

RESPUESTAS BIOQUÍMICAS EN FRESA AL SUMINISTRO DE FÓSFORO EN FORMA DE FOSFITO

Elías Estrada-Ortiz¹; Libia Iris Trejo-Téllez¹; Fernando Carlos Gómez-Merino²; Roberto Núñez-Escobar¹; Manuel Sandoval-Villa¹

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. km 36.5 Carretera México-Texcoco. C. P. 56230, Montecillo, Estado de México. Correo-e: tlibia@colpos.mx (¹Autora para correspondencia)

²Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. km 348 Carretera Córdoba-Veracruz. C. P. 94946, Amatlán de los Reyes, Veracruz.

RESUMEN

En esta investigación se evaluó la concentración de azúcares solubles totales, clorofilas a, b y total en las fases de floración y fructificación, y de aminoácidos libres y proteínas solubles en la fase de fructificación, en hojas de fresa cv. Festival en respuesta a la adición de distintos porcentajes del P total suministrado en forma de fosfito (0, 20, 30, 40 y 50 %) a la solución nutritiva. Cuando 20 % del P total en la solución nutritiva fue adicionado como fosfito, la concentración de azúcares se incrementó significativamente sólo en la fase de floración. El contenido de clorofila a en la fase de floración no presentó diferencias significativas entre tratamientos conteniendo fosfito con respecto al testigo; por el contrario, durante la fructificación, el contenido mayor de clorofilas a, b y total se registró con la adición de 30 % de P como fosfito en la solución nutritiva. Los aminoácidos libres totales tuvieron una concentración que se relacionó de manera positiva con el porcentaje del P total como fosfito en la solución nutritiva en el intervalo de 0 a 30 %; cantidades porcentuales superiores de fosfito propiciaron un decremento en éstos. Una tendencia similar fue observada en la concentración de proteínas solubles totales; en esta variable la media más baja se registró en el testigo; siendo incluso diferente significativamente al tratamiento consistente en la adición del 50 % del P en forma de fosfito. Estos resultados permiten concluir que la adición del 30 % del P total a la solución nutritiva como fosfito, estimula la acumulación de biomoléculas en fresa en la etapa de fructificación.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Fragaria x ananasa* Duch.; azúcares solubles totales, clorofila, aminoácidos, proteínas solubles

BIOCHEMICAL RESPONSES IN STRAWBERRY PLANTS SUPPLYING PHOSPHORUS IN THE FORM OF PHOSPHITE

ABSTRACT

In this study we evaluated the concentration of total soluble sugars, chlorophylls a, b and total during blooming stage and fructification stage, and free amino acids and soluble proteins during fructification stage, in strawberry leaves cv. Festival in response to the addition of P in the form of phosphite in different proportions (0, 20, 30, 40 and 50 %) in the nutrient solution. When 20 % of total P in the form of phosphite was added in the nutrient solution, the concentrations of sugars significantly increased only during the blooming stage. Content of chlorophyll a during blooming stage did not show significant differences among treatments containing phosphite with respect to the control treatment; on the contrary, during the fructification stage, the highest content of chlorophyll a, b, and total was recorded with the addition of 30 % of P as phosphite in the nutrient solution. Total free amino acids had a concentration positively related to the proportion of total P as phosphite in the nutrient solution in the range of 0 to 30 %; higher percentages of phosphite led to a decrease in free amino acids. A similar trend in the concentration of total soluble proteins was observed; variable in which the lowest mean in the control was registered; being significantly different to the treatment involving the addition of 50 % of P in the form of phosphite. These results led to the conclusion that the addition of 30 % of total P to the nutrient solution as phosphite stimulates the accumulation of biomolecules in strawberry plants during the fructification stage.

ADDITIONAL KEY WORDS: *Fragaria x ananasa* Duch.; total soluble sugars, chlorophyll, free amino acid; soluble proteins

INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un elemento esencial para el desarrollo y la reproducción de plantas superiores. Sus funciones no pueden ser realizadas por ningún otro nutriente. Si no se le agrega la cantidad de fósforo suficiente a la planta, ésta no expresará su máximo potencial en rendimiento, puesto que este nutriente es muy importante en el almacenamiento y transferencia de energía en las células vegetales (Fageria, 2008).

Este elemento es un componente estructural esencial de muchas biomoléculas y desempeña un papel fundamental en la conservación de la energía y la regulación del metabolismo. El ortofosfato inorgánico (Pi), la forma de fósforo asimilada, a menudo es un macronutriente limitante tanto en los ecosistemas terrestres como en los acuáticos. Como consecuencia, la asimilación, almacenamiento y metabolismo del Pi están altamente regulados en los procesos que afectan directamente el crecimiento de las plantas (Raghothama, 1999).

Las plantas absorben el P en forma de fosfatos inorgánicos, principalmente como anión fosfato monobásico (H_2PO_4^-) y anión fosfato dibásico (HPO_4^{2-}). No obstante, la planta también puede, a través de sus enzimas, desprender grupos fosfatos de los compuestos orgánicos y posteriormente absorberlos. Este elemento, a diferencia del nitrógeno y azufre, no es reducido en la planta al ser asimilado por ella, sino que es incorporado a los compuestos orgánicos en su mismo estado de oxidación (Alcántar *et al.*, 2007).

Por otra parte, el anión fosfito es una forma reducida del fosfato (Bozzo *et al.*, 2004). Los iones fosfito, al presentar gran semejanza en estructura con los fosfatos, son absorbidos por la planta vía transportadores de fosfatos y su velocidad de absorción es muy similar (Varadarajan *et al.*, 2002).

El fosfito se está comercializado ampliamente para uso agrícola, ya sea como supresor de enfermedades (Rebollar-Alviter *et al.*, 2007) o como fuente de P para la nutrición de los cultivos en medios donde éste puede ser oxidado a fosfato (McDonald *et al.*, 2001a). Está bien establecido que el fosfito aumenta la resistencia a las enfermedades a través de un mecanismo que se conoce como resistencia sistémica adquirida (Andreu *et al.*, 2004). El fosfito se ha empleado recientemente como fertilizante, con resultados contradictorios. Varadarajan *et al.* (2002) reportan que el fosfito no participa en las rutas bioquímicas en plantas, es decir, no es metabolizado, y adicionalmente mostraron que no puede ser convertido a fosfatos dentro de la planta. Lo anterior se traduce en efectos negativos del fosfito sobre el metabolismo vegetal. Sin embargo, aplicado vía foliar incrementa el rendimiento y mejora la calidad en varios cultivos (Rickard, 2000).

En fresa, Moor *et al.* (2009) encontraron que la fertilización con fosfito no inhibe ni promueve el crecimiento

INTRODUCTION

Phosphorus (P) is a key element for the development and reproduction of superior plants. Its functions can be performed by any other nutrient. If not enough phosphorus is added to the plant, it will not show its maximum yield potential, because this nutrient is very important in the storage and transfer of energy in vegetable cells (Fageria, 2008).

This element is an important structural component of many biomolecules and it is fundamental in conservation of energy and regulation of metabolism. Inorganic orthophosphate (Pi), assimilable phosphorus, is often a limiting macronutrient both in terrestrial and aquatic ecosystems. As a result, absorption, storage and metabolism of Pi are highly regulated in the processes that directly affect plants growth (Raghothama, 1999).

Plants absorb the P in form of inorganic phosphates, mainly as monobasic phosphate anion (H_2PO_4^-) and dibasic phosphate anion (HPO_4^{2-}). However, the plant can as well -by means of its enzymes- give off phosphate groups of the organic compounds and then absorb them. This element, unlike nitrogen and sulfur, is not reduced in the plant by being absorbed; on the contrary, it is added to the organic compounds in its oxidation state (Alcántar *et al.*, 2007).

Moreover, the phosphite anion is a reduced form of phosphate (Bozzo *et al.*, 2004). When phosphite ions show great similarity in structure with phosphates, the plant absorb them via phosphate transporters and their absorption rate is very similar (Varadarajan *et al.*, 2002).

Phosphite is widely marketed for agricultural use, either as a suppressor of diseases (Rebollar-Alviter *et al.*, 2007) or as source of P for crop nutrition in environments where it can be oxidized to phosphate (McDonald *et al.*, 2001a). Phosphite increases resistance to diseases by means of a mechanism that is known as systemic acquired resistance (Andreu *et al.*, 2004). Phosphite has recently been used as fertilizer, with contradictory results. Varadarajan *et al.* (2002) reported that phosphite does not participate in biochemical pathways in plants, in other words, it is not metabolized, and additionally they showed that it cannot be converted to phosphates within the plant. Showing negative effects of phosphite on plant metabolism. However, applied via foliar increases yield and enhance the quality in several crops (Rickard, 2000).

In strawberry plants, Moor *et al.* (2009) observed that the fertilization with phosphite does not inhibit neither promotes the growth of the plants; also, this fertilization does not have advantages on the fertilization with phosphates, with respect to yield. Nevertheless, Moor *et al.* (2009) indicated that foliar fertilization with phosphite did change the flavor of the fruit, increasing its acidity and decreasing its concentration of sugars.

In Mexico, phosphite is applied in strawberry crops as a preventive measure against *Phytophthora cactorum*,

de plantas de fresa; asimismo, la fertilización a base de fosfito no tiene ventajas sobre la fertilización con fosfatos en lo que al rendimiento respecta. No obstante, Moor *et al.* (2009) indicaron que la fertilización foliar con fosfito sí modificó el sabor de la fruta, incrementando su acidez y disminuyendo en consecuencia su concentración de azúcares.

El fosfito está siendo aplicado en cultivos de fresa en nuestro país como medida preventiva contra *Phytophthora cactorum*, sin que se haya evaluado el efecto que tiene sobre el cultivo. En el contexto anterior, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes porcentajes del P total en la solución nutritiva en forma de fosfito sobre la concentración de biomoléculas en hojas recientemente maduras (sitio predominante de fotosíntesis en plantas superiores, así como órganos de acumulación y suministro) de fresa cv. Festival. Las biomoléculas analizadas fueron azúcares solubles totales; clorofilas a, b y total, las cuales correlacionan de manera positiva con la tasa fotosintética de acuerdo a un gran número de reportes científicos; concentración de aminoácidos libres totales y proteínas solubles totales, al tener los aminoácidos libres una función esencial en el metabolismo vegetal y ser precursores de proteínas y ácidos nucleicos y asociarse su acumulación en respuesta a diversos tipos de estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

Condiciones experimentales

El presente trabajo se realizó en un invernadero tipo túnel localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. La temperatura diurna tuvo un promedio de 24 °C, en tanto que la nocturna fue de 11 °C. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 530 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Se establecieron plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Festival en tezontle rojo previamente cribado para obtener un tamaño de partícula de 3 a 5 mm de diámetro, en bolsas negras de polietileno de 30 x 30 cm.

Tratamientos y diseño experimental

En este experimento se evaluaron cinco soluciones nutritivas con macro y micronutrientes que se diferenciaron sólo en el porcentaje de fosfito (H_2PO_3^-). Estas soluciones nutritivas se formularon tomando como referencia la Solución Nutritiva Universal de Steiner (1984), cuya concentración al 50 % en $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ fue de 5.28 de NO_3^- , 0.72 de NH_4^+ , 0.5 de H_2PO_4^- , 3.5 de SO_4^{2-} , 3.5 de K^+ , 4.5 de Ca^{2+} , y 2 de Mg^{2+} . Las soluciones fueron complementadas con una mezcla de micronutrientes, con las siguientes concentraciones ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): 1.6 de Mn, 0.11 de Cu, 0.865 de B, 0.023 de Zn, 0.048 de Mo, y 5 de Fe, en donde, el Mn, Cu y Zn se suministraron en forma de sulfatos; el B como H_3BO_3 , Mo como H_2MoO_4 y el Fe como quelato (Fe-EDTA), de acuerdo al método descrito por Steiner y Van Winden (1970). Los reactivos utilizados para la preparación de las soluciones nutritivas fueron de la marca J. T. Baker, grado analítico.

without having assessed the effect that it may produce. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of different proportions of P in nutrient solution in the form of phosphite on biomolecule concentrations in recently mature strawberry leaves cv. Festival (predominant site of photosynthesis in superior plants, as well as organs of accumulation and supply). The analyzed biomolecules were: total soluble sugars; chlorophylls a, b and total, which were positively related with the photosynthetic rate according to a large number of scientific reports; concentration of total free amino acids and total soluble proteins, having free amino acids an essential function in plant metabolism and be precursors of proteins and nucleic acids and associate its accumulation in response to several types of stress.

MATERIALS AND METHODS

Experimental conditions

The present study was conducted in a tunnel-type greenhouse located at 19° 29' N, 98° 53' W, at an altitude of 2,250 m. Daily average temperature was 24 °C, and at night the temperature was 11 °C. Average light intensity was 530 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Festival were placed on previously sifted red volcanic stones in order to obtain a particle size with a diameter between 3 to 5 mm, black polyethylene bags of 30 x 30 cm were used.

Treatments and experimental design

In this study, five nutrient solutions with macro and micronutrients were evaluated, which differed only in the proportion of phosphite (H_2PO_3^-). These nutrient solutions were formulated taking into account the Steiner's Universal Nutrient Solution (1984) as reference; the concentration at 50 % in $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}$ was 5.28 of NO_3^- , 0.72 of NH_4^+ , 0.5 of H_2PO_4^- , 3.5 of K^+ , 4.5 of Ca^{2+} , and 2 of Mg^{2+} . The solutions were supplemented with a mixture of micronutrient, with the following concentrations ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$): 1.6 of Mn, 0.11 of Cu, 0.865 of B, 0.023 of Zn, 0.048 of Mo, and 5 of Fe, where, Mn, Cu and Zn were provided in form of sulfates; B as H_3BO_3 , Mo as H_2MoO_4 and Fe as chelates (Fe-EDTA), according to the method described by Steiner and Van Winden (1970). The reagents used for the preparation of the nutrient solutions were from the belonged to J. T. Baker, analytical grade.

The evaluated proportions of total P in form of phosphite in nutrient solution were 0, 20, 30, 40 and 50 %. Phosphite was supplied from phosphonic acid or phosphorous acid (H_3PO_3 , Sigma-Aldrich, 99 %); the pH of the solution was between 5.5 and 5.8 using H_2SO_4 at 97% or NaOH 1N, to assure that phosphite was available (Hanrahan *et al.*, 2005). The addition of phosphite in the nutrient solution of Steiner was conducted as follow: 50 % during the blooming stage, and 75% during the fructification stage. The supply of the nutrient solutions was carried out using drip irrigation system with a timer, watering 8 times, for only two minutes (120 ml each time).

Los porcentajes del P total en forma de fosfito en la solución nutritiva evaluados fueron 0, 20, 30, 40 y 50 %. El fosfito fue suministrado a partir de ácido fosfónico o ácido fosforoso (H_3PO_3 , Sigma-Aldrich, 99 %); el pH de la solución se mantuvo ajustado entre 5.5 y 5.8 utilizando H_2SO_4 al 97 % o NaOH 1N, para garantizar que estuviera disponible el fosfito (Hanrahan *et al.*, 2005). La adición de fosfito en la solución nutritiva de Steiner 50 % se hizo en la etapa de floración, y en la etapa de fructificación se usó una concentración del 75 %. El suministro de las soluciones nutritivas se realizó a través de un sistema de riego por goteo programado con un temporizador para suministrar ocho riegos de dos minutos cada uno. El gasto por gotero por día fue de 960 ml (120 ml por gotero).

Se utilizó un diseño en bloques al azar generalizado (BAG), teniendo cinco bloques, y en cada uno de ellos se ensayó cada tratamiento con tres repeticiones. La unidad experimental fue una bolsa negra de polietileno de 30 x 30 cm conteniendo una planta de fresa. Los resultados obtenidos se analizaron de manera independiente en cada una de las fases fenológicas.

Variables evaluadas

Se muestreó una hoja trifoliada recientemente madura y sin peciolo de diez de las quince plantas de cada uno de los tratamientos, las cuales se homogenizaron para las determinaciones que a continuación se describen.

Azúcares totales en hojas. Se determinaron en las etapas de floración y fructificación, por el método descrito por Southgate (1976) empleando antrona, ácido sulfúrico y etanol al 80 %. La absorbancia fue determinada a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb, EEUU). Se utilizó glucosa como estándar para elaborar la curva de calibración.

Concentración de clorofilas a, b y total. Se determinó por el método de Harborne (1973), y las muestras fueron analizadas en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb, EEUU) a 663 y 645 nm. Posteriormente, se realizó el cálculo de clorofilas a, b y totales según las ecuaciones correspondientes para cada una de éstas. Esta determinación se realizó en hojas tanto en la fase de floración como en la de fructificación.

Aminoácidos libres totales. Se realizó la extracción etanólica en hojas en la etapa de fructificación, siguiendo la metodología de Geiger *et al.* (1998) y se empleó el método de la ninhidrina (Moore y Stein, 1954). Se utilizó leucina para la elaboración de la curva estándar y se leyó a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV, Madison, WI 53711, USA).

Proteínas solubles totales. Se realizó la extracción de acuerdo a lo descrito por Höfner *et al.* (1989) en hojas en la etapa de fructificación. La cuantificación se hizo

A generalized randomized block designs (GRBD) was used, having five blocks. In each one of them, a treatment with 3 replications was tested. The experimental unit was a black polyethylene bag of 30 x 30 cm with a strawberry plant. The results were independently analyzed in each of the phenological phases.

Evaluated variables

A recently mature trifoliate leaf without petiole of ten of the fifteen plants of each treatment was sampled. These leaves were homogenized for the determinations described as follow:

Total sugars in leaves. Sulfuric acid and ethanol at 80 % were determined with the method described by Southgate (1976) using anthrone, during the blooming stage and the fructification stage. Absorbance was determined at a wavelength of 620 nm using a spectrophotometer (Spectronic 20, Bausch & Lomb, USA). Glucose was used as standard to develop the calibration curve.

Concentrations of chlorophyll a, b, and total. It was determined by Harborne's method (1973), and the samples were analyzed with a spectrophotometer (Spectronic 20, Bausch & Lomb, USA) at 663 and 645 nm. Subsequently, chlorophyll a, b, and total were calculated according to the corresponding equations. This was conducted in leaves both during the blooming stage and the fructification stage.

Total free amino acids. Following the methodology of Geiger *et al.* (1998) and using the ninhydrin method (Moore and Stein, 1954), ethanolic extraction in leaves, during the fructification stage, was carried out. Leucine was used to develop the standard curve and it was determined at a wavelength of 570 nm using a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV, Madison WI 53711, USA).

Total soluble proteins. Extraction was conducted according to that described by Höfner *et al.* (1989) in leaves during the fructification stage. Quantification was carried out using amido black for staining and bovine serum albumin as standard protein. The absorbance of the samples was determined using a spectrophotometer (Thermo Fisher scientific, Genesys 10 UV, Madison, WI 53711, USA) at a wavelength of 640nm.

Statistical analysis

An analysis of variance of the obtained data was carried out and means were compared using the Tukey's test ($P \leq 0.05$), using the Statistical Analytic System (SAS Institute, 2003).

RESULTS

Total sugar concentrations in leaves

The analysis of variance showed that total sugars in strawberry leaves presented statistical significant differences during the blooming stage (Tukey $P \leq 0.05$); whereas

empleando negro de amido para la tinción y albúmina de suero bovino como proteína estándar. La absorbancia de las muestras fue leída en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV, Madison, WI 53711, EEUU) a una longitud de onda de 640 nm.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$ %), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical (SAS Institute, 2003).

RESULTADOS

Concentración de azúcares totales en hojas

El análisis de varianza indicó que los azúcares totales en hojas de fresa, únicamente presentaron diferencias estadísticas significativas en la etapa de floración (Tukey, $P \leq 0.05$); mientras que en la etapa de fructificación no se observaron diferencias estadísticas (Tukey, $P > 0.05$). El análisis de comparación de medias muestra que el tratamiento con un porcentaje de 20 del P total como fosfito en la solución nutritiva en la etapa de floración, tuvo una mayor concentración de azúcares en hojas (Cuadro 1).

Concentración de clorofila

Las concentraciones de clorofila a en hojas tanto en floración como en fructificación no mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos (Tukey, $P \leq 0.05$) (Figuras 1

CUADRO 1. Azúcares totales en hojas de fresa cultivar Festival, en dos etapas fenológicas, expuesta a soluciones nutritivas con diferentes porcentajes del P total adicionado en forma de fosfito.

Table 1. Total sugars in strawberry leaves cv. Festival, in two phenological stages, exposed to nutrient solutions with different percentages of P added in the form of phosphite.

Fosfito en la solución nutritiva (% del P total)	Azúcares totales en hojas ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ de peso de materia fresca)	
	Floración	Fructificación
0	21.08 b ^z	27.68 a
20	25.14 a	24.30 a
30	21.08 b	25.75 a
40	20.07 b	26.24 a
50	19.92 b	28.17 a
DMS ^y	3.404	4.475

^zValores con diferente letra entre columnas, son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey, a una $P \leq 0.05$.

^yDMS: diferencia mínima significativa.

^zValues with different letter between columns are different according to the Tukey's test at $P \leq 0.05$.

^yDMS: least significant difference (LSD).

during the fructification stage no statistical differences were observed (Tukey $P \leq 0.05$). The mean comparison analysis showed that the treatment with 20 % of the total P as phosphite in nutrient solution during blooming stage had a higher concentration of sugars in leaves (Table 1).

Chlorophyll concentration

Concentrations of chlorophyll a in leaves both during the blooming stage and the fructification stage did not show statistical differences between treatments (Tukey $P \leq 0.05$) (Figures 1 and 2). Plants treated with 20 % of phosphite had lower concentrations of chlorophyll a in their leaves during the blooming stage; on the other hand, plant leaves treated with 50 % of phosphite, had higher concentration of chlorophyll a ($0.73 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) (Figure 1).

During the fructification stage, the mean comparison analysis showed that the treatment with 30 % of phosphite produced statistical significant differences (Tukey $P \leq 0.05$) in comparison with the rest of the treatments, overcoming them in more than 32 % (Figure 2).

The analysis of variance showed statistical significant differences between treatments in concentration of chlorophyll b in leaves during the fructification stage (Tukey $P \leq 0.05$); whereas, no significant differences during the blooming were observed. The treatment with the highest concentration of chlorophyll b during the fructification stage ($1.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) was the treatment with 30 % of phosphite, value statistically different from the rest of the treatments. Concentrations of chlorophyll a and b followed the same tendency (Figure 2).

The analysis of variance showed statistical significant differences in the foliar concentration of total chlorophyll only during the fructification stage (Figure 2); no statistical significant differences were observed during the blooming stage (Figure 1).

Mean comparison showed that the treatment with the highest concentration of total chlorophyll during the fructification stage was ($2.68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) the treatment with 30 % of phosphate, being statistically different from the rest of the treatments evaluated (Figure 2). The concentration of total chlorophyll had the same tendency than chlorophyll a and b in both phenological phases (Figures 1 and 2).

Total free amino acids

Total free amino acids showed significant differences between treatments. These differences were observed between the treatment with 30 % of phosphate and the rest. The highest concentration of amino acids in strawberry ($30.68 \text{ } \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$) (Figure 3) was registered in leaves treated with 30 % of phosphite.

Amino acids in leaves were evaluated during the fructification stage and the results are positively related with the highest levels of chlorophyll; the highest values of amino acids were observed for the treatment with 30 % of

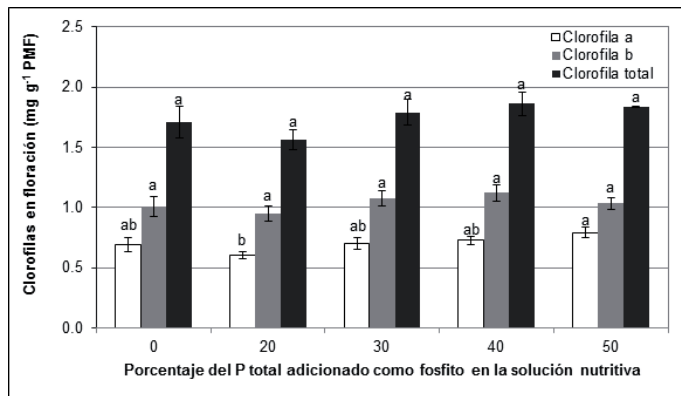


FIGURA 1. Concentración de clorofilas en hojas de plantas de fresa cultivar Festival en etapa de floración, expuestas a soluciones nutritivas con diferentes porcentajes del P total adicionado en forma de fosfito. Medias con letras distintas en cada fase fenológica son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey, a una $P \leq 0.05$. PMF = peso de materia fresca.

FIGURE 1. Concentrations of chlorophyll in strawberry leaves cv. Festival during the blooming stage, exposed to nutrient solutions with different proportions of total P added in the form of phosphite. Means with different letters in each phenological phase are different according to the Tukey's test at $P \leq 0.05$. PMF = weight of fresh matter.

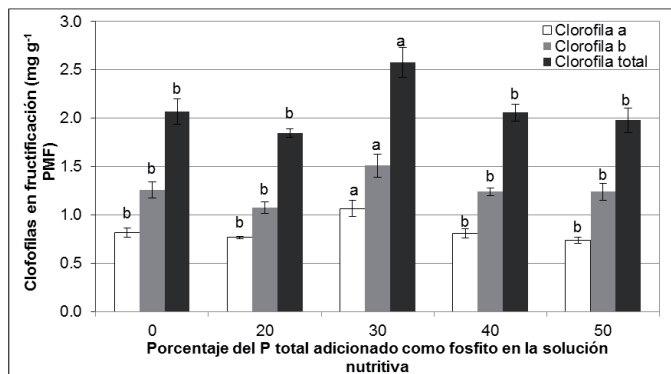


FIGURA 2. Concentración de clorofilas en hojas de plantas de fresa cultivar Festival en etapa de fructificación, expuestas a soluciones nutritivas con diferentes porcentajes del P total adicionado en forma de fosfito. Medias con letras distintas en cada fase fenológica son diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey, a una $P \leq 0.05$. PMF = peso de materia fresca.

FIGURE 2. Chlorophyll concentrations in strawberry leaves cv. Festival during the fructification stage, exposed to nutrient solutions with different proportions of total P added in the form of phosphite. Means with different letters in each phenological phase are different according to the Tukey's test at $P \leq 0.05$. PMF = weight of fresh matter.

y 2). En la etapa de floración las plantas tratadas con 20 % de fosfito tuvieron menor concentración de clorofila a en sus hojas; por el contrario, las hojas de plantas tratadas con 50 % de fosfito presentaron mayor concentración de clorofila a ($0.73 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) (Figura 1).

En la etapa de fructificación la comparación de medias indicó que el tratamiento con 30 % de fosfito mostró diferencias estadísticas significativas (Tukey, $P \leq 0.05$) con el resto de los

phosphate in nutrient solution, the same as the protein concentrations.

Total soluble proteins

The treatment with the highest concentration of total proteins was the treatment with 30 % of total P as phosphate ($2.89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), being statistically different from the rest of the treatments. The lowest content of total soluble proteins ($0.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) was observed in the control treatment; between the treatment with 20 and 40 % of phosphate no statistical significant differences were observed; whereas, the treatment with 50 % of phosphite had lower concentration of total soluble proteins than the treatments with 20, 30 and 40 of phosphite. The treatment with 50 % of phosphite was only higher than the control treatment (Figure 4).

DISCUSION

P has great influence on photosynthesis and carbon metabolism. Under P deficiency, the accumulation of carbohydrates in roots increases significantly (Li *et al.*, 2001), registering positively correlations among the concentration of P in the environment, the correlation of P in the plant and the concentration of hexose phosphate in leaves (Silber *et al.*, 2002), starch precursor biomolecular and sucrose in chloroplasts and cytosol, respectively. With the addition of 20 % of total P in the form of phosphite, a significant increment in the concentration of total sugars during the blooming stage was observed (Table 1), a positive effect, because a high concentration of total sugars in the plant benefits the early production and increases the yield (Stapleton *et al.*, 2001).

On the other hand, P is a nutriment that has influence on the stability of the chlorophyll molecule (Bojović y Stojanović, 2006). In *Arabidopsis thaliana*, Ticconi *et al.* (2001) showed that leaves treated with high concentrations of phosphite had a light green color, indicating a possible change in the concentration of chlorophyll; in this study, the addition of total P as phosphite to concentrations of 40 and 50 % significantly decreased the concentrations of chlorophyll a, b, and total, only during the fructification stage, in comparison with the addition of 30 %, which increased the content of these biomolecules (Figures 1 and 2). In strawberry, Blanque (2002) observed that the concentration of total chlorophyll in leaves during the fructification stage ranged between 1.5 and $2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ PMF, this agrees with the result obtained in this experiment (content between 1.8 and $2.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ PMF); with the exception of the treatment with 30 % of phosphite during the fructification stage, where it was observed that the nutrient solution with 30 % of total P in form of phosphite increased the concentration of this pigment ($2.68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ PMF) in leaves (Figure 2). This author also indicated that in strawberry leaves there is a higher production of chlorophyll a than a production of chlorophyll b. The concentration of chlorophyll b was higher than the concentration of chlorophyll a for all treatments (Figures 1 and 2).

tratamientos, superándolos en más de 32 % (Figura 2).

El análisis de varianza mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en la concentración de clorofila b en hojas en la etapa de fructificación (Tukey, $P \leq 0.05$); en floración la concentración de clorofila b no se vio influido significativamente por los tratamientos. En fructificación el tratamiento con mayor concentración de clorofila b ($1.61 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) fue el de 30 % de fosfito, valor estadísticamente diferente al del resto de los tratamientos. Se observó que en fructificación la concentración de clorofilas a y b siguió la misma tendencia (Figura 2).

El análisis de varianza mostró que hubo diferencias estadísticas significativas en la concentración foliar de clorofila total sólo en la etapa de fructificación (Figura 2); en floración no hubo diferencia estadística significativa (Figura 1).

La comparación de medias mostró que en fructificación el tratamiento que mayor concentración de clorofila total presentó ($2.68 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$) fue el tratamiento con 30 % de fosfito, siendo estadísticamente diferente al resto de los tratamientos evaluados (Figura 2). Se observó que la concentración de clorofila total conservó la misma tendencia que las clorofilas a y b en ambas etapas fenológicas (Figuras 1 y 2).

Aminoácidos libres totales

Los aminoácidos libres totales presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Tales diferencias se observaron entre el tratamiento con 30 % de fosfito y el resto, registrándose en hojas de plantas tratadas con 30 % de fosfito la mayor concentración de aminoácidos en hojas de fresa ($30.68 \text{ } \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$) (Figura 3).

Los aminoácidos en las hojas se evaluaron en el periodo de fructificación y los resultados observados se relacionan de manera positiva con los niveles más elevados de clorofilas, ya que para el tratamiento con fosfito al 30 % en la solución nutritiva se observaron los valores más elevados de aminoácidos, igual que las concentraciones de proteínas.

Proteínas solubles totales

El tratamiento con la mayor concentración de proteínas totales fue el de 30 % del P total como fosfito ($2.89 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$), que fue diferente estadísticamente al resto de los tratamientos. El testigo fue el que presentó la menor cantidad de proteínas solubles totales ($0.53 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$); entre el tratamiento con 20 y 40 % de fosfito no hubo diferencias estadísticas significativas; mientras que el tratamiento de 50 % tuvo menor concentración de proteínas solubles totales que los tratamientos con 20, 30 y 40 % de fosfito, y superó únicamente al testigo (Figura 4).

La concentración de proteínas se relacionó en

Phospite can inhibit and produce stress in the plant (Ticconi *et al.*, 2001; Varadarajan *et al.*, 2002). One kind of these stress expressions is the production of free amino acids as asparagine, aspartic acid and glutamine, situation that also was observed in this study when 30 % of phosphite was used, overcoming the control treatment, which was under a normal situation (Figure 3).

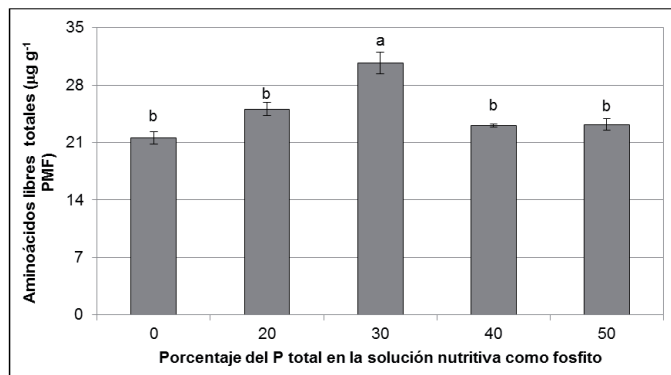


FIGURA 3. Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de fresa cultivar Festival, expuestas a soluciones nutritivas con diferentes porcentajes del P total adicionado en forma de fosfito. Medias con letras distintas son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey, a una $P \leq 0.05$. PMF = peso de materia fresca.

FIGURE 3. Concentration of total free amino acids in strawberry leaves cv. Festival, exposed to nutrient solutions with different proportions of P added in the form of phosphite. Means with different letters are different according to the Tukey's test, at $P \leq 0.05$. PMF = weight of fresh matter.

Phosphites inhibit the protein phosphorylation when there is stress in P. Under these conditions phosphites omitted the activity of nucleolytic enzymes and the expression of acid phosphatase and of phosphate transporter gene in *A. thaliana* (Ticconi *et al.*, 2001). Gulen and Eris (2004) reported that putting plants under stress by heat (increasing the temperature) the concentration of proteins in strawberry leaves decreases, because there is a reduction in the synthesis, and probably at higher temperatures (40°C) a denaturalization can be produced. In the present experiment the plants were put under stress with phosphites, and it was observed that, and in comparison with the stress provoked by temperature, a significant increment was produced in the protein synthesis in strawberry leaves (Figure 4) using determined percentages of total P as phosphite in the nutrient solution, mainly at 30 %. In *Brassica nigra*, under deficient conditions of phosphate and supply of phosphite in concentrations of 1.5 and 10 mM, the induction of the activity of phosphoenolpyruvate phosphatase and pyrophosphate-dependent phosphofructokinase was observed; whereas the concentration of protein and the activity of ATP-dependent phosphofructokinase and pyruvate kinase were not affected both in deficient plants in P and those sufficient in this element. Phosphite is not a substratum in enzymatic reactions of transfer of phosphoryl groups, other phosphate binding proteins such as the phosphate transporters, participate in the absorption of phosphates or

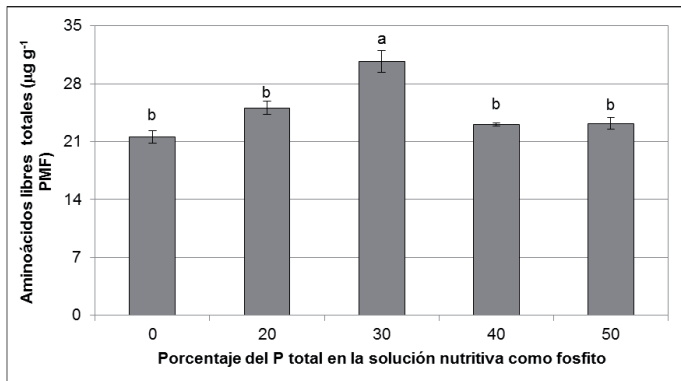


FIGURA 4. Concentración de proteínas solubles totales en hojas de fresa cultivar Festival, expuesta a soluciones nutritivas con diferentes porcentajes del P total adicionado en forma de fosfito. Medias con letras distintas son diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey, a una $P \leq 0.05$. PMF = peso de materia fresca.

Figure 4. Concentration of total soluble proteins in strawberry leaves cv. Festival, exposed to nutrient solutions with different proportions of total P added in the form of phosphite. Means with different letters are different according to the Tukey's test at $P \leq 0.05$. PMF = weight of fresh matter.

forma positiva con los datos observados para clorofilas y aminoácidos solubles, ya que nuevamente se observó una mayor concentración de proteínas en el tratamiento con 30 % de fosfito, lo que indica un efecto positivo en esta variable con dicha concentración.

DISCUSIÓN

El P tiene gran influencia sobre la fotosíntesis y el metabolismo del carbono. Bajo deficiencia de P, la acumulación de carbohidratos en raíces se incrementa significativamente (Li *et al.*, 2001), registrándose correlaciones positivas entre la concentración de P en el medio, la concentración de P en la planta y la concentración de hexosas fosfato en las hojas (Silber *et al.*, 2002), biomolécula precursora de almidón y sacarosa en cloroplastos y citosol, respectivamente. En la presente investigación, se observó un incremento significativo en la concentración de azúcares totales en la etapa de floración (Cuadro 1) con la adición de 20 % del P total en forma de fosfito, lo que representa un efecto positivo, dado que una alta concentración de éstos en la planta favorece producción precoz y aumenta rendimientos (Stapleton *et al.*, 2001).

Por otra parte, el P es un nutrimento que tiene influencia sobre la estabilidad de la molécula de clorofila (Bojović y Stojanović, 2006). En *Arabidopsis thaliana*, Ticconi *et al.* (2001) reportaron que las hojas tratadas con altas concentraciones de fosfito tuvieron un color verde claro, lo que indica una posible alteración en la concentración de clorofila; en esta investigación, al añadir P total como fosfito a concentraciones de 40 y 50 % disminuyeron significativamente las concentraciones de

as componentes relacionados con la detección del estado de fosfato en plantas; aparentemente sin diferencia entre fosfatos y fosfitos (McDonald *et al.*, 2001b), o porque las plantas convierten fosfitos en fosfatos.

Proteínas y aminoácidos pueden estar asociados con la adaptación de las plantas a cambios en las condiciones ambientales y al estrés. Los aminoácidos y otros componentes solubles de nitrógeno juegan un papel importante en el metabolismo de la planta, siendo los productos primarios de la asimilación inorgánica de nitrógeno y precursores de proteínas y ácidos nucleicos. (Hsu and Kao, 2003).

CONCLUSIONES

La adición de fosfito en plantas de fresa tuvo diferentes respuestas como función de la etapa fenológica. La etapa de fructificación fue más sensible a la presencia de fosfito que la etapa de floración. Durante la etapa de fructificación, la adición de 30 % del P total como fosfito estimuló el metabolismo de la planta, aumentando las concentraciones de clorofilas a, b y totales, aminoácidos y proteínas.

ACKNOWLEDGES

To the Linea Prioritaria de Investigación 5 Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal del Colegio de Postgraduados, for the facilities provided.

End of English Version

clorofilas a, b y totales, sólo en fructificación, en comparación con el 30 %, que fue un porcentaje que elevó el contenido de estas biomoléculas (Figuras 1 y 2). En fresa, Blanque (2002) encontró que la concentración de clorofila total en hojas en la etapa de fructificación oscila entre 1.5 y 2 mg·g⁻¹ PMF, lo cual concuerda con lo obtenido en este experimento (contenido entre 1.8 y 2.2 mg·g⁻¹ PMF); excepto en el tratamiento con 30 % de fosfito en fructificación, en donde en particular se observó que la solución nutritiva con el 30 % del P total en forma de fosfito incrementó la concentración de este pigmento (2.68 mg·g⁻¹ PMF) en las hojas (Figura 2). El mismo autor señala que en hojas de fresa hay una mayor producción de clorofila a que de clorofila b, en una relación de 3-4:1, respectivamente; y por el contrario, en la presente investigación se observó que la concentración de clorofila b fue mayor a la de clorofila a para todos los tratamientos (Figuras 1 y 2).

A determinadas concentraciones, el fosfito puede causar estrés en las plantas y en cierto grado puede inhibir el crecimiento (Ticconi *et al.*, 2001; Varadarajan *et al.*, 2002). Una de las manifestaciones de este tipo de estrés es la producción de aminoácidos libres como asparagina, ácido aspártico y glutamina, situación que también se observó en este experimento al utilizar fosfito al 30 %, ya

que supera al testigo que se encontraba bajo situación normal (Figura 3).

Los fosfitos inhiben la fosforilación de proteína cuando existe estrés por P. Bajo estas condiciones los fosfitos suprimieron la actividad de enzimas nucleolíticas y la expresión de la fosfatasa ácida y de genes transportadores de fosfato en *A. thaliana* (Ticconi *et al.*, 2001). En particular en fresa, Gulen y Eris (2004) reportaron que al someter las plantas a estrés por calor, a medida que se incrementa la temperatura disminuye la concentración de proteínas en las hojas, pues hay una disminución en su síntesis, y quizás a temperaturas superiores a 40 °C una desnaturalización de éstas. En el presente experimento las plantas se sometieron a un estrés con fosfitos, y se observó que, a diferencia del estrés por temperatura, a ciertos porcentajes del P total como fosfito en la solución nutritiva, principalmente 30 %, se da un incremento significativo en la síntesis de proteínas en hojas de fresa (Figura 4). En *Brassica nigra*, bajo condiciones de deficiencia de fosfato y abastecimiento de fosfito en concentraciones de 1.5 a 10 mM, se observó la inducción de la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato fosfatasa y la fosfofructocinasa dependiente de la pirofosfatasa; mientras que la concentración de proteína y la actividad de las enzimas fosfofructocinasa dependiente de ATP y de la piruvato cinasa no fueron afectadas tanto en plantas deficientes en P como en aquellas suficientes en este elemento. Si bien el fosfito no es un sustrato en reacciones enzimáticas de transferencia de grupos fosforil, otras proteínas de unión a fosfato tales como los transportadores de fosfato, participan en la absorción de fosfatos o como componentes de la traducción de señales relacionados con la detección del estatus de fosfato en planta; aparentemente no discriminan entre fosfatos y fosfitos (McDonald *et al.*, 2001b), o porque las plantas transforman los fosfitos en fosfatos.

El metabolismo de proteínas y aminoácidos puede estar asociado con la adaptación de las plantas a cambios en las condiciones ambientales y a estrés. Los aminoácidos y otros compuestos nitrogenados solubles tienen un papel determinante en el metabolismo vegetal, siendo los productos primarios de la asimilación inorgánica del nitrógeno y precursores de proteínas y ácidos nucleicos (Hsu y Kao, 2003).

CONCLUSIONES

La adición de fosfito en plantas de fresa tuvo respuestas diferenciales en función de la etapa fenológica. La etapa de fructificación fue más sensible a la presencia de fosfito que la etapa de floración. En fructificación la adición de 30 % del P total como fosfito estimuló el metabolismo de la planta, incrementándose las concentraciones de clorofilas a, b y totales, de aminoácidos y de proteínas.

AGRADECIMIENTOS

A la Línea Prioritaria de Investigación 5 Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal del Colegio de Postgraduados, por las facilidades brindadas.

LITERATURA CITADA

- ALCÁNTAR, G. G.; SANDOVAL V., M.; SÁNCHEZ G., P. 2007. Elementos esenciales. pp. 8-47. *In*: G. G. ALCÁNTAR; L. TREJO-TÉLLEZ. (eds.). Nutrición de cultivos. Colegio de Postgraduados. Editorial Mundi-prensa. México.
- ANDREU, A. B.; GUEVARA, M. G.; WOLSKI, E.M DALEO, G. R.; CALDIZ, D. O. 2004. Induced systemic resistance (ISR); Its impact on defense mechanism as components of integrated disease control strategies. *GILB Newletters* 22: 2-4.
- BLANQUE, M. 2002. Photosynthesis of strawberry fruit. *Acta Hort.* 567: 373-376.
- BOJOVIĆ, B.; STOJANOVIĆ, J. 2006. Some wheat leaf characteristics in dependence of fertilization. *Kragujevac Journal of Science* 28: 139-146.
- BOZZO, G. G.; SINGH V. K.; PLAXTON, W. C. 2004. Phosphate of phosphate addition promotes the proteolytic turnover of phosphate-starvation inducible tomato purple acid phosphatase isozymes. *FEBS Letters* 573: 51-54.
- FAGERIA, N. K. 2008. The use of nutrients in crop plants. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 430 p.
- GEIGER M.; WALCH-LIU, P.; ENGELS, C.; HARNECKER, J.; SCHULZE, E. D.; LUDEWIG, F.; SONNEWALD, U.; SCHEIBLE, W. R.; STITT, M. 1998. Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. *Plant Cell Environ.* 21: 253-268.
- GULEN H.; ERIS, A. 2004. Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Sci.* 166: 739-744.
- HANRAHAN, G.; SALMASSI, T. M.; KHACHIKIAN, C. S.; FOSTER, K. L. 2007. Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: Significance, speciation and determination. *Talanta* 66: 435-444.
- HARBORNE, J. B. 1973. Chlorophyll extraction. *In*: Phytochemical Methods. Recommended technique. pp. 205- 207. HARBONE, J. B. (ed.). Chapman and Hall, London.
- HÖFNER, R.; VÁSQUEZ-MORENO, L.; ABOU-MANDOUR, A. A.; BOHNERT, H. J.; SCHMITT, J. M. 1989. Two isoforms of phosphoenolpyruvate carboxylase in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.* 27: 803-810.
- HU, S. Y.; KAO, C. H. 2003. The protective effect of free radical scavengers and metal chelators on polyethylene glycol-treated rice leaves. *Biol. Plant* 46: 617-619.
- LI, H. B.; XIA, M.; WU, P. 2001. Effect of phosphorus deficiency stress on rice lateral root growth and nutrient absorption. *Acta Bot. Sin.* 43: 1154-1160.
- MCDONALD, A. E.; GRANT, B. R.; PLAXTON, W. C. 2001a. Phosphite (phosphorous acid): Its relevance in the

- environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. 24: 1505-1519.
- McDONALD, A. E.; NIERE, J. O.; PLAXTON, W. C. 2001b. Phosphite disrupts the acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to phosphate starvation. *Can. J. Microbiol.* 47: 969-978.
- MOOR, U.; PÖLDMA, P.; TÖNUTARE, T.; KARP, K.; STARAST, M.; VOOL, E. 2009. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Sci. Hortic.* 119: 264-269.
- MOORE, S.; STEIN; W. H. 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.* 211: 893-906.
- RAGHOTHAMA, K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 665-693.
- REBOLLAR-ALVITER, A.; MADDEN, L. V.; ELLIS, M. A. 2007. Pre- and post-infection activity of azoxystrobin, pyraclostrobin, mefenoxam, and phosphite against leather rot of strawberry, caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease* 91: 559-564.
- RICKARD, D. A. 2000. Review of phosphorus acid and its salts as fertilizer materials. *J. Plant Nutr.* 23: 161-180.
- SAS Institute. 2003. SAS/STAT User's Guide. Version 9.1. Volumes 1-7. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- SILBER, A.; BEN-JAACOV, J.; ACKERMAN, A.; BAR-TAL, A.; LEVKOVITCH, I.; MATSEVITZ-YOSEF, T.; SWARTZBERG, D.; RIOV, J.; GRANOT, D. 2002. Interrelationship between phosphorus toxicity and sugar metabolism in *Verticordia plumosa* L. *Plant and Soil* 245: 249-260.
- STAPLETON, S. C.; CHANDLER, K. C.; LEGARD, E. D.; PRICE, E. J.; SUMLER; C. J. 2001. Transplant source affects fruiting performance and pests of 'Sweet Charlie' strawberry in Florida. *HortTechnology* 11: 61-65.
- STEINER, A. 1984. The universal nutrient solution. *In: I. S. O. S. C. Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture.* pp. 633-649. The Netherlands.
- STEINER, A.; VAN WINDEN; H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.* 46: 862-863.
- SOUTHGATE, D. A. 1976. Determination of food carbohydrates. Applied Science Publishers. LTD. London. 105 pp.
- TICCONI, C. A.; DELATORRE, C. A.; ABEL, S. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 963-972.
- VARADARAJAN, D. K.; KARTHIKEYAN, A. S.; MATILDA, P. D.; RAGHOTHAMA, K. G. 2002. Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant Physiol.* 129: 1232-1240.