg^{+2} , el P también se vuelve indisponible cuando se adsorbe a la superficie de partículas cargadas del suelo, o cuando pasa a formar parte de moléculas orgánicas por acción biológica.

En plantas creciendo rápidamente, la absorción de P desde la solución del suelo es más alta que la tasa de transporte de nutrientes desde las zonas más alejadas de suelo hacia la rizosfera, lo que resulta en una zona de agotamiento alrededor de las raíces (Hendriks et al. 1981) dando lugar a un gradiente de disponibilidad en pocos milímetros en torno a la raíz, por esta razón la morfología radical resulta determinante del volumen de suelo explorado y de la habilidad de la planta para adquirir P.

La absorción de nutrientes por parte de la raíz genera un gradiente de concentración el cual es la fuerza motriz que genera el flujo difusivo de la mayor parte del fósforo del suelo que es absorbido por la planta (Barber 1980). La extensión de la zona de agotamiento se ha demostrado de forma convincente en autorradiografías de suelo marcada con P 32 (Lewis y Quirk 1967).

Varias respuestas fisiológicas a la baja disponibilidad externa de P han sido observadas, algunas de las cuales varían en gran medida entre mono y dicotiledóneas. Así, mientras que el bajo suministro de P conduce a una reducción de la elongación de las raíces en *Arabidopsis thaliana* (Jiang y col., 2007), en trigo se ha observado un incremento del peso seco de la raíz (Wang y col., 2013). En ambos grupos de plantas existe una clara tendencia a la acumulación diferencial de biomasa en la raíz en relación al vástago, así como a la proliferación de raíces laterales (Jiang y col., 2007). Por otro lado, se ha observado que cuando las raíces, acorde a su crecimiento exploratorio, encuentran zonas de abundante disponibilidad de P, ocurre un crecimiento localizado (Chiou y Lin, 2011). En tanto, diferencias en la utilización de P podrían implicar diferencias en la removilización de este nutriente desde las hojas viejas hacia las jóvenes, la removilización de P desde el ARN debido a la actividad de ribonucleasas (Bariola et al. 1999), o retardo en la senescencia (Kováčik y col, 2009), así como eventuales cambios en el cierre de estomas (Cogliatti y Clarkson, 1983).

Cuando las plantas se enfrentan a situaciones de déficit de P desarrollan numerosas y variadas respuestas de aclimatación que les permiten mejorar la adquisición y el uso del nutriente, entre las modificaciones morfológicas, fisiológicas y bioquímicas descritas, la generación de raíces proteoides es la más efectiva para su propósito (Purnell, 1960), estas raíces descritas originalmente en la familia de las proteáceas, poseen adaptaciones morfológicas y fisiológicas que mejoran su capacidad de absorber fósforo; morfológicamente desarrollan una proliferación extraordinaria de pelos radicales que le dan a la raíz el aspecto de un pompón, e incrementan la superficie de interacción raíz-suelo; y fisiológicamente sintetizan y liberan ácidos orgánicos, fundamentalmente citrato, que tienen una doble acción por un lado en la solubilización y aumento de la disponibilidad del P del suelo; uniéndose a los cationes que precipitan con el P y por otro, compitiendo con el P por los sitios de adsorción, desplazando el equilibrio de adsorción en favor de las formas de P en solución (Roelofs et al., 2001). Posteriormente, la presencia de raíces proteoides también fue descrita en plantas de otras familias, como es el caso del lupino blanco (*Lupinus albus* L.), perteneciente a la familia de las leguminosas (Gardner et al., 1983a). La solubilización y aumento de la disponibilidad del fósforo en el suelo por efecto de la planta ha sido estudiado en relación a exudaciones de aniones orgánicos que afectan la adsorción de fosfato inorgánico en el suelo y modifican el pH del ambiente rizosférico (Gardner et al., 1983b), como también con exudaciones de fosfatasas acidas que buscan hidrolizar los fosfatos presentes en la materia orgánica del suelo (Wasaki et al., 2003).

El lupino: los cultivos de cobertura y el fósforo

El lupino es una especie perteneciente a la Familia de las Leguminosas (Fabaceae). Es un antiguo cultivo de la cuenca mediterránea y América del Sur. *Lupinus albus* L. (Lupino Blanco) se cultivó en Grecia y en el Valle del Nilo; los antiguos romanos ya sabían que el Lupino Blanco se adaptaba a suelos pobres y poco aptos para otros cultivos, mejorando sus condiciones para el posterior cultivo de cereales, práctica utilizada como rotación agrícola ya en la antigua Roma (Hondelmann, 1984). Existen trabajos que estudian las exudaciones de la raíz proteiforme del lupino blanco y su efecto solubilizador sobre el fósforo no disponible del suelo (Lambers, 2013).

Una importante limitación de la planta al acceso del fósforo del suelo es que una gran proporción del fósforo que está presente en el suelo (de origen natural o proveniente de fertilizantes) se encuentra en formas químicas que no son inmediatamente disponible para absorción por las plantas (McLaughlin et al. 1991). Para los sistemas agrícolas, esta retención (a veces denominada "fijación") de P en los suelos es una ineficiencia que induce la formación de raíces en racimo, o *cluster roots*, morfología típica de las raíces proteoides, esto estaría regulado por la concentración de P en los tejidos celulares de la planta en lugar de la concentración de P del sistema radicular o la solución del suelo (Shen et al. 2003). La formación de agrupaciones de raíces es más evidente en las plantas cultivadas a baja disponibilidad de P y, en conjunción con la liberación inducida de aniones orgánicos, es una respuesta morfológica y fisiológica eficaz frente a la deficiencia de P.

Existen antecedentes que demuestran mejoras en el crecimiento y absorción de P en cultivos cuando los mismos se desarrollan de manera intercalada con el lupino (Kamh, 1999), pero no se han llevado adelante mediciones del efecto residual en la solubilización de P edáfico, si pudiera confirmarse dicho efecto, se sumaría a las ya conocidas ventajas de las leguminosas como abono verde, que se destacan por fijar N atmosférico a través del proceso simbiótico (Neumann et al., 2009).

Un cultivo de cobertura (CC) es definido como una cobertura vegetal viva que cubre el suelo en forma temporal o permanente, el cual está cultivado en asociación con otras plantas (intercalado, en relevo o en rotación). Los términos "cultivos de cobertura" y "abono verde" se han usado en el pasado como sinónimos. Sin embargo, los CC están caracterizados por sus funciones más amplias y multi-propósitos, las cuales incluyen la supresión de malezas, conservación de suelo y agua, control de plagas y enfermedades, alimentación humana y para el ganado (Pound, 1997).

La inclusión de cultivos de CC durante el período invernal previo al cultivo de verano incrementa el volumen de residuos aportados, mejorando el balance de carbono orgánico del suelo bajo prácticas agrícolas continuas (Alvarez et al., 2005).

Algunos importantes servicios ambientales proporcionados por el incremento de la diversidad biológica vegetal a través del uso de CC incluyen la protección del suelo contra la erosión, la captura y la prevención de pérdidas de nutrientes del suelo, la fijación

del nitrógeno por parte de las leguminosas, el incremento del carbono del suelo y mejoramientos asociados a sus características físicas y químicas, la disminución de la temperatura del suelo, el aumento de organismos benéficos y la supresión de las malezas y las plagas (Sustainable Agriculture Network, 1998).

La importancia de las leguminosas en el esquema de rotación de cultivos para romper el ciclo de enfermedades en cereales, y el valor de los residuos de cosecha, necesariamente deben ser considerados, a fin de no subestimar el aporte real del cultivo (Peñaloza et al., 1995).

HIPOTESIS

- El lupino blanco actúa como solubilizador del P no disponible que forma parte del *stock* del suelo aun en condiciones de suficiencia de nutriente.
- El efecto de solubilización de P generado por el lupino se mantiene luego de la muerte de la planta, dejando mayor cantidad de P disponible para el cultivo inmediato posterior.

OBJETIVOS

Cuantificar la capacidad solubilizadora de P que tiene el lupino blanco, y el efecto residual de la misma durante los meses posteriores al secado de este. **En suelos que no presentan concentraciones limitantes de P disponible.**

Objetivos particulares

- 1- Cuantificar el efecto solubilizador de P disponible en suelo por el cultivo de lupino blanco, en condiciones no limitantes de P.**
- 2- Analizar la duración del efecto de solubilización de P ejercido por el lupino, si es que este existe.**
- 3- Evaluar variación de la actividad fosfatasa en el tiempo luego de dar por finalizado el cultivo.**

MATERIALES Y METODOS

Diseño Experimental

El trabajo consistió en dos ensayos, uno en tierra con suficiencia de fósforo y otro en hidroponía con déficit y suficiencia de fosforo¹.

Cultivo en suelo: Las semillas de *Lupinus albus* (Lupino Blanco) fueron germinadas previamente e implantadas a los 4 días. El ensayo se realizó en tubos de pvc de 1,5 m de altura y 23 cm de diámetro (62 L), colocando 4 semillas (previamente germinadas en cámara húmeda a 28 °C durante 4 días) por maceta. El suelo utilizado en las macetas provenía de ensayos donde existía una suficiencia del nutriente fósforo constatado en laboratorio. La tierra fue homogeneizada por mezclado y tamizado.

Secado del cultivo: A los 4 meses se pulverizó con glifosato en una dosis estimada de 3 L/ha, a fin de secar las plantas y comenzar a extraer las muestras para las determinaciones analíticas planteadas.

De las muestras de suelo extraídas de los tratamientos y testigos se obtuvieron resultados de disponibilidad de fósforo a diferentes profundidades (5-20-40-60 cm) y en diferentes tiempos (169- 190- 211-234- días desde la siembra). Previo al inicio del ensayo también se tomaron muestras para determinar fósforo disponible (tiempo 0). Se tomaron muestras de tejido vegetal de raíces sin distinguir profundidad. Las plantas se mantuvieron a capacidad de campo, sin limitantes hídricas.

¹ Descripto en el ítem contenidos de fosfatasas en solución nutritiva de Materiales y métodos.

Tabla 1.

	Germinación en Cámara Húmeda	Siembra	Aplicación de Herbicida	Extracción de Muestras			
				T1	T2	T3	T4
Fecha	7/5	11/5	16/9	16/9	7/10	28/10	20/11
Días desde siembra	-	0	169	169	190	211	234
Días desde aplicación de herbicida	-	-	0		21	42	65
Estado general	Semillas con cubierta seminal endurecida.	Semillas hinchadas con cubierta seminal blanda e hipocotilo sobresalido.	Plantas en estado fenológico de floración, con aproximadamente 16 hojas verdaderas y unos 60 cm de altura.	Plantas en estado de desecación, conservando aun algunas partes de sus tallos verdes.	Plantas totalmente desecadas y con algunas hojas en el suelo.	Plantas totalmente desecadas con gran parte del follaje en el suelo.	

Cultivo hidropónico: Las semillas de lupino blanco (*Lupinus albus*) fueron puestas a germinar en oscuridad durante 48 h. Posteriormente se transfirieron a recipientes de 0,8 L en método hidropónico, conteniendo la solución nutritiva de Hoagland: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM, MgSO_4 0,5 mM, NaCl 0,15 mM, KCl 1mM, Fe EDTA 50 μM , CaCl_2 50 μM , H_3BO_3 25 μM , ZnSO_4 2 μM , MnSO_4 2 μM , CuSO_4 0.5 μM , ácido molíbdico 0,5 μM , MES 2,5 mM, y H_3PO_4 0,5 mM. Divididos en dos grupos de plantas al azar, un grupo tuvo solución nutritiva completa (+P), el otro grupo tuvo la misma solución nutritiva sin el agregado de P (-P). Los cultivos se mantuvieron en cámara de cultivo durante una semana, la radiación fotosintéticamente activa fue de 300 $\mu\text{moles fotones s}^{-1}$ provista por un banco de luces Philips de 40W, a 25°C durante el día y 22°C durante la noche, con un fotoperiodo de 13 h.

- **Análisis de concentración de P disponible, método Bray Kurtz N° 1 (IRAM-SAGyP, 2010)**

Pasos seguidos:

1. Se secaron las muestras de suelo a 60 ° C hasta peso constante y se tamizaron en malla de 2 mm.
2. Se pesó un gramo en tubos Falcón de centrifuga.
3. Se agregó 7 ml de solución extractante pH 2,6 (consiste en fluoruro de amonio y ácido clorhídrico)
4. Los tubos se taparon y agitaron durante 5 minutos
5. Se centrifugó y se filtró el sobrenadante
6. Del filtrado se tomó una alícuota de 1 ml
7. Se agregaron 9 ml de solución B [Reactivo colorimétrico preparado en el momento de la medición. Contiene 0,25 g de ácido ascórbico, 62,5 ml de reactivo solución A (la cual contiene 48 ml de ácido sulfúrico, 4,3 g de molibdato de amonio, 0,12 g de tartrato de antimonio y potasio, llevada a los 1000 ml con agua desionizada) y se agregó agua destilada hasta llegar a los 250 ml].
8. Se dejó reposar al menos 30 minutos.
9. Se calibró el espectrofotómetro a 880 nm para medir la absorbancia
10. Los cálculos se realizaron utilizando una curva de calibración.

- **Determinación de pH del suelo (Actual). Dilución 1:2,5 con pH metro de mano (SAMLA 2004)**

Se acondicionaron las muestras de suelo homogeneizándolas.

Materiales:

- 1- Medidor de pH con electrodo de vidrio en combinación con electrodo de referencia
- 2- Balanza con sensibilidad de 0,1 g
- 3- Probetas de 50 ml
- 4- Frascos de vidrio con capacidad de 100 ml

5- Varilla de vidrio agitadora.

Procedimiento:

- 1- Se pesaron 20 g de suelo en frasco de vidrio de 100 ml
- 2- Se adicionaron 50 ml (g) de agua destilada
- 3- Luego se agitó la mezcla con varilla de vidrio por 30 segundos.
- 4- Se dejó reposar durante 60 minutos como mínimo.
- 5- Se calibró el medidor de pH con soluciones buffer de pH 4,00 y 7,00
- 6- Se agitó nuevamente la suspensión y se introdujo el electrodo del medidor
- 7- Se registró el valor de pH al momento en que la lectura se estabilizó

- **Determinación de fosfatasas ácidas en suelo (LeBansky et al., 1992)**

1. En tubos Eppendorff se colocaron 0,25 g de la muestra de suelo y se mezclaron con 1 ml de agua bidestilada, se agregó 0,25 ml de Nitro Fenil Fosfato (NPP) 2,5 mM, este tubo conformó la MUESTRA. En otro tubo colocamos 0,25 g de la misma muestra de suelo con 1,25 ml de agua bidestilada, este tubo conformó el BLANCO.
2. Se incubaron los tubos 90 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
3. Se centrifugaron a 15000 g durante 10 minutos.
4. Preparación de la mezcla que detiene la reacción: 0,5 ml de sobrenadante con 3,6 ml de NaOH 0,5 M y 0,9 ml de CaCl 0,5 M.
5. Se centrifugaron 4000 g durante 10 minutos.
6. Se midió la Absorbancia en Espectrofotómetro a 405 nm.

Los datos se expresaron como unidades de actividad enzimática, equivalentes a $\mu\text{M P/min.gr}$ de suelo, los cálculos se realizaron a partir del coeficiente de extinción molar brindado por Sigma-Aldrich, proveedor del reactivo (NPP).

- **Determinación de fosfatasa ácida en tejidos de raíces**

Se utilizaron las muestras de raíces de cada tratamiento, las cuales fueron extraídas del suelo y lavadas con agua destilada en un colador procurando desechar la mayor cantidad de suelo, posteriormente las mismas fueron almacenadas en freezer a -20°C. Con las muestras obtenidas para cada tiempo realizamos un homogeneizado manteniendo la cadena de frío con hielo, siguiendo los siguientes pasos:

Se tomó el peso fresco del tejido y se colocó en mortero al cual se le agregó buffer de homogeneización en proporción 2:1 (2 ml de buffer por cada g de raíz) y se procedió al macerado.

Buffer de homogeneización: Tris HCl 50 mM pH 7,0, MgCl₂ 3 mM, EDTA 1 mM, 1% PVP (soluble)

En tubos eppendorf de 2 ml (muestra) se adicionaron:

- 0,5 ml de buffer acetato de sodio 100 mM pH 4,3 conteniendo 2 mM de NPP.
- 0,15 ml del sobrenadante obtenido de la centrifugación a 10.000g durante 4 minutos a 4°C.

En tubos eppendorf de 2 ml (control) se adicionaron:

- 0,5 ml. de buffer acetato de sodio 100 mM pH 4,3 conteniendo 2 mM de NPP.
- 0,15 ml del sobrenadante obtenido de la centrifugación a 10.000g durante 4 minutos a 4°C.
- 0,9 ml de NaOH 0,2 N.

Seguidamente los tubos se incubaron a 37° C de 1 a 10 minutos dependiendo de la medición lograda en espectrofotómetro (según respuesta de reacción).

Para cortar la reacción se adicionan 0,9 ml de NaOH 0,2 N solo a los tubos que conformaron las muestras. Por último, se determinó en espectrofotómetro la absorbancia a 400 nm y se expresó el resultado en unidades de actividad enzimática, equivalentes a $\mu\text{M P/min.gr}$ de tejido, obtenidas a partir del coeficiente de extinción molar brindado por Sigma-Aldrich, proveedor del reactivo.

Análisis del contenido de fosfatasa en solución nutritiva

Luego de 1 semana del cultivo hidropónico, se realizaron los siguientes procedimientos:

- 1- Las plantas mantenidas en soluciones +P y -P se transfirieron desde los recipientes de 0,8 L, a tubos de ensayo conteniendo la misma solución, y se mantuvieron durante 6 h.
- 2- En tubos falcón de 15 ml con 0,5 ml de Buffer de acetato de sodio 100mM pH 4,3, conteniendo 2 mM PNP, se le adicionaron 0,2 ml de solución, de soluciones nutritivas correspondientes a ambos tratamientos. Se llevaron a incubar durante 17 minutos a 37°C
- 3- Posteriormente a la incubación se le agregaron 0,9 ml de NaOH 0,2N para frenar actividad enzimática. A las muestras blanco o testigo, el agregado de NaOH 0,2 N se realizó previo a la incubación.
- 4- Se realizó la medición de absorbancia a 400nm en espectrofotómetro.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó adelante utilizando el programa Statistica, mediante la herramienta ANOVA para detectar la existencia de diferencias significativas entre los valores obtenidos, llevando adelante el análisis de una vía o factorial, según corresponda. Para la realización de los gráficos se obtuvieron los promedios y los desvíos estándar a partir del mismo programa.

RESULTADOS

Las plantas tuvieron un periodo de crecimiento de 120 días (4 meses). Al momento de la aplicación de herbicida tenían un tamaño de 60 cm, habiendo 4 plantas por tubo. Las plantas se encontraban en estado fenológico de floración y tenían un desarrollo de 16 hojas verdaderas (trifoliadas). La profundidad máxima a la que se encontraron raíces fue de unos 35 cm. Los tiempos de cosecha se refieren a T1=16/9 T2=7/10 T3=28/10 T4=20/11, ver tabla 1.

El siguiente grafico ordena dichos resultados donde se observa como la cantidad de P disponible en el suelo no varía significativamente entre profundidades dentro de cada tiempo de muestreo, ni para la misma profundidad entre los diferentes tiempos de muestreo.

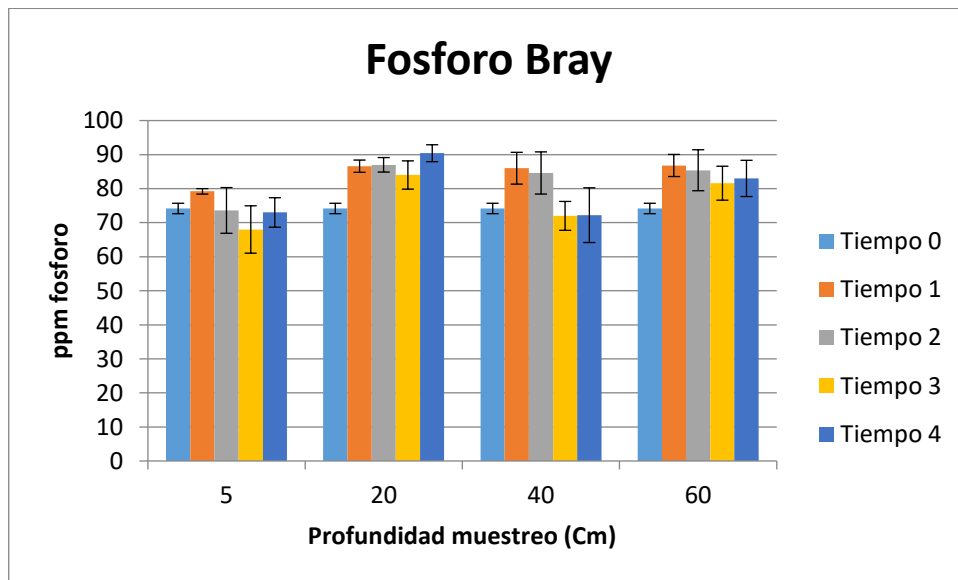


Figura 1: Contenido de fósforo en ppm disponible en suelo, a diferentes profundidades y tiempos de muestreo post secado de las plantas.

Partiendo de que no existieron diferencias significativas en la disponibilidad de fósforo en el suelo, como se observa en la Figura 1, se evaluó la actividad de las enzimas fosfatasas en el suelo (Figura 2) para observar si existía una diferencia en la actividad. Al no observarse diferencias significativas entre las profundidades dentro de cada replica, se procedió a promediar todas las profundidades de muestreo para cada replica (Figura 3), para observar con claridad como las actividades fosfatasas de los tratamientos y los testigos en diferentes tiempos, considerando el promedio de todas las profundidades, no presentan diferencias significativas entre si, no pudiendo asignarse a la presencia de lupino la existencia de una diferencia en la actividad de las enzimas fosfatasas en suelo.

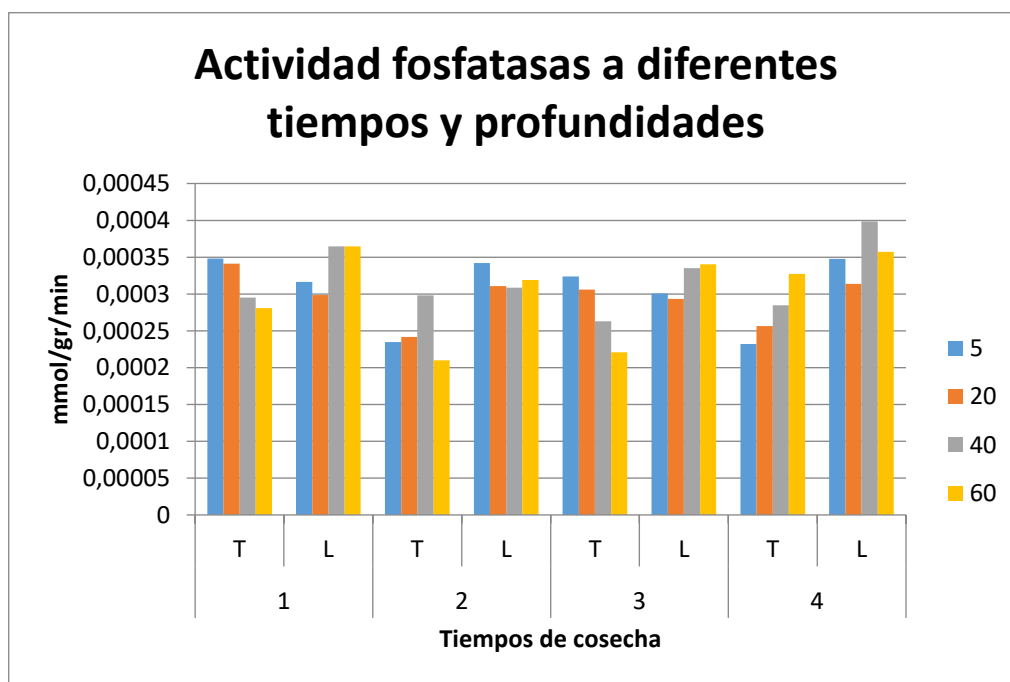


Figura 2: Actividad de enzima fosfatasa en suelo a distintas profundidades y distintos tiempos. T (corresponde al suelo testigo) L (corresponde al suelo con lupino).

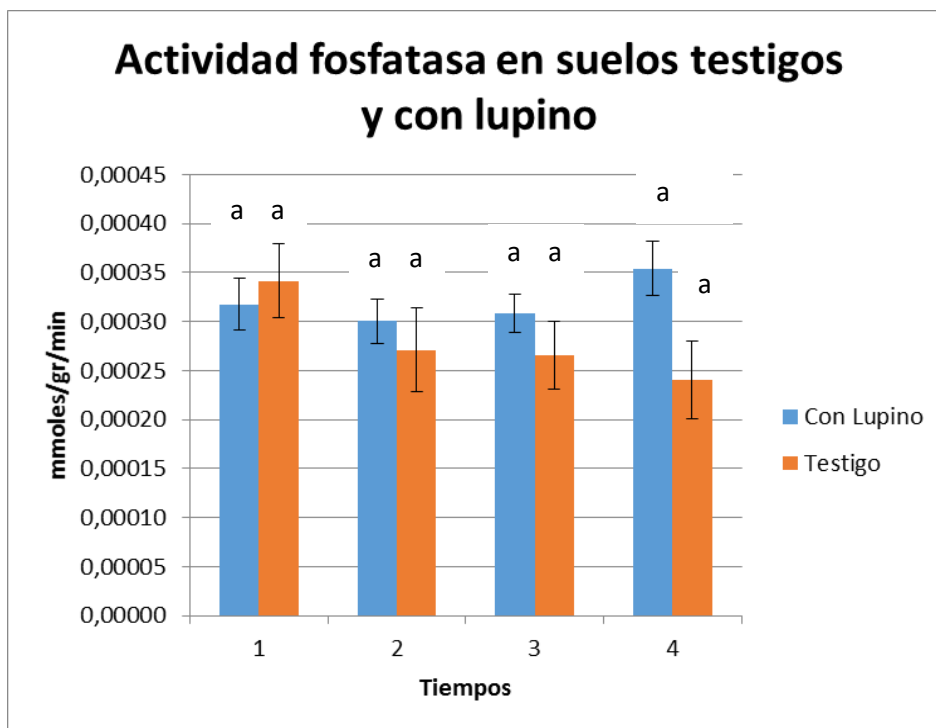


Figura 3: Promedio de las actividades fosfatasas para los tratamientos (suelo con lupino) y testigos, expresado como promedio de las distintas profundidades de muestreo para cada tiempo.

Al analizar la actividad de las enzimas fosfatasas ácidas en los tejidos de la raíz, observamos que la actividad de las fosfatasas en los tejidos de raíces presentes en el suelo disminuye marcadamente a partir del momento de la cosecha (Figura 4), pudiendo tratarse de degradación de estas o de una liberación masiva al medio, observando los resultados del grafico anterior se infiere que se trata de una degradación, ya que las fosfatasas no presentan un incremento en los suelos en los días posteriores al secado de las plantas de lupino.

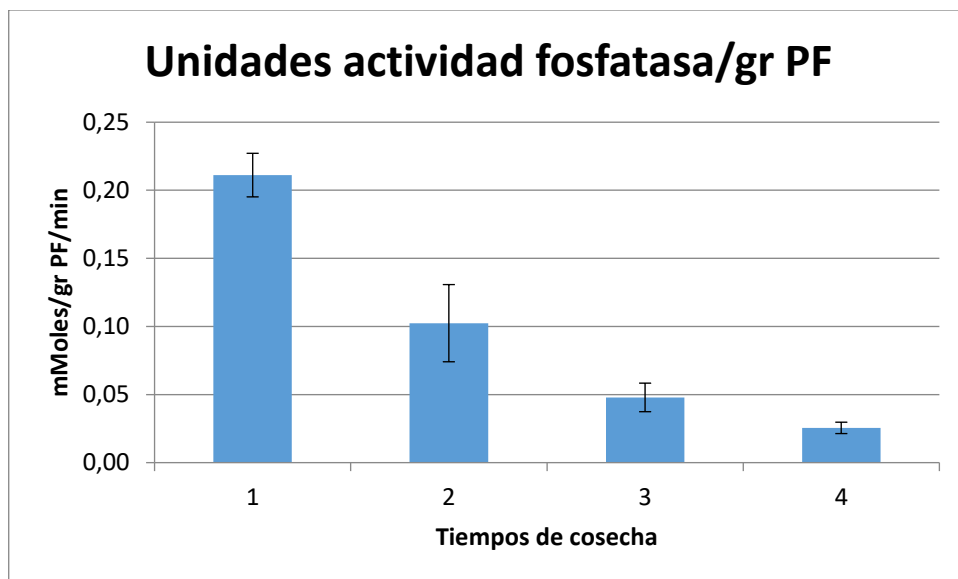


Figura 4: Contenido de enzima fosfatasa en tejido vegetal de raíces en diferentes tiempos de cosecha.

Al estudiar la actividad fosfatasa en el suelo para los distintos tratamientos, podemos observar que no existieron variaciones ni entre profundidades ni entre tiempos, lo cual estaría confirmando que las mismas se degradaron, ya que no se encuentran ni en la raíz ni en el suelo.

En referencia al pH del suelo, un factor que determina en gran medida la solubilidad del P, encontramos que no varía para los diferentes tiempos para tratamientos en relación a los testigos (Figura 5), descartando que el cultivo tenga efecto sobre el pH del suelo, bajo las condiciones experimentales descritas.

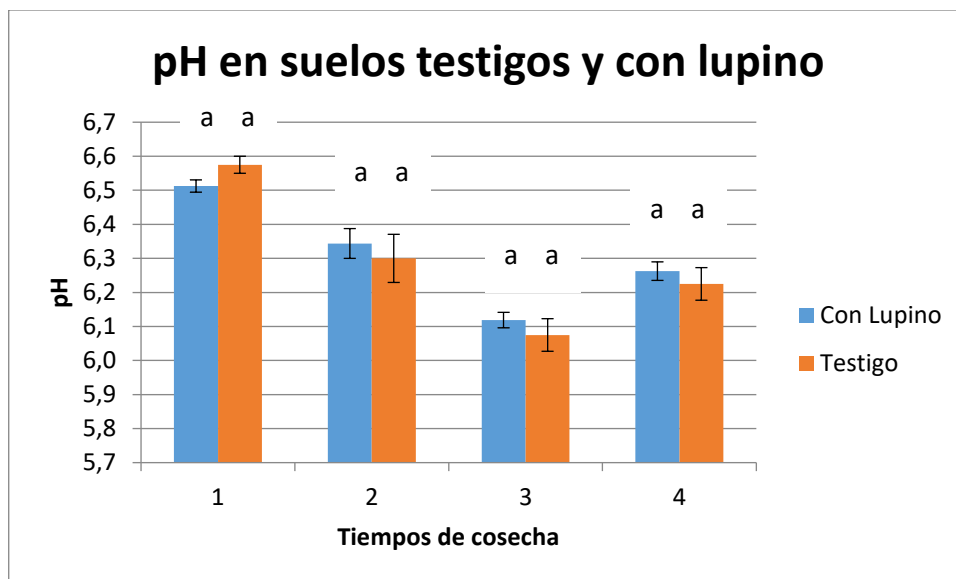


Figura 5: pH del suelo dilución 1:2,5, promedios de los tratamientos por tiempo contrastado con los testigos del correspondiente tiempo.

Ante los resultados obtenidos, donde no se evidencia exudación de fosfatasas al medio, producción diferencial de fosfatasas en raíces, ni acidificación del suelo para mejorar la disponibilidad del fósforo del suelo, es necesario confirmar que estas respuestas sí se desarrollan por parte de la planta bajo condiciones de deficiencia, y que las mismas no se han expresado debido a las condiciones experimentales. Es probable que esas estrategias sean de tipo facultativo, o sea que se expresan cuando el medio o las condiciones son favorables para que ello suceda. Tal caso puede darse ante un déficit de nutricional.

Para confirmar la hipótesis de que el lupino exuda fosfatasas en condiciones de déficit de P repetimos el experimento en condiciones controladas (cámara de cultivo), cultivando las plantas en solución Hoagland con y sin dotación de fósforo (+P y -P) en cámara de crecimiento y determinando el contenido de fosfatasas en solución donde comprobamos una respuesta ante el déficit de fósforo con un incremento significativo de fosfatasas en el medio y atribuidas a la presencia del lupino (Figura 6).

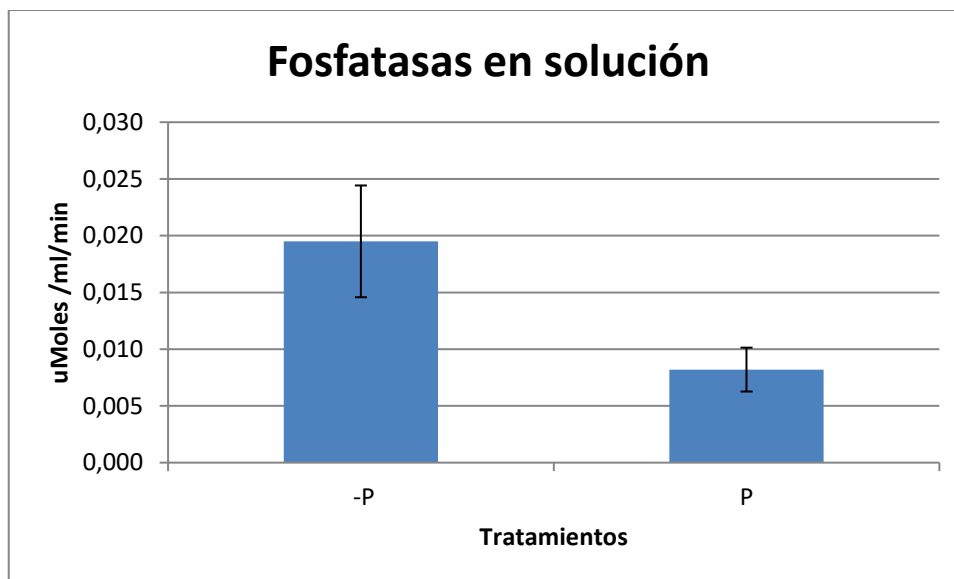


Grafico 6. Actividad de la enzima fosfatasa en solución nutritiva luego de 7 días de crecimiento bajo dos condiciones de dotación de P, 0 (-P) y 0,5 mM (P).

DISCUSION

Existe gran cantidad de trabajos que estudian la formación de raíces proteoides en respuesta al déficit de fósforo en lupino blanco (Marschner, Rômhheld y Cakmak, 1987) y la capacidad de estas raíces proteoides para exudar iones orgánicos, principalmente citrato o ácido cítrico (Gerke, Rômer y Jungk, 1994) y fosfatasas, todos ellos en condiciones de deficiencia extrema del macronutriente fosforo. Esto pudo ser comprobado en este trabajo al cultivar semillas de lupino blanco en condiciones de deficiencia del nutriente, encontrando una respuesta significativa de exudación de fosfatasas ácidas (Figura 6).

También existen estudios que comprueban la formación de raíces proteoides y de su efecto de exudación de citrato y fosfatasas en condiciones de suelos con fertilidad adecuada, demostrando la solubilización de fósforo indisponible aun en condiciones de fertilidad normales (Keerthisinghe, 1998).

Al cultivar en suelo en condiciones de disponibilidad suficiente de P (70 ppm), como lo hicimos en este trabajo, no encontramos evidencia de que se generen variaciones significativas en el pH del suelo como consecuencia de la presencia del

lupino blanco comparándolo con un suelo sin cultivar (Figura 5), ni siquiera en la zona de mayor actividad radical (0-20 cm). Tampoco se encontraron indicios de exudación de fosfatasas al suelo por parte de la raíz (Figura 3), lo que nos indicaría que cuando los nutrientes se encuentran en concentraciones óptimas o supraóptimas la planta no activa estas estrategias para aumentar la disponibilidad de fósforo en suelo.

Las estrategias que han sido estudiadas en nuestro cultivo son aquellas que buscan incrementar la disponibilidad del nutriente a costa del *stock* o *pool* existente en el suelo, estrategia denominada de tipo “minera”, que mejorarían la desorción o movilización de fósforo de depósitos escasamente disponibles (Richardson, 2011). Tales estrategias, que son activadas frente a deficiencias de fósforo, no se ha manifestado en los ensayos realizados en el presente trabajo donde el nutriente se encontraba en cantidad suficiente.

Según Marschner *et al.* (1987) la concentración interna de fósforo de la planta determina la iniciación de las raíces proteoides en vez de la concentración de fósforo en el sustrato, y se ha asumido generalmente que las raíces proteoides se forman como una respuesta a la deficiencia severa de fósforo. Esta acumulación de fósforo en el suelo es ilustrado por un análisis del *stock* de fósforo del suelo para diferentes sistemas agrícolas de Australia, donde, por ejemplo, las proporciones entre entradas y salidas (exportaciones) de fósforo para los sistemas de cultivos y pastos están en el orden de 2: 1 y 5: 1, respectivamente, indicando una retención neta en el suelo de 50 a 80% de las entradas de fósforo (McLaughlin *et al.* 1991). Una acumulación de fósforo en el suelo fertilizado es consistente con estudios que muestran que la eficiencia de uso de fósforo aplicado (como superfosfato) por las plantas es sólo el 10-20% en el año de aplicación y, en general alcanza un máximo de alrededor de 50% con el tiempo debido al valor residual (Holford 1997).

Varios estudios han demostrado importantes tasas de mineralización de fósforo orgánico en relación con la actividad de la fosfatasa en el suelo (George *et al.* 2002.), lo que vuelve a las fosfatasas un factor importante en la disponibilidad del P en el suelo.

El *lupino blanco* es un cultivo que podría ser utilizado intercalado con otras especies en suelos destinados a agricultura continua permitiendo mejorar la eficiencia de fertilizantes fosforados en condiciones de fertilidad instantánea media o baja del nutriente según consta en bibliografía citada en este trabajo. No encontramos ese efecto en

condiciones de suficiencia del nutriente evidenciando que los mecanismos de solubilización tan desarrollados en el lupino blanco no se activan constitutivamente, sino que nos inducidos por el déficit ya que no expresaron su capacidad de exudación de fosfatasas, ni de aumentar la disponibilidad de fósforo.

CONCLUSION

El lupino no produjo variaciones en la disponibilidad de P en condiciones de **suficiencia** de provisión de nutriente. La capacidad hidrolítica de los fosfatos orgánicos se expresa frente a un déficit del fósforo pudiendo inferirse que dicha capacidad es facultativa, lo cual pudo ser demostrado al cultivarse en medio deficitario de fósforo.

Al no existir efecto sobre la disponibilidad del fósforo (rechazando la primera hipótesis) no es posible cuantificar su duración en el tiempo (descartando la segunda hipótesis).

BIBLIOGRAFIA

Alvarez, C.; Barraco, M.; Díaz Zorita, M.; Scianca, C.; Pecorari, C. 2005. Uso de cultivos de cobertura en rotaciones con base soja: efecto sobre algunas propiedades edáficas y rendimiento de los cultivos en un Hapludol típico del noroeste bonaerense. Boletín de divulgación técnica N° 87.

Bariola P., MacIntosh G.C., Green P.J. 1999. Regulation of S-Like Ribonuclease Levels in Arabidopsis . Antisense Inhibition of RNS1 or RNS2 Elevates Anthocyanin Accumulation 1 Plant Physiol. 119:331-342.

Barber, S. A. 1980. Soil-plant interactions in the phosphorus nutrition of plants. In: Khasawneh FE, Sample EC, Kamprath EJ (eds) The role of phosphorus in agriculture. Am Soc Agronomy, Madison, Wisconsin, pp 591-615. (Version traducida al inglés).

Cassman K. G., Whitney A. S., Stockinger K. R. 1980. Root Growth and Dry Matter Distribution of Soybean as Affected by Phosphorus Stress, Nodulation, and Nitrogen Source.

Chiou T.J., Lin S.I. 2011. Signaling network in sensing phosphate availability in plants. *Ann Rev Plant Biol* 62:185–206.

Cogliatti D.H., Clarkson D.T. 1983. Physiological changes in , and phosphate uptake by potato plants during development of , and recovery from phosphate deficiency. *Physiol Plant* 58:287-294.

Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. 2008. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Global environmental change*, 19(2), 292-305.

Epstein E., Bloom A.J. 2005. Mineral Nutrition of Plants. Second Edition. SinauerAssoc, Inc Publishers

Gardner W.K., Barber D.A., Parberry D.G. 1983a. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. *Plant and Soil* **70**, 107–124.

Gardner W. K. , D. G. Parbery, D. A. Barber, AND L. Swinden. 1983b .The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. V. The diffusion of exudates away from roots: A computer simulation. *Plant and Soil*72 : 13 – 29.

George TS, Gregory PJ, Robinson JS, Buresh R. J. 2002. Changes in phosphorus concentrations and pH in the rhizosphere of some agroforestry and crop species. *Plant and Soil* 246, 65 –73.

Hendriks L, Claassen N, Jungka.1981. Phosphatverarmung des wurzelnahen Bodens und Phosphataufnahme von Mais und Raps. *Z Pflanzenern/ihrBodenkd* 144:486-499 (Versión traducida al inglés).

Hinsinger P. 2001. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review

Hondelmann, W. 1984 . The lupin—Ancient and modern crop plant. *Theoretical and Applied Genetics* 68 : 1 – 9 .

IRAM-SAGyP 29570-1. 2010. Determinación de fósforo extraíble en suelos - Parte 1 – Método Bray Kurtz 1 modificado (Extracción con solución de fluoruro de amonio – ácido clorhídrico). Instituto Argentino de Normalización y Certificación.

- Jiang, L., Gao X., Harberd, N.P., Fu, X.** 2007. Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol* 145:1460–1470.
- Kamh, M., Horst, W. J., Amer, F., Mostafa, H., Maier, P.** 1999. Mobilization of soil and fertilizer phosphate by cover crops. *Plant and Soil* 1999 Plan soil 211:19.
- Keerthisinghe, G., Hocking, P. J., Ryan, P. R., Delhaize, E.** 1998. Effect of phosphorus supply on the formation and function of proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell & Environment* 21, 467–478.
- Kováčik, J., Klejdus B., Bačkor, M.** 2009. Nitric oxide signals ROS scavenger-mediated enhancement of PAL activity in nitrogen-deficient *Matricaria chamomilla* roots: side effects of scavengers. *Free Radic Biol Med* 12: 1686-1693.
- Lambers, H., Clements, J. C., Nelson, M. N.** 2013. How a phosphorus-acquisition strategy based on carboxylate exudation powers the success and agronomic potential of lupines (*Lupinus*, Fabaceae) *American Journal of Botany* 100(2): 263–288. 2013.
- LeBansky B. R., McKnight, T. D., Griffing L. R.** 1992. Purification and Characterization of a Secreted Purple Phosphatase from Soybean Suspension Cultures. *Plant Physiology* 99, 391-395.
- Lewis D. G., Quirk J. P.,** 1967. Phosphate diffusion in soil and uptake by plants. III. 31P movement and uptake by plants as indicated by 32P autoradiography. *Plant and Soil* 27:445-453.
- Marschner, H., Römheld, V., Cakmak, I.** 1987 Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *Journal of Plant Nutrition* 10, 1175–1184.
- McLaughlin, M.J., Fillery, I. R., Till, A. R.** 1991. Operation of the phosphorus, sulphur and nitrogen cycles. In 'Australia's renewable resources: sustainability and global change. Bureau of Rural Resources Proceedings No. 14'. (Eds RM Gifford, MM Barson) pp. 67–116. (Australian Government Printing Services: Canberra).
- Neumann, A., Werner, J. & Rauber, R.** 2009. Evaluation of yield-density relationships and optimization of intercrop compositions of field-grown pea-oat intercrops using the replacement series and the response surface design. *Field Crop Research* 114: 286-294.

Nussaume, L., Kanno, S., Javot, H., Marin, E., Pochon, N., Ayadi, A., Thibaud, M.C. 2011. Phosphate Import in Plants: Focus on the PHT1 Transporters. *Frontiers in Plant Science*, 2, 83.

Peñaloza, E., Galdamez, R. y Aguilera, A. 1995. Nueva variedad de lupino en el sur de Chile. *Tierra Adentro* 2. pp 34-37.

Pound, R. 1997 Cultivos de Cobertura para la Agricultura Sostenible en América. Conferencia electrónica de la FAO sobre "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica". Disponible en: <http://www.fao.org/ag/aga/AGAP/frq/AGROFOR1/Pound7.htm>.

Purnell, H. M. 1960. Studies of the family Proteaceae. I. Anatomy and morphology of the roots of some Victorian species in Australian. *Journal of Botany* 8.

Richardson, A. E., Lynch, J. P., Ryan, P. R., Delhaize, E., Smith, F. A., Smith, S. E., Harvey, P. R., Ryan, M. H., Veneklaas, E. J., Lambers, H., Oberson, A., Culvenor, R. A., Simpson, R. J. 2011. Plant and microbial strategies to improve the phosphorus efficiency of agriculture - *Plant Soil* 2011 349:121–156

Roelofs, R. F. R., Rengel, Z., Cawthray, G. R., Dixon, K. W., Lambers, H. 2001. Exudation of carboxylates in Australian Proteaceae: chemical composition - *Plant, Cell and Environment* (2001) 24, 891–903.

SAMLA. 2004. Recopilación de técnicas de laboratorio. Formato CD-ROM. ISBN 987-9184-40-8 SENASA, 2015.

Shen, J., Rengel, Z., Tang, C., Zhang, F. 2003. Role of phosphorus nutrition in development of cluster roots and release of carboxylates in soil-grown *Lupinus albus*. *Plant and Soil* 248, 199–206.

Sustainable Agriculture Network. 1998. Managing cover crops profitably. Second edition. Handbook. Series Book 3. Beltsville, MD, Estados Unidos de América. 212pp.

Uexküll, H.R., Mutert, E.W. 1995. Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil* 171: 1–15.

Wang, J, Sun J., Miao, J., Guo, J., Shi, Z., He, M., Chen, Y., Zhao, X., Li, B., Han, F., Tong, Y., Li, Z. 2013. A phosphate starvation response regulator *Ta-PHR1* is involved in phosphate signalling and increases grain yield in wheat. *Annals of Botany* 111: 1139–1153.

Wasaki, J., Yamura, T., Shinano, T., Osaki, D. M., 2003. Secreted acid phosphatase is expressed in cluster roots of lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant and Soil* 248 :129 –136.

ANEXO I

Imágenes



Plantas en estado de floración, momento en el que se interrumpió su desarrollo con aplicación de herbicida



Determinación de las diferentes profundidades de muestreo a evaluar para cada tratamiento





Extracción de muestras de diferentes tratamientos