



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**FOSFITO EN EL METABOLISMO DE HORTALIZAS
DE HOJA**

ELÍAS ESTRADA ORTIZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

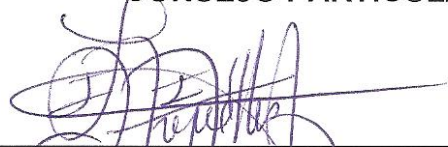
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO
2014

La presente tesis, titulada **Fosfito en el metabolismo de hortalizas de hoja**, realizada por el alumno **Elías Estrada Ortiz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

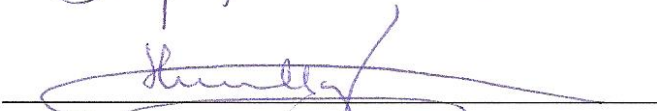
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:




DRA. LIBIA IRIS TREJO-TÉLLEZ

ASESOR:



DR. FERNANDO CARLOS GÓMEZ MERINO

ASESORA:



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESORA:



DRA. ANA MARÍA CASTILLO GONZÁLEZ

ASESOR:



DR. EDILBERTO AVITIA GARCÍA

FOSFITO EN EL METABOLISMO DE HORTALIZAS DE HOJA

Elías Estrada Ortiz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

Las plantas superiores no presentan mecanismos selectivos que les permitan discriminar entre especies de fósforo. Una vez absorbido por las raíces, el fosfito (Phi) es altamente móvil en el xilema, en el floema y su efecto depende fuertemente del nivel de suficiencia de fosfato (Pi) en la planta. Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Phi adicionadas a la solución nutritiva, así como diferentes concentraciones de Phi vía foliar, sobre indicadores agronómicos, fisiológicos y de calidad, en los cultivos de lechuga, acelga, col y apio; 2) evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Pi y Phi adicionadas a la solución nutritiva, sobre flavonoides y glucosinolatos (GLS) en los cultivos de *Brassica campestris* cv. Red Giant y *B. juncea* cv. Mibuna Early cultivados bajo dos intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Los resultados mostraron que al suministrar $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva, bajo condiciones de suficiencia de Phi, se incrementa la actividad antioxidante total y fenoles totales, en lechuga, acelga y col, mientras que en apio se requiere del suministro de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi para incrementar la actividad antioxidante, bajo las mismas condiciones de suficiencia de Pi. Tanto para *B. campestris* como para *B. juncea*, se observó que las deficiencias de Pi tienen un efecto positivo en la acumulación de algunos flavonoides y GLS, principalmente bajo alta PAR; y que bajas PAR tienden a disminuir concentraciones de flavonoides y GLS. Puesto que el Phi no es metabolizado por la planta, sus aplicaciones tienden a incrementar deficiencias de Pi, por lo que favorece el incremento de algunos flavonoides y GLS como posible mecanismo de defensa al estrés. Se observó que la respuesta a aplicaciones de Phi ya sea en la solución o vía foliar, depende fuertemente del genotipo, las condiciones de cultivo y la concentración de Phi utilizada.

Palabras clave: Fósforo, Phi, Pi, *Lactuca sativa*, *Beta vulgaris* L. var. *cicla*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Apium graveolens* L., *Brassica campestris*, *Brassica juncea*.

PHOSPHITE ON METABOLISM IN LEAFY VEGETABLES

Elías Estrada Ortiz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2014

Higher plants do not display selective mechanisms in order to discriminate among phosphorus species. Once phosphite (Phi) is absorbed by roots, it is highly mobile into the xylem and phloem and its effect would strongly depend on phosphate (Pi) sufficiency in plants. Therefore, the aims of this research were: 1) to evaluate the effect of different concentrations of Phi added to the nutrient solution, as well as different concentrations of Phi applied to the leaves, on agronomic, physiological and quality variables of lettuce, chard, cabbage and celery; 2) to evaluate the effect of different concentrations of Phi and Pi added to the nutrient solution, on flavonoids and glucosinolates (GLS) contents of the leaf mustards *Brassica campestris* cv. Red Giant and *B. juncea* cv. Mibuna Early cultivated under two photosynthetically active radiation (PAR) intensities. Results showed that when adding $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ Phi in the nutrient solution in sufficient content of Pi, total antioxidant activity and total phenols increase in lettuce, chard and cabbage, while in celery plants antioxidant activity increases only when adding $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ Phi under the same experimental conditions. In both *B. campestris* and *B. juncea*, Pi deficiencies positively affect flavonoids and GLS accumulation, mainly when PAR is high; when PAR is low, both flavonoids and GLS accumulations diminish. As Phi is not metabolized by plants, its application increase Pi deficiencies, and therefore an increase in flavonoids and GLS is observed, as a possible mechanism of defense to stress. Finally, the response to Phi application either to roots or to leaves is strongly affected by the genotype, the crop conditions and the concentration of Phi used.

Key words: Phosphorus, Phi, Pi, *Lactuca sativa*, *Beta vulgaris* L. var. *cicla*, *Brassica oleracea* var. *capitata*, *Apium graveolens* L., *Brassica campestris*, *Brassica juncea*.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, mi gratitud eterna, tú me has ayudado a lo largo de mi vida y jamás me has olvidado, te estaré eternamente agradecido.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo otorgado para llevar a cabo mis estudios de Doctorado.

A la Línea Prioritaria de Investigación 5 Biotecnología Microbiana, Vegetal y Animal del Colegio de Postgraduados por los apoyos otorgados para la realización de esta investigación.

Al Fideicomiso Institucional no. 167304 del Colegio de Postgraduados por el financiamiento parcial a este trabajo de investigación.

A la Dra. Libia I. Trejo-Téllez, no tengo palabras para agradecerle todo su apoyo y amistad, le reitero mi gratitud, usted fue una gran guía en mis estudios.

Al Dr. Fernando Carlos Gómez Merino por sus acertadas aportaciones y observaciones realizadas a la presente investigación.

A la Dra. Hilda Victoria Silva Rojas por sus valiosas observaciones durante la realización de la investigación.

A la Dra. Ana María Castillo González por sus valiosos comentarios durante la realización de la investigación.

Al Dr. Edilberto Avitia García por sus acertados comentarios durante la realización de la investigación.

Al Dr. Dietmar Schwarz y a la Dra. Angelika Krumbein por el apoyo y las facilidades brindadas para realizar parte de esta investigación en el Leibniz Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau ubicado en Großbeeren, Alemania, con financiamiento del CONACyT y del Servicio Alemán de Intercambio Académico a través del proyecto “Phosphite in leafy vegetables” no. 16620.

DEDICATORIA

A mi esposa adorada Paulina, por estar siempre conmigo, apoyándome y dándome ánimo, sabemos que el camino no ha sido fácil, pero tarde o temprano nos rendirá fruto; te agradezco infinitamente tu compañía y apoyo.

A mi hijo Raúl Elías, hijo éste es un pequeño trabajo el cual te dedico, quiero poder ser un buen ejemplo para ti, estoy muy orgulloso de ti, y a tu corta edad me has enseñado muchas cosas, te amo.

A mis padres Cristina y Elías[†], gracias por darme la vida, porque supieron hacer de mi un hombre de bien, me enseñaron el significado del trabajo, el sentido de la honradez y la responsabilidad y que desde siempre me dieron la confianza y apoyo; mamá te agradezco infinitamente todas tus oraciones.

A mis hermanos y hermanas Ángel, Lucía, Felipe, Juve, Mago, Chelo, Tita, por el apoyo incondicional que me brindan, con cariño para ustedes.

A mis sobrinos y sobrinas Vero, Mayra, Luis, Daniel, Cristina, Roberto, Leonel, Gimena, Elías, Neri, Valeria, Monse, Anthony, Miguel y Juan Pablo.

A mis suegros Martha y Raúl por su gran amistad.

A todos mis amigos, y a los profesores que han formado parte importante a lo largo de mi vida.

Sinceramente.....Elías

TABLA DE CONTENIDO

FOSFITO EN EL METABOLISMO DE HORTALIZAS DE HOJA i

PHOSPHITE ON METABOLISM IN LEAFY VEGETABLES.....ii

AGRADECIMIENTOSiii

DEDICATORIA.....iv

TABLA DE CONTENIDO v

ÍNDICE DE CUADROS xvii

ÍNDICE DE FIGURAS xxvi

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL..... 1

1.1. Absorción de fosfito en plantas superiores 1

1.2. Transporte de fosfito en plantas superiores 2

1.3. Compartimentalización de Phi a nivel celular 2

1.4. Efecto de Phi en el metabolismo celular 3

1.5. Importancia de hortalizas de hoja 5

1.6. LITERATURA CITADA..... 6

CAPÍTULO 2. RESPUESTA DE LECHUGA A APLICACIONES A LA RAÍZ DE FOSFITO..... 9

2.1. INTRODUCCIÓN 9

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS 10

2.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales 10

2.2.2. Tratamientos y diseño experimental 11

2.2.3. Manejo del cultivo 12

2.2.4. Variables evaluadas 13

2.2.4.1. Indicadores agronómicos 13

2.2.4.2. Indicadores de calidad 14

2.2.4.3. Indicadores fisiológicos 15

Tabla de contenido

2.2.4.4. Concentración nutrimental	17
2.2.5. Análisis estadístico	17
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
2.3.1. Indicadores agronómicos.....	18
2.3.1.1. Peso fresco de vástago, bola y volumen de raíz.....	18
2.3.1.2. Peso seco de bola y raíz.....	18
2.3.2. Indicadores de calidad.....	19
2.3.2.1. Actividad antioxidante total	19
2.3.2.2. Fenoles totales.....	21
2.3.2.3. Flavonoides totales	22
2.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico	23
2.3.3. Indicadores fisiológicos.....	24
2.3.3.1. Concentración de clorofila a, b y total	24
2.3.3.2. Azúcares totales en hojas	25
2.3.3.3. Aminoácidos libres totales	26
2.3.3.4. Proteínas solubles totales	27
2.3.4. Concentración nutrimental.....	29
2.4. CONCLUSIONES	31
2.5. LITERATURA CITADA.....	31
CAPÍTULO 3. APLICACIONES DE FOSFITO VÍA FOLIAR EN LECHUGA.....	38
3.1. INTRODUCCIÓN	38
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales	39
3.2.2. Tratamientos y diseño experimental	39
3.2.3. Manejo del cultivo	39
3.2.4. Variables evaluadas	42
3.2.5. Análisis estadístico	42
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
3.3.1. Indicadores agronómicos.....	42
3.3.1.1. Peso fresco de vástago bola y volumen de raíz.....	42

Tabla de contenido

3.3.1.2.	Peso seco de bola y raíz.....	43
3.3.2.	Indicadores de calidad.....	44
3.3.2.1.	Actividad antioxidante total	44
3.3.2.2.	Fenoles totales.....	45
3.3.2.3.	Flavonoides totales	46
3.3.2.4.	Concentración de ácido ascórbico	47
3.3.3.	Indicadores fisiológicos.....	48
3.3.3.1.	Concentración de clorofilas a, b y total	48
3.3.3.2.	Azúcares totales en hojas	49
3.3.3.3.	Aminoácidos libres totales	50
3.3.3.4.	Proteínas solubles totales	51
3.3.4.	Concentración nutrimental.....	52
3.4.	CONCLUSIONES	54
3.5.	LITERATURA CITADA.....	55
CAPÍTULO 4. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE ACELGA A APLICACIONES EN LA RAÍZ DE FOSFITO.....		58
4.1.	INTRODUCCIÓN	58
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	59
4.2.1.	Material vegetal y condiciones experimentales	59
4.2.2.	Tratamientos y diseño experimental	59
4.2.3.	Manejo del cultivo	60
4.2.4.	Variables evaluadas	61
4.2.5.	Análisis estadístico	62
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
4.3.1.	Indicadores agronómicos.....	62
4.3.1.1.	Peso fresco de vástago y volumen de raíz	62
4.3.1.2.	Peso seco de vástago y raíz	63
4.3.2.	Indicadores de calidad.....	64
4.3.2.1.	Actividad antioxidante total	64
4.3.2.2.	Fenoles totales.....	65

Tabla de contenido

4.3.2.3.	Flavonoides totales	66
4.3.2.4.	Concentración de ácido ascórbico	67
4.3.3.	Indicadores fisiológicos.....	68
4.3.3.1.	Concentración de clorofilas a, b y total	68
4.3.3.2.	Azúcares totales en hojas	68
4.3.3.3.	Aminoácidos libres totales	69
4.3.3.4.	Proteínas solubles totales	70
4.3.4.	Concentración nutrimental.....	72
4.4.	CONCLUSIONES	74
4.5.	LITERATURA CITADA.....	74
CAPÍTULO 5. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE ACELGA A APLICACIONES FOLIARES DE FOSFITO.....		78
5.1.	INTRODUCCIÓN	78
5.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	79
5.2.1.	Material vegetal y condiciones experimentales	79
5.2.2.	Tratamientos y diseño experimental.....	79
5.2.3.	Manejo del cultivo.....	79
5.2.4.	Variables evaluadas	81
5.2.5.	Análisis estadístico	82
5.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
5.3.1.	Indicadores agronómicos.....	82
5.3.1.1.	Peso fresco de vástago y volumen de raíz.....	82
5.3.1.2.	Peso seco de vástago y raíz.....	83
5.3.2.	Indicadores de calidad.....	84
5.3.2.1.	Actividad antioxidante total	84
5.3.2.2.	Fenoles totales.....	85
5.3.2.3.	Flavonoides totales	86
5.3.2.4.	Concentración de ácido ascórbico	87
5.3.3.	Indicadores fisiológicos.....	88
5.3.3.1.	Concentración de clorofilas a, b y total	88

5.3.3.2.	Azúcares totales en hojas	89
5.3.3.3.	Aminoácidos libres totales	90
5.3.3.4.	Proteínas solubles totales	91
5.3.4.	Concentración nutrimental	92
5.4.	CONCLUSIONES.....	94
5.5.	LITERATURA CITADA.....	95
CAPÍTULO 6. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE COL A APLICACIONES VÍA RAÍZ DE FOSFITO		98
6.1.	INTRODUCCIÓN	98
6.2.	MATERIALES Y MÉTODOS	99
6.2.1.	Material vegetal y condiciones experimentales	99
6.2.2.	Tratamientos y diseño experimental	99
6.2.3.	Manejo del cultivo	100
6.2.4.	Variables evaluadas	102
6.2.5.	Análisis estadístico	102
6.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	102
6.3.1.	Indicadores agronómicos.....	102
6.3.1.1.	Peso fresco de vástago y volumen de raíz	102
6.3.1.2.	Peso seco de vástago y raíz	103
6.3.2.	Indicadores de calidad.....	104
6.3.2.1.	Actividad antioxidante total	104
6.3.2.2.	Fenoles totales.....	105
6.3.2.3.	Flavonoides totales	106
6.3.2.4.	Concentración de ácido ascórbico	107
6.3.3.	Indicadores fisiológicos.....	108
6.3.3.1.	Concentración de clorofilas a, b y total	108
6.3.3.2.	Azúcares totales en hojas	109
6.3.3.3.	Aminoácidos libres totales	110
6.3.3.4.	Proteínas solubles totales	111
6.3.4.	Concentración nutrimental	113

6.4. CONCLUSIONES.....	115
6.5. LITERATURA CITADA.....	116
CAPÍTULO 7. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE COL A APLICACIONES FOLIARES DE FOSFITO.....	119
7.1. INTRODUCCIÓN	119
7.2. MATERIALES Y MÉTODOS	120
7.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales	120
7.2.2. Tratamientos y diseño experimental	120
7.2.3. Manejo del cultivo	121
7.2.4. Variables evaluadas	123
7.2.5. Análisis estadístico	123
7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	123
7.3.1. Indicadores agronómicos.....	123
7.3.1.1. Peso fresco de vástago y volumen de raíz	123
7.3.1.2. Peso seco de vástago y raíz	124
7.3.2. Indicadores de calidad.....	125
7.3.2.1. Actividad antioxidante total	125
7.3.2.2. Fenoles totales.....	126
7.3.2.3. Flavonoides totales	127
7.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico	128
7.3.3. Indicadores fisiológicos.....	130
7.3.3.1. Concentración de clorofila a, b y total	130
7.3.3.2. Azúcares totales en hojas	131
7.3.3.3. Aminoácidos libres totales	131
7.3.3.4. Proteínas solubles totales	132
7.3.4. Concentración nutrimental	133
7.4. CONCLUSIONES.....	135
7.5. LITERATURA CITADA.....	136

CAPÍTULO 8. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL APIO A APLICACIONES EN LA RAÍZ DE FOSFITO.....	139
8.1. INTRODUCCIÓN	139
8.2. MATERIALES Y MÉTODOS	140
8.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales	140
8.2.2. Tratamientos y diseño experimental	141
8.2.3. Manejo del cultivo	142
8.2.4. Variables evaluadas	143
8.2.5. Análisis estadístico	143
8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	144
8.3.1. Indicadores agronómicos.....	144
8.3.1.1. Peso fresco de vástago y volumen de raíz	144
8.3.1.2. Peso seco de vástago y raíz	145
8.3.2. Indicadores de calidad.....	146
8.3.2.1. Actividad antioxidante total	146
8.3.2.2. Fenoles totales.....	147
8.3.2.3. Flavonoides totales	148
8.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico	150
8.3.3. Indicadores fisiológicos.....	151
8.3.3.1. Concentración de clorofila a, b y total	151
8.3.3.2. Azúcares totales en hojas	152
8.3.3.3. Aminoácidos libres totales	153
8.3.3.4. Proteínas solubles totales	154
8.3.4. Concentración nutrimental	155
8.4. CONCLUSIONES.....	158
8.5. LITERATURA CITADA.....	158
CAPÍTULO 9. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL APIO A APLICACIONES FOLIARES DE FOSFITO.....	163
9.1. INTRODUCCIÓN	163

9.2. MATERIALES Y MÉTODOS	164
9.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales	164
9.2.2. Tratamientos y diseño experimental	164
9.2.3. Manejo del cultivo	165
9.2.4. Variables evaluadas	167
9.2.5. Análisis estadístico	167
9.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	167
9.3.1. Indicadores agronómicos	167
9.3.1.1. Peso fresco de vástago y volumen de raíz	167
9.3.1.2. Peso seco de vástago y raíz	168
9.3.2. Indicadores de calidad	170
9.3.2.1. Actividad antioxidante total	170
9.3.2.2. Fenoles totales	171
9.3.2.3. Flavonoides totales	172
9.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico	173
9.3.3. Indicadores fisiológicos	174
9.3.3.1. Concentración de clorofila a, b y total	174
9.3.3.2. Azúcares totales en hojas	175
9.3.3.3. Aminoácidos libres totales	176
9.3.3.4. Proteínas solubles totales	177
9.3.4. Concentración nutrimental	178
9.4. CONCLUSIONES	181
9.5. LITERATURA CITADA	181
CAPÍTULO 10. EFECTO DE DOS FUENTES DE FOSFITO EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA SOBRE CRECIMIENTO Y FISIOLOGÍA EN PLANTAS DE LECHUGA.	185
10.1. INTRODUCCIÓN	185
10.2. MATERIALES Y MÉTODOS	186
10.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales	186

Tabla de contenido

10.2.2.	Tratamientos y diseño experimental.....	186
10.2.3.	Manejo del experimento	187
10.2.4.	Variables evaluadas	187
10.2.4.1.	Materia seca.....	187
10.2.4.2.	Número de hojas.....	187
10.2.4.3.	Área foliar.....	187
10.2.4.4.	Lecturas Spad	188
10.2.4.5.	Tasa de crecimiento absoluto (TCA).....	188
10.2.4.6.	Tasa de crecimiento relativo (TCR).....	188
10.2.4.7.	Concentración nutrimental	189
10.2.5.	Análisis estadístico.....	189
10.3.	RESULTADOS	Y
DISCUSIÓN.....		189
10.3.1.	Peso seco	189
10.3.2.	Número de hojas.....	193
10.3.3.	Área foliar.....	195
10.3.4.	Lecturas Spad.....	196
10.3.5.	Tasa de crecimiento absoluto (TCA).....	198
10.3.6.	Tasa de crecimiento relativo (TCR).....	200
10.3.7.	Concentración nutrimental	202
10.4.	CONCLUSIONES.....	208
10.5.	LITERATURA CITADA.....	208
CAPÍTULO 11. CRECIMIENTO Y FISIOLÓGÍA DE PLANTAS DE LECHUGA EN FUNCIÓN DE FUENTES DE FOSFITO VÍA FOLIAR		
11.1.	INTRODUCCIÓN.....	212
11.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	213
11.2.1.	Material vegetal y condiciones experimentales	213
11.2.2.	Tratamientos y diseño experimental.....	213
11.2.3.	Manejo del experimento	214
11.2.4.	Variables evaluadas	214
11.2.5.	Análisis estadístico.....	214

11.3.. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	215
11.3.1. Peso seco	215
11.3.2. Número de hojas	216
11.3.3. Área foliar	219
11.3.4. Lecturas Spad	221
11.3.5. Tasa de crecimiento absoluto (TCA)	222
11.3.6. Tasa de crecimiento relativo (TCR)	222
11.3.7. Concentración nutrimental	225
11.4.. CONCLUSIONES.....	230
11.5.LITERATURA	CITADA
230	
CAPÍTULO 12. CAMBIOS EN COMPUESTOS ANTIOXIDANTES INDUCIDOS POR DIFERENTES FUENTES DE FÓSFORO Y NIVELES DE RADIACIÓN EN DOS ESPECIES DE <i>Brassica</i>.	233
12.1. INTRODUCCIÓN	233
12.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	236
12.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales.....	236
12.2.2. Acondicionamiento de las muestras	237
12.2.3. Variables evaluadas	238
12.2.3.1. Análisis de flavonoides	238
12.2.3.2. Análisis de glucosinolatos	239
12.2.3.3. Análisis de nitrato	240
12.2.4. Análisis estadístico	241
12.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	241
12.3.1. Flavonoides	241
12.3.2. Concentración de nitrato.....	244
12.3.3. Glucosinolatos	246
12.4. CONCLUSIONES	252
12.5. LITERATURA CITADA.....	252

CAPÍTULO 13. DIFERENTES FUENTES DE FÓSFORO Y NIVELES DE RADIACIÓN EN MATERIA FRESCA, SECA Y CONCENTRACIÓN NUTRIMENTAL DE DOS ESPECIES DE <i>Brassica</i>.	256
13.1. INTRODUCCIÓN	256
13.2. MATERIALES Y MÉTODOS	257
13.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales.....	257
13.2.2. Acondicionamiento de las muestras	258
13.2.3. Variables evaluadas	259
13.2.3.1. Materia fresca.....	259
13.2.3.2. Materia seca	259
13.2.3.3. Número de hojas.....	259
13.2.3.4. Área foliar	260
13.2.3.5. Fotosíntesis, conductancia y transpiración.....	260
13.2.3.6. Concentración nutrimental	260
13.2.4. Análisis estadístico	260
13.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	261
13.3.1. Materia fresca	261
13.3.2. Materia seca	263
13.3.3. Número de hojas	263
13.3.4. Área foliar	266
13.3.5. Fotosíntesis, conductancia y transpiración	267
13.3.6. Análisis nutrimental.....	269
13.4. CONCLUSIONES	274
13.5. LITERATURA CITADA.....	274
CAPÍTULO 14. CONCLUSIONES GENERALES	277
14.1. Lechuga	277
14.1.1. Fosfito en la solución nutritiva.....	277
14.1.2. Fosfito vía foliar	277
14.2. Acelga.....	277
14.2.1. Fosfito en la solución nutritiva.....	277

Tabla de contenido

14.2.2. Fosfito vía foliar	278
14.3. Col.....	278
14.3.1. Fosfito en la solución nutritiva.....	278
14.3.2. Fosfito vía foliar	279
14.4. Apio.....	279
14.4.1. Fosfito en la solución nutritiva.....	279
14.4.2. Fosfito vía foliar	280
14.5. Fuente de fosfito en lechuga.....	280
14.5.1. Fosfito en la solución nutritiva.....	280
14.5.2. Fosfito vía foliar	281
14.6. Brassica campestris cv. Mibuna Early.....	281
14.7. Brassica juncea cv. Red Giant	281

ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO 2

	Página
Cuadro 1 Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento (en mol _c m ⁻³).	10
Cuadro 2 Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de lechuga cv. Climax con aplicaciones de fosfito en la solución nutritiva.	17
Cuadro 3 Acumulación de biomasa en raíz y bola de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito a la solución nutritiva.	18
Cuadro 4 Concentración de macronutrientes en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.	27
Cuadro 5 Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.	28

CAPÍTULO 3

Cuadro 1 Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, (en mol _c m ⁻³).	38
Cuadro 2 Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos de fosfito vía foliar.	41
Cuadro 3 Acumulación de materia seca en raíz y bola de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.	42
Cuadro 4 Concentración de azúcares totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.	48

- Cuadro 5** Concentración de proteínas solubles totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar. 50
- Cuadro 6** Concentración de macronutrientes en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar. 51
- Cuadro 7** Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar. 52

CAPÍTULO 4

- Cuadro 1** Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes (en mol_c m⁻³). 57
- Cuadro 2** Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de acelga cv. Fordhook Giant con aplicaciones de fosfito en la solución nutritiva. 60
- Cuadro 3** Acumulación de materia seca en raíz y vástago de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a aplicaciones con fosfito en la solución nutritiva. 61
- Cuadro 4** Concentración de azúcares totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva. 67
- Cuadro 5** Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva. 68
- Cuadro 6** Concentración de macronutrientes en vástago y raíz de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva. 70
- Cuadro 7** Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a 71

tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

CAPÍTULO 5

- Cuadro 1** Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes ($\text{mol}_c \text{m}^{-3}$). 77
- Cuadro 2** Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de acelga cv. Fordhook Giant con aplicaciones de fosfito vía foliar. 80
- Cuadro 3** Acumulación de materia seca en raíz y vástago de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a aplicaciones con fosfito vía foliar. 81
- Cuadro 4** Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito aplicadas vía foliar. 86
- Cuadro 5** Concentración de azúcares totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar. 87
- Cuadro 6** Concentración de macronutrientes en vástago y raíz de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar. 90
- Cuadro 7** Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar. 91

CAPÍTULO 6

- Cuadro 1** Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes ($\text{mol}_c \text{m}^{-3}$). 97
- Cuadro 2** Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de col cv. Copenhagen Market cv. Copenhagen Market con aplicaciones de fosfito en la solución nutritiva. 100

Cuadro 3	Acumulación de materia seca en raíz y vástago de col cv. Copenhagen Market en respuesta a aplicaciones con fosfito en la solución nutritiva.	101
Cuadro 4	Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.	106
Cuadro 5	Concentración de macronutrientes en vástago y raíz de col cv. Copenhagen Market en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.	111
Cuadro 6	Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de col cv. Copenhagen Market en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.	112

CAPÍTULO 7

Cuadro 1	Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento en miliequivalentes (en mol _c m ⁻³).	120
Cuadro 2	Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de col cv. Copenhagen Market con aplicaciones de fosfito vía foliar.	121
Cuadro 3	Acumulación de materia seca en raíz y vástago de col cv. Copenhagen Market en respuesta a aplicaciones con fosfito vía foliar.	122
Cuadro 4	Concentración de azúcares totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar.	128
Cuadro 5	Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar.	129
Cuadro 6	Concentración de macronutrientes en vástago y raíz de col cv. Copenhagen Market en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.	131

Cuadro 7	Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de col cv. Copenhagen Market en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.	132
-----------------	---	-----

CAPÍTULO 8

Cuadro 1	Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes (en mol _c m ⁻³).	138
Cuadro 2	Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de apio cv. Tall Utha 52-70 con aplicaciones de fosfito en la solución nutritiva.	142
Cuadro 3	Acumulación de materia seca en raíz y vástago de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a aplicaciones con fosfito en la solución nutritiva.	143
Cuadro 4	Concentración de ácido ascórbico en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.	147
Cuadro 5	Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.	148
Cuadro 6	Concentración de azúcares totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.	149
Cuadro 7	Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.	153
Cuadro 8	Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.	154

CAPÍTULO 9

Cuadro 1	Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes (en mol _c m ⁻³).	161
Cuadro 2	Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de apio cv. Tall Utha 52-70 con aplicaciones de fosfito vía foliar.	164
Cuadro 3	Acumulación de materia seca en raíz y vástago de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a aplicaciones con fosfito vía foliar.	165
Cuadro 4	Concentración de ácido ascórbico en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar.	170
Cuadro 5	Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar.	173
Cuadro 6	Concentración de macronutrientes en vástago y raíz de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.	175
Cuadro 7	Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.	176

CAPÍTULO 10

Cuadro 1	Acumulación de materia seca en raíz y vástago de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva, en cuatro muestreos.	188
Cuadro 2	Número de hojas de plantas de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva, en cinco fechas después de la siembra.	190

Cuadro 3	Área foliar de plantas de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva, en cuatro muestreos después de la siembra.	192
Cuadro 4	Lecturas Spad en hojas de lechuga cv. Climax, con dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva, en cinco muestreos después de la siembra.	193
Cuadro 5	Tasa de crecimiento absoluto de plantas de lechuga cv. Climax, con aplicaciones de dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.	195
Cuadro 6	Tasa de crecimiento relativo de plantas de lechuga cv. Climax, con aplicaciones de dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.	198
Cuadro 7	Concentración de macronutrientes en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con dos fuentes de fosfito a diferentes concentraciones en la solución nutritiva.	202
Cuadro 8	Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con dos fuentes de fosfito a diferentes concentraciones en la solución nutritiva.	203

CAPÍTULO 11

Cuadro 1	Acumulación de materia seca en raíz y vástago de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar, en cuatro muestreos.	212
Cuadro 2	Número de hojas de plantas de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar, en cinco fechas después de la siembra.	214

Cuadro 3	Área foliar de plantas de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar, en cuatro muestreos después de la siembra.	216
Cuadro 4	Lecturas Spad en hojas de lechuga cv. Climax, con dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar, en cinco muestreos después de la siembra.	217
Cuadro 5	Tasa de crecimiento absoluto de plantas de lechuga cv. Climax, con aplicaciones de dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar.	219
Cuadro 6	Tasa de crecimiento relativo de plantas de lechuga cv. Climax, con aplicaciones de dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar.	220
Cuadro 7	Concentración de macronutrientes en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con dos fuentes de fosfito a diferentes concentraciones vía foliar.	224
Cuadro 8	Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con dos fuentes de fosfito a diferentes concentraciones vía foliar.	225

CAPÍTULO 12

Cuadro 1	Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración de flavonoides (mg g^{-1} PS) en dos especies de <i>Brassica</i> .	239
Cuadro 2	Influencia de Pi, Phi y PAR en la concentración de nitrato en hojas sin nervadura central de dos especies de <i>Brassica</i> .	241
Cuadro 3	Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración de glucosinolatos (mg g^{-1} PS) en <i>Brassica juncea</i> .	246
Cuadro 4	Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración	247

de glucosinolatos (mg g^{-1} PS) en *Brassica campestris*.

CAPÍTULO 13

- | | | |
|-----------------|---|-----|
| Cuadro 1 | Pi, Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en peso fresco, peso seco de hojas (PSH), peso seco de hojas sin nervadura central (PSHSN) y número de hojas a cosecha, en plantas de <i>Brassica campestris</i> . | 258 |
| Cuadro 2 | Pi, Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en peso de materia fresca, peso seco de hojas (PSH), peso seco de hojas sin nervadura central (PSHSN) y número de hojas en plantas de <i>Brassica juncea</i> . | 260 |
| Cuadro 3 | Influencia de la concentración de Pi y Phi en número de hojas en dos especies de <i>Brassica</i> . | 261 |
| Cuadro 4 | Influencia de la concentración de Pi y Phi en área foliar (m^2 planta ⁻¹) de dos especies de <i>Brassica</i> . | 263 |
| Cuadro 5 | Pi, Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en fotosíntesis, conductancia y transpiración de <i>Brassica campestris</i> . | 264 |
| Cuadro 6 | Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración nutrimental en vástago de <i>Brassica juncea</i> . | 268 |
| Cuadro 7 | Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración nutrimental en vástago de <i>Brassica campestris</i> . | 269 |

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

	Página
Figura 1 Actividad antioxidante total determinada por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas en cada tiempo de evaluación son estadísticamente diferentes (Tukey, 0,05). (15, $p=0.0011$; 30, $p=0.0098$; 60, $p=0.0004$). PF=peso fresco.	19
Figura 2 Concentración de fenoles totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey 0,05). ($p=0.0001$). PF=peso fresco.	20
Figura 3 Concentración de flavonoides totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey 0,05). ($p=0.0478$). PF=peso fresco.	21
Figura 4 Concentración de ácido ascórbico en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF=peso fresco.	22
Figura 5 Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de lechuga v. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0095$; Chl b, $p=0.0095$; y Chl total, $p=0.0082$).	23

PF= peso fresco.

- Figura 6** Concentración de azúcares totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0013$). PF= peso fresco. 24
- Figura 7** Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05) ($p=0.0001$). PF= peso fresco. 25
- Figura 8** Concentración de proteínas solubles totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05) ($p=0.01$). PF= peso fresco. 26

CAPÍTULO 3

- Figura 1** Actividad antioxidante total evaluada por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas en cada tiempo de evaluación son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.0024$; 30, $p=0.0231$; 60, $p=0.0001$). PF=peso fresco. 43
- Figura 2** Concentración de fenoles totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0084$). PF=peso fresco. 44
- Figura 3** Concentración de flavonoides totales en hojas de lechuga en 45

respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0.0001$). PF=peso fresco.

- Figura 4** Concentración de ácido ascórbico en hojas de lechuga cv. Climax como respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco. 46
- Figura 5** Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0082$; Chl b, $p=0.0026$; Chl total, $p=0.0058$). PF= peso fresco. 47
- Figura 6** Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0004$). PF= peso fresco. 49

CAPÍTULO 4

- Figura 1** Actividad antioxidante total en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas en cada tiempo de evaluación, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.0004$; 30, $p=0.0012$; 60, $p=0.0016$). PF=peso fresco. 62
- Figura 2** Concentración de fenoles totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras 63

distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).
($p=0.0001$). PF=peso fresco.

Figura 3 Concentración de flavonoides totales en hojas de acelga cv. 64

Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).
($p=0.0065$). PF=peso fresco.

Figura 4 . Concentración de ácido ascórbico en hojas de acelga cv. 65

Fordhook Giant como respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).
($p=0.0001$). PF= peso fresco.

Figura 5 Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de acelga cv. 66

Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0137$; Chl b, $p=0.0457$; Chl total, $p=0.0380$). PF= peso fresco.

Figura 6 Concentración de proteínas solubles totales en hojas de 69

acelga en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

CAPÍTULO 5

Figura 1 Actividad antioxidante total en hojas de acelga cv. Fordhook 82

Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas en cada tiempo de incubación, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).
(15, $p=0.0001$; 30, $p=0.0001$; 60, $p=0.0001$). PF=peso fresco.

- Figura 2** Concentración de fenoles totales en hojas de acelga en 83
 respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar.
 Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente
 diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0002$). PF=peso fresco.
- Figura 3** Concentración de flavonoides totales en hojas de acelga en 84
 respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar.
 Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente
 diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0045$). PF=peso fresco.
- Figura 4** Concentración de ácido ascórbico en hojas de acelga cv. 85
 Fordhook Giant como respuesta a aplicaciones de fosfito vía
 foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente
 diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0002$). PF= peso fresco.
- Figura 5** Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de 88
 acelga en respuesta a diferentes aplicaciones de fosfito vía
 foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente
 diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0224$). PF= peso fresco.
- Figura 6** Concentración de proteínas solubles totales en hojas de 89
 acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes
 concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras
 distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).
 ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

CAPÍTULO 6

- Figura 1** Actividad antioxidante total en hojas de col cv. Copenhagen 102
 Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito
 en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son
 estadísticamente diferentes (15, $p=0.0002$; 30, $p=0.0002$; 60,
 $p=0.0006$). PF=peso fresco.
- Figura 2** Concentración de fenoles totales en hojas de col en 103
 respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la

solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0094$). PF=peso fresco.

Figura 3 Concentración de flavonoides totales en hojas de col en 104
respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la
solución nutritiva. Medias con letras distintas son
estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0004$).
PF=peso fresco.

Figura 4 Concentración de ácido ascórbico en hojas de col cv. 105
Copenhagen Market como respuesta a diferentes
concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias
con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey,
0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

Figura 5 Concentración de azúcares totales en hojas de col cv. 107
Copenhagen Market en respuesta a diferentes
concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias
con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey,
0.05). ($p=0.0004$). PF= peso fresco.

Figura 6 Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de col 108
cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes
concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias
con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey,
0.05). ($p=0.0039$). PF= peso fresco.

Figura 7 Concentración de proteínas solubles totales en hojas de col 109
cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes
concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias
con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey,
0.05). ($p=0.0069$). PF= peso fresco.

CAPÍTULO 7

- Figura 1** Actividad antioxidante total en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.0001$; 30, $p=0.0001$; 60, $p=0.0001$). PF=peso fresco. 123
- Figura 2** Concentración de fenoles totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0010$). PF=peso fresco. 124
- Figura 3** Concentración de flavonoides totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0067$). PF=peso fresco. 125
- Figura 4** Concentración de ácido ascórbico en hojas de col cv. Copenhagen Market como respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco. 126
- Figura 5** Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes aplicaciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0110$; Chl b, $p=0.0178$; Chl total, $p=0.0124$). PF= peso fresco. 127
- Figura 6** Concentración de proteínas solubles totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). 130

($p=0.0001$). PF= peso fresco.

CAPÍTULO 8

- Figura 1** Actividad antioxidante total en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.4176$; 30, $p=0.0195$; 60, $p=0.0755$). PF=peso fresco. 144
- Figura 2** Concentración de fenoles totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0401$). PF=peso fresco. 145
- Figura 3** Concentración de flavonoides totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0128$). PF=peso fresco. 146
- Figura 4** Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0420$). PF= peso fresco. 150
- Figura 5** Concentración de proteínas solubles totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0473$). PF= peso fresco. 152

CAPÍTULO 9

- Figura 1** Actividad antioxidante total en hojas de apio cv. Tall Utha 52- 167
70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.0261$; 30, $p=0.0148$; 60, $p=0.0113$). PF=peso fresco.
- Figura 2** Concentración de fenoles totales en hojas de apio cv. Tall 168
Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0132$). PF=peso fresco.
- Figura 3** Concentración de flavonoides totales en hojas de apio cv. 169
Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF=peso fresco.
- Figura 4** Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de apio cv. 171
Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes aplicaciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0367$; Chl b, $p=0.0449$; Chl total, $p=0.0172$). PF= peso fresco.
- Figura 5** Concentración de azúcares totales en hojas de apio cv. Tall 172
Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0016$). PF= peso fresco.
- Figura 6** Concentración de proteínas solubles totales en hojas de apio 174
en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0003$). PF= peso fresco.

CAPÍTULO 12

Figura 1 Relación entre concentración de flavonoides totales y 242 concentración de nitrato en hojas de *B. campestris* y *B. juncea*. Flavonoides totales en *B. juncea* = $3.4295 + 0.0468$ ($\text{NO}_3\text{-N}$) ($R^2=0.1167$). Flavonoides totales en *B. campestris* = $4.2729 - 0.062$ ($\text{NO}_3\text{-N}$) ($R^2=0.5968^*$). *significativo a $p \leq 0.05$.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Absorción de fosfito en plantas superiores

El fosfito (Phi , H_2PO_3^-) es un isómero del anión fosfato (Pi , H_2PO_4^-) en el cual, uno de los oxígenos unidos al átomo de P es reemplazado por hidrógeno (Carswell *et al.* 1996). Debido a la similitud estructural entre estos aniones y a las propiedades cinéticas de los sistemas de absorción, el Phi es absorbido por transportadores de Pi de alta afinidad a nivel membrana (d'Arcy-Lameta y Bompeix, 1991).

Las plantas superiores no presentan mecanismos selectivos que les permitan discriminar entre especies de P. La deficiencia de Pi en plantas superiores ocasiona el crecimiento radical, incremento de pelos radicales, y la elongación de las raíces; así como el descenso regulado en la inducción de enzimas tales como la fosfatasa ácida, la fosfoenolpiruvato fosfatasa y la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato orgánico (Carswell *et al.*, 1997). Ticconi *et al.* (2001) demostraron que estas respuestas no son observadas cuando se suministra Phi.

De manera adicional, estudios pioneros de cinética revelaron que el Pi y el Phi compiten por los sitios de unión en el sistema de transporte de Pi (Griffith *et al.*, 1989) y recientemente, análisis transcripcionales han demostrado la expresión de al menos dos miembros de la familia de genes *Ph1*, y de los genes *NtPT1* y *NtPT2*, en presencia de Phi (Chen *et al.*, 2007). Los niveles de transcritos de transportadores de alta afinidad de Pi incrementan bajo condiciones de deficiencia de Pi; la adición de Phi a un medio deficiente en Pi suprime la acumulación de transcritos de estos transportadores. La expresión de *LePT1* y *TPSI1* parece ser menos sensitiva a Phi en comparación con otros genes inducidos por deficiencia de Pi. La disminución en el nivel de transcritos está asociada con el incremento en las concentraciones de Phi. La expresión de *LePS2*, un gen de fosfatasa alcalina aislado de tomate (Baldwin *et al.*, 2001) y los genes *LePS3* y *TPSI1* (Liu *et al.*, 1998) fueron también suprimidos en plantas con deficiencia de Pi tratadas con Phi (Varadarajan *et al.*, 2002).

Capítulo 1

1.2. Transporte de fosfito en plantas superiores

Una vez absorbido por las raíces, el Phi es altamente móvil en el xilema y en el floema. Usando cromatografía iónica se ha observado que el Phi es altamente estable en plantas de aguacate, persistiendo en esta forma por algunos meses (Ouimette y Coffey, 1990). Schroetter *et al.* (2006) coinciden en que el Phi dentro de la planta es muy estable, debido a que sólo una pequeña cantidad de Phi absorbido es oxidada a Pi.

En estudios sobre la absorción foliar de Phi, Schroetter *et al.* (2006) reportaron incrementos considerables en la concentración de P en hojas de maíz, cuando éstas fueron asperjadas con Phi. Estos autores evaluaron también los contenidos de Pi y Phi en cada segmento de la planta, registrando que en los tratamientos con aspersión foliar de Phi, este ion fue detectable en todas las plantas de maíz, lo cual es una evidencia de movilidad en floema y xilema. Ratjen (2005) describe resultados similares en investigaciones realizadas en calabaza (*Cucurbita pepo* L.) y concluyó que el Phi es mejor absorbido por las hojas que el Pi.

1.3. Compartimentalización de Phi a nivel celular

Para elucidar los mecanismos de absorción de Phi, su distribución celular y efectos metabólicos en plantas; así como para analizar su interacción con el metabolismo del Pi, se ha empleado recientemente un método no destructivo *in vivo* de resonancia magnética nuclear empleando ^{31}P . Con base en las propiedades cinéticas del sistema de transporte de fosfato de las células BY-2, se demostró que Phi inhibe la absorción de Pi de manera competitiva. Para seguir directamente el destino y la distribución de Phi y Pi en citoplasma y vacuola, se consideró el cambio químico de sensibilidad al pH que muestra el ion Phi (Danova-Alt *et al.*, 2008).

Las células con deficiencia de Pi acumulan predominantemente al Phi en el citosol, y parece que el Phi importado a las vacuolas no es un proceso favorecido bajo tales condiciones. En contraste, células reabastecidas con Pi acumulan Phi principalmente en vacuolas. Esta condición favorece la absorción vacuolar tanto de Pi como de Phi. Sin embargo, con la misma concentración celular de ambos iones, la intensidad de la

Capítulo 1

señal vacuolar de Pi y Phi muestran una mayor acumulación de Pi que de Phi, lo cual indica la posible existencia de diferentes elementos regulatorios que intervienen en el transporte de Pi y Phi desde el citosol a la vacuola. Mientras la absorción de Pi en la vacuola tiene fines de almacenamiento, el secuestro de Phi en este orgánulo puede obedecer a razones de desintoxicación de un xenobiótico (Danova-Alt *et al.*, 2008).

1.4. Efecto de Phi en el metabolismo celular

Si bien el Phi puede ser transportado al interior de la célula, este ion no está involucrado en ninguna fase del metabolismo del fósforo (producción de ATP, fotosíntesis o respiración); por lo que, la similitud entre los iones Pi y Phi parece terminar en aspectos relacionados con su asimilación. El Phi no es convertido a Pi dentro de la planta y por tanto no participa en las rutas bioquímicas (Varadarajan *et al.*, 2002). Por el contrario, se ha demostrado que el Phi perturba la fosforilación de proteínas durante deficiencia de Pi. En *Arabidopsis*, los Phi suprimen la actividad de enzimas nucleolíticas y la expresión de la fosfatasa ácida y de los genes transportadores de Pi (Ticconi *et al.*, 2001). El Phi inhibe múltiples respuestas inducidas por insuficiencia de fosfato (Carswell *et al.*, 1997). Ávila *et al.* (2013) encontraron una disminución de la fosfatasa ácida al incrementar las concentraciones de Phi en condiciones de insuficiencia de Pi. Y además mencionan que bajo condiciones de suficiencia de Pi, el Phi incrementa la concentración de catalasa, lo cual es ventajoso ya que dicha enzima protege contra estrés oxidativo a la planta.

Los efectos del Phi en plantas son contradictorios. En especies como *Allium cepa* y *Brassica nigra*, se ha demostrado incluso, efectos negativos del Phi sobre el crecimiento (Sukarno *et al.*, 1993; Carswell *et al.*, 1996); este efecto negativo es disminuido con el suministro de Pi (Varadarajan *et al.*, 2002). Por el contrario, Moor *et al.* (2009) indican que la fertilización con Phi no afecta el crecimiento de las plantas, ni representa ventajas en términos de incremento del rendimiento en comparación con la fertilización tradicional con Pi; pero si incrementa la calidad de frutos rojos al activar los mecanismos de defensa de las plantas lo que ocasiona síntesis de ácido ascórbico y antocianinas.

Capítulo 1

Los efectos negativos de Phi no son evidentes en plantas suplementadas con Pi. Los genes que expresan los niveles de deficiencia de Pi son LePT1, LePT2, AtPT1, y ATPT2 (de alta afinidad Pi transportadores), los cuales fueron suprimidos por el Phi. Lo anterior prueba que el Phi interfiere con la expresión de genes a nivel de la transcripción (Varadarajan *et al.*, 2002). El Phi reprime la señalización de insuficiencia de P, lo que lleva a cambios en la composición de la membrana fotosintética del cloroplasto (Kobayashi *et al.*, 2006).

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 fosfato o como componentes de la traducción de señales relacionadas con la detección del estatus de fosfato en planta; aparentemente no discriminan entre fosfato y fosfito (McDonald *et al.*, 2001).

La aplicación de Phi en papa incrementa los mecanismos de defensa contra patógenos, ya que refuerza la pared celular incrementando el contenido de pectina; de igual manera incrementa la quitinasa presente en tejidos de la peridermis (Olivieri *et al.*, 2012). También en el cultivo de papa, Lobato *et al.* (2011) realizaron aplicaciones de Phi como estrategia de manejo contra *Phytophthora* y encontraron un incremento en fitoalexinas, así como un aumento en la actividad de peroxidasa y polifenol oxidasa, por lo que dichas enzimas pueden formar parte de los mecanismos de defensa inducidos por Phi.

Capítulo 1

1.5. Importancia de hortalizas de hoja

México se encuentra entre los principales productores y exportadores de hortalizas en el mundo, se ubica en cuarto lugar a nivel mundial y el primero en el continente. Otros exportadores de gran peso son: Países Bajos, España, China, Francia, Bélgica y Canadá; los diez principales productores de hortalizas suman alrededor del 70% de la producción de hortalizas en el mundo. En México se producen alrededor de 70 variedades de hortalizas que se clasifican en siete grupos diferentes. Dentro de las hortalizas de hoja mayormente producidas en México tenemos: col de Bruselas, col china, repollo, brócoli, espinaca, acelga, lechuga, nabo, berro, pápalo, quelite, entre otras (Financiera Rural, 2008).

Las hortalizas de hoja verde son un importante componente de una dieta saludable, ya que son una fuente importante de vitaminas, minerales y nutrimentos, es por ello que de manera internacional se promueve su consumo para mejorar la nutrición. Su consumo regular y en cantidades suficientes puede ayudar a prevenir enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Taban y Halkman, 2011).

En años recientes se ha comprobado que las hortalizas de hoja pertenecientes al género *Brassica* tienen una gran cantidad de antioxidantes naturales que incluyen vitaminas, carotenoides y compuestos fenólicos. Cantidades de antioxidantes naturales en la dieta, como los flavonoides son muy importantes ya que son capaces de actuar como reductores de especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que pueden ayudar a disminuir enfermedades cardiovasculares y cáncer (Podsdek, 2007).

Se ha reportado que el consumo en cantidades adecuadas de hortalizas de hoja, trae consigo grandes beneficios a la salud, muchos estudios señalan que su consumo está asociado con la disminución de la incidencia de enfermedades como la diabetes tipo 2. Su posible beneficio se asocia al contenido de antioxidantes ya que contribuyen a la reducción del estrés oxidativo sistémico (Carter *et al.*, 2010).

Capítulo 1

1.6. LITERATURA CITADA

- Ávila, F. W.; Faquin, V.; da Silva, L. A. K.; Andressa, A.P.; Marques, D. J.; Silva, G. E. M.; Yuen, T. D. K. 2013. Effect of phosphite supply in nutrient solution on yield, phosphorus nutrition and enzymatic behavior in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *A. J. C. S.* 7(5): 713-722.
- 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.
- Carswell, C.; Grant, B. R.; Theodorou, M. E.; Harris, J.; Niere, J. O.; Plaxton, W. C. 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol.* 110: 105-110.
- Carswell, M. C.; Grant, B. R.; Plaxton, W. C. 1997. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta.* 203: 67-74.
- Carter, P., Gray, L. J., Troughton, J.; Khunti, K.; Davies, M. J. 2010. Fruit and vegetable intake and incidence of type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *B. M. J.* 341: 1-8.
- Chen, A. Q.; Hu, J.; Sun, S. B.; Xu, G. H. 2007. Conservation and divergence of both phosphate and mycorrhiza regulated physiological responses and expression patterns of phosphate transporters in *Solanaceus* species. *New Phytologist.* 173: 817-831.
- d'Arcy-Lameta, A.; Bompeix, G. 1991. Systemic transport of tritiated phosphonate in tomato plantlets (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Pestic. Sci.* 32: 7-14.
- Danova-Alt, R.; Dijkema, C.; De Waard, P.; Köck, M. 2008. Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells –kinetic and ³¹P nuclear magnetic resonance studies. *Plant Cell and Environ.* 31: 1510-1521.
- Financiera Rural. 2008. La producción de hortalizas en México. 47 p.
- Griffith, J. M.; Akins, L. A.; Grant, B. R. 1989. Properties of the phosphate and phosphite transport systems of *Phytophthora palmivora*. *Arch. Microbiol.* 152: 430-436.

Capítulo 1

- Kobayashi, K.; Masuda, T.; Takamiya, K.; Ohta, H. 2006. Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. *Plant J.* 47: 238-248.
- Liu, C.; Muchhal, U. S.; Mukatira, U.; Kononowicz, A. K.; Raghothama, K. G. 1998. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Physiol.* 116: 91-99.
- Lobato, M. C.; Machinandiarena, M. F.; Tambascio, C.; Dosio, G. A. A.; Caldiz, D. O.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B.; Olivieri, F. P. 2011. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. *Eur. J. Plant Pathol.* 130: 155-163.
- McDonald, A. E.; Niere, J. O.; Plaxton, W. C. 2001. Phosphite disrupts the acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to phosphate starvation. *Can. J. Microbiol.* 47: 969-978.
- Moor, U.; Poldma, P.; Tonutare, T.; Karp, K.; Starast, M.; Vool, E. 2009. Effect of phosphate fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Sci. Hort.* 119: 264-269.
- Olivieri, F. P.; Feldman, M. L.; Machinandiarena, M. F.; Lobato, M. C.; Caldiz, D. O.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B. 2012. Phosphite applications induce molecular modifications in potato tuber periderm and cortex that enhance resistance to pathogens. *Crop Protection.* 32: 1-6.
- Ouimette, D. G.; Coffey, M. D. 1990. Symplastic entry and problem translocation of phosphonate. *Pestic. Biochem. Physiol.* 38: 18-25.
- Podsdek, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *LTW-Food Science Technol.* 40 (1): 1-11.
- Ratjen, A. M. 2005. Bedeutung von Phosphite in Landwirtschaft und Gartenbau. Kiel, Univ, Bachelor Thesis. 84 p.
- Schroetter, S.; Angeles-Wedler, D.; Kreuzig, R.; Schnug, E. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschung Völkenrode.* 56(3-4): 87-99.
- Sukarno, N.; Smith, S. E.; Scott, E. S. 1993. The effect of fungicides on vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis: I. The effects on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth. *New Phytol.* 25: 139-147.

Capítulo 1

- Taban, B. M.; Halkman, A. K. 2011. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat (RTE) salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*. 17: 286-287.
- 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.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2. RESPUESTA DE LECHUGA A APLICACIONES A LA RAÍZ DE FOSFITO

2.1. INTRODUCCIÓN

Después del nitrógeno, el fósforo (P) es el segundo macronutriente que de manera más frecuente limita el crecimiento de las plantas. El P es un importante macronutriente de la planta, que llega a representar hasta el 0.2% del peso de materia seca vegetal. Es un componente clave en moléculas como ácidos nucleicos, fosfolípidos, azúcares fosforilados y ATP (Schachtman *et al.*, 1998; Berkowitz *et al.*, 2013). El P es un elemento esencial para el desarrollo y reproducción de la planta, y es requerido en grandes cantidades. Sus funciones no pueden ser realizadas por ningún otro elemento y sin la cantidad suficiente la planta no expresará su máximo potencial en rendimiento, ya que el nutriente juega un papel importante en el almacenamiento y transferencia de energía en las células vegetales (Fageria, 2008), participa en la síntesis de proteínas y es constituyente de numerosos compuestos imprescindibles en el metabolismo vegetal (Alcántar *et al.*, 2007). El P también está involucrado en el control de reacciones enzimáticas y en la regulación de rutas metabólicas (Theodorou y Plaxton, 1993).

El P es absorbido y asimilado por la planta en forma de fosfato ($H_2PO_4^-$, Pi). El fosfito ($H_2PO_3^-$, Phi) es un análogo del fosfato en donde un grupo hidroxilo es reemplazado por un átomo de hidrógeno. El Phi entra a la célula vía transportadores de Pi, por lo que compite en la absorción con Pi y es móvil dentro de la planta (Ouimette y Coffey, 1989; Danova-Alt *et al.*, 2008).

El Phi tiene efectos directos e indirectos sobre el crecimiento de las plantas y es considerado como un producto muy valioso en aplicaciones agrícolas. Phi inhibe el proceso de síntesis de la pared celular, la formación de micelio y las funciones del citoesqueleto del hongo *Phytophthora cinnamomi* (King *et al.*, 2010). En algunas especies como *Brassica napus*, se han demostrado incluso, efectos negativos del Phi sobre el crecimiento (Carswell *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha encontrado que la

Capítulo 2

adición de Phi en plantas de fresa tuvo respuestas diferenciales en función de la etapa fenológica; por ejemplo en fructificación, la adición de 30% del P total como Phi estimuló el metabolismo de la planta, incrementándose las concentraciones de clorofilas a, b y total, aminoácidos y proteínas; mientras que en floración se observaron efectos positivos con la adición de 20 % del P como Phi sobre la concentración de azúcares totales en hojas (Estrada-Ortiz *et al.*, 2011).

Una dieta rica en hortalizas y frutas se asocia con una vida sana y bajas probabilidades de enfermedades cardiovasculares y cáncer (Hooper y Cassidy, 2006). Los efectos benéficos sobre la salud se asocian a que las frutas y hortalizas poseen una gran cantidad de vitaminas y fitoquímicos como ácido ascórbico, carotenoides, polifenoles y fibra que son parte fundamental de lipoproteínas, membranas y ADN (Szeto *et al.*, 2004). La lechuga forma parte de la familia *Asteraceae*, es una de las hortalizas mas consumida en ensaladas y actualmente se considera como un alimento saludable (Dupont *et al.*, 2000). De hecho en algunos estudios se han observado efectos benéficos de la ingesta de lechuga sobre la salud, ayudando a prevenir enfermedades cardiovasculares en ratas y humanos (Nicolle *et al.*, 2004; Serafini *et al.*, 2002).

Con base en lo mencionado anteriormente en esta investigación se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Phi adicionadas a la solución nutritiva, sobre indicadores agronómicos, fisiológicos y de calidad, en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivar Climax.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante el verano de 2011, en un invernadero tipo cenital, localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivar Climax, cultivada en un sistema hidropónico de raíz flotante con oxigenación. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento fueron 35.8, 5.2 y 18 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

Capítulo 2

2.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron tres diferentes soluciones nutritivas diferenciándose entre sí por las concentraciones de Phi. Las soluciones se formularon tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984) al 100% preparada con reactivos grado analítico, utilizando 1.06 g L^{-1} de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.30 g L^{-1} de KNO_3 ; 0.14 g L^{-1} de KH_2PO_4 ; 0.49 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.26 g L^{-1} de K_2SO_4 . La solución nutritiva se complementó con micronutrientes en las siguientes concentraciones: 1.6 mg L^{-1} de Mn; 0.11 mg L^{-1} de Cu; 0.86 mg L^{-1} de B; 0.023 mg L^{-1} de Zn y 0.048 mg L^{-1} de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L^{-1} a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970).

Para la preparación de la solución nutritiva se empleó agua de pozo profundo, de la cual se obtuvo el análisis nutrimental (Cuadro 1) y de esa manera poder saber de que disposición nutrimental se partió para la elaboración de las soluciones nutritivas.

Cuadro 1. Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento (en $\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$).

	N-NO₃⁻	P- H₂PO₄⁻	S- SO₄²⁻	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
mol_c m⁻³	0.294	0.062	0.186	0.100	1.356	2.527

La concentración de Phi en la solución fue evaluada a las siguientes concentraciones: 0, 0.25 y 0.5 $\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$. El Phi se obtuvo a partir de ácido fosforoso grado analítico (Sigma-Aldrich). El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5.5 y 5.8 ya que se considera un pH óptimo para la disponibilidad de Phi (Hanrahan *et al.*, 2005), el cual se ajustó adicionando H_2SO_4 al 97% y NaOH 1 N.

La unidad experimental estuvo constituida por seis plantas en un sistema hidropónico de raíz flotante. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se utilizó diseño experimental completamente al azar.

Capítulo 2

2.2.3. Manejo del cultivo

Previamente a la instalación del experimento, el 12 de junio de 2011, se pusieron a germinar semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Climax, en una mezcla de turba con perlita (70:30 V/V) previamente humedecida y colocada en charolas de plástico negras de 200 cavidades. Posteriormente a la siembra se cubrieron con un plástico negro para mantener en oscuridad y conservar la humedad hasta su emergencia.

Después de la emergencia se realizaron riegos diarios con agua durante una semana, a fin de mantener la humedad. Después de ello se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 25% diariamente, hasta el momento del trasplante, a fin de tener plantas vigorosas.

Previo al trasplante se construyó un sistema de raíz flotante, el cual fue hecho con madera por lo cual se cortó y clavó, para construir cajas de 80 x 40 x 20 (largo x ancho x profundidad) las cuales se forraron con plástico negro calibre 600 (cada caja fue considerada como una unidad experimental). El sistema de oxigenación se colocó pegado al fondo de las cajas, para lo cual se utilizó manguera de látex tipo espagueti, a la cual se conectó en los extremos una bomba de aire de dos salidas por cada 3 unidades experimentales lo cual permitió tener oxigenada la raíz.

Cada unidad experimental tuvo como soporte placas de unicel, las cuales además sirvieron para mantener aislado al material vegetal de la solución nutritiva y evitar daños en tejido aéreo por quemaduras.

Previo al trasplante, se preparó la solución nutritiva de Steiner al 50% (ajustándose con la concentración nutrimental del agua de pozo referida en el Cuadro 1), se ajustó el pH a 5.5 y se colocaron los soportes de unicel. El 4 de julio (22 días después de la siembra) por la tarde se realizó el trasplante, para lo cual se utilizaron vasos de plástico no. 4 (118 mL) previamente perforados en el fondo, en los cuales se colocó la plántula de lechuga, rellenando los espacios libres con agrolita. Cabe señalar que la aplicación de tratamientos se inició el mismo día del trasplante.

Capítulo 2

El sistema de oxigenación se programó con un temporizador, realizando catorce programaciones distribuidas de la siguiente manera: cada hora de 8:00 AM a 8:00 PM durante el día y a las 12:00 AM y 4:00 AM durante la noche teniendo una duración cada una de un minuto, dando un total de 14 min de oxigenación diarios durante todo el experimento.

El nivel de la solución nutritiva y el pH se ajustaron cada tercer día. Se realizó el cambio de la solución nutritiva cada 10 días, incrementando la concentración de la solución nutritiva Steiner de acuerdo al desarrollo del cultivo, aproximadamente a los 20 días después del trasplante se incremento al 75% y a los 40 días al 100%.

La cosecha se realizó cuando la lechuga alcanzó un tamaño comercial (51 días después del trasplante). Al momento de la cosecha se realizaron muestreos de todos los tratamientos, y se congelaron ocho plantas por tratamiento a -80 °C para su posterior análisis. De igual manera ocho plantas de lechuga por tratamiento se llevaron a una estufa de secado.

2.2.4. Variables evaluadas

2.2.4.1. Indicadores agronómicos

2.2.4.1.1. Materia fresca de vástago, bola y volumen de raíz

Al final del ciclo, la planta se separó en parte aérea y raíz. De esta manera se determinó el peso de la materia fresca de vástago y de la bola (parte comercial) empleando una balanza granataria. Para determinar el volumen de raíz se utilizaron probetas de cristal de 250 mL.

2.2.4.1.2. Materia seca de bola y raíz

La bola y raíz se colocaron en una estufa de aire forzado (Riossa, HCF-125D, México) durante 72 h a una temperatura de 70 °C, asegurándose de tener un peso constante en el material vegetal. Se evaluó el peso de biomasa seca de bola y de raíz en una balanza analítica.

Capítulo 2

2.2.4.2. Indicadores de calidad

2.2.4.2.1. Actividad antioxidante total

Se utilizó una metodología empleada por Castañeda *et al.*, 2008; Chizzola *et al.*, 2008; Ibarra *et al.*, 2011; Kuskoski *et al.*, 2005; Scherer y Teixeira, 2009, con algunas modificaciones, como se indica a continuación. Se procedió a pesar 100 mg de tejido vegetal previamente macerado y homogenizado con nitrógeno líquido, se agregó 1.5 mL de etanol al 60%, y se dejó reposar durante 24 h en refrigeración a 3 °C. Al siguiente día se centrifugó durante 20 min a 4 °C y a 15000 rpm; en un tubo de reacción se colocaron 400 µL del sobrenadante, 600 µL de metanol al 80%, finalmente se agregó 1 mL de solución de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) y se agitó en vórtex. Transcurridos 15, 30 y 60 min de agregado el DPPH se leyó en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV, Madison, WI 53711, USA) a una longitud de onda de 517 nm. Se utilizó trólox (6-hidroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) como estándar. En la metodología se utilizaron 2 blancos, uno para calibrar el espectrofotómetro (400 µL de etanol al 60% más 600 µL de metanol al 80%) y el segundo blanco fue utilizado en la curva estándar (sin trólox).

2.2.4.2.2. Fenoles totales

La extracción se realizó de acuerdo al método de Folin y Ciocalteu descrito por Waterman y Mole (1994), utilizando la metodología empleada para material vegetal sólido. Para lo cual se pesaron 100 mg de hojas previamente maceradas y homogenizadas con nitrógeno líquido, posteriormente se le agregó 500 µL de metanol al 80% (previamente enfriado a 4 °C); posterior a ello se centrifugó durante 20 min a 4 °C y a 15000 rpm. En un tubo de reacción se colocó 50 µL del sobrenadante, se adicionó 50 µL de agua desionizada, 100 µL de reactivo de Folin, se agitó en vórtex (se cronometró el tiempo a partir de agregado el reactivo de Folin). Después de 1 y antes de 8 min, se agregó 200 µL de Na₂CO₃ al 20 %. Se dejó reposar 2 h en oscuridad y se leyó a 760 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV, Madison, WI 53711, USA). Se utilizó ácido gálico como estándar.

Capítulo 2

2.2.4.2.3. Flavonoides totales

Se realizó una complementación entre las metodologías empleadas por Ghasemi *et al.* (2009), Ebrahimzadeh *et al.* (2008) y Nanyonga *et al.* (2013). En donde se pesaron 75 mg de hojas previamente maceradas con nitrógeno líquido, se le agregó 1.5 mL de metanol al 80% y se incubó durante una hora a 70 °C; cuando el material se enfrió se procedió a centrifugar durante 20 min, a 4 °C y a 15000 rpm. En un eppy se colocaron 200 µL del sobrenadante, se agregaron 600 µL de metanol al 80%, 40 µL de cloruro de aluminio al 10 %, 40 µL de acetato de potasio 1 M y 1120 µL de agua destilada y se agitó al agregar cada solución. Se dejó reposar la solución durante 40 min a temperatura ambiente y a oscuridad y se leyó en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV, Madison, WI 53711, USA) a 451 nm. Para el cálculo se utilizó la ecuación obtenida a partir de la elaboración de la curva estándar con quercetina.

2.2.4.2.4. Concentración de ácido ascórbico

Se utilizó el método de la AOAC (Boland, 1990), por titulación con solución de Tillman (DFI-2,6 diclorofenol indofenol 0.02%). Se usaron 3 g de material vegetal previamente homogenizado y molido con nitrógeno líquido y se licuaron con 50 mL de ácido oxálico (0.5%), inmediatamente se procedió a centrifugar durante 10 min a 4 °C a 15 000 rpm. Se tomaron 5 mL del sobrenadante y se titularon con la solución de Tillman hasta notar el vire de color a rosa pálido visible por un minuto. Para el cálculo se utilizó la ecuación obtenida a partir de la elaboración de la curva estándar con ácido ascórbico.

2.2.4.3. Indicadores fisiológicos

2.2.4.3.1. Concentración de clorofilas a, b y total

Se determinó por el método de Harborne (1973), se pesó 0.3 g de material vegetal, se utilizó 10 mL de acetona como extractante, y se dejó reposar 24 h en oscuridad. Las muestras se analizaron en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10

Capítulo 2

UV, Madison, WI 53711, USA) a 663 y 645 nm. Posteriormente se realizó el cálculo de clorofilas a, b y totales utilizando las siguientes ecuaciones.

$$\text{Clorofila a} = \frac{(12.7 * A_{663}) - (2.59 * A_{645}) * V}{1000 * P}$$

$$\text{Clorofila b} = \frac{(22.9 * A_{645}) - (4.68 * A_{663}) * V}{1000 * P}$$

$$\text{Clorofila total} = \frac{(8.20 * A_{663}) + (20.2 * A_{645}) * V}{1000 * P}$$

Donde:

A = Absorbancia, los subíndices indican la longitud de onda (en nm)

V= Volumen aforado (mL)

P= Peso de la muestra (g)

1000= Factor de conversión

La concentración se expresa en: mg g⁻¹ PMF

2.2.4.3.2. Azúcares totales en hojas

Se determinó por el método descrito por Southgate (1976). A un gramo de tejido vegetal finamente picado (previamente almacenado a -80 °C) se le agregan 50 mL de etanol al 80%, posteriormente se llevó a ebullición en una plancha caliente, se retiró, se filtró y se aforó a 20 mL. Se tomó un mL de la solución y se evaporó en baño de agua caliente; posteriormente se diluyó en 20 mL de agua destilada. Para la lectura se tomó 1 mL de la muestra, se agregaron 2 mL de agua destilada y 6 mL de solución de antrona en ácido sulfúrico; se colocaron 3 min en baño de agua caliente y posteriormente se realizó la lectura. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV, Madison, WI 53711, USA). Se utilizó sacarosa como estándar para elaborar la curva estándar.

2.2.4.3.3. Aminoácidos libres totales

Capítulo 2

Se realizó la extracción etanólica 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).

2.2.4.3.4. Proteínas solubles totales

Se realizó una extracción de acuerdo a lo descrito por Höfner *et al.* (1989). La cuantificación se realizó empleando la solución de Bradford (1976) y utilizando albúmina de suero bovino como proteína estándar; posteriormente se tomó lectura a las muestras en un espectrofotómetro (Thermo Fisher Scientific, Genesys 10 UV, Madison, WI 53711, USA) a una longitud de onda de 640 nm.

2.2.4.4. Concentración nutrimental

Se utilizó material vegetal secado en la estufa y finamente molido, se realizó el análisis de N total empleando el método Semimicro-Kjeldahl descrito por Bremner, 1965. Las determinaciones de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B se realizaron mediante digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). A los extractos obtenidos se les tomó lectura en un equipo de espectrometría de emisión e inducción por plasma (ICP-VARIAN 725-ES).

2.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlet para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$ %), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

Capítulo 2

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Indicadores agronómicos

2.3.1.1. Peso fresco de vástago, bola y volumen de raíz

El peso fresco de vástago, bola y volumen de raíz en lechuga no fueron afectados significativamente por los tratamientos evaluados, se observó que mientras se mantuvo el nivel de Pi en suficiencia el peso fresco y volumen de raíz no disminuyeron significativamente al incrementar la concentración de Phi en la solución nutritiva (Cuadro 2). En estudios realizados en espinaca, apio, espinaca japonesa (Komatsuna) y lechuga, para evaluar relaciones fosfato-fosfito, se encontró que a medida que se incrementó la concentración de Phi, el crecimiento de las plantas disminuyó (Thao y Yamakawa, 2008; Thao *et al.*, 2008a, 2008b), lo que difiere con los resultados obtenidos en lechuga en nuestro experimento.

Cuadro 2. Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de lechuga cv. Climax con aplicaciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol_c m⁻³)	Volumen de raíz (cm³ planta⁻¹)	Bola (g planta⁻¹ PF^x)	Vástago (g planta⁻¹ PF)
0.00	37.75 a ^z	355.75 a	686.58 a
0.25	34.50 a	366.44 a	695.97 a
0.50	33.50 a	384.34 a	665.54 a
DHS ^y	10.59	38.36	57.93
Pr>F	0.5800	0.1991	0.9082

^zValores con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

2.3.1.2. Peso seco de bola y raíz

El peso seco de bola y de raíces de lechuga, no fue significativamente afectado por la adición de Phi a la solución nutritiva (Cuadro 3) ($p=0.61$ y $p=0.30$ respectivamente).

Capítulo 2

Cuadro 3. Acumulación de biomasa en raíz y bola de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito a la solución nutritiva.

Fosfito (mol_c m⁻³)	Raíz (g planta⁻¹ PS^x)	Bola (g planta⁻¹ PS)
0.00	1.83 a ^z	20.23 a
0.25	1.78 a	19.40 a
0.50	1.53 a	14.08 a
DHS ^y	0.87	11.27
Pr>F	0.6072	0.3027

^zValores con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Thao *et al.* (2009) encontraron en lechuga que al adicionar Phi y Pi (en niveles de suficiencia) a la solución nutritiva en plantas sanas, no existió efecto positivo de Phi sobre el crecimiento de las plantas. Bajo un nivel de suficiencia de P en el cultivo de fresa, no hubo efectos en el peso seco de vástago por la adición de Phi (Estrada-Ortiz *et al.*, 2012). Los resultados anteriores concuerdan con los obtenidos en el presente experimento.

2.3.2. Indicadores de calidad

2.3.2.1. Actividad antioxidante total

En lechuga se observó que en el minuto 60 de incubación, la actividad antioxidante se incrementó marcadamente con respecto al minuto 15 y 30 (Figura 1). Se observó también que en los minutos de incubación 15 y 30 la mayor actividad antioxidante se registró al adicionar 0.25 mol_c m⁻³ de Phi vía raíz (15 min, $p=0.0011$; 30 min, $p=0.0098$) y en el minuto 60 se observó que una mayor concentración de Phi vía raíz (0.50 mol_c m⁻³), favoreció el incremento de la actividad antioxidante, sin haber diferencias

Capítulo 2

estadísticas con la adición de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi vía raíz. Lo cual nos indica que el incremento en la actividad antioxidante es una respuesta fisiológica al estrés provocado por Phi en la planta de lechuga.

Un caso similar pero con diferentes agentes de estrés es reportado por Eraslan *et al.* (2007), ellos estudiaron tratamientos de estrés en lechuga causados por salinidad (40 mM), boro ($300 \mu\text{M}$) y su combinación, encontrando un incremento en el radical H_2O_2 (peróxido de hidrógeno) por efecto de los tratamientos con respecto al testigo, principalmente en la combinación salinidad con boro, pero de la misma manera encontraron un incremento en la actividad de las enzimas superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ascorbato peroxidasa (APX), por lo que ante la presencia de radicales libres estas enzimas realizaron una rápida detoxificación. La enzima SOD reacciona con superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) formando H_2O_2 (Bowler *et al.*, 1992) y en ausencia de enzimas como CAT y APX, H_2O_2 se acumula en los tejidos en grandes cantidades. La APX reduce al H_2O_2 a agua a través de la ruta Halliwell-Asada (Foyer y Halliwell, 1976).

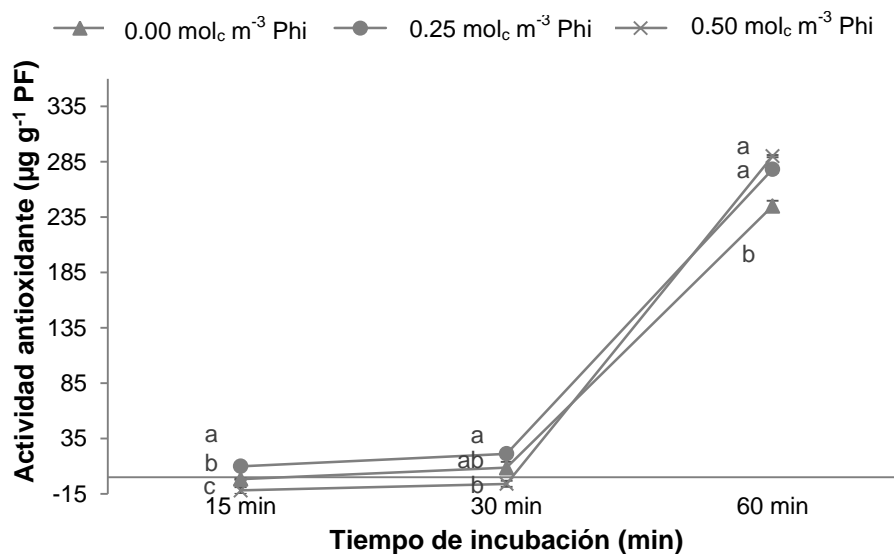


Figura 1. Actividad antioxidante total determinada por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones

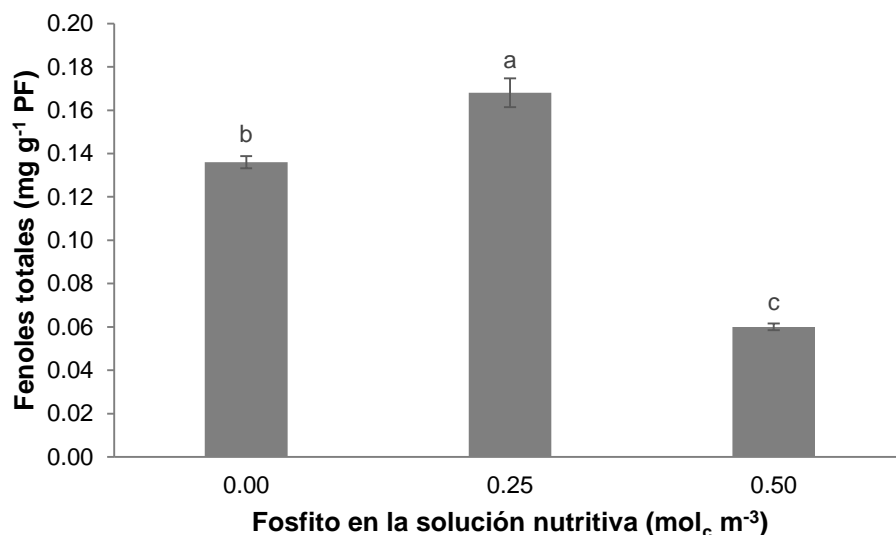
Capítulo 2

de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas en cada tiempo de evaluación son estadísticamente diferentes (Tukey, 0,05). (15, $p=0.0011$; 30, $p=0.0098$; 60, $p=0.0004$). PF=peso fresco.

2.3.2.2. Fenoles totales

Se observó que el mejor tratamiento fue con $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva, observándose un incremento de 23.5% con respecto al testigo, también fue claro que al agregar Phi a una concentración de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ se presentó una disminución de fenoles totales del 56% con respecto al testigo, en hojas de lechuga (Figura 2).

Kim *et al.* (2007) realizaron aplicaciones de tratamientos con metil jasmonato en la solución nutritiva de 0.05, 0.1, 0.25 y 0.5 mM en el cultivo de lechuga y encontraron que utilizando como fuente de estrés al metil jasmonato lograron incrementar la concentración de compuestos fenólicos totales, particularmente señalan que al adicionar 0.5 mM de metil jasmonato se tuvo un incremento de 32.6% de fenoles totales con respecto al testigo.



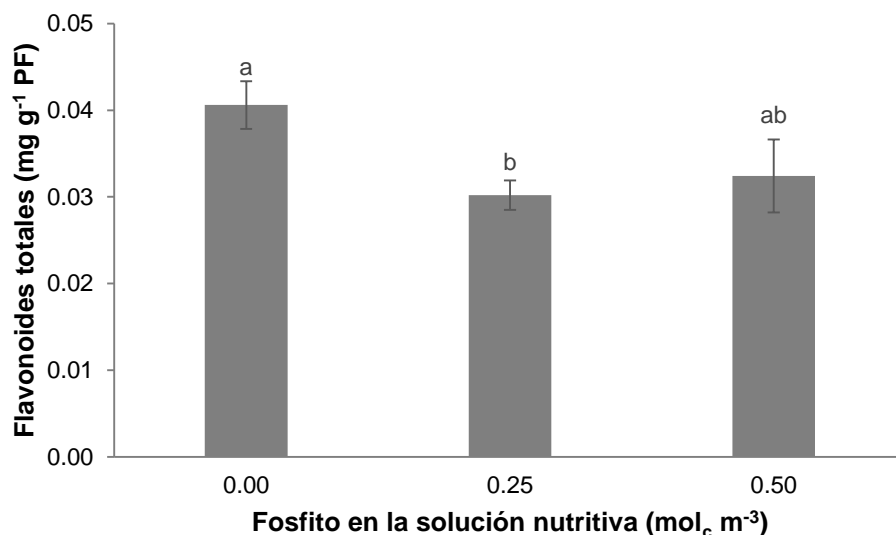
Capítulo 2

Figura 2. Concentración de fenoles totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey 0,05). ($p=0.0001$). PF=peso fresco.

En un estudio posterior Kim *et al.* (2008) investigaron el efecto del estrés salino en el incremento de compuestos fenólicos en lechuga suministrando tratamientos cortos de dos días antes de la cosecha (0, 50, 100, 500 y 1000 mM de NaCl) y tratamientos largos durante 15 días antes de la cosecha (0, 5, 50, 100 y 200 mM de NaCl) y no encontraron resultados positivos, encontrando una disminución entre 18 y 25 % con los tratamientos más concentrados (100-1000 mM de NaCl).

2.3.2.3. Flavonoides totales

Al aplicar Phi vía raíz en lechuga se observó una disminución de flavonoides como se observa en la Figura 3, pudiéndose observar una concentración superior de flavonoides en el testigo, siendo superior estadísticamente al tratamiento con $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas del testigo con el tratamiento de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ (Figura 3).



Capítulo 2

Figura 3. Concentración de flavonoides totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey 0,05). ($p=0.0478$). PF=peso fresco.

Bahorun *et al.* (2004) reportan una concentración de flavonoides totales de $87\mu\text{g g}^{-1}$ PF utilizando como estándar quercetina en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L. var. Mignonette). Por otro lado DuPont *et al.* (2000) cuantificaron los flavonoides de ocho variedades de lechuga: Iceberg, Green batavia, Cos remus, Green salad bowl, Green oak leaf, Red oak leaf, Lollo biondo y Lollo rosso, encontraron concentraciones de 0.3, 0.7, 9.6, 19.9, 32.9, 76.2, 95.7 y $87\mu\text{g g}^{-1}$ PF respectivamente, por lo que dicha concentración de flavonoides totales, se atribuye a la variedad y cultivar empleado en su determinación.

2.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico

De manera similar a lo observado en flavonoides totales, en la concentración de vitamina C se observó la misma tendencia, e incluso con mayor claridad, ya que a medida que se incrementó la concentración de Phi en la solución nutritiva, se observó una disminución en la concentración de ácido ascórbico.

Thao *et al.* (2009) no encontraron efecto de aplicaciones de fosfito en hojas de lechuga y señalan que no tiene efecto en la biosíntesis de ácido ascórbico; en nuestro experimento en cambio se observaron efectos negativos con aplicaciones en el mismo cultivo. Por otro lado Moor *et al.* (2009) encontraron que aplicaciones de Phi incrementaron la concentración de ácido ascórbico en frutos de fresa.

Capítulo 2

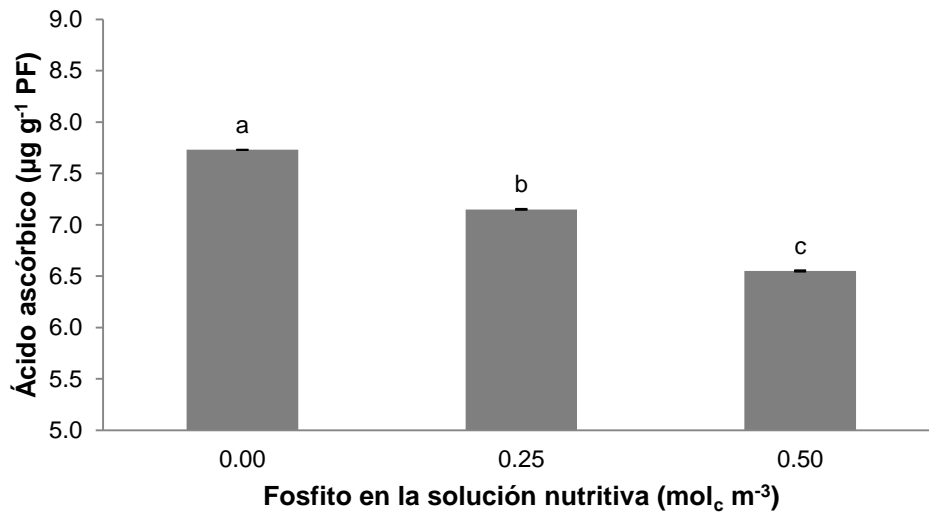


Figura 4. Concentración de ácido ascórbico en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

2.3.3. Indicadores fisiológicos

2.3.3.1. Concentración de clorofila a, b y total

La aplicación de Phi en la solución nutritiva incrementó la concentración de clorofila a, b y total en hojas (Figura 5). Al adicionar 0.25 mol_c m⁻³ de Phi a la solución nutritiva en lechuga, se observó un incremento de 26.3, 60 y 33.3% en clorofilas a, b y total, respectivamente, y al adicionar 0.50 mol_c m⁻³ de Phi a la solución nutritiva en lechuga, las clorofilas a, b y total se incrementaron 71.1, 100 y 77.1%, respectivamente, con relación al testigo.

Capítulo 2

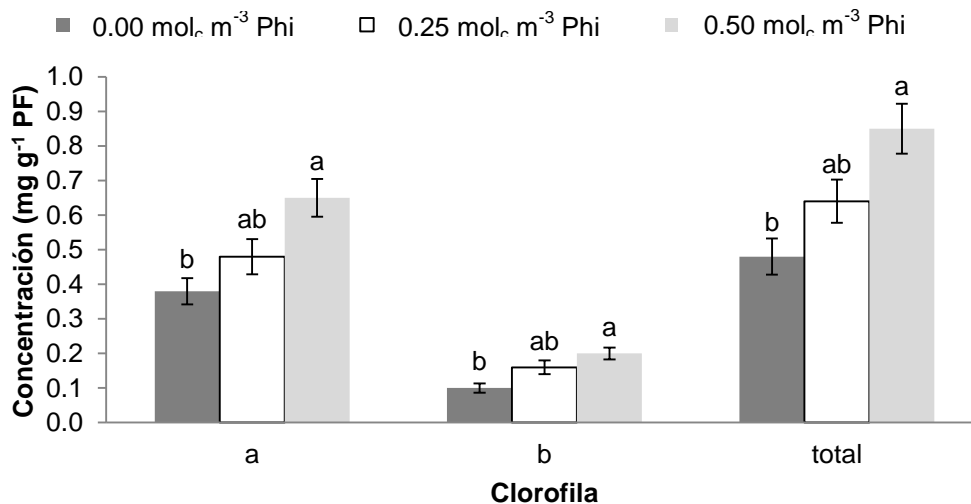


Figura 5. Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de lechuga v. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0095$; Chl b, $p=0.0095$; y Chl total, $p=0.0082$). PF= peso fresco.

El P es un nutriente que tiene influencia sobre la estabilidad de la molécula de clorofila (Bojović y Stojanović, 2006). El Phi reprime la señalización de insuficiencia de P, lo que lleva a cambios en la composición de la membrana fotosintética del cloroplasto (Kobayashi *et al.*, 2006). En concordancia, Estrada-Ortiz *et al.* (2011) encontraron un incremento en la concentración de clorofilas a, b y total al adicionar 30% de P en forma de Phi a la solución nutritiva en hojas de fresa en etapa de fructificación.

2.3.3.2. Azúcares totales en hojas

Se observó un incremento de un 72.5% en azúcares totales al adicionar 0.25 mol_c m⁻³ de Phi vía raíz con respecto al testigo. De la misma manera en la Figura 6 se puede observar que concentraciones superiores a 0.25 mol_c m⁻³ de Phi vía raíz pueden tener efectos negativos en la acumulación de azúcares totales en lechuga. Coincidiendo con estos resultados Estrada-Ortiz (2010) en el cultivo de fresa, observó que durante la etapa de floración se dio un incremento de azúcares totales en hojas adicionando el

Capítulo 2

20% de fósforo en forma de fosfito en la solución nutritiva y cantidades superiores tuvieron efectos negativos en su acumulación.

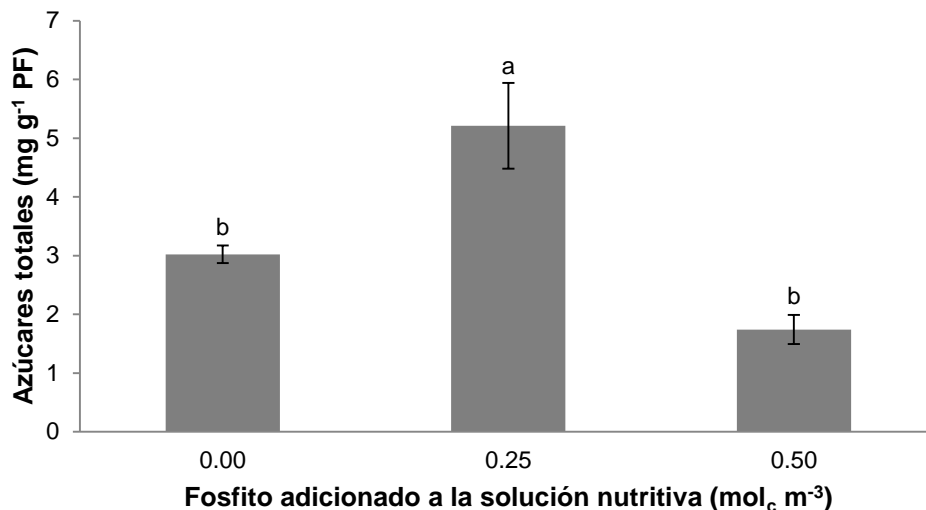


Figura 6. Concentración de azúcares totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0013$). PF= peso fresco.

Es bien sabido desde hace años, que los azúcares no funcionan únicamente como sustratos para sostener el crecimiento de tejidos demandantes, sino que, también son importantes moléculas señalizadoras que regulan el metabolismo de fuente y demanda (Roitsch, 1999). Por lo que tienen una fuerte influencia en el rendimiento de las plantas.

2.3.3.3. Aminoácidos libres totales

La adición de 0.25 mol_c m⁻³ de Phi incrementó significativamente la concentración de aminoácidos (Figura 7) con relación a los demás tratamientos ($p=0.0001$).

Capítulo 2

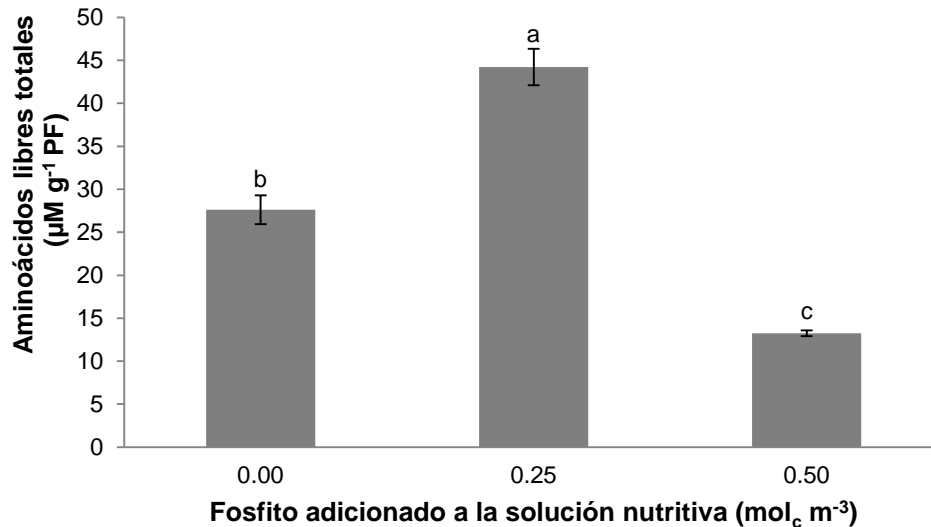


Figura 7. Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05) ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

Berkowitz *et al.* (2013) encontraron que Phi disminuye los niveles de aminoácidos como asparagina, aspartato, glutamato y serina. Asimismo, se ha observado una disminución de aminoácidos en condiciones de limitación fuerte de P en *Arabidopsis* (Morcuende *et al.*, 2007). Estos resultados coinciden con los aquí obtenidos cuando la concentración de Phi en la solución nutritiva se incrementó a 0.5 mol_c m⁻³ en lechuga. Estos resultados son importantes, dado que diversos estudios recientes han identificado una función primaria de metabolitos como los aminoácidos, en el establecimiento de la resistencia contra patógenos en plantas (Chanda *et al.*, 2011; Hwang *et al.*, 2011; Stuttmann *et al.*, 2011; Voll *et al.*, 2012), ya que al alterarse los niveles de metabolitos específicos en las rutas metabólicas de plantas pueden inducir resistencia a patógenos.

2.3.3.4. Proteínas solubles totales

La concentración de proteínas en hojas de lechuga siguió una tendencia similar a la mostrada en la concentración de aminoácidos libres totales en respuesta al suministro

Capítulo 2

de Phi. La concentración de proteína en hojas de lechuga fue superior en el tratamiento con $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi (Figura 8). Sin embargo, este tratamiento no fue estadísticamente diferente al testigo.

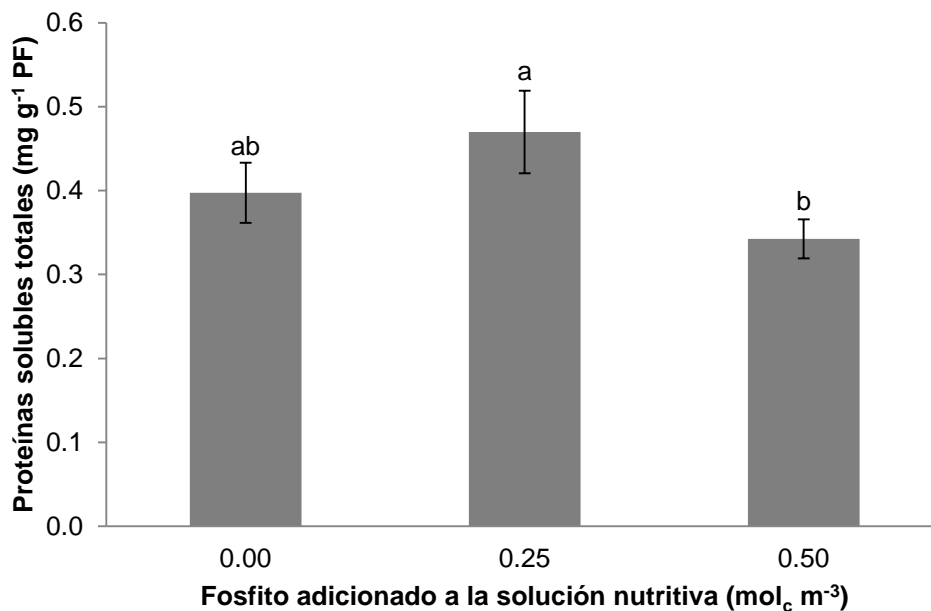


Figura 8. Concentración de proteínas solubles totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05) ($p=0.01$). PF= peso fresco.

Estrada-Ortiz *et al.* (2011) encontraron que concentraciones de 30% de P total en forma de Phi suministrado a la solución nutritiva, incrementó la concentración de proteínas en hojas de fresa y concentraciones mayores la disminuyen. Dicho comportamiento es muy similar a lo encontrado en el presente experimento ya que al adicionar $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi a la solución nutritiva se promovió una mayor concentración de proteínas en lechuga, en tanto que la concentración de Phi más alta evaluada ($0.5 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$) la redujo.

Capítulo 2

2.3.4. Concentración nutrimental

De manera general la concentración de macronutrientos fue mayor en raíz que en vástago, independientemente de los tratamientos con Phi, excepto en N, en donde la concentración en raíz y vástago fue muy similar (Cuadro 4). En vástago y raíz de lechuga, no se observó ningún efecto significativo en la concentración de N y S al adicionar diferentes concentraciones de Phi a la solución nutritiva, aunado a esto, en raíz no se presentaron diferencias significativas en la concentración de K y Mg.

Cuadro 4. Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Tejido	Phi (mol _c m ⁻³)	Concentración (g kg ⁻¹ PS ^x)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Vástago	0.00	26.40 a	5.14 b ^z	12.15 b	3.99 ab	1.91 b	1.86 a
	0.25	27.95 a	5.94 ab	14.68 ab	3.58 b	1.84 b	1.86 a
	0.50	26.80 a	7.75 a	17.27 a	5.11 a	2.50 a	2.53 a
	DHS ^y	6.49	2.10	4.38	1.32	0.57	0.68
	Pr>F	0.79	0.02	0.03	0.03	0.02	0.03
Raíz	0.00	26.65 a	13.24 b	13.84 a	12.21 ab	2.84 a	7.27 a
	0.25	27.35 a	16.32 a	14.18 a	13.73 a	2.89 a	7.71 a
	0.50	26.75 a	13.54 b	14.50 a	9.86 b	2.60 a	6.42 a
	DHS	3.47	2.73	2.01	3.46	0.34	2.87
	Pr>F	0.83	0.02	0.67	0.04	0.09	0.47

^zValores con letras distintas en cada macronutriente por órgano, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Por otro lado en el vástago se observó un incremento de la concentración de P, K, Ca y Mg al adicionar 0.50 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva, mientras que en raíz se observó un incremento en la concentración de P y Ca al adicionar 0.25 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva. Normalmente el P interactúa de manera positiva a manera de sinergismo con N, K y Mg y tal efecto positivo normalmente se asocia con un incremento en crecimiento y rendimiento de los cultivos (Fageria, 2009).

Capítulo 2

En micronutrientos se observó en vástago, que la concentración de Zn y Mn no tuvo variaciones estadísticamente significativas al adicional Phi a la solución nutritiva, mientras que en raíz no se observó ningún efecto en concentraciones de Cu y Mn (Cuadro 5). Por otro lado en vástago se observó una mayor acumulación de Fe, Cu, B y Na al adicionar 0.50 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva, mientras que en raíz se observó la mayor concentración de Fe, Zn y B al adicionar 0.25 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva; sin embargo, para Na se observó la mayor concentración en raíz sin la adición de Phi.

Cuadro 5. Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Tejido	Phi (mol _c m ⁻³)	Concentración (mg kg ⁻¹ PS ^x)					
		Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Vástago	0.00	76.63 ab	4.11 b	21.83 a	38.58 a	78.99 b	1490.20 b
	0.25	67.48 b ^z	5.43 ab	25.91 a	37.61 a	86.40 a	1552.20 b
	0.50	93.69 a	7.49 a	26.61 a	54.67 a	90.33 a	2025.00 a
	DHS ^y	17.78	2.81	11.35	19.50	6.34	365.72
	Pr>F	0.0078	0.0250	0.4767	0.0650	0.0023	0.0054
Raíz	0.00	7263 b	45.21 a	43.21 b	469.63 a	107.03 a	6134 a
	0.25	16666 a	52.97 a	56.12 a	664.34 a	104.06 a	5383.9 b
	0.50	10223 b	42.85 a	48.29 ab	557.52 a	93.53 b	5457.6 b
	DHS	5509.20	18.09	12.39	258.29 a	6.75	675.48
	Pr>F	0.0030	0.3103	0.0490	0.1600	0.0008	0.0237

^zValores con letras distintas en cada micronutriente por órgano, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Ávila *et al.* (2012) encontraron que bajo condiciones de suficiencia de P, al adicionar Phi en concentraciones altas en frijol (50 y 100 mg de Phi dm⁻³ de suelo seco), observaron un incremento de N, Ca, Mg, S, B, Zn, Cu, Mn en vástago, mencionan también que en las mismas condiciones pero suministrando bajas concentraciones de Phi (0, 3.125, 6.25, 12.5 y 25 mg de Phi dm⁻³ de suelo seco) no observaron incremento en concentración de nutrientes.

Capítulo 2

Por otro lado, Thao *et al.* (2009) observaron que bajo condiciones de suficiencia de Pi (0.3 mM) altas concentraciones de Phi (2.0 mM) en lechuga, no afectaron la concentración nutrimental en vástago, e incluso incrementaron la concentración de N; sin embargo, cuando se aplicó la misma concentración de Phi, pero bajo deficiencias de Pi (0.05, 0.1, 0.15 mM) encontraron que hubo un decremento en la concentración de nutrimentos como N, K, Ca, Mg, Fe, Mn y Zn.

2.4. CONCLUSIONES

Suministrar $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva, bajo condiciones de suficiencia de Phi en lechuga, incrementa la actividad antioxidante total, fenoles totales, azúcares totales, aminoácidos libres totales y proteínas solubles totales, sin afectar materia fresca y seca del cultivo de lechuga.

Adiciones de Phi en una concentración de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ en la solución nutritiva incrementa la concentración de clorofilas a, b y total, así como la concentración de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu y B en vástago.

Al adicionar Phi en la solución nutritiva causa un efecto negativo en la concentración de ácido ascórbico.

2.5. LITERATURA CITADA

- Alcántar G., G.; Sandoval V., M.; Sánchez G., P. 2007. Elementos esenciales. *In:* Alcántar G., G. y Trejo-Téllez, L. I. (eds.). Nutrición de cultivos. Colegio de Postgraduados. Editorial Mundi-Prensa. México. pp. 8-47.
- Alcántar, G. G.; Sandoval, V. M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación Especial No. 10 de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A. C., Chapingo, México.
- Ávila, F. W.; Faquin, V.; Ramos, S. J.; Pinheiro, G. L.; Marques, D. J.; da Silva, L. A. K.; Ferreira de Oliveira, N.C.; Ávila, P. A. 2012. Effects of phosphite and phosphate supply in a weathered tropical soil on biomass yield, phosphorus status and nutrient concentrations in common bean. *J. F. A. E.* 10(2): 312-317.

Capítulo 2

- Bahorun, T.; Luximon-Ramma, A.; Crozier, A.; Aruoma, O. I. 2004. Total phenol, flavonoid, proanthocyanidin and vitamin C levels and antioxidant activities of Mauritian vegetables. *J. S. F. A.* 84: 1553-1561.
- Berkowitz, O.; Jost, R.; Kollehn, D. O.; Fenske, R.; Finnegan, P. M.; O'Brien, P. A.; Hardy, G. E. St. J.; Lambers, H. 2013. Acclimation responses of *Arabidopsis thaliana* to sustained phosphite treatments. *Journal of Experimental Botany.* 64(6): 1731-1743.
- Bojović, B.; Stojanović, J. 2006. Some wheat leaf characteristics in dependence of fertilization. *K. J. S.* 28: 139-146.
- Boland, F. E. 1990. Fruits and fruit products. *In: Official methods of analysis of the association of analytical methods (AOAC).* Helrich, K. (ed.). 15th edition. VA. USA. pp. 910-911.
- Bowler, C.; Montagu, M. V.; Inze, D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43: 83-116.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-255.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. *In: Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9.* Black, C. A. (ed.). American Society of Agronomy. Madison, WI, USA. pp. 1149-1178.
- Carswell, M. C.; Grant, B. R.; Plaxton, W. C. 1997. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta.* 203: 67-74.
- Castañeda, C. B.; Ramos, LL. E.; Ibáñez, V. L. 2008. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horiz. Méd.* 8(1): 56-72.
- Chanda, B.; Xia, Y.; Mandal, M. K.; Yu, K.; Sekine, K. T.; Gao, Q. M.; Selote, D.; Hu, Y., Stromberg, A.; Navarre, D.; Kachroo, A.; Kachroo, P. 2011. Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature Genetics.* 43: 421-427.

Capítulo 2

- Chizzola, R.; Michistschs, H.; Franz, C. 2008. Antioxidative properties of thymus vulgaris leaves comparison of different extracts and essential oil chemotypes. J. Agric. Food Chem. 56: 6897-6904.
- Danova-Alt, R.; Dijkema, C.; De Waard, P.; Kock, M. 2008. Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells-kinetic and ^{31}P nuclear magnetic resonance studies. Plant, Cell Environ. 31: 1510-1521.
- DuPont, S.; Mondj, Z., Williamson, G.; Price, K. 2000. Effect of variety, processing, and storage on the flavonoid glycoside and composition of lettuce and chicory. J. Agric. Food Chem. 48: 3957-3964.
- Ebrahimzadeh, M. A.; Pourmorad, F.; Bekhradnia, A. R. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. A. J. B. 7(18): 3188-3192.
- Eraslan, F.; Inal, A.; Savasturk, O.; Gunes, A. 2007. Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. Scientia Hort. 114: 5-10.
- Estrada-Ortiz, E. 2010. Fosfito en la producción de fresa. Tesis de Maestría en Ciencias. Posgrado en Edafología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 104 p.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2011. Biochemical responses in strawberry plants supplying phosphorus in the form of phosphite. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 17: 129-138.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2012. Phosphite on growth and fruit quality in strawberry. Acta Hort. 947: 277-282.
- Fageria, N.K. 2008. The use of nutrients in crop plants. CRC Press. Boca Raton, FL, USA.
- Fageria, N. K. 2009. Phosphorus. *In*: The use of nutrients in crop plants. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, U.S.A. pp. 91-130.
- Foyer, C. H.; Hilliwell, B. 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplast: a proposed role in acid metabolism. Planta. 133: 21-25.

Capítulo 2

- 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.
- Ghasemi, K.; Ghasemi, Y.; Ebrahimzadeh, M. A. 2009. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. *Pak. J. Pharm. Sci.* 22(3):227-281.
- Hanrahan, G.; Salmassi, T. M.; Khachikian, C. S.; Förster, K. L. 2005. 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.* Harbone, J. B. (ed.). Chapman and Hall, London. pp. 205-207.
- 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.
- Hooper, L.; Cassidy, A. 2006. A review of the health care potencial of bioactive compounds. *J. S. F. A.* 86: 1805-1813.
- Hwang, I.S.; An, S.H.; Hwang, B.K. 2011. Pepper *asparagine synthetase 1 (CaAS1)* is required for plant nitrogen assimilation and defense responses to microbial pathogens. *The Plant Journal.* 67: 749-762.
- Ibarra, E. E.; Pacheco, S. M.; García M. R.; San Miguel, Ch. R.; Ramírez, V. G.; Soto, H. R. M. 2011. Actividad antioxidante de alcaloides de *Erythrina americana* Miller. *Rev. Fitotec. Mex.* 34(4): 241-246.
- Kim, H. J.; Fonseca, J. M.; Choi, J. H.; Kwon, D. Y. 2008. Salt in irrigation wáter affects the nutritional and visual properties of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 56(10): 3772-3776.
- Kim, H. J.; Fonseca, J. M.; Choi, J. H.; Kubota, C. 2007. Effect of methyl jasmonate on phenolic compounds and carotenoids of romaine lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.* 55(25): 10366-10372.

Capítulo 2

- King, M.; Reeve, W.; Van der Hoek, M. B.; Williams, N.; McComb, J.; O'Brien, P.A.; Hardy, G.E.St.J. 2010. Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. Mol. Genet. Genomics. 284: 425-435.
- Kobayashi, K.; Masuda, T.; Takamiya, K.; Ohta, H. 2006. Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. Plant J. 47: 238-248.
- Kuskoski, E. M.; Asuero, A. G.; Troncoso, A. M.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciênc. Tecnol. Aliment. 25(4): 726-732.
- Moor, U.; Põldma, O.; Tõnutare, T.; Karp, K.; Starast, M., Vool, E. 2009. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. Scientia Hort. 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.
- Morcuende, R.; Bari, R.; Gibon, Y.; Zheng, W.; Pant, B. R. D.; Sing, O. B.; Usadel, B. R.; Czechowski, T.; Udvardi, M. K.; Stitt, M.; Scheible, W. D. 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. Plant, Cell Environ. 30: 85-112.
- Nanyonga, S. K.; Opoku, A.R.; Lewu, F.B.; Oyedeji, O.O.; Singh, M.; Oyedeji, A. O. 2013. Antioxidant activity and cytotoxicity of the leaf and bark extracts of *Tarchonanthus camphorates*. Trop. J. Pharm. Res. 12 (3): 377-383.
- Nicolle, C.; Cardinault, N.; Gueux, E.; Jaffrelo, L.; Rock, E.; Mazur, A.; Amouroux, P.; Rémésy, C. 2004. Health effect of vegetable-based diet: Lettuce consumption improves cholesterol metabolism and antioxidant status in the rat. Clinical Nutrition. 23: 605-614.
- Ouimette, D.G.; Coffey, M.D. 1989. Phosphonate levels in avocado (*Persea americana*) seedlings and soil following treatment with fosetyl-Al or potassium phosphonate. Plant Disease. 73: 212-215.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. Current Opinión in Plant Biol. 2: 198-206.

Capítulo 2

- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schachtman, D. P.; Reid, R. J.; Ayling, S. M. 1998. Phosphorus uptake by plants: From soil to cell. *Plant Physiol.* 116: 447-453.
- Scherer R.; Teixeira G. H. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil method. *Food Chem.* 112: 654-658.
- Serafini, M.; Bugianesi, R.; Salicci, M.; Azzini, E.; Raguzzini, A.; Maiani, G. 2002. Effect of acute ingestión of fresh and stored lettuce (*Lactuca sativa*) on plasma total antioxidant capacity and antioxidant levels in human subjects. *B. J. N.* 88: 615-623.
- Southgate, D. A. 1976. Determination of food carbohydrates. Applied Science Publishers. LTD. London. 105 p.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution, *In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture.* The Netherlands. pp. 633-649.
- Steiner, A.; van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.*, 46: 862-863.
- Stuttman, J.; Hubberten, H. M.; Rietz, S.; Kaur, J.; Muskett, P.; Guerois, R.; Bednarek, P.; Hoefgen, R.; Parker, J. E. 2011. Perturbation of *Arabidopsis* amino acid metabolism causes incompatibility with the adapted biotrophic pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *Plant Cell.* 23: 2788-2803.
- Szeto, Y. T.; Kwok, T. C.; Benzie, I. F. 2004. Effects of a long-term vegetarian diet on biomarkers of antioxidant status and cardiovascular disease risk. *Nutrition.* 20: 863-866.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2008. Growth of celery (*Apium graveolens* var. dulce) as influenced by phosphite. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University,* 53: 375-378.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Sarr, P.S.; Myint, A. K. 2008a. Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth and phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 761-768.

Capítulo 2

- Thao, H.T.B.; Yamakawa, T.; Shibata, K.; Sarr, P.S.; Myint, A.K. 2008b. Growth response of Komatsuna (*Brassica rapa* var. *Peruviridis*) to root and foliar applications of phosphite. *Plant Soil*. 308: 1-10.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite-phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 172: 378-384.
- Theodorou, M. E.; Plaxton, W. C. 1993. Metabolic adaptations of plant respiration to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiol.* 101: 339-334.
- Voll, L. M.; Zell, M. B.; Engelsdorf, T.; Saur, A.; Wheeler, M. G.; Drincovich, M. F.; Weber, A. P.; Maurino, V. G. 2012. Loss of cytosolic NADP-malic enzyme 2 in *Arabidopsis thaliana* is associated with enhanced susceptibility to *Colletotrichum higginsianum*. *New Phytol.* 195: 189-2802.
- Waterman, P. G.; Mole, S. 1994. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell scientific publications, Oxford, UK. 238 p.

Capítulo 3

CAPÍTULO 3. APLICACIONES DE FOSFITO VÍA FOLIAR EN LECHUGA

3.1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) participa en varias rutas metabólicas y forma parte estructural de muchas macromoléculas. Paradójicamente, el P es uno de los nutrimentos que se encuentra menos disponible en el suelo por su baja solubilidad. La principal forma en la que se absorbe por las raíces es como fosfato (P_i , $H_2PO_4^-$ y HPO_4^{2-}), es transportado a las células y entonces entra en el metabolismo celular para ser incorporado en formas orgánicas (Plaxton, 1998).

El P_i es la forma de fósforo óptima para un adecuado crecimiento y desarrollo de las plantas; sin embargo, hay otra forma de P, el fosfito (Phi , $H_2PO_3^-$), al que comunmente se le ha catalogado que tiene acción fungicida, bioestimulante y como una posible fuente de P para la nutrición de las plantas (Deliopoulos *et al.*, 2010; McDonald *et al.*, 2001; Thao y Yamakawa, 2009).

Se ha reportado que el Phi es efectivo como fungicida, y ha sido utilizado para prevenir y controlar a *Phytophthora* en la raíz (Guest y Grant, 1991; Barret *et al.* 2003); su utilización puede incrementar el crecimiento o rendimiento de algunos cultivos como piña, aguacate, pimiento (Pegg *et al.*, 1985; Rohrbach y Schenck, 1985; Förster *et al.*, 1998) y cítricos (Orbovic *et al.*, 2008). También se han descrito otros efectos positivos de Phi en árboles de naranjo, en donde aplicaciones foliares durante el invierno se utilizaron para incrementar floración, sólidos solubles en jugo y rendimiento de fruto (Albrigo, 1999).

De acuerdo con Lovatt (1999), dos aplicaciones de fosfito de potasio incrementaron el valor comercial de naranja, al aumentar el tamaño tanto en largo como en ancho, y los sólidos solubles totales en jugo, en comparación con el testigo sin Phi . Orbovic *et al.* (2008) concluyeron que los citricultores pueden aplicar Phi , ya sea de manera foliar o en el suelo, tanto solo como combinado con P_i , debido al doble efecto que posee Phi , como agente antifúngico y como una fuente indirecta de P, ya que en aplicaciones en suelo puede haber una oxidación de Phi a P_i .

Capítulo 3

El resultado de las aplicaciones de Phi depende de varios factores, como el cultivo, la suficiencia de P, si es aplicado de manera foliar o en solución nutritiva, así como las concentraciones, por mencionar algunos. En esta investigación se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Phi vía foliar, sobre indicadores agronómicos, fisiológicos y de calidad, en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivar Climax.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante el verano de 2011, en un invernadero tipo cenital, localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue lechuga (*Lactuca sativa* L.) cultivar Climax, cultivada en un sistema hidropónico de raíz flotante. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento fueron 35.8, 5.2 y 18 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

3.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron cuatro tratamientos de Phi, los cuales fueron suministrado de manera foliar. Las concentraciones de Phi evaluadas fueron 0, 0.25, 0.50 y 0.75%. Los tratamientos fueron suministrados a los días 10 y 25 después del trasplante. El Phi se obtuvo a partir de ácido fosforoso grado analítico (Sigma-Aldrich). El pH de la solución foliar se mantuvo en 5, para ello se ajustó adicionando KOH 1 N. El agua utilizada en la aplicación de tratamientos fue destilada.

La unidad experimental se constituyó por seis plantas. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se utilizó diseño experimental completamente al azar.

3.2.3. Manejo del cultivo

El 12 de junio de 2011, se germinaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Climax, en una mezcla de turba con perlita (70:30 V/V) previamente humedecida y

Capítulo 3

colocada en charolas de plástico negras de 200 cavidades. Después de la siembra se cubrieron con un plástico negro para mantener en oscuridad y conservar la humedad hasta su emergencia.

Para la preparación de la solución nutritiva se empleó agua de pozo profundo, de la cual se obtuvo el análisis nutrimental (Cuadro 1) y de esta manera poder saber de que disposición nutrimental se partió para la elaboración de la solución nutritiva.

Cuadro 1. Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, (en mol_c m⁻³).

	N-NO₃⁻	P- H₂PO₄⁻	S- SO₄²⁻	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
mol_c m⁻³	0.294	0.062	0.186	0.100	1.356	2.527

Se regó con agua durante una semana, a fin de mantener la humedad. Después de ello se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 25% hasta el momento del trasplante, a fin de tener plantas vigorosas.

Antes del trasplante se construyó un sistema de raíz flotante, el cual fue realizado con madera por lo cual se cortó y clavó, para construir cajas de 80 x 40 x 20 (largo x ancho x profundidad) las cuales se forraron con plástico negro calibre 600 (cada caja fue considerada como una unidad experimental). El sistema de oxigenación se colocó pegado al fondo de las cajas, para lo cual se utilizó manguera de látex tipo espagueti, a la cual se conectó en los extremos una bomba de aire de dos salidas por cada 3 unidades experimentales lo cual permitió tener oxigenada la raíz y evitar su pudrición.

Cada unidad experimental tuvo como soporte placas de unicef, las cuales además sirvieron para mantener aislado al material vegetal de la solución nutritiva y evitar daños en tejido aéreo por quemaduras.

La solución nutritiva Steiner se preparó al 50% y se ajustó el pH a 5.5 y se colocaron los soportes de unicef. El 4 de julio (22 días después de la siembra) por la tarde se realizó el trasplante, para lo cual se utilizaron vasos de plástico no. 4 (118 mL)

Capítulo 3

previamente perforados en el fondo, en los cuales se colocó la plántula de lechuga, rellenando los espacios libres con agrolita.

Todos los tratamientos fueron nutridos con la misma solución y a medida que se desarrolló el cultivo, la solución se llevó al 100%, fue formulada tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984), siendo preparada con reactivos grado analítico, utilizando 1.06 g L^{-1} de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.30 g L^{-1} de KNO_3 , 0.14 g L^{-1} de KH_2PO_4 , 0.49 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.26 g L^{-1} de K_2SO_4 . La solución nutritiva se complementó con micronutrientes en las siguientes concentraciones: 1.6 mg L^{-1} de Mn, 0.11 mg L^{-1} de Cu, 0.86 mg L^{-1} de B, 0.023 mg L^{-1} de Zn, 0.048 mg L^{-1} de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L^{-1} a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970). El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5.5 y 5.8, el cual se ajustó adicionando H_2SO_4 al 97% y NaOH 1 N.

El sistema de oxigenación se programó con un temporizador, realizando catorce programaciones distribuidas de la siguiente manera: cada hora de 8:00 AM a 8:00 PM durante el día y a las 12:00 AM y 4:00 AM durante la noche teniendo una duración cada una de un minuto, dando un total de 14 minutos de oxigenación diarios durante todo el experimento.

El nivel de la solución nutritiva y el pH se ajustaron cada tercer día. Se realizó el cambio de la solución nutritiva cada 10 días, incrementando la concentración de la solución nutritiva Steiner de acuerdo al desarrollo del cultivo, aproximadamente a los 20 días después del trasplante se incremento al 75% y a los 40 días al 100%.

La cosecha se realizó cuando la lechuga alcanzó un tamaño comercial, (51 días después del trasplante). Al momento de la cosecha se realizaron muestreos de todos los tratamientos, congelando ocho plantas por tratamiento a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior análisis. De igual manera ocho plantas de lechuga por tratamiento se llevaron a una estufa de secado.

Capítulo 3

3.2.4. Variables evaluadas

Se evaluaron variables agronómicas (materia fresca de vástago, bola y volumen de raíz, materia seca de bola y raíz), indicadores de calidad (actividad antioxidante total método DPPH, fenoles totales, flavonoides totales, concentración de ácido ascórbico), e indicadores fisiológicos (concentración de clorofilas a, b y total, azúcares totales en hojas, aminoácidos libres totales, proteínas solubles totales, concentración nutrimental en hojas), de la misma manera como se describe en el Capítulo 2.

3.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlett para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$ %), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Indicadores agronómicos

3.3.1.1. Peso fresco de vástago bola y volumen de raíz

La aplicación de 0.25 % de Phi vía foliar incrementó el peso fresco de bola de lechuga y concentraciones superiores la disminuyeron; sin embargo, aplicaciones de Phi no tuvieron efectos estadísticos significativos en peso fresco de vástago y volumen de raíz (Cuadro 2).

Ávila *et al.* (2012) reportaron que aplicaciones foliares de Phi (40 μM) afectaron en forma negativa únicamente el crecimiento de vástago en frijol en la etapa de madurez fisiológica cuando se les suministró Pi de manera insuficiente (40 mg de P por dm^{-3} de suelo), también observaron que cuando se suministró Pi en suficiencia (200 mg de P

Capítulo 3

por dm^{-3} de suelo) no hubo efectos negativos de Phi. En el presente experimento hay concordancia con los trabajos anteriormente mencionados, ya que por un lado se observa que aplicaciones foliares de Phi no afectan volumen de raíz solo en vástago y dependiendo de la concentración foliar de Phi.

Cuadro 2. Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos de fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Volumen de raíz ($\text{cm}^3 \text{ planta}^{-1}$)	Bola ($\text{g planta}^{-1} \text{ PF}^x$)	Vástago ($\text{g planta}^{-1} \text{ PF}$)
0.00	37.75 a	355.75 ab^z	686.58 a
0.25	31.12 a	386.46 a	664.58 a
0.50	37.00 a	330.27 b	632.09 a
0.75	32.75 a	333.28 b	663.48 a
DHS ^y	13.45	45.08	55.24
Pr>F	0.4755	0.0058	0.0860

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

3.3.1.2. Peso seco de bola y raíz

Las aplicaciones foliares de Phi en el cultivo de lechuga no tuvieron efectos estadísticos significativos en peso seco de raíz y bola de lechuga, lo cual es positivo al no tener efectos negativos en materia seca (Cuadro 3).

Capítulo 3

Cuadro 3. Acumulación de materia seca en raíz y bola de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Raíz (g planta⁻¹ PS^x)	Bola (g planta⁻¹ PS)
0.00	1.83 a ^z	20.23 a
0.25	1.78 a	19.18 a
0.50	2.00 a	17.48 a
0.75	1.80 a	17.88 a
DHS ^y	0.83	11.98
Pr>F	0.8501	0.8986

^zValores con letras iguales en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Moor *et al.* (2009) encontraron que el fosfito no suprime ni promueve el crecimiento de plantas de fresa. Por su parte, Schroetter *et al.* (2006) encontraron que el peso de materia seca de plantas de maíz con deficiencias de P se vio fuertemente disminuido habiendo diferencias estadísticas significativas con aplicaciones de Phi, en comparación con el testigo y con las plantas tratadas con Pi; sin embargo, también registraron que en plantas de maíz con suficiencia de P no hubieron diferencias significativas al aplicar Phi, respecto al testigo y a las tratadas con Pi.

3.3.2. Indicadores de calidad

3.3.2.1. Actividad antioxidante total

En la actividad antioxidante a lo largo del periodo de incubación se observaron diferentes efectos. En los tiempos de incubación de 15 y 30 min, el tratamiento que obtuvo una mayor actividad antioxidante fue la aplicación foliar de 0.25% de Phi; sin embargo, al llegar a los 60 min de incubación la actividad antioxidante del testigo superó a los demás tratamientos (Figura 1).

Capítulo 3

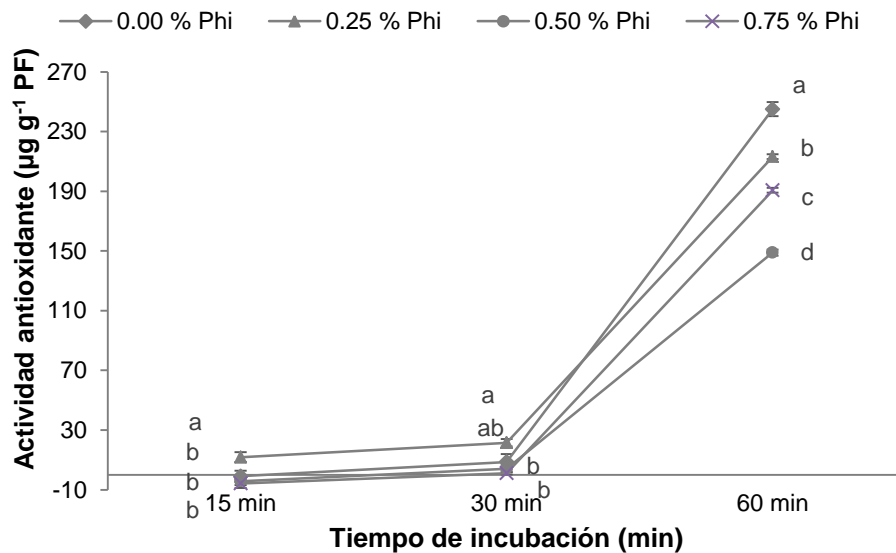


Figura 1. Actividad antioxidante total evaluada por el método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas en cada tiempo de evaluación son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.0024$; 30, $p=0.0231$; 60, $p=0.0001$). PF=peso fresco.

Ávila *et al.* (2011) evaluaron la actividad de la enzima guayacol peroxidasa y encontraron que las plantas tratadas con 644 μM de Pi tuvieron una actividad dos veces superior cuando se reemplazó un 25% de éste por Phi, también encontraron que plantas con 52 μM de Pi (bajo en P), los tratamientos con Phi incrementaron la actividad de la enzima en el cultivo de maíz. Estos resultados son coincidentes con los de nuestro experimento en lechuga, en el cual se observaron efectos positivos de Phi sobre la actividad antioxidante.

3.3.2.2. Fenoles totales

Se observó que con porcentajes de 0.25 y 0.50 de Phi vía foliar la concentración de fenoles totales disminuyó con respecto al testigo, sin embargo al asperjar 0.75 % de Phi en lechuga se observó un incremento que igualó estadísticamente al testigo. Por lo

Capítulo 3

que, no se observan ventajas de la aplicación de Phi vía foliar en lechuga en la concentración de fenoles totales (Figura 2).

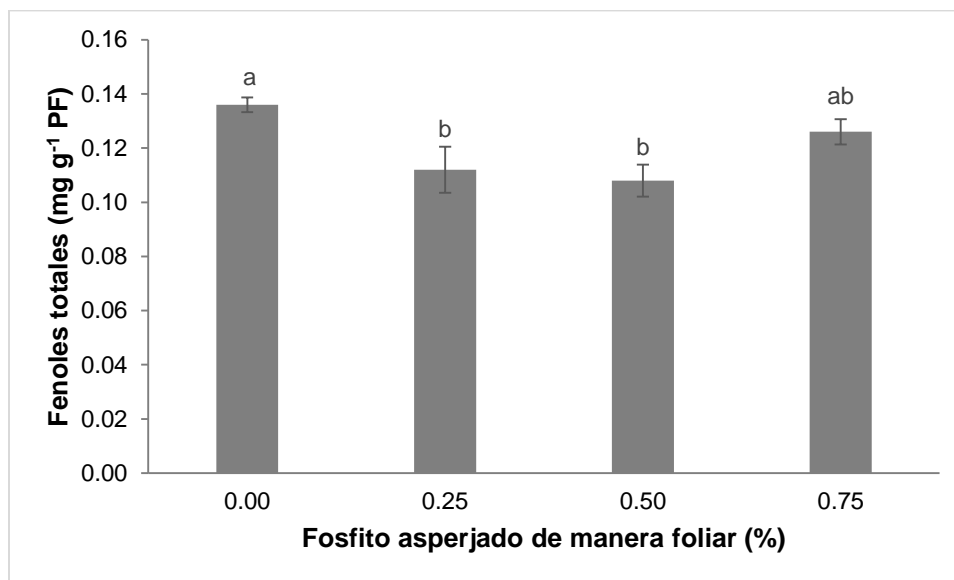


Figura 2. Concentración de fenoles totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0084$). PF=peso fresco.

Ávila *et al.* (2011) cuantificaron fenoles totales en maíz tratado con concentraciones de suficiencia de Pi (644 μ M) y niveles insuficientes de Pi (52 μ M) así también en otros tratamientos se mantuvieron las concentraciones pero se sustituyó una cuarta parte del Pi por Phi. Se encontró que la mayor concentración de fenoles totales se presentó al aplicar bajos niveles de Pi (52 μ M) y que la aplicación de Phi no modificó significativamente la concentración de fenoles totales. Por lo que hubo un comportamiento similar al presente experimento, solamente que en esta investigación solo se realizó esta evaluación bajo condiciones de suficiencia de P, con aplicaciones vía foliar de Phi.

3.3.2.3. Flavonoides totales

En lechuga tratada vía foliar con Phi, la concentración de flavonoides totales aumentó a medida que se incrementó la concentración de Phi en las soluciones foliares, aunque el

Capítulo 3

testigo también tuvo valores comparables con las concentraciones más altas de flavonoides totales (Figura 3).

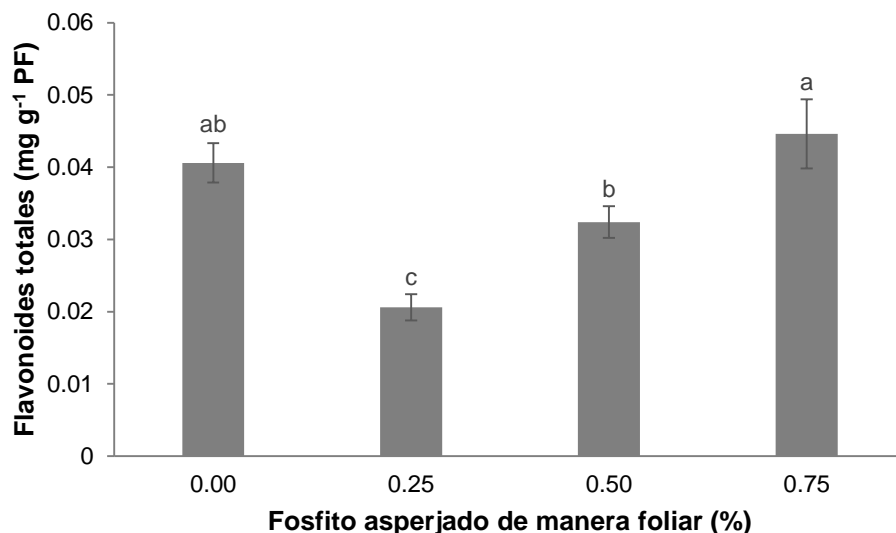


Figura 3. Concentración de flavonoides totales en hojas de lechuga en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0.0001$). PF=peso fresco.

En muchos de los casos un estrés en la planta trae consigo el incremento de flavonoides (Van Oosten *et al.*, 2013). Chalker-Scott (1999) mencionan que un estrés causado por sales en plantas de *Arabidopsis*, trae consigo un incremento de antocianinas y flavonoides, estas respuestas son coincidentes con las que muestran los resultados aquí obtenidos, ya que el Phi de alguna manera es una forma de estrés para la planta, la cual la hace reaccionar a éste, provocando un incremento en la concentración de flavonoides.

3.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico

Se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos para la variable ácido ascórbico en lechuga, apreciándose una respuesta negativa al asperjar Phi vía foliar, ya que a medida que se incrementa la concentración de Phi, la concentración de ácido ascórbico en hojas disminuyó (Figura 4).

Capítulo 3

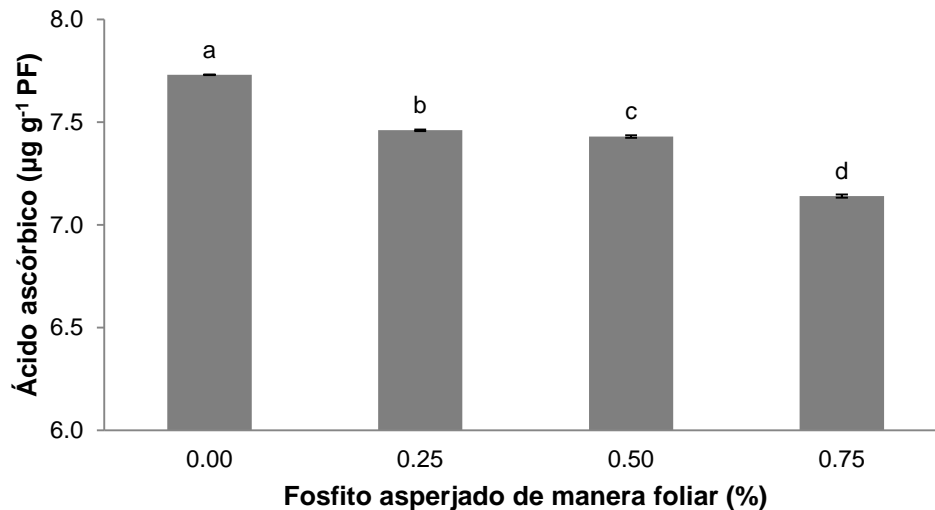


Figura 4. Concentración de ácido ascórbico en hojas de lechuga cv. Climax como respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

Moor *et al.* (2009) mencionan que aplicaciones de Phi en el cultivo de fresa incrementaron la concentración de ácido ascórbico en frutos de fresa. Por otro lado Estrada-Ortiz *et al.* (2010) reportaron que no hubo diferencias estadísticas significativas en concentración de ácido ascórbico de frutos de fresa con y sin aplicaciones de Phi en la solución nutritiva. En este experimento en el cultivo de lechuga, las aplicaciones de Phi redujeron la concentración de vitamina C, por lo que la respuesta de concentraciones de ácido ascórbico está muy ligada a los cultivos.

3.3.3. Indicadores fisiológicos

3.3.3.1. Concentración de clorofilas a, b y total

Aplicaciones foliares de Phi (0.25, 0.50 y 0.75 %) en lechuga promueven el incremento de la concentración de clorofilas a, b y total. Por ejemplo, aplicaciones foliares de 0.25 % de Phi incrementaron clorofila a, b y total en un 55.9, 77.8 y 56.8 % respectivamente, con respecto al testigo sin aplicaciones de Phi (Figura 5).

Capítulo 3

Estrada-Ortiz, *et al.* (2011) encontraron un incremento en la concentración de clorofilas a, b y total al adicionar 30% de P en forma de Phi a la solución nutritiva en hojas de fresa en etapa de fructificación. Lo cual es concordante con lo obtenido en el presente experimento.

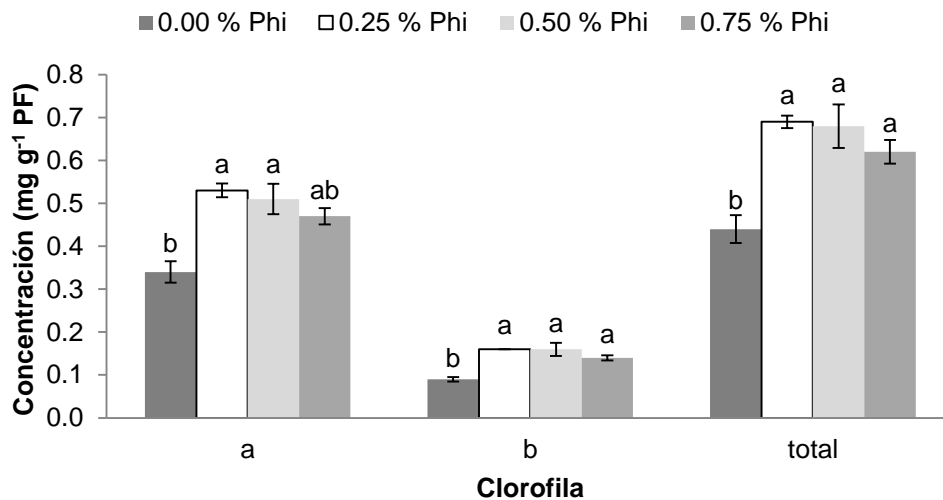


Figura 5. Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0082$; Chl b, $p=0.0026$; Chl total, $p=0.0058$). PF= peso fresco.

3.3.3.2. Azúcares totales en hojas

Los resultados mostrados en el Cuadro 4 indican que no hubo diferencias estadísticas significativas al asperjar de manera foliar Phi en plantas de lechuga. Sin embargo si observamos los números, la mayor concentración se observó al asperjar 0.25% de Phi vía foliar; esta respuesta es similar a la observada con la adición de Phi en la solución nutritiva en lechuga (Capítulo 2, Figura 6), donde aplicaciones de Phi a una concentración de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$, incrementó significativamente la concentración de azúcares totales.

Estrada-Ortiz *et al.* (2010), no encontraron variaciones estadísticas en la concentración de azúcares solubles totales en hojas de fresa en las cuales se realizaron aplicaciones

Capítulo 3

de Phi en la solución nutritiva con respecto al testigo. Por otro lado Constán-Aguilar *et al.* (2014) encontraron que aplicaciones de foliares de Phi en plantas de pepino deficientes en Pi, incrementaron la concentración de azúcares solubles.

Cuadro 4. Concentración de azúcares totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Azúcares totales en hojas de lechuga (mg g⁻¹ PF^x)
0.00	3.02 a ^z
0.25	4.29 a
0.50	3.51 a
0.75	2.41 a
DHS ^y	2.06
Pr>F	0.0992

^zValores con letras iguales son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

3.3.3.3. Aminoácidos libres totales

Las concentraciones de Phi vía foliar evaluadas 0.25 a 0.75 %), se relacionaron de manera positiva con la concentración de aminoácidos (Figura 6); empero, en plantas no tratadas con Phi éstas no fueron estadísticamente diferentes a las obtenidas con el tratamiento 0.75% de Phi.

Capítulo 3

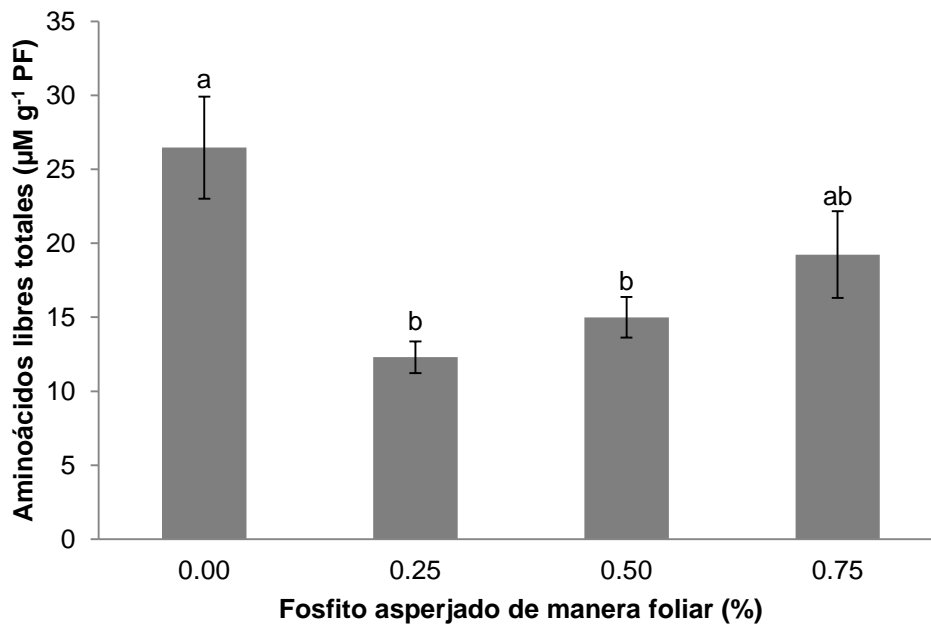


Figura 6. Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas en cada variable son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0004$). PF= peso fresco.

Berkowitz *et al.* (2013) encontraron en *Arabidopsis thaliana*, que Phi disminuye los niveles de aminoácidos como asparagina, aspartato, glutamato y serina.

3.3.3.4. Proteínas solubles totales

Al igual que para azúcares totales, las concentraciones de proteínas solubles totales no son diferentes entre los tratamientos evaluados (Cuadro 5).

Capítulo 3

Cuadro 5. Concentración de proteínas solubles totales en hojas de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Concentración de proteínas solubles totales (mg g⁻¹ PF^x)
0.00	0.41 a ^z
0.25	0.34 a
0.50	0.45 a
0.75	0.42 a
DHS ^y	0.13
Pr>F	0.1130

^zValores con letras iguales son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

3.3.4. Concentración nutrimental

La concentración de macro y micronutrientes fue mayor en raíz que en vástago, independientemente a los tratamientos foliares con Phi, excepto en N, en donde la concentración en raíz y vástago fue muy similar (Cuadros 6 y 7). En vástago y raíz de lechuga, no se observó ningún efecto significativo en concentración de macronutrientes al asperjar diferentes concentraciones de Phi vía foliar (Cuadro 6).

Capítulo 3

Cuadro 6. Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Tejido	Phi (%)	Concentración (g kg ⁻¹ PS ^x)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Vástago	0.00	26.40 a ^z	5.14 a	12.15 a	3.99 a	1.91 a	1.86 a
	0.25	25.23 a	6.00 a	14.63 a	4.14 a	2.08 a	2.09 a
	0.50	25.88 a	5.61 a	11.58 a	3.68 a	1.74 a	1.77 a
	0.75	23.70 a	5.51 a	11.46 a	3.96 a	1.85 a	1.81 a
	DHS	5.31	2.51	5.68	1.54	0.69	0.80
	Pr>F	0.49	0.80	0.35	0.84	0.53	0.66
Raíz	0.00	26.65 a	13.24 a	13.84 a	12.21 a	2.84 a	7.27 a
	0.25	26.73 a	10.43 a	13.16 a	10.87 a	2.67 a	7.60 a
	0.50	27.48 a	12.23 a	14.66 a	10.48 a	2.82 a	7.30 a
	0.75	26.48 a	12.01 a	14.04 a	10.77 a	2.84 a	7.35 a
	DHS ^y	3.29	2.98	2.28	2.26	0.44	4.07
	Pr>F	0.81	0.09	0.32	0.16	0.64	0.99

^zValores con mismas letras en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Se observó en vástago, que la concentración de Fe, Cu, Zn, Mn y B no tuvieron variaciones estadísticamente significativas al asperjar Phi vía foliar, mientras que en raíz no se observó ningún efecto en concentraciones de Fe, Cu, Zn, Mn y Na (Cuadro 7). Por otro lado, en vástago se observó una mayor acumulación de Na al asperjar 0.25% de Phi vía foliar, mientras que en raíz se observó la mayor concentración de B al asperjar 0.50 y 0.75% de Phi foliar.

Capítulo 3

Cuadro 7. Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Tejido	Phi (mol _c m ⁻³)	Concentración (mg kg ⁻¹ PS ^x)					
		Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Vástago	0.00	76.63 a ^z	4.11 a	21.83 a	38.59 a	78.99 a	1490.20 b
	0.25	74.97 a	4.83 a	22.19 a	38.10 a	85.39 a	2093.40 a
	0.50	68.46 a	4.81 a	22.32 a	32.86 a	76.56 a	1649.70 ab
	0.75	65.87 a	4.17 a	22.76 a	32.80 a	83.05 a	1871.90 ab
	DHS	21.83	3.74	14.65	21.89	9.58	448.83
	Pr>F	0.44	0.90	1.00	0.77	0.07	0.009
Raíz	0.00	7263.00 a	45.21 a	43.21 a	469.63 a	107.03 ab	6134.00 a
	0.25	6770.00 a	35.92 a	35.53 a	404.58 a	96.35 b	5954.70 a
	0.50	8746.00 a	39.08 a	45.43 a	354.24 a	110.36 a	6225.20 a
	0.75	8022.00 a	39.00 a	42.50 a	419.61 a	109.50 a	6221.10 a
	DHS ^y	4636.90	14.90	10.86	140.82	12.97	992.35
	Pr>F	0.62	0.35	0.09	0.17	0.03	0.83

^zValores con distintas letras en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Ávila *et al.* (2012) encontraron que bajo condiciones de suficiencia de P, al adicionar Phi en concentraciones altas en frijol (50 y 100 mg de Phi dm⁻³ de suelo seco), observaron un incremento de N, Ca, Mg, S, B, Zn, Cu, Mn en vástago, mencionan también que en las mismas condiciones pero suministrando bajas concentraciones de Phi (0, 3.125, 6.25, 12.5 y 25 mg de Phi dm⁻³ de suelo seco) no observaron incremento en concentración de nutrimentos.

3.4. CONCLUSIONES

Aplicaciones foliares de 0.25% Phi en lechuga, incrementan el peso de materia fresca de bola, de la misma manera incrementa la actividad antioxidante de hojas de lechuga al medirla en tiempos de incubación de 15 y 30 min.

Capítulo 3

La aplicación de Phi foliar en lechuga incrementa la concentración de clorofila a, b y total, obteniendo mejores resultados al asperjar 0.25% de Phi.

Al aplicar 0.75% de Phi vía foliar en lechuga se incrementa la concentración de flavonoides totales.

Las aplicaciones foliares de Phi tienen un efecto negativo en la concentración de ácido ascórbico en hojas de lechuga.

3.5. LITERATURA CITADA

Albrigo, L. G. 1999. Effects of foliar applications of urea or Nutriphite on flowering and yields of Valencia orange trees. Proc. Fla. State Hort. Soc. 112: 1-4.

Ávila, F. W.; Faquin, V.; Lopes, A.J.; Marques, D. J.; Ribeiro, J. P. M.; da Silva, L. A. K.; Junio, R. S.; Pereira, B. D. 2011. Phosphite supply affects phosphorus nutrition and biochemical responses in maize plants. Aus. J. Crop. Sci. 5(6): 646-653.

Ávila, F. W.; Faquin, V.; Ramos, S. J.; Pinheiro, G. L.; Marques, D. J.; da Silva, L. A. K.; Ferreira de Oliveira, N.C.; Ávila, P. A. 2012. Effects of phosphite and phosphate supply in a weathered tropical soil on biomass yield, phosphorus status and nutrient concentrations in common bean. J. Food, Agric. Environ. 10(2): 312-317.

Barret, S. R.; Shearer, B. L.; Hardy, G. E. S. J. 2003. Efficacy of phosphite applied after inoculation on the colonization of *Banksia brownii* stems by *Phytophthora cinnamomi*. Aust. J. Plant Pathol. 32: 1-7.

Berkowitz, O.; Jost, R.; Kollehn, D. O.; Fenske, R.; Finnegan, P. M.; O'Brien, P. A.; Hardy, G. E. St. J.; Lambers, H. 2013. Acclimation responses of *Arabidopsis thaliana* to sustained phosphite treatments. J. Exp. Bot. 64(6): 1731-1743.

Chalker-Scott, L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. Photochem Photobiol. 70: 1-9.

Constán-Aguilar, C.; Sánchez-Rodríguez, E.; Rubio-Wilhelmi, M. M.; Camacho, M. A.; Romero, L.; Ruiz, J. M.; Blasco, B. 2014. Physiological and nutritional evaluation

Capítulo 3

- of the application of phosphite as a phosphorus source in cucumber plants. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 45: 204-222.
- Deliopoulos, T.; Kettlewell, P. S.; Hare, M. C. 2010. Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. *Crop Prot.* 29: 1059-1075.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2010. Fosfito en la producción de fresa. Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestría.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2011. Biochemical responses in strawberry plants supplying phosphorus in the form of phosphite. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 17: 129-138.
- Förster, H.; Adaskaveg, J. E.; Kim, D. H.; Stanghellini, M. E. 1998. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of peppers to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Dis.* 82: 1165-1170.
- Guest, D.; Grant, B. 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biol. Rev.* 66: 159-187.
- Lovatt, C. J. 1999. Timing citrus and avocado foliar nutrient applications to increase fruit set and size. *Hort. Technol.* 9: 607-612.
- McDonald, A. E.; Grant, R. G.; Plaxton, W. C. 2001. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *J. Plant Nutr.* 24: 1505-1519.
- Moor, U.; Põldma, O.; Tõnutare, 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.
- Orbovic, V.; Syvertsen, J. P.; Bright, D.; Van Clief, D. L.; Graham, J. H. 2008. Growth of citrus seedlings and their susceptibility to *Phytophthora* root rot are affected by PO₃ and PO₄ sources of phosphorus. *J. Plant Nutr.* 31: 774-787.
- Pegg, K. G.; Whiley, A. W.; Saranah, J. B.; Glass, R. J. 1985. Control of *Phytophthora* root rot of avocado with phosphorus acid. *Aust. J. Plant Pathol.* 14: 25-29.

Capítulo 3

- Plaxton, W. C. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. *In*: J.P. Lynch and J. Deikman (eds.), Phosphorous in plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic and ecosystem processes. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville (MD), USA. pp. 229-241.
- Rohrbach, K. G.; Schenck, S. 1985. Control of pineapple heart rot, caused by *Phytophthora parasitica* and *P. cinnamoni*, with metalaxyl, fosetyl Al and phosphorous acid. *Plant Dis.* 69: 320-323.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schroetter, S.; Angeles-Wedler, D.; Kreuzig, R.; Schnug, E. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschung Völkenrode.* 56: 87-99.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution. *In*: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. pp. 633-649.
- Steiner, A., van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.* 46: 862-863.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2009. Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *Soil Sci. Plant Nutr.* 55: 228-234.
- Van Oosten, M. J.; Sharkhuu, A.; Batelli, G. Bressan, R. A.; Maggio, A. 2013. The *Arabidopsis thaliana* mutant *air1* implicates SOS3 in the regulation of anthocyanins under salt stress. *Plant Mol. Biol.* 83: 405-415.

CAPÍTULO 4. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE ACELGA A APLICACIONES EN LA RAÍZ DE FOSFITO

4.1. INTRODUCCIÓN

El anión fosfato (P_i , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} y PO_4^{3-}) es la mayor forma de fósforo utilizada por las plantas para un adecuado crecimiento y desarrollo (Ribot *et al.*, 2008). Mientras que el anión fosfito (Phi , $H_2PO_3^-$ y HPO_3^{2-}), es efectivo en el control de algunas enfermedades importantes en las plantas (Wilkinson *et al.*, 2001; Shearer y Fairman, 2007; Orbović *et al.*, 2008; Cook *et al.*, 2009) causadas principalmente por Oomicetos.

En el mercado, muchos de los productos a base de Phi son ofrecidos como bioestimulantes de plantas, elicitores de defensas, o como fertilizantes foliares, o de aplicación en fertirriego (Thao y Yamakawa, 2009). Sin embargo ya también se ha reportado que el Phi no es una fuente de P que pueda ser metabolizada por la planta (Schoroetter *et al.*, 2006; Thao *et al.*, 2008b), aunque las sales de Phi son comúnmente recomendadas como fuente de fertilizante principalmente por contener otros nutrimentos como potasio, amonio, calcio o magnesio. Hay estudios en donde se indica que el Phi causa un estrés en plantas con suficiencia de P_i , lo cual ocasiona respuestas positivas en plantas (Schoroetter *et al.*, 2006; Thao *et al.*, 2009; Moor *et al.*, 2009).

También se ha observado que los resultados de tratamientos con Phi en diferentes cultivos dependen tanto de la concentración de Phi como de la susceptibilidad del cultivo a estrés. Debido a ello es importante evaluar en diferentes cultivos sobre todo como acelga, ya que es un cultivo de consumo en fresco y que tiene un alto potencial en producción de metabolitos antioxidantes que pueden prevenir enfermedades degenerativas como el cáncer.

Con base en lo mencionado anteriormente en esta investigación se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Phi adicionadas a la solución nutritiva, sobre indicadores agronómicos, fisiológicos y de calidad, en el cultivo de acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) cv. Fordhook Giant.

Capítulo 4

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante el verano de 2011, en un invernadero tipo cenital, localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) cv. Fordhook Giant, cultivada en un sistema hidropónico de raíz flotante con oxigenación. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento fueron 35.8, 5.2 y 18 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

4.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron tres diferentes soluciones nutritivas. Las soluciones se formularon tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984) al 100% preparada con reactivos grado analítico, utilizando 1.06 g L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ 4H₂O; 0.30 g L⁻¹ de KNO₃; 0.14 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0.49 g L⁻¹ de MgSO₄ 7H₂O y 0.26 g L⁻¹ de K₂SO₄. La solución nutritiva se complementó con micronutrientes en las siguientes concentraciones: 1.6 mg L⁻¹ de Mn; 0.11 mg L⁻¹ de Cu; 0.86 mg L⁻¹ de B; 0.023 mg L⁻¹ de Zn y 0.048 mg L⁻¹ de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L⁻¹ a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970).

Cuadro 1. Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes (en mol_c m⁻³).

	N-NO₃⁻	P- H₂PO₄⁻	S- SO₄²⁻	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
mol_c m⁻³	0.294	0.062	0.186	0.100	1.356	2.527

Para la preparación de la solución nutritiva se empleó agua de pozo profundo, de la cual se obtuvo el análisis nutrimental (Cuadro 1) y de esta manera poder saber de qué disposición nutrimental se partió para la elaboración de la solución nutritiva.

Capítulo 4

La concentración de Phi en la solución fue evaluada a las siguientes concentraciones: 0, 0.25 y 0.5 mol_c m⁻³. El Phi se obtuvo a partir de ácido fosforoso grado analítico (Sigma-Aldrich). El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5.5 y 5.8 ya que se considera un pH óptimo para la disponibilidad de Phi (Hanrahan *et al.*, 2005), el cual se ajustó adicionando H₂SO₄ al 97% y NaOH 1 N.

La unidad experimental se constituyó por 6 plantas. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se utilizó diseño experimental completamente al azar.

4.2.3. Manejo del cultivo

Previamente a la instalación del experimento, el 12 de junio de 2011, se pusieron a germinar semillas de acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) cv. Fordhook Giant, en una mezcla de turba con perlita (70:30 V/V) previamente humedecida y colocada en charolas de plástico negras de 200 cavidades. Después de la siembra, las charolas se cubrieron con un plástico negro para mantener en oscuridad y conservar la humedad hasta su emergencia.

Posteriormente se realizaron riegos con agua durante una semana, a fin de mantener la humedad. Después de ello se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 25% hasta el momento del trasplante, a fin de tener plantas vigorosas.

Previo al trasplante se construyó un sistema de raíz flotante, el cual fue realizado con madera por lo cual se cortó y clavó, para construir cajas de 80 x 40 x 20 (largo x ancho x profundidad) las cuales se forraron con plástico negro calibre 600 (cada caja fue considerada como una unidad experimental). El sistema de oxigenación se colocó pegado al fondo de las cajas, para lo cual se utilizó manguera de látex tipo espagueti, a la cual se conectó en los extremos una bomba de aire de dos salidas por cada 3 unidades experimentales lo cual permitió tener oxigenada la raíz.

Cada unidad experimental tuvo como soporte placas de unicel, las cuales además sirvieron para mantener aislado al material vegetal de la solución nutritiva y evitar daños en tejido aéreo por quemaduras.

Capítulo 4

Previo al trasplante, se preparó solución nutritiva Steiner al 50% y se ajustó el pH a 5.5 y se colocaron los soportes de unicel. El 4 de julio (22 días después de la siembra) por la tarde se realizó el trasplante, para lo cual se utilizaron vasos de plástico no. 4 (118 mL) previamente perforados en el fondo, en los cuales se colocó la plántula de lechuga, rellenando los espacios libres con agrolita. Cabe señalar que la aplicación de tratamientos se inició el mismo día del trasplante.

El sistema de oxigenación se programó con un temporizador, realizando catorce programaciones distribuidas de la siguiente manera: cada hora de 8:00 AM a 8:00 PM durante el día y a las 12:00 AM y 4:00 AM durante la noche teniendo una duración cada una de un minuto, dando un total de 14 min de oxigenación diarios durante todo el experimento.

El nivel de la solución nutritiva y el pH se ajustaron cada tercer día. Realizando un cambio de la solución nutritiva cada 10 días, incrementando la concentración de la solución nutritiva Steiner de acuerdo al desarrollo del cultivo hasta llevarla al 100%.

La cosecha se realizó cuando la acelga alcanzó un tamaño comercial, (51 días después del trasplante). Al momento de la cosecha se realizaron muestreos de todos los tratamientos, congelando 8 plantas por tratamiento a -80 °C para su posterior análisis. De igual manera 8 plantas de acelga por tratamiento se llevaron a una estufa de secado.

4.2.4. Variables evaluadas

Se evaluaron variables agronómicas (materia fresca de vástago, y volumen de raíz, materia seca vástago y raíz), indicadores de calidad (actividad antioxidante total método DPPH, fenoles totales, flavonoides totales, concentración de ácido ascórbico), e indicadores fisiológicos (concentración de clorofilas a, b y total, azúcares totales en hojas, aminoácidos libres totales, proteínas solubles totales, concentración nutrimental en hojas), de la misma manera como se describe en el Capítulo 2.

Capítulo 4

4.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlett para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05 \%$), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Indicadores agronómicos

4.3.1.1. Peso fresco de vástago y volumen de raíz

En acelga se observó que en condiciones de suficiencia de Pi, concentraciones superiores de Phi a $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ en la solución nutritiva, disminuyeron el peso fresco del vástago, sin reducir significativamente el volumen de raíz, como se observa en el Cuadro 2. En estudios realizados en espinaca, apio, espinaca japonesa (Komatsuna) y lechuga, para evaluar relaciones fosfato-fosfito, se encontró que a medida que se incrementó la concentración de Phi, el crecimiento de las plantas disminuyó (Thao y Yamakawa, 2008; Thao *et al.*, 2008a, 2008b), lo que coincide con los resultados obtenidos en acelga en nuestro experimento.

Cuadro 2. Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de acelga cv. Fordhook Giant con aplicaciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito ($\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$)	Volumen de raíz ($\text{cm}^3 \text{ planta}^{-1}$)	Vástago ($\text{g planta}^{-1} \text{ PF}^x$)
0.00	50.00 a ^z	426.97 a
0.25	48.75 a	347.99 b
0.50	38.75 a	330.47 b
DHS ^y	11.5	57.34

Capítulo 4

Pr>F

0.0446

0.0004

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

4.3.1.2. Peso seco de vástago y raíz

Se observó que adicionar más de 0.25 mol_c m⁻³ de Phi vía raíz disminuyó significativamente la acumulación de materia seca en raíz ($p=0.01$), mientras que en vástago el peso seco disminuyó al adicionar 0.50 mol_c m⁻³ de Phi vía raíz ($p=0.0009$) (Cuadro 3).

Bertsch *et al.* (2009) encontraron un efecto sinérgico de Phi sobre el peso seco cuando éste se adiciona en combinación con Pi en cantidad de 30 mg kg⁻¹ de cada fuente de P vía raíz en lechuga, plátano y tomate. De manera contrastante, en plantas de calabaza se reportó una disminución significativa en el crecimiento y en el peso de materia seca cuando se aplicó Phi al suelo como fuente de P (Ratjen y Gerendás, 2009), lo cual concuerda con los resultados obtenidos con el experimento en acelga.

Cuadro 3. Acumulación de materia seca en raíz y vástago de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a aplicaciones con fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol _c m ⁻³)	Raíz (g planta ⁻¹ PS ^x)	Vástago (g planta ⁻¹ PS)
0.00	5.38 a ^z	42.58 a
0.25	5.15 ab	44.83 a
0.50	4.35 b	31.15 b
DHS ^y	0.80	7.00
Pr>F	0.014	0.0009

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Capítulo 4

4.3.2. Indicadores de calidad

4.3.2.1. Actividad antioxidante total

Se observó que cuando se adicionó $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ en la solución nutritiva, la actividad antioxidante total en hojas de acelga se incrementó significativamente, observándose incrementos de 162, 105.7 y 78.9% en la actividad antioxidante en los tiempos de incubación de 15, 30 y 60 min, respectivamente en comparación con el testigo (Figura 1).

Moor *et al.* (2009) reportan que la aplicación de Phi en fresa, no modificó la actividad antioxidante total, lo cual si sucedió en nuestro experimento; sin embargo, también reportan que los tratamientos en donde aplicaron Phi reportaron un incremento en la concentración de antocianina en fruto. También en acelga es evidente el incremento en la actividad antioxidante con la aplicación de Phi; sin embargo, es importante evaluar varias concentraciones de Phi debido a que si nos excedemos en concentración, no se alcanzan a obtener los beneficios deseados.

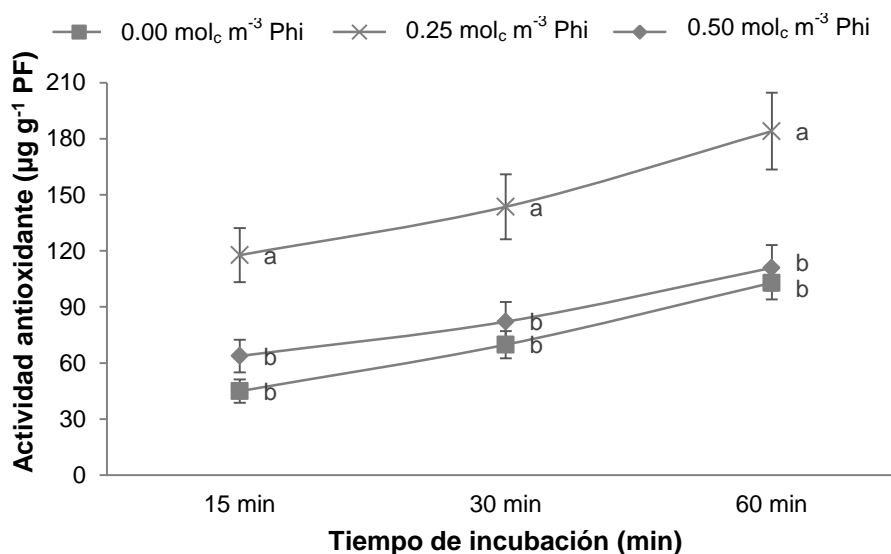


Figura 1. Actividad antioxidante total en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE

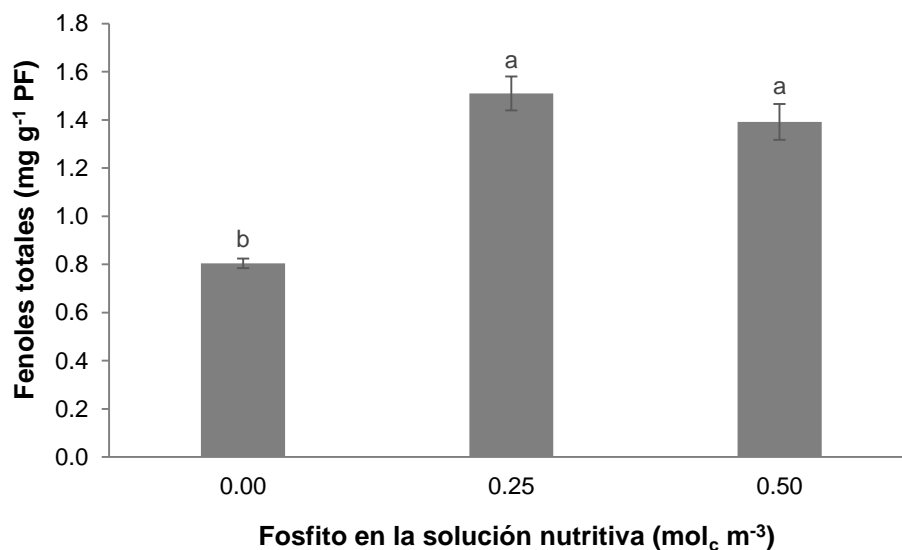
Capítulo 4

con letras distintas en cada tiempo de evaluación, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.0004$; 30, $p=0.0012$; 60, $p=0.0016$). PF=peso fresco.

4.3.2.2. Fenoles totales

Los resultados observados son muy favorables, debido a que al adicionar $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ en la solución nutritiva se incrementó hasta en un 87.8% la concentración de fenoles totales en comparación con el testigo, observándose también que cantidades superiores de Phi pueden disminuir la concentración de fenoles como se puede observar en la Figura 2.

Cuando una planta está estresada es muy común que la producción de los metabolitos secundarios se incremente porque el crecimiento es inhibido por la disminución en fotosíntesis y por la fijación de carbono principalmente en compuestos de metabolismo secundario (Seigler, 1998). Cuando una planta se somete a estrés nutricional, se ve un marcado incremento en compuestos fenólicos (Chalker-Scott y Fenchigami, 1989). En nuestro experimento se da un estrés por la presencia de Phi, debido al bloqueo de Pi que se da al no poderse metabolizar el Phi dentro de la planta, generándose una reducción en la asimilación de Pi, lo cual tuvo como resultado el incremento de fenoles totales.

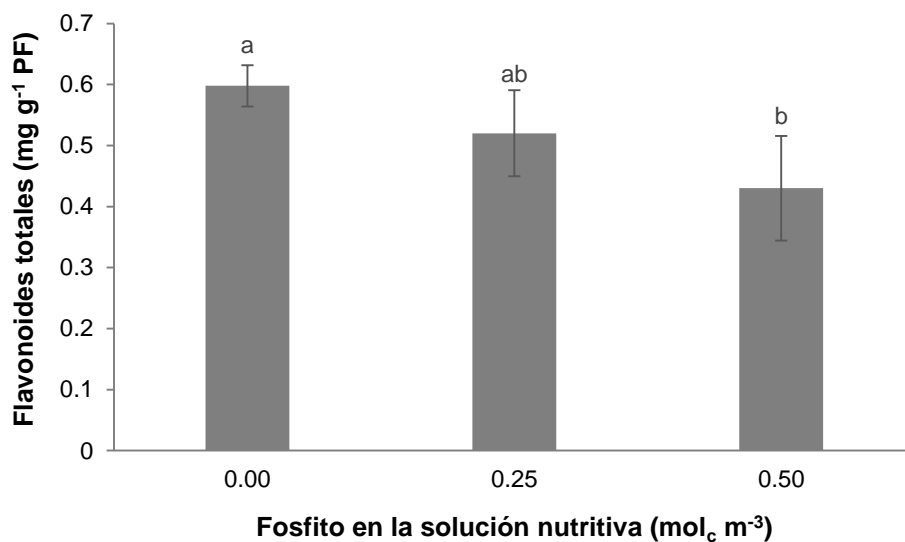


Capítulo 4

Figura 2. Concentración de fenoles totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF=peso fresco.

4.3.2.3. Flavonoides totales

Se observó que al adicionar Phi en la solución nutritiva se causaron efectos adversos, debido a que al compararlos con el testigo, este último tiene concentraciones superiores. Se observó que a medida en que aumenta la concentración de Phi en la solución, se disminuyó la concentración de flavonoides totales en hojas (Figura 3). Sacan y Yanardag (2010), reportan niveles de flavonoides en acelga de 11.88 μg por mg en base a peso fresco, valor muy por debajo de los aquí obtenidos; sin embargo, sería conveniente utilizar una concentración de Phi que no disminuya significativamente los flavonoides y que por el contrario, incremente otras variables de importancia, tal como la de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$.



Capítulo 4

Figura 3. Concentración de flavonoides totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0065$). PF=peso fresco.

4.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico

Contrario a lo que se observó en el cultivo de lechuga al adicionar Phi en la solución nutritiva (Figura 4 del Capítulo 2), en el cultivo de acelga se observó algo totalmente opuesto, debido a que al adicionar Phi en una concentración de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ se incrementó la concentración de ácido ascórbico en hojas, observándose una tendencia a aumentar con concentración crecientes de Phi en la solución nutritiva (Figura 4).

Moor *et al.* (2009) reportan un incremento en la concentración de ácido ascórbico de plantas de fresa tratadas previamente a su trasplante con una solución con fosfito, ellos justifican este incremento mencionando que el Phi es un promotor de los mecanismos de defensa de las plantas, sin embargo resaltan la importancia de realizar su aplicación de manera adecuada, es decir aplicándolo en dosis moderadas y siempre en suficiencia de Pi.

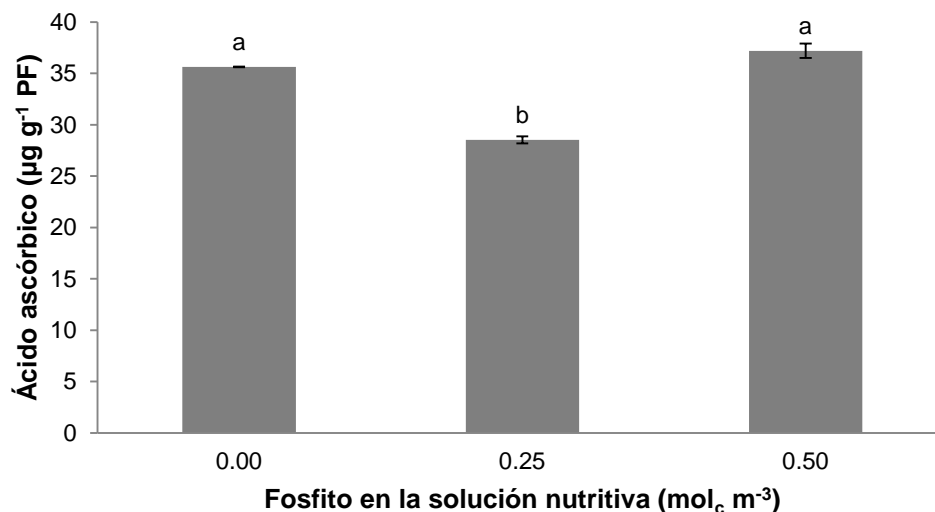


Figura 4. Concentración de ácido ascórbico en hojas de acelga cv. Fordhook Giant como respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias

Capítulo 4

± DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$).
PF= peso fresco.

4.3.3. Indicadores fisiológicos

4.3.3.1. Concentración de clorofilas a, b y total

Se observaron incrementos en clorofilas a y total al adicionar $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi a la solución nutritiva de 13.9 y 9.9%, respectivamente, en comparación con el testigo (Figura 5).

En el cultivo de fresa aplicaciones de Phi del 30% del P total incrementaron la concentración de clorofilas a, b y total (Estrada-Ortiz *et al.*, 2011), lo cual corresponde a lo observado en tratamientos con Phi en el cultivo de acelga, la diferencia fue que en acelga no hubo incremento de clorofila b, pero demuestra el claro efecto que tiene el Phi sobre la concentración de clorofila en hojas.

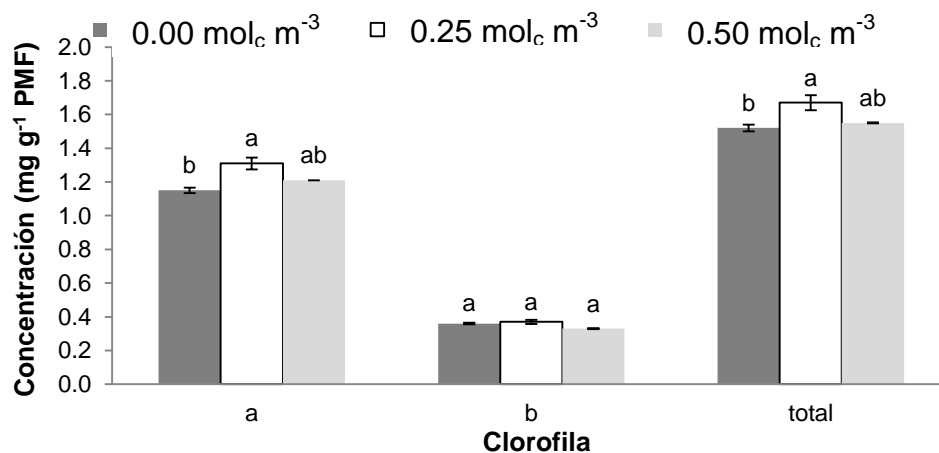


Figura 5. Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias ± DE con letras distintas en cada variable, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0137$; Chl b, $p=0.0457$; Chl total, $p=0.0380$). PF= peso fresco.

4.3.3.2. Azúcares totales en hojas

Capítulo 4

En el Cuadro 4 se muestra que no hubo diferencias estadísticas significativas al adicionar Phi en la solución nutritiva sobre azúcares totales en hojas.

Cuadro 4. Concentración de azúcares totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol_c m⁻³)	Concentración de azúcares totales (mg g⁻¹ PF^x)
0.00	2.51 a ^z
0.25	3.36 a
0.50	2.93 a
DHS ^y	1.24
Pr>F	0.2173

^zValores con letras iguales son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

Los azúcares solubles totales son un indicador bioquímico del estatus nutrimental de fósforo en la planta y su síntesis depende de la presencia de este nutriente en el citoplasma (Ruiz *et al.*, 1996). Atendiendo a lo anteriormente mencionado, el fósforo siempre estuvo disponible en suficiencia en la planta y en nuestro experimento no se observó efecto de la adición de Phi en la solución sobre la concentración de azúcares totales en hojas.

4.3.3.3. Aminoácidos libres totales

En aminoácidos libres totales en acelga se observó la misma tendencia que en azúcares totales, ya que a pesar de no haber diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, la media observada al adicionar el Phi en la concentración de 0.25 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva fue superior a los demás tratamientos (Cuadro 5).

Capítulo 4

Cuadro 5. Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol_c m⁻³)	Aminoácidos libres totales (mg g⁻¹ PF^x)
0.00	2.51 a ^z
0.25	3.36 a
0.50	2.93 a
DHS ^y	1.24
Pr>F	0.6650

^zValores con letras iguales son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

Berkowitz *et al.* (2013) condujeron experimentos en *Arabidopsis* en donde realizaron aplicaciones de Phi en plantas con suficiencia de Pi (0.5 mM Pi + 2.5 mM Phi) comparándolas con plantas con limitación de Pi (0.05 mM Pi) y reportan que en plantas tratadas con Phi se produjo una reducción entre 40 y 60% en aminoácidos como asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico y serina, y en contraste en plantas con limitación de Pi, pero sin Phi, los mismos aminoácidos se incrementaron entre un 10 y 20% tomando como referencia un testigo con 0.5 mM de Pi. Estos resultados difieren de los que aquí se reportan en acelga al adicionar Phi en la solución, ya que no se observaron diferencias estadísticas con el testigo, e incluso hay un ligero incremento en aminoácidos libres totales en los tratamientos con Phi.

4.3.3.4. Proteínas solubles totales

Entre las diferentes variables se observan diferentes efectos, en algunas la adición de Phi tiene efectos positivos, sin embargo en algunas otras tiene efectos negativos, tal es el caso de proteínas solubles totales, en donde se observó que a medida que se

Capítulo 4

incrementa la concentración de Phi en la solución nutritiva, la concentración de proteínas solubles totales en hojas de acelga disminuye.

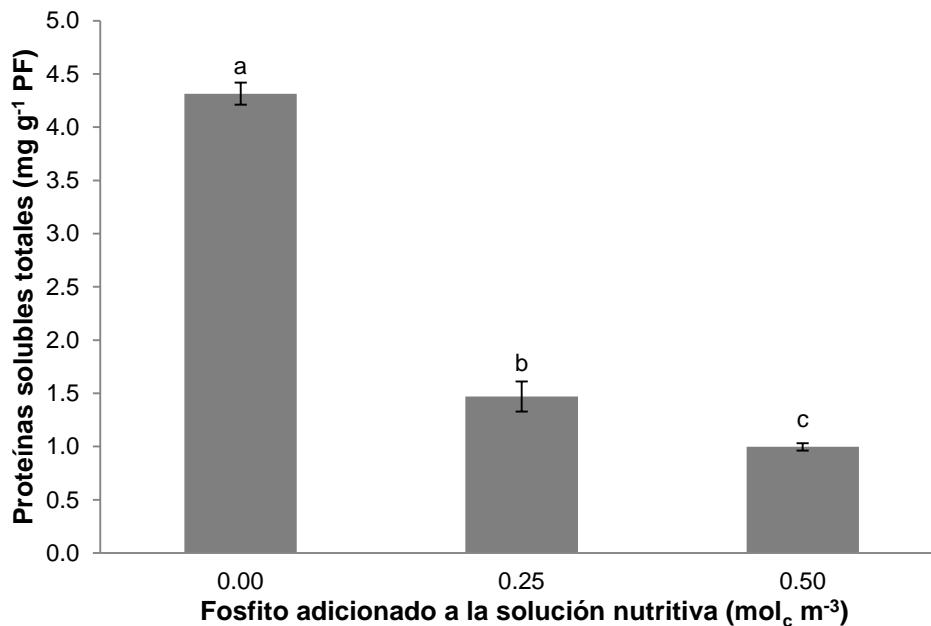


Figura 6. Concentración de proteínas solubles totales en hojas de acelga en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

El metabolismo de proteínas puede estar asociado con la adaptación de la planta a cambios en condiciones ambientales y al estrés. El Phi inhibe la fosforilación de proteínas cuando existe estrés por P. De acuerdo con Ticconi *et al.* (2001) el Phi inhibe la actividad de las enzimas nucleolíticas y la expresión de la fosfatasa ácida y de genes transportadores de P en *Arabidopsis*. En este experimento hubo condiciones de suficiencia de P en la solución nutritiva, por lo que seguramente Phi interfiere con Pi dentro de la planta inhibiendo algunos procesos y causando así la disminución de la concentración de proteína en acelga.

Capítulo 4

4.3.4. Concentración nutrimental

La concentración de macro y micronutrientos fue mayor en raíz que en vástago, para la mayoría de nutrientes, sin embargo se observó que Mg, B y Na tuvieron mayor concentración en vástago y el N tuvo concentraciones similares tanto en raíz como en vástago (Cuadros 6 y 7).

Cuadro 6. Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Tejido	Phi (mol _c m ⁻³)	Concentración (g kg ⁻¹ PS ^x)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Vástago	0.00	26.90	2.79	18.32 a	7.00	5.84	3.39 b ^z
	0.25	27.70	2.83	18.72 a	6.81	6.17	4.00 a
	0.50	28.70	2.95	14.16 b	6.78	5.20	3.01 b
	DHS	1.83	0.49	3.30	1.21	1.04	0.60
	Pr>F	0.064	0.656	0.007	0.870	0.075	0.004
Raíz	0.00	26.90	8.31	11.52	30.81	3.42	21.72
	0.25	27.70	8.98	11.81	38.70	4.16	29.11
	0.50	28.70	6.94	9.15	29.07	3.75	21.90
	DHS ^y	1.83	3.89	2.88	16.80	0.72	12.85
	Pr>F	0.064	0.370	0.058	0.283	0.054	0.240

^zValores con distintas letras en cada columna por órgano son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

En raíz de acelga no se observaron diferencias significativas entre tratamientos de Phi en la solución nutritiva con respecto al testigo. En vástago se observó que no hubo diferencias estadísticas en N, P, Ca y Mg, por otro lado se observaron diferencias estadísticas significativas en K y S, observándose que se incrementó su concentración en vástago cuando se adicionó Phi en un nivel de 0.25 mol_c m⁻³ de en la solución nutritiva (Cuadro 6).

En vástago las concentraciones de Cu, Zn, Mn y Na tuvieron una relación negativa con la concentración de Phi en la solución nutritiva; por el contrario, la menor dosis de Phi

Capítulo 4

evaluadas ($0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$) incrementó significativamente la concentración de B, en comparación con el resto de los tratamientos. La concentración de Fe en vástago no fue afectada por los tratamientos evaluados (Cuadro 7).

En raíces, las concentraciones de Cu, Zn y Na fueron afectadas en forma negativa por la adición de Phi a la solución nutritiva. La concentración de los micronutrientes Fe, Mn y B en raíz, no fueron influenciados por la concentración de Phi en la solución nutritiva (Cuadro 7).

Cuadro 7. Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Tejido	Phi ($\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$)	Concentración ($\text{mg kg}^{-1} \text{ PS}^x$)					
		Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Vástago	0.00	198.05 a	6.75 a	18.84 a	179.13 a	137.48 b	12754.90 a
	0.25	116.93 a	6.77 a	14.68 ab	156.64 ab	154.02 a	11837.40 ab
	0.50	107.20 a	4.99 b ^z	11.74 b	113.54 b	130.82 b	10732.70 b
	DHS ^y	102.91	1.40	5.28	48.19	11.27	1561.10
	Pr>F	0.068	0.009	0.014	0.012	0.0008	0.018
Raíz	0.00	3553.00 a	39.27 a	30.31 a	983.20 a	96.65 a	4034.40 a
	0.25	3260.30 a	30.16 ab	27.05 a	1118.60 a	100.69 a	3381.80 a
	0.50	2299.10 a	20.33 b	18.14 b	813.10 a	93.10 a	2532.80 b
	DHS	2661.80	13.93	8.21	426.40	12.16	836.92
	Pr>F	0.344	0.014	0.007	0.190	0.270	0.002

^zValores con letras distintas en cada columna por órgano son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Thao *et al.* (2009) encontraron que la adición de Phi en la solución nutritiva disminuyó la concentración de N, K, Ca, Mg, Fe y Zn en vástago de lechuga bajo condiciones de deficiencia de P, reportan también inhibición del desarrollo radicular con la presencia de Phi, con lo que también se ve afectada la absorción de algunos nutrientes. En este experimento coincide con la disminución en absorción de K y Zn, pero difiere con el resto de nutrientes.

Capítulo 4

4.4. CONCLUSIONES

Aplicaciones de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva en acelga, incrementan la actividad antioxidante, la concentración de fenoles totales y clorofila a y total en hojas de acelga.

Aplicar cantidades superiores a $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva disminuye la materia fresca de vástago y la materia seca de raíz en acelga. De la misma manera disminuyen la concentración de Cu, Zn, Mn y Na en vástago y Cu, Zn y Na en raíz.

Aplicaciones de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva en acelga disminuyen la materia seca de vástago.

Se observó que aplicaciones de Phi en la solución nutritiva disminuyen la concentración de flavonoides totales y proteínas solubles totales en hojas de acelga.

4.5. LITERATURA CITADA

- Berkowitz, O.; Jost, R.; Kollehn, D. O.; Fenske, R.; Finnegan, P. M.; O'Brien, P. A.; Hardy, G. E. St. J.; Lambers, H. 2013. Acclimation responses of *Arabidopsis thaliana* to sustained phosphite treatments. J. Experim. Bot. 64(6): 1731-1743.
- Bertsch, F.; Ramírez, F.; Henríquez, C. 2009. Evaluación del fosfito como fuente fertilizante de fósforo vía radical y foliar. Agronomía Costarricense. 33: 249-265.
- Chalker-Scott, L.; Fenchigami, L. H. 1989. The role of phenolic compounds in plant stress responses. In: Paul L, Ed. Low temperature stress physiology in crops. Boca Raton, Florida. CRC Press Inc. 40 p.
- Cook, P. J.; Landschoot, P. J.; Schlossberg, M. J. 2009. Inhibition of *Pythium* spp. and suppression of Pythium blight of turfgrasses with phosphonate fungicides. Plant Dis. 93: 809-814.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2011. Biochemical responses in strawberry plants supplying phosphorus in the form of phosphite. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 17: 129-138.

Capítulo 4

- Hanrahan, G.; Salmassi, T. M.; Khachikian, C. S.; Förster, K. L. 2005. Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: Significance, speciation and determination. *Talanta*. 66: 435-444.
- Moor, U.; Põldma, O.; Tõnutare, T.; Karp, K.; Starast, M., Vool, E. 2009. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Scientia Hort.* 119: 264-269.
- Orbović, V.; Syvertsen, J. S.; Bright, D.; Van Clief, D. L.; Graham, J. H. 2008. Citrus seedling growth and susceptibility to root rot as affected by phosphite and phosphate. *J. Plant Nutr.* 31: 774-787.
- Ratjen, A.M.; Gerendás, J. 2009. A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 821:828.
- Ribot, C.; Wang, Y.; Poirier, Y. 2008. Expression analyses of three members of the *AtPHO1* family reveal differential interactions between signaling pathways involved in phosphate deficiency and the responses to auxin, cytokinin and abscisic acid. *Planta*. 227: 1025-1036.
- Ruiz, J. M.; Belakbir, A.; Romero L. 1996. Foliar level of phosphorus and its bioindicators in Cucumis melo grafted plants: A possible effect of rootstocks. *J. Plant Physiol.* 149: 400-404.
- Sacan, O.; Yanardag, R. 2010. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of chard (*Beta vulgaris* L. var. cicla). *Food Chem. Toxicol.* 48:1275-1280.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schroetter, S.; Angeles-Wedler, D.; Kreuzig, R.; Schnug, E. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschung Volkenrode*. 56: 87-99.
- Seigler D. S. 1998. Plant secondary metabolism. Boston MA: Chapman and Hall. Kluwer academic Publishers. 711 p.

Capítulo 4

- Shearer, B. L.; Fairman, R. G. 2007. A stem injection of phosphite protects *Banksia* species and *Eucalyptus marginata* from *Phytophthora cinnamomi* for at least four years. *Austral. Plant Pathol.* 36: 78-86.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution, *In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands.* pp. 633-649.
- Steiner, A.; van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.*, 46: 862-863.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2009. Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or bio-stimulator? *Soil Sci. Plant Nutr.* 55:228- 234.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite- phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172:378-384.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2008. Growth of celery (*Apium graveolens* var. dulce) as influenced by phosphite. *J. Faculty Agricult., Kyushu University.* 53: 375-378.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Sarr, P. S.; Myint, A. K. 2008a. Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth and phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 761-768.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite-phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 172: 378-384.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K.; Sarr, P. S.; Myint, A. K. 2008b. Growth response of Komatsuna (*Brassica rapa* var. Peruviridis) to root and foliar applications of phosphite. *Plant Soil.* 308: 1-10.
- Ticconi, C. A.; Delatorre, C. A.; Abel, S. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 127: 963-972.
- Wilkinson, C. J.; Holmes, J. M.; Dell, B.; Tynan, K. M.; McComb, J. A.; Shearer, B. L.; Colquhoun, I. J.; Hardy, G. E. S. T. J. 2001. Effect of phosphite on in planta zoospore production of *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathol.* 50: 587-593.

Capítulo 4

Capítulo 5

CAPÍTULO 5. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE ACELGA A APLICACIONES FOLIARES DE FOSFITO

5.1. INTRODUCCIÓN

El fosfato (P_i , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-}) juega un papel central en el metabolismo celular y bioenergético, y es uno de los nutrimentos que se encuentran menos disponibles tanto en ecosistemas terrestres como en acuáticos (Raghothama, 1999; Abel *et al.*, 2002; Poirier y Bucher, 2002; Franco-Zorrilla *et al.*, 2004; Plaxton, 2004), pero no es la única forma de fósforo que pueden absorber las plantas, también está el fosfito (Φ , $H_2PO_3^-$).

El Φ es una forma reducida de P_i en donde un hidrógeno reemplaza a uno de los oxígenos que están unidos al átomo de P. El Φ es muy importante en la agricultura, pero a la vez es muy controversial, ya que se ha utilizado por algunos como fungicida y por otros como una fuente de P. Está bien estudiado que Φ tiene una alta eficiencia en el control de patógenos de plantas pertenecientes a los Oomicetos en particular *Phytophthora* (McDonald *et al.*, 2001).

Por otro lado, hay evidencia de que cuando se aplica Φ como única fuente de P en las plantas, éstas presentan deficiencias de P, debido a que aunque el Φ es absorbido por la planta, permanece estable y no parece oxidarse a formas metabolizables dentro de la planta. Hay evidencia de que aplicaciones de Φ causan efectos detrimentales en plantas con deficiencias de P_i , lo cual no ocurre así en plantas con suficiencia de P_i (Abel *et al.*, 2002; Poirier y Bucher, 2002; Carswell *et al.*, 1996; Carswell *et al.*, 1997; McDonald, *et al.*, 2001; Ticconi *et al.*, 2001; Varadarajan *et al.*, 2002).

Con base en lo mencionado anteriormente en esta investigación se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Φ vía foliar, sobre indicadores agronómicos, fisiológicos y de calidad, en el cultivo de acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) cv. Fordhook Giant.

Capítulo 5

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante el verano de 2011, en un invernadero tipo cenital, localizado a 19° 29´ latitud norte, 98° 53´ longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) cv. Fordhook Giant, cultivada en un sistema hidropónico de raíz flotante con oxigenación. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento fueron 35.8, 5.2 y 18 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

5.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron cuatro tratamientos de Phi, los cuales fueron suministrados de manera foliar. Las concentraciones de Phi evaluadas fueron 0, 0.25, 0.50 y 0.75%. Los tratamientos fueron suministrados a los días 10 y 25 después del trasplante. El Phi se obtuvo a partir de ácido fosforoso grado analítico (Sigma-Aldrich). El pH de la solución foliar se mantuvo en 5, para ello se ajustó adicionando KOH 1 N.

La unidad experimental se constituyó por seis plantas. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se utilizó diseño experimental completamente al azar.

5.2.3. Manejo del cultivo

Previamente a la instalación del experimento, el 12 de junio de 2011, se pusieron a germinar semillas de acelga (*Beta vulgaris* L. var. *cicla*) cv. Fordhook Giant, en una mezcla de turba con perlita (70:30 V/V) previamente humedecida y colocada en charolas de plástico negras de 200 cavidades. Posteriormente a la siembra se cubrieron con un plástico negro para mantener en oscuridad y conservar la humedad hasta su emergencia.

Para la preparación de la solución nutritiva se empleó agua de pozo profundo, de la cual se obtuvo el análisis nutrimental (Cuadro 1) y de esa manera poder saber de qué disposición nutrimental se partió para la elaboración de la solución nutritiva.

Capítulo 5

Cuadro 1. Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes ($\text{mol}_e \text{ m}^{-3}$).

	N-NO₃⁻	P- H₂PO₄⁻	S- SO₄²⁻	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
mol_e m⁻³	0.294	0.062	0.186	0.100	1.356	2.527

Posteriormente se realizaron riegos con agua durante una semana, a fin de mantener la humedad. Después de ello se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 25% hasta el momento del trasplante, a fin de tener plantas vigorosas.

Previo al trasplante se construyó un sistema de raíz flotante, el cual fue realizado con madera por lo cual se cortó y clavó, para construir cajas de 80 x 40 x 20 (largo x ancho x profundidad) las cuales se forraron con plástico negro calibre 600 (cada caja fue considerada como una unidad experimental). El sistema de oxigenación se colocó pegado al fondo de las cajas, para lo cual se utilizó manguera de látex tipo espagueti, a la cual se conectó en los extremos una bomba de aire de dos salidas por cada tres unidades experimentales lo cual permitió tener oxigenada la raíz.

Cada unidad experimental tuvo como soporte placas de unicel, las cuales además sirvieron para mantener aislado al material vegetal de la solución nutritiva y evitar daños en tejido aéreo por quemaduras.

Previo al trasplante, se preparó solución nutritiva Steiner al 50% y se ajustó el pH a 5.5 y se colocaron los soportes de unicel. El 4 de julio (22 días después de la siembra) por la tarde se realizó el trasplante, para lo cual se utilizaron vasos de plástico no. 4 (118 mL) previamente perforados en el fondo, en los cuales se colocó la plántula de lechuga, rellenando los espacios libres con agrolita.

Todos los tratamientos fueron nutridos con la misma solución y a medida que se desarrolló el cultivo, la solución se llevó al 100%, tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984), fue preparada con reactivos grado analítico, se utilizó 1.06 g L^{-1} de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.30 g L^{-1} de KNO_3 ; 0.14 g L^{-1} de KH_2PO_4 ; 0.49 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.26 g L^{-1} de K_2SO_4 . La solución nutritiva se complementó con

Capítulo 5

micronutrientes en las siguientes concentraciones: 1.6 mg L⁻¹ de Mn; 0.11 mg L⁻¹ de Cu; 0.86 mg L⁻¹ de B; 0.023 mg L⁻¹ de Zn; 0.048 mg L⁻¹ de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L⁻¹ a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970). El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5.5 y 5.8, el cual se ajustó adicionando H₂SO₄ al 97% y NaOH 1 N.

El sistema de oxigenación se programó con un temporizador, con catorce programaciones distribuidas de la siguiente manera: cada hora de 8:00 AM a 8:00 PM durante el día y a las 12:00 AM y 4:00 AM durante la noche con una duración cada una de un minuto, dando un total de 14 min de oxigenación diarios durante todo el experimento.

El nivel de la solución nutritiva y el pH se ajustaron cada tercer día. Realizando un cambio de la solución nutritiva cada 10 días, incrementando la concentración de la solución nutritiva Steiner de acuerdo al desarrollo del cultivo hasta llevarla al 100%.

La cosecha se realizó cuando la acelga alcanzó un tamaño comercial, (51 días después del trasplante). Al momento de la cosecha se realizaron muestreos de todos los tratamientos, congelando 8 plantas por tratamiento a -80 °C para su posterior análisis. De igual manera ocho plantas de acelga por tratamiento se llevaron a una estufa de secado.

5.2.4. Variables evaluadas

Se evaluaron variables agronómicas (materia fresca de vástago y volumen de raíz, materia seca de vástago y raíz), indicadores de calidad (actividad antioxidante total método DPPH, fenoles totales, flavonoides totales, concentración de ácido ascórbico), e indicadores fisiológicos (concentración de clorofilas a, b y total, azúcares totales en hojas, aminoácidos libres totales, proteínas solubles totales, concentración nutrimental en hojas), de la misma manera como se describe en el Capítulo 2.

Capítulo 5

5.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlett para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$ %), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Indicadores agronómicos

5.3.1.1. Peso fresco de vástago y volumen de raíz

Al aplicar Phi vía foliar en acelga, para volumen de raíz no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; sin embargo, se observó un decremento en volumen a medida que se incrementó la concentración de Phi. Para vástago se vio un efecto similar al observado también en acelga pero con aplicaciones en la solución nutritiva (Cuadro 2 del Capítulo 4); y se obtuvo que a medida que se incrementó la concentración de Phi en aplicaciones foliares el peso fresco disminuyó, con respecto al testigo sin Phi (Cuadro 2).

Thao *et al.* (2008b) realizaron experimentos con espinaca en hidroponía, y realizaron varios tratamientos con Phi (0, 0.05, 0.2 y 2 mM) en combinación con cuatro concentraciones de Pi (0.05, 0.1, 0.15 y 0.3 mM), se encontró un incremento en el peso fresco en raíces con el tratamiento más deficiente de Pi. En este experimento el volumen de raíz se mantuvo estable sin cambios importantes, pero el vástago si se vio afectado en forma negativa.

Capítulo 5

Cuadro 2. Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de acelga cv. Fordhook Giant con aplicaciones de fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Volumen de raíz (cm³ planta⁻¹)	Vástago (g planta⁻¹ PF^x)
0.00	50.00 a ^z	426.97 a
0.25	48.25a	392.79 ab
0.50	48.25 a	361.08 ab
0.75	38.50 a	328.84 b
DHS ^y	68.37	14.24
Pr>F	0.1209	0.0028

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

5.3.1.2. Peso seco de vástago y raíz

Las aplicaciones foliares de Phi disminuyeron de manera significativa la ganancia de peso seco de raíz, en comparación con el testigo libre de Phi, mientras que en vástago no se afectó estadísticamente el peso seco (Cuadro 3).

Ávila *et al.* (2013) realizaron experimentos en frijol, encontraron que aplicaciones de Phi en niveles de suficiencia de Pi, no afectaron el peso seco de raíz y vástago; sin embargo, concentraciones de 256 y 512 µM de Phi disminuyeron el peso seco de raíz y vástago de plantas con nivel deficiente de Pi. En esta investigación las concentraciones más altas de Phi disminuyeron el peso seco de raíz.

Capítulo 5

Cuadro 3. Acumulación de materia seca en raíz y vástago de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a aplicaciones con fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Raíz (g planta⁻¹ PS^x)	Vástago (g planta⁻¹ PS)
0.00	5.38 a ^z	42.58 a
0.25	4.83 ab	37.60 a
0.50	4.55 ab	45.90 a
0.75	4.35 b	35.03 a
DHS ^y	0.98	12.12
Pr>F	0.0459	0.0811

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

5.3.2. Indicadores de calidad

5.3.2.1. Actividad antioxidante total

En acelga se observó que todos los tratamientos foliares con Phi fueron superiores al testigo, además se observó que el mejor tratamiento foliar fue la aspersion de 0.50% Phi debido a que incrementó de manera significativa la actividad antioxidante hasta en un 344.3, 235.1 y 172.6%, en los tiempos de incubación de 15, 30 y 60 min, respectivamente en comparación con el testigo, y que aplicaciones foliares superiores a 0.50% disminuyen la actividad antioxidante en hojas de acelga (Figura 1).

Lobato *et al.* (2011) realizaron aplicaciones de Phi en papa como estrategia de manejo contra *Phytophthora* y encontraron un incremento en fitoalexinas, así como un incremento actividad de peroxidasa y polifenol oxidasa, por lo que dichas enzimas pueden formar parte de los mecanismos de defensa inducidos por Phi. Si bien no se evaluó la actividad de una enzima específica, se corrobora que la actividad antioxidante en aplicaciones foliares de apio se incrementa.

Capítulo 5

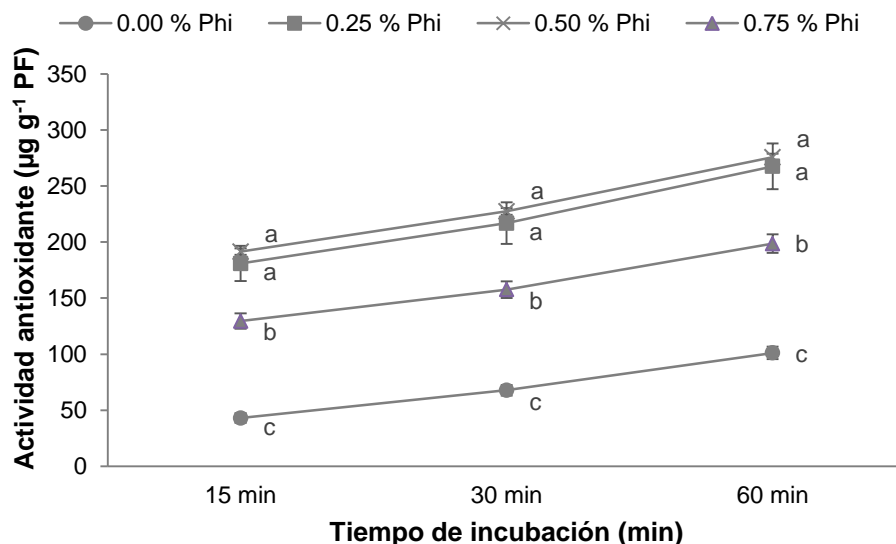


Figura 1. Actividad antioxidante total en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas en cada tiempo de incubación, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.0001$; 30, $p=0.0001$; 60, $p=0.0001$). PF=peso fresco.

5.3.2.2. Fenoles totales

En la variable fenoles totales se observó una tendencia similar que en actividad antioxidante, pudiendo observar que la aplicación de todos los tratamientos fue superior al testigo. Aunado a ello se observó que el mejor tratamiento fue la aplicación de 0.50% de Phi, así como una tendencia en la disminución de la concentración de fenoles totales, al aplicar cantidades superiores de 0.50% de Phi vía foliar (Figura 2).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios derivados de las rutas metabólicas de plantas de las pentosa fosfato, shikimato y fenilpropanoides (Randhir *et al.*, 2004). Estos compuestos son considerados de gran importancia en las plantas ya que juegan un papel muy importante en crecimiento, reproducción y protección contra patógenos y herbívoros (Bravo, 1998), y también contribuyen en el color y características sensoriales de frutas y hortalizas (Alasalvar *et al.*, 2001). En base a lo

Capítulo 5

mencionado por los autores y los resultados aquí obtenidos, podemos observar un efecto positivo muy importante derivado de la aplicación de Phi en acelga.

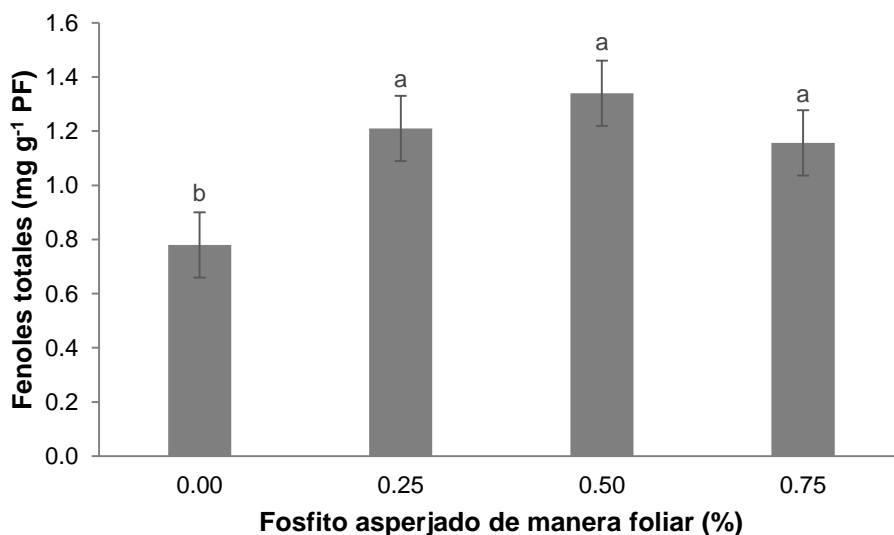


Figura 2. Concentración de fenoles totales en hojas de acelga en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0002$). PF=peso fresco.

5.3.2.3. Flavonoides totales

En la Figura 3 se observan los resultados obtenidos de los tratamientos con Phi vía foliar en acelga y se encontró que aplicaciones de 0.50% de Phi promovieron la concentración de flavonoides totales en hojas hasta en un 18% más respecto al testigo. Además se observó que concentraciones superiores a 0.50% asperjadas al follaje tienden a disminuir la concentración de flavonoides totales en hojas.

Oh *et al.* (2009) realizaron un trabajo en lechuga en donde los tratamientos consistieron en aplicar un estrés ambiental al cultivo, su factor de estrés fue el calor en lapsos cortos (40 °C durante 10 min), frío (4 °C un día) aunado a altas intensidades luminosas (800 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$), y encontraron que varios compuestos fenólicos se incrementaron en

Capítulo 5

respuesta a este tipo de estrés. En el experimento se observó que aplicaciones de 0.50% de Phi favorecieron el incremento de flavonoides.

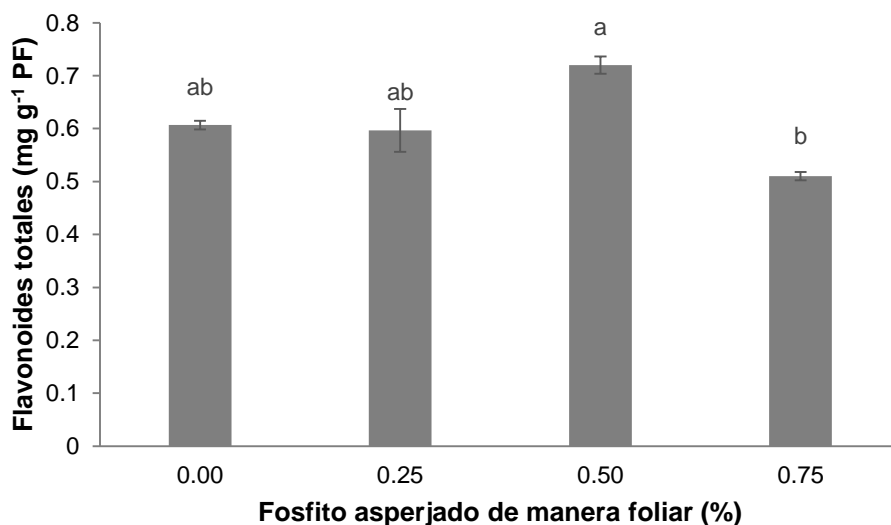


Figura 3. Concentración de flavonoides totales en hojas de acelga en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0045$). PF=peso fresco.

5.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico

Los resultados obtenidos al aplicar los tratamientos foliares de Phi en acelga muestran una tendencia positiva al incrementar la dosis en la aspersión en la concentración de ácido ascórbico, obteniendo la más alta concentración de éste con la aplicación de 0.75% de Phi, siendo superior en 13% a la concentración registrada en el testigo (Figura 4).

Lee y Kader (2000) reportaron que existen diversos factores de precosecha que pueden modificar severamente la concentración de ácido ascórbico; entre ellos la intensidad luminosa que puede incrementar la producción de azúcares, y éstos a su vez, en consecuencia incrementar la síntesis de ácido ascórbico. En este experimento el Phi también provoca un incremento en concentración de ácido ascórbico.

Capítulo 5

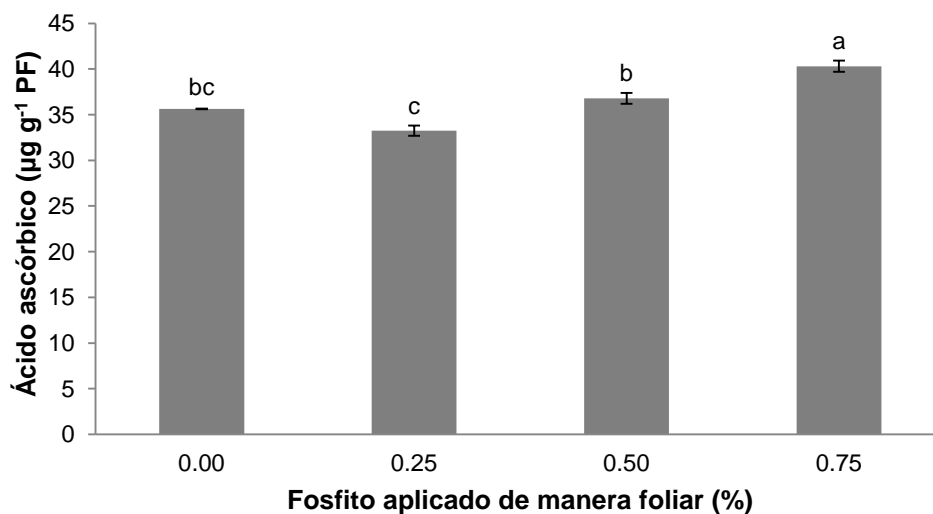


Figura 4. Concentración de ácido ascórbico en hojas de acelga cv. Fordhook Giant como respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0002$). PF= peso fresco.

5.3.3. Indicadores fisiológicos

5.3.3.1. Concentración de clorofilas a, b y total

En clorofila a, b y total no se observaron diferencias estadísticas significativas en concentración en hojas de acelga debidas a tratamientos foliares con Phi (Cuadro 4).

Estrada-Ortiz *et al.* (2011) realizaron un experimento en fresa en donde aplicaron porcentajes del P total en forma de Phi en la solución nutritiva, y no encontraron diferencias estadísticas significativas en clorofila a y b en hojas de fresa en etapa de floración. Un caso muy similar ocurre en este experimento en donde no se ve afectada la concentración de clorofilas a, b y total al aplicar aspersiones de Phi en hojas de acelga.

Capítulo 5

Cuadro 4. Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito aplicadas vía foliar.

Fosfito (%)	Clorofilas (mg g ⁻¹ PF ^x)		
	a	b	total
0.00	1.15 a	0.35 a ^z	1.52 a
0.25	1.40 a	0.37 a	1.56 a
0.50	1.45 a	0.38 a	1.64 a
0.75	1.15 a	0.43 a	1.99 a
DHS ^y	0.34	0.13	0.49
Pr>F	0.0643	0.3446	0.0531

^zValores con las mismas letras en cada columna, son estadísticamente iguales (Tukey). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

5.3.3.2. Azúcares totales en hojas

En acelga no parece haber efectos estadísticos significativos en la concentración de azúcares totales que se pueda atribuir a tratamientos foliares con Phi (Cuadro 5). En acelga, se observó la misma tendencia (Cuadro 4 del Capítulo 4).

Estrada-Ortiz *et al.* (2011) realizaron un experimento en fresa en donde aplicaron porcentajes del P total en forma de Phi en la solución nutritiva, y no encontraron diferencias estadísticas significativas en la concentración de azúcares en hojas de fresa en etapa de fructificación, pero por otro lado encontraron que en etapa de floración la concentración de azúcares en hojas disminuyó al incrementar los porcentajes de Phi en la solución nutritiva.

Capítulo 5

Cuadro 5. Concentración de azúcares totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar.

Fosfito (mol _c m ⁻³)	Concentración de azúcares totales (mg g ⁻¹ PF ^x)
0.00	2.51 a ^z
0.25	2.73 a
0.50	1.85 a
0.75	2.75 a
DHS ^y	1.06
Pr>F	0.2173

^zValores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

5.3.3.3. Aminoácidos libres totales

La aplicación foliar de fosfito incrementó la concentración de aminoácidos libres totales en hojas de acelga; empero solo la concentración más baja evaluada (0.25%) fue significativamente diferente al testigo (Figura 5).

Hernández *et al.* (2000) reportan que en hojas de fresa *in vitro*, sometida a estrés salino e inoculación con *Glomus*, se incrementó la concentración de aminoácidos libres, en particular de asparagina, ácido aspártico y glutamina. En muchas de las ocasiones, los factores de estrés ocasionan el incremento en la síntesis de algunos compuestos benéficos como los aminoácidos que ayudan a contrarrestar a la planta dicho estrés, cuando la intensidad o bien la duración del estrés son altos, esta respuesta fisiológica puede verse afectada, como se observa en la Figura 5.

Capítulo 5

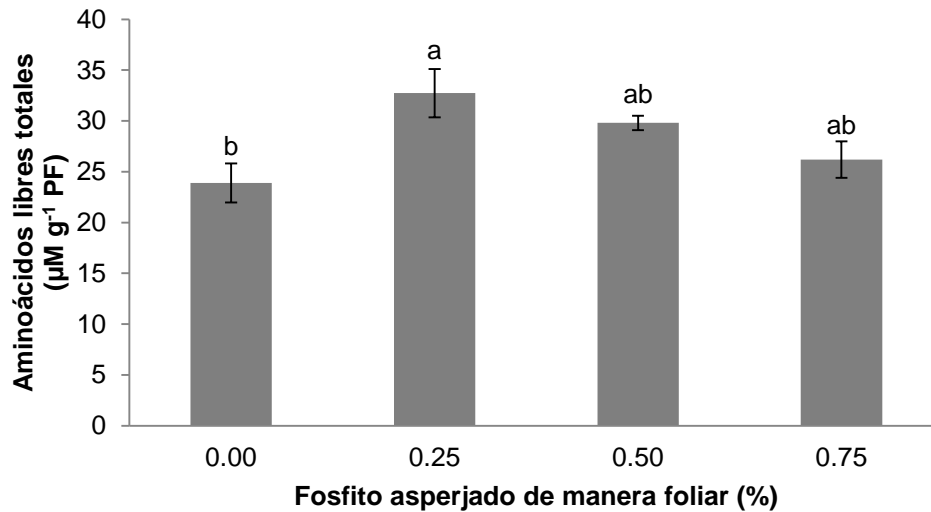


Figura 5. Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de acelga en respuesta a diferentes aplicaciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0224$). PF= peso fresco.

5.3.3.4. Proteínas solubles totales

Es muy evidente el efecto negativo de la aplicación foliar de Phi en la concentración de proteínas solubles totales en hoja de acelga; al observarse la baja significativa en ésta con todas las concentraciones de Phi evaluadas (Figura 6).

El Phi inhibe la fosforilación de proteínas cuando existe estrés por P, condición en la que el Phi suprime la actividad de enzimas nucleolíticas y la expresión de la fosfatasa ácida y de genes transportadores de P en *A. thaliana* (Ticconi *et al.*, 2001). El Phi inhibe múltiples respuestas inducidas por el insuficiencia de fosfato (Carswell *et al.*, 1997). Es por ello que se vio disminuida la concentración de proteína en hojas de acelga, a pesar de que los tratamientos tuvieron suficiencia de Pi, pero al absorber vía foliar la planta al Phi aplicado, ocupó espacios que utilizaría el Pi e inhibió algunas reacciones metabólicas.

Capítulo 5

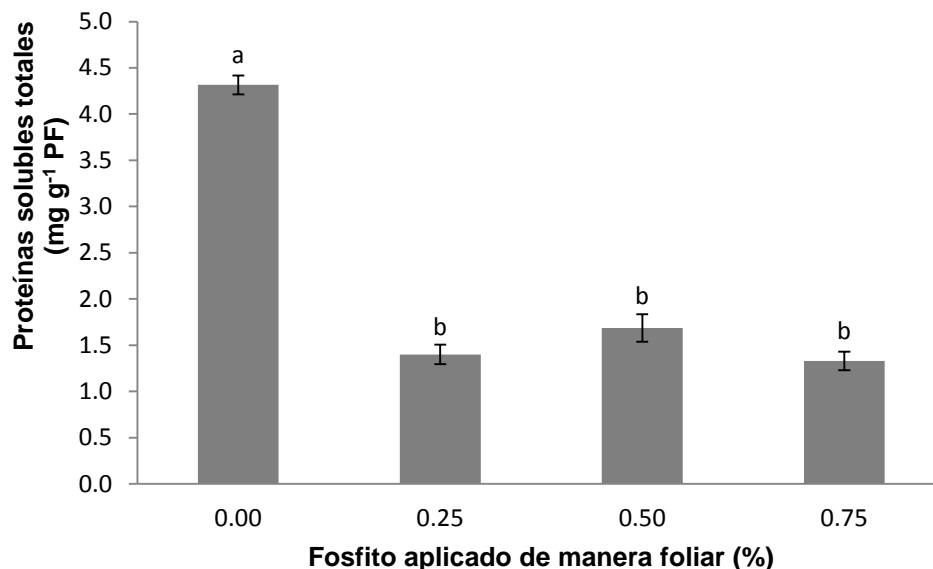


Figura 6. Concentración de proteínas solubles totales en hojas de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias \pm DE con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

5.3.4. Concentración nutrimental

En vástago, las concentraciones de K, Ca, Mg y S fueron reducidas con la aspersion foliar de Phi. En el caso de la concentración de N, el valor significativamente más alto se obtuvo con la concentración menor de Phi evaluada (0.25%); mientras que la concentración de P no se vio afectada por la aspersion de Phi vía foliar. En raíces solo la concentración más alta de Phi redujo significativamente la concentración de N; el resto de las concentraciones de macronutrientes en raíz no fueron influenciadas por los tratamientos aplicados (Cuadro 6).

Capítulo 5

Cuadro 6. Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Tejido	Phi (%)	Concentración (g kg ⁻¹ PS ^x)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Vástago	0.00	26.90 b ^z	2.79 a	18.32 a	7.00 a	5.83 a	3.39 a
	0.25	28.48 a	2.85 a	15.95 ab	6.86 a	5.25 ab	3.10 ab
	0.50	23.78 c	2.48 a	12.49 c	5.82 ab	4.82 b	2.95 b
	0.75	23.88 c	2.39 a	13.96 bc	5.20 b	4.65 b	2.97 ab
	DHS ^y	1.44	0.50	2.71	1.36	0.86	0.42
	Pr>F	0.0001	0.0443	0.0002	0.0055	0.0068	0.0323
Raíz	0.00	21.93 a	8.31 a	11.52 a	30.81 a	3.42 a	21.72 a
	0.25	22.65 a	9.35 a	13.37 a	31.00 a	4.15 a	22.96 a
	0.50	20.78 ab	8.48 a	12.08 a	31.63 a	3.83 a	24.05 a
	0.75	19.33 b	7.36 a	10.68 a	33.87 a	3.93 a	26.55 a
	DHS	2.47	2.80	3.16	11.33	0.86	9.26
	Pr>F	0.0091	0.2655	0.1357	0.8445	0.135	0.483

^zValores con distintas letras en cada columna por órgano, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

En vástago, las concentraciones de micronutrientos y de Na de manera general se redujeron a medida que la concentración de Phi en la solución foliar asperjada aumentó. En raíces, las concentraciones de micronutrientos siguieron la misma tendencia que en vástago, con la excepción de Zn y B que no fueron influenciados por los tratamientos aplicados. En el caso de la concentración de Na en raíces las tendencias observadas no se relacionan con los tratamientos (Cuadro 7).

Estrada-Ortiz *et al.* (2013) reportan incrementos en la concentración de P en hojas de fresa en etapa de fructificación al adicionar 40% de fósforo en forma de Phi manteniendo siempre un nivel de suficiencia de Pi. Thao *et al.* (2009) encontraron que la adición de Phi en la solución nutritiva incrementó la concentración de N en vástago de lechuga bajo condiciones suficiencia de P (0.3 mM de Pi). En este experimento se manejaron condiciones de suficiencia de P en forma de Pi; sin embargo, lo observado

Capítulo 5

en la concentración de N, fue opuesta, ya que al incrementar la concentración de Phi vía foliar, disminuyó la concentración de macro y micronutrientes en hojas.

Cuadro 7. Concentración de micronutrientes y sodio en vástago y raíz de acelga cv. Fordhook Giant en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Tejido	Phi (mol _c m ⁻³)	Concentración (mg kg ⁻¹ PS ^x)					
		Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Vástago	0.00	198.05 a ^z	6.75 a	18.84 a	179.13 a	137.48 a	12754.90 a
	0.25	106.24 ab	4.97 b	10.94 b	147.55 ab	125.56 ab	10526.70 b
	0.50	96.95 b	4.66 b	8.30 b	133.87 ab	112.92 b	10648.20 b
	0.75	89.48 b	4.24 b	7.84 b	111.79 b	121.58 ab	9576.20 b
	DHS ^y	95.38	1.13	4.79	50.12	17.66	1351.60
	Pr>F	0.0179	0.0001	0.0001	0.0125	0.0104	0.0001
Raíz	0.00	3553.00 a	39.27 a	30.31 a	983.20 ab	96.65 a	4034.40 a
	0.25	2908.10 ab	32.19 ab	30.01 a	982.40 ab	99.96 a	3237.50 b
	0.50	3391.80 a	35.40 ab	33.35 a	1335.50 a	97.81 a	4023.70 a
	0.75	2364.50 b	27.33 b	28.83 a	686.60 b	97.32 a	2854.20 b
	DHS	1006.50	11.18	8.91	449.54	11.07	773.52
	Pr>F	0.0179	0.0459	0.5069	0.0090	0.8281	0.0013

^zValores con letras distintas en cada columna por órgano, son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

5.4. CONCLUSIONES

Aplicaciones de soluciones con 0.25% de Phi vía foliar en acelga, incrementan la concentración de aminoácidos libres totales, así como la mayor concentración de N en vástago.

La aspersión de concentraciones de 0.50% de Phi en acelga promueve el incremento de concentraciones en actividad antioxidante total, fenoles totales, así como de flavonoides totales.

Concentraciones de 0.75% de Phi vía foliar incrementan la concentración de ácido ascórbico en hojas de acelga.

Capítulo 5

Aplicaciones de Phi vía foliar superiores a 0.25% en acelga disminuyen la acumulación de materia fresca en vástago, materia seca en raíz, concentración de proteínas solubles totales, concentración de K, Ca, Mg, S, micronutrientos y Na en vástago.

5.5. LITERATURA CITADA

Abel, S.; Ticconi, C. A.; Delatorre, C.A. 2002. Phosphate sensing in higher plants. *Physiol. Plantarum*. 115:1-8.

Alasalvar, C.; Grigor, J. M.; Zhang, D.; Quantick, P. C.; Shahidi, F. 2001. Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1410-1416.

Ávila, F. W.; Faquin, V.; da Silva, L. A. K.; Ávila, P. A.; Marques, D. J.; Silva, G. E. M.; Yuen, T. D. K. 2013. Effect of phosphite supply in nutrient solution on yield, phosphorus nutrition and enzymatic behavior in common vena (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *A.J.C.S.* 7(5):713-722.

Bravo, L. 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*. 56: 317-333.

Carswell, C.; Grant, B. R.; Theodorou, M. E.; Harris, J.; Niere, J. O.; Plaxton, W. C. 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol.* 110: 105-110.

Carswell, M. C.; Grant, B. R.; Plaxton, W. C. 1997. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta*. 203: 67-74.

Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L.I.; Gómez-Merino, F.C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2011. Biochemical responses in strawberry plants supplying phosphorus in the form of phosphite. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 17: 129-138.

Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F.C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2013. The effects of phosphite on strawberry yield and fruit quality. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 13: 612–620.

Capítulo 5

- Franco-Zorrilla, J. M.; González, E.; Bustos, R.; Linhares, F.; Leyva, A.; Paz-Ares, J. 2004. The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J. Exp. Bot.* 55: 285-293.
- Hernández, S. C.; Samson, G.; Pierre, Y. B.; Piche, Y.; Desjardins, Y. 2000. *Glomus intraradices* causes differential changes in amino acid and starch concentrations of in vitro strawberry subjected to water stress. *New Phytol.* 148: 177-186.
- Lee, S. K. and A. A. Kader. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 207-220.
- Lobato, M. C.; Machinandiarena, M. F.; Tambascio, C.; Dosio, G. A. A.; Caldiz, D. O.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B.; Olivieri, F. P. 2011. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. *Eur. J. Plant Pathol.* 130:155-163.
- McDonald, A. E.; Grant, R. G.; Plaxton, W. C. 2001. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *J. Plant Nutr.* 24:1505-1519.
- Oh, M. M.; Carey, E. E.; Rajashekar, C. B. 2009. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. *Plant Physiol. Biochem.* 47: 578-583.
- Plaxton, W.C. 2004. Plant response to stress: Biochemical adaptations to P deficiency. *In: Encyclopedia of plant and Crop Science* (Goodman, R., ed). Marcel Dekker, New York. pp. 976-980.
- Poirier Y.; Bucher M. 2002. Phosphate transport and homeostasis in Arabidopsis. *In CR Somerville, E. M. Meyerowitz, eds, The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, doi/10.1199/tab.0024, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- Raghothama, K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 665-693.
- Randhir, R.; Lin, Y. T.; Shetty, K. 2004. Phenolics, their antioxidant and antimicrobial activity in dark germinated fenugreek sprout in response to peptide and phytochemical elicitors. *A. P. J. C. N.* 13: 295-307.

Capítulo 5

SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.

Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution, *In*: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. pp. 633-649.

Steiner, A., van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.* 46: 862-863.

Thao, H. T. B., T. Yamakawa, K. Shibata, P. S. Sarr, and A. K. Myint. 2008. Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth and phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Soil Science and Plant Nutrition* 54: 761-768.

Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite- phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172:378-384.

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.

Capítulo 6

CAPÍTULO 6. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE COL A APLICACIONES VÍA RAÍZ DE FOSFITO

6.1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es uno de los 17 nutrientes esenciales requeridos para el crecimiento de las plantas (Ragothama, 1999). Es el segundo nutriente más importante después del nitrógeno, que limita el crecimiento de las plantas. Las plantas contienen más de 0.5% de P en base a peso seco y este elemento participa en diversos procesos en las plantas, como la fotosíntesis, respiración, en la generación y transporte de energía, en la biosíntesis de ácidos nucleicos y como componente de muchas estructuras y fosfolípidos (Vance *et al.*, 2003). A pesar de su importancia en el crecimiento de las plantas y metabolismo, el P es uno de los macronutrientes más limitantes para las plantas, debido a la poca disponibilidad en los suelos y baja eficiencia de aplicación de fertilizantes. La baja eficiencia de P también se debe a que fácilmente reacciona con hierro y aluminio en suelos ácidos y en alcalinos con calcio y magnesio (Vance *et al.*, 2003; Cordell *et al.*, 2011).

Existen dos formas en las que la planta puede absorber el P, cuando está fuertemente oxidado se le llama fosfato (Pi) y cuando está reducido se llama fosfito (Phi) y tiene un oxígeno menos que Pi en su estructura, y se obtiene del ácido fosforoso. El Phi es más soluble que el Pi y entra de una manera más eficiente a la planta tanto por raíz como por la hoja (Lovatt y Mikkelsen, 2006).

Hay numerosos estudios que indican que el Phi provoca efectos negativos en el crecimiento de plantas y que no es realmente utilizado por la planta como fuente de P (Abel *et al.*, 2002; Carswell *et al.*, 1996; Carswell *et al.*, 1997; Forster *et al.*, 1998; Schroetter *et al.*, 2006). Por otro lado se ha encontrado que el Phi suprime las respuestas moleculares de las plantas a la deficiencia de P (Abel *et al.*, 2002; Carswell *et al.*, 1996; Carswell *et al.*, 1997; Ticconi *et al.*, 2001; Varadarajan *et al.*, 2002).

También se tienen reportes de que las aplicaciones de Phi tienen efectos benéficos en cultivos como pepino, en donde mejoró el crecimiento, y en naranja satsuma en Japón

Capítulo 6

mejoró rendimiento y calidad (Watanabe, 2005), al igual que en naranja Valencia en Florida (Albrigo, 1999). Lovatt y Mikkelsen; (2006) así como Rickard (2000), mencionan que los efectos benéficos de Phi no están relacionados con las propiedades fungicidas, sino que más bien se relacionan con propiedades estimulantes del crecimiento, que puede conferir Phi, si se utiliza en concentraciones adecuadas, mismas que no pueden ser estimuladas por Pi.

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, en esta investigación se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Phi en la solución nutritiva, sobre indicadores agronómicos, fisiológicos y de calidad, en el cultivo de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cv. Copenhagen Market.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante los meses de diciembre de 2012 a febrero de 2013, en un invernadero tipo túnel, localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cv. Copenhagen Market, cultivada en un sistema hidropónico de raíz flotante con oxigenación. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento dentro del invernadero fueron 40.8, 3.4 y 17 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 273 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

6.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron tres diferentes soluciones nutritivas diferenciándose entre sí por las concentraciones de Phi. Las soluciones se formularon tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984) al 100% preparada con reactivos tipo analítico, utilizando 1.06 g L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ 4H₂O, 0.30 g L⁻¹ de KNO₃, 0.14 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0.49 g L⁻¹ de MgSO₄ 7H₂O y 0.26 g L⁻¹ de K₂SO₄. La solución nutritiva se complementó con micronutrientes en las siguientes concentraciones: 1.6 mg L⁻¹ de Mn, 0.11 mg L⁻¹ de Cu, 0.86 mg L⁻¹ de B, 0.023 mg L⁻¹ de Zn, 0.048 mg L⁻¹ de Mo. El hierro se abasteció

Capítulo 6

como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L^{-1} a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970).

Para la preparación de la solución nutritiva se empleó agua de pozo profundo, de la cual se obtuvo el análisis nutrimental (Cuadro 1) y de esta manera poder saber de qué disposición nutrimental se partió para la elaboración de la solución nutritiva.

Cuadro 1. Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes ($\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$).

	N-NO₃⁻	P- H₂PO₄⁻	S- SO₄²⁻	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
mol_c m⁻³	0.294	0.062	0.186	0.100	1.356	2.527

La concentración de Phi en la solución fue evaluada a las siguientes concentraciones: 0, 0.25 y 0.5 $\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$. El Phi se obtuvo a partir de ácido fosforoso grado analítico (Sigma-Aldrich). El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5.5 y 5.8 ya que se considera un pH óptimo para la disponibilidad de Phi (Hanrahan *et al.*, 2005), el cual se ajustó adicionando H₂SO₄ al 97% y NaOH 1 N.

La unidad experimental se constituyó por seis plantas. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se utilizó diseño experimental completamente al azar.

6.2.3. Manejo del cultivo

El 25 de octubre de 2012, se pusieron a germinar semillas de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cv. Copenhagen Market, en una mezcla de turba con perlita (70:30 V/V) previamente humedecida y colocada en charolas de unicel de 200 cavidades. Posteriormente a la siembra se cubrieron con un plástico negro para mantener en oscuridad y conservar la humedad hasta su emergencia.

Posteriormente se realizaron riegos con agua durante una semana, a fin de mantener la humedad. Después de ello se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 25% hasta el momento del trasplante, a fin de tener plantas vigorosas.

Capítulo 6

Antes del trasplante se instaló el sistema hidropónico raíz flotante, el cual constó de cajas de madera de 80 x 40 x 20 (largo x ancho x profundidad) forradas con plástico negro calibre 600, considerando cada caja como unidad experimental. El sistema de oxigenación se colocó pegado al fondo de las cajas, para lo cual se utilizó manguera negra tipo espagueti, la cual fue conectada en una línea principal y ésta a su vez fue conectada a un compresor de aire, lo cual permitió tener oxigenada la raíz.

Cada unidad experimental tuvo como soporte láminas de fibra de vidrio, las cuales además sirvieron para mantener aislado al material vegetal de la solución nutritiva y evitar daños en tejido aéreo por quemaduras.

Previo al trasplante, se preparó solución nutritiva Steiner al 50% y se ajustó el pH a 5.5 y se colocaron los soportes de fibra de vidrio. El 15 de diciembre de 2012 en la tarde, se realizó el trasplante, para lo cual se utilizaron vasos de plástico no. 4 (118 mL) previamente perforados en el fondo, en los cuales se colocó la plántula de col, rellenando los espacios libres con agrolita. Cabe señalar que la aplicación de tratamientos se inició el mismo día del trasplante.

El sistema de oxigenación se programó con un temporizador, realizando catorce programaciones distribuidas de la siguiente manera: cada hora de 8:00 AM a 8:00 PM durante el día y a las 12:00 AM y 4:00 AM durante la noche teniendo una duración cada una de un minuto, dando un total de 14 minutos de oxigenación diarios durante todo el experimento.

El nivel de la solución nutritiva y el pH se ajustaron cada tercer día y se hicieron cambios de la solución nutritiva cada 10 días. La concentración de la solución nutritiva Steiner se incrementó a lo largo del experimento hasta llevarla al 100%.

La cosecha de col se realizó 56 días después del trasplante. Al momento de la cosecha se realizaron muestreos de todos los tratamientos, congelando las muestras a -80 °C para su posterior análisis. De igual manera se muestreo el peso de materia fresca y posteriormente dichas muestras se llevaron a la estufa de secado para posteriormente evaluar el peso de materia seca.

Capítulo 6

6.2.4. Variables evaluadas

Se evaluaron variables agronómicas (materia fresca de vástago, y volumen de raíz, materia seca vástago y raíz), indicadores de calidad (actividad antioxidante total método DPPH, fenoles totales, flavonoides totales, concentración de ácido ascórbico), e indicadores fisiológicos (concentración de clorofilas a, b y total, azúcares totales en hojas, aminoácidos libres totales, proteínas solubles totales, concentración nutrimental en hojas), de la misma manera como se describe en el Capítulo 2.

6.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlett para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$ %), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Indicadores agronómicos

6.3.1.1. Peso fresco de vástago y volumen de raíz

En col no se observó algún efecto estadístico en volumen de raíz por aplicaciones de Phi en la solución nutritiva; sin embargo, en vástago se observó un efecto negativo de éstas, en peso fresco, debido a que hay una disminución por aplicaciones de 0.25 y 0.50 mol_c m⁻³ de Phi con respecto al testigo (Cuadro 2).

Capítulo 6

Cuadro 2. Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de col cv. Copenhagen Market cv. Copenhagen Market con aplicaciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol_c m⁻³)	Volumen de raíz (cm³ planta⁻¹)	Vástago (g planta⁻¹ PF^x)
0.00	30.00 a ^z	307.69 a
0.25	27.00 a	206.06 b
0.50	28.25 a	255.36 b
DHS ^y	6.13	43.25
Pr>F	0.4771	0.0091

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

Thao y Yamakawa (2010) realizaron un experimento en komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruvidis* cv. Ajsai) y encontraron que aplicaciones de Phi con suficiencia de Pi no afectaron el crecimiento de vástago y raíz; sin embargo, aplicaciones de Phi en plantas con niveles de insuficiencia de Pi, disminuyeron significativamente el rendimiento de raíz y vástago. Por otro lado, apoyando lo anteriormente mencionado, Danova-Alt *et al.* (2008) mencionan que el Phi inhibe competitivamente la entrada de Pi a la célula. Nuestros resultados coinciden con lo mencionado por estos autores, especialmente en vástago, al haber por competencia, una disminución de peso de materia fresca.

6.3.1.2. Peso seco de vástago y raíz

No se observó ningún efecto estadístico significativo en peso seco de raíz y vástago de col, por aplicaciones de Phi en la solución nutritiva (Cuadro 3).

McDonald *et al.* (2001) mencionan que el Phi intensifica el efecto de deficiencia de P. Por el contrario, el efecto negativo de Phi en plantas con suficiencia de Pi no es muy evidente (Thao *et al.*, 2008; Thao *et al.*, 2009); esto último es evidente se aprecia en este experimento con col, ya que no se afectó la biomasa seca tanto de vástago como de raíz.

Capítulo 6

Cuadro 3. Acumulación de materia seca en raíz y vástago de col cv. cv. Copenhagen Market en respuesta a aplicaciones con fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol_c m⁻³)	Raíz (g planta⁻¹ PS^x)	Vástago (g planta⁻¹ PS)
0.00	2.24 a ^z	32.69 a
0.25	2.06 a	29.61 a
0.50	2.02 a	28.72 a
DHS ^y	0.26	4.00
Pr>F	0.0967	0.0510

^zValores con mismas letras en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

6.3.2. Indicadores de calidad

6.3.2.1. Actividad antioxidante total

Se observó un efecto positivo de aplicaciones de Phi en la solución nutritiva sobre la actividad antioxidante en hojas de col, siendo los tratamientos con Phi superiores al testigo. Se detectó además que la concentración de 0.50 mol_c m⁻³ fue la mejor al incrementar en un 28.4, 23 y 18.6% la actividad antioxidante en hojas de col en los tiempos de incubación de 15, 30 y 60 min respectivamente, en comparación con el tratamiento testigo (Figura 1).

La col es un cultivo muy importante a nivel mundial, no solo por sus propiedades alimenticias, sino por su alta actividad antioxidante y capacidad de detoxificación de nuestro organismo que ayuda a eliminar la producción de sustancias carcinogénicas (Brooks *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2006). La col tiene propiedades antioxidantes muy buenas, que con aplicaciones de Phi se ven incrementadas notoriamente.

Capítulo 6

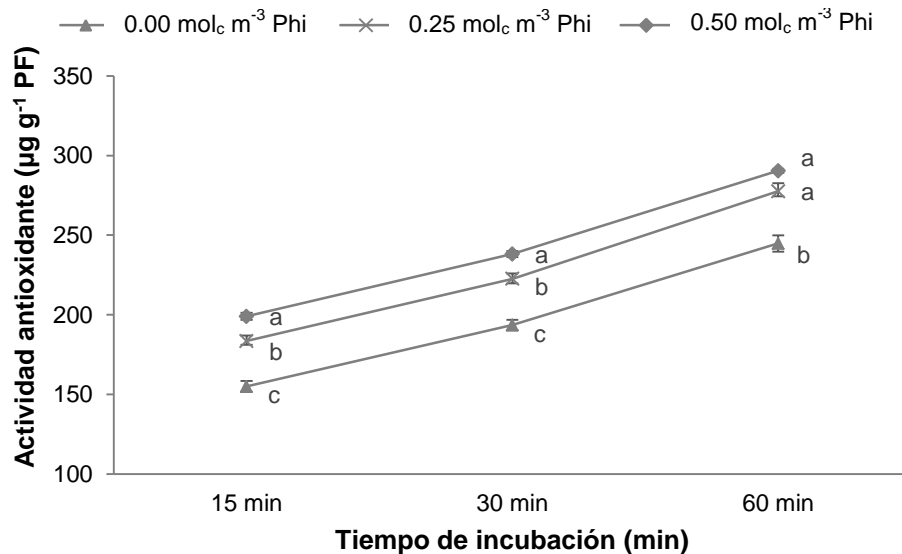


Figura 1. Actividad antioxidante total en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (15, $p=0.0002$; 30, $p=0.0002$; 60, $p=0.0006$). PF=peso fresco.

6.3.2.2. Fenoles totales

Se observó que las aplicaciones de Phi en la solución nutritiva promueven el incremento de la concentración de fenoles totales. De los tratamientos aplicados, el mejor fue el de 0.50 mol_c m⁻³ al incrementar en un 23.5%, la concentración de fenoles totales en hojas, con respecto al testigo (Figura 2).

Los compuestos fenólicos son los antioxidantes más abundantes en las brasicas (Podsdek, 2007). Los compuestos fenólicos son constituyentes naturales de las plantas superiores; sin embargo, su biosíntesis es también inducida en plantas que son sometidas a algún tipo de estrés, como por ejemplo salinidad (Petridis *et al.* 2012). Las aplicaciones de Phi realizadas provocaron un pequeño estrés en la planta, lo que dio como resultado un ligero incremento de fenoles en hojas de col.

Capítulo 6

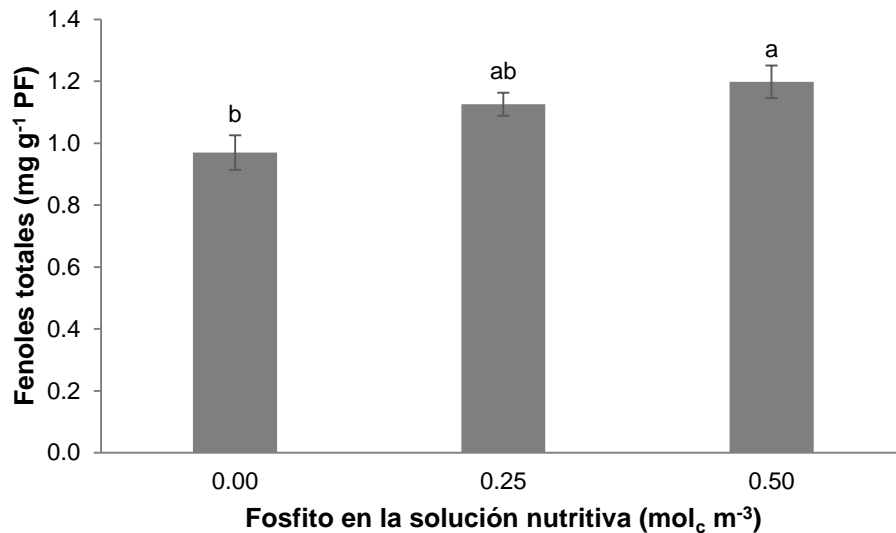


Figura 2. Concentración de fenoles totales en hojas de col en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0094$). PF=peso fresco.

6.3.2.3. Flavonoides totales

Para flavonoides totales se observó la misma tendencia que para actividad antioxidante total y fenoles totales, debido a que al incrementar la concentración de Phi en la solución nutritiva se aumentó la concentración de flavonoides totales en hojas de col, encontrándose como mejor tratamiento la aplicación de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ (Figura 3).

Chalquer-Scott (1999) mencionan que un estrés causado en las plantas por sales trae consigo un incremento de antocianinas y flavonoides, lo reportaron en Arabidopsis, lo que se aplica al observar los resultados aquí obtenidos, ya que el Phi es una forma de estrés para la planta, a la cual reacciona la planta con el incremento en la concentración de flavonoides.

Capítulo 6

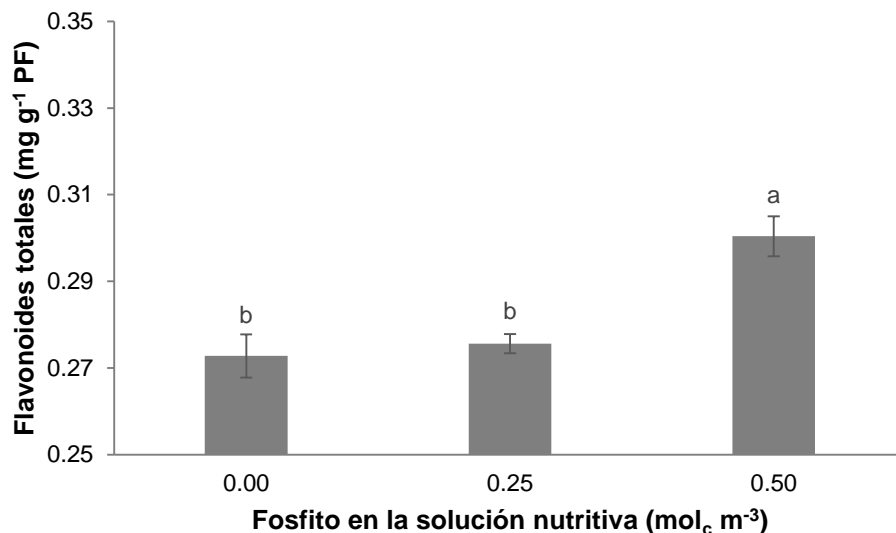


Figura 3. Concentración de flavonoides totales en hojas de col en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0004$). PF=peso fresco.

6.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico

Se observó un gran incremento en la concentración de ácido ascórbico a medida que se aumentó la concentración de Phi en la solución nutritiva, se obtuvo que la concentración de 0.50 mol_c m⁻³ de Phi incrementó hasta en 1589.8% la concentración de ácido ascórbico en hojas, en relación al testigo (Figura 4).

Thao *et al.* (2009) no encontraron efecto de aplicaciones de fosfito en hojas de lechuga y señalan que no tiene efecto en la biosíntesis de ácido ascórbico; sin embargo, en este experimento hay un incremento muy importante de vitamina C, lo cual nos hace pensar que el cultivo influye notoriamente en la respuesta a Phi de plantas de col lo cual incrementa la concentración de ácido ascórbico.

Capítulo 6

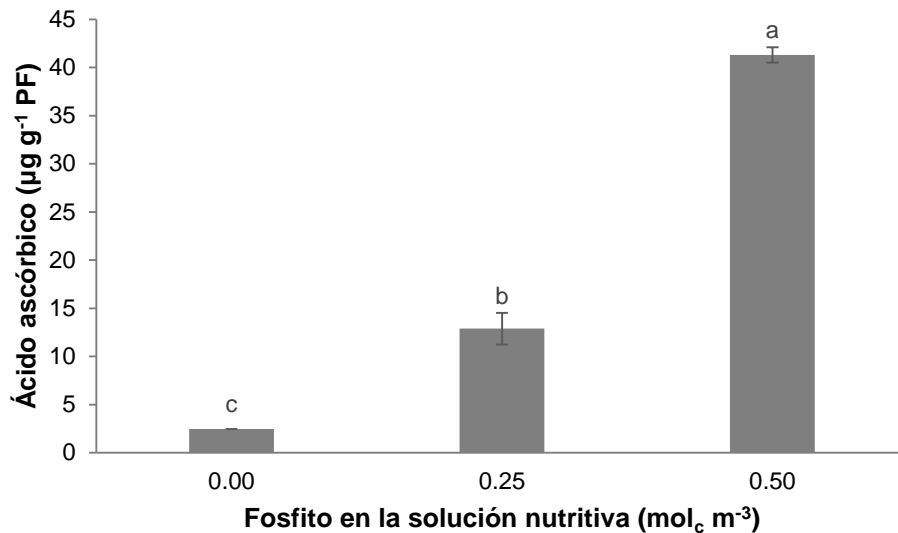


Figura 4. Concentración de ácido ascórbico en hojas de col cv. Copenhagen Market como respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

6.3.3. Indicadores fisiológicos

6.3.3.1. Concentración de clorofilas a, b y total

En el Cuadro 4 se pueden observar los resultados de los tratamientos con Phi sobre la variable concentración de clorofilas a, b y total, obteniendo que no hay diferencias estadísticas entre tratamientos.

Ticconi *et al.* (2001) reportaron que las hojas tratadas con altas concentraciones de Phi, tienen una tonalidad de hoja más clara, por lo cual quiere decir que Phi tiene una influencia sobre la molécula de la clorofila. Sin embargo en el cultivo de col no hubo respuesta en la concentración de clorofila, al no tener variaciones de clorofila a, b y total en hojas.

Capítulo 6

Cuadro 4. Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (%)	Clorofilas (mg g ⁻¹ PF ^x)		
	a	b	Total
0.00	0.33 a	0.17 a ^z	0.51 a
0.25	0.41 a	0.18 a	0.59 a
0.50	0.38 a	0.17 a	0.56 a
DHS ^y	0.14	0.06	0.2
Pr>F	0.3906	0.7375	0.5169

^zValores con las mismas letras en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

6.3.3.2. Azúcares totales en hojas

La respuesta observada en la concentración de azúcares totales en hojas de col sigue la misma tendencia que las variables de calidad, ya que a medida que se incrementó la concentración de Phi en la solución nutritiva, aumentó la concentración de azúcares totales (Figura 5).

Bajo deficiencias de P, la acumulación de carbohidratos en raíces y hojas se incrementa marcadamente (Li *et al.*, 2001), como se mencionó ya con anterioridad, el Phi compite directamente con Pi en la entrada a la planta y muchas ocasiones tienen efectos muy marcados por competencia, lo cual se vio reflejado en el incremento de azúcares al adicionar Phi, lo cual hace evidente el incremento de azúcares en hojas.

Capítulo 6

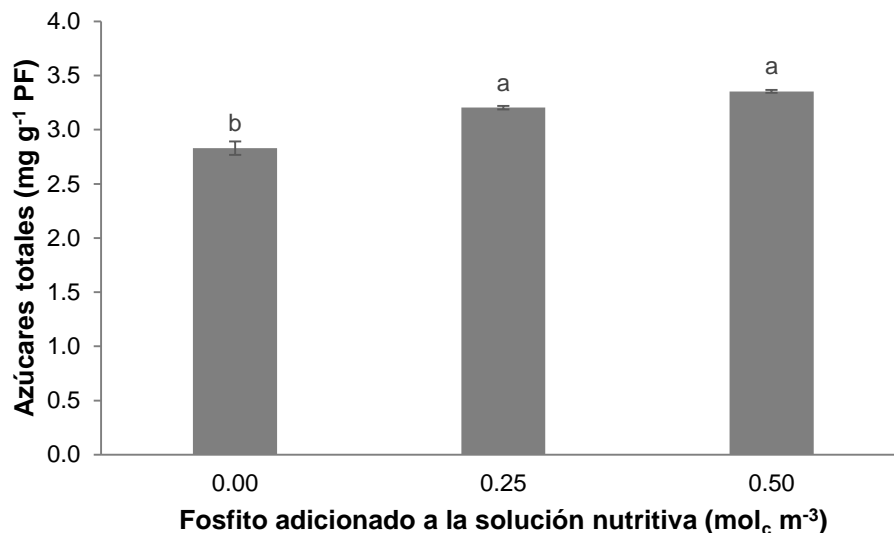


Figura 5. Concentración de azúcares totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0004$). PF= peso fresco.

6.3.3.3. Aminoácidos libres totales

A diferencia de otras variables estudiadas en el cultivo de col, la variable aminoácidos totales mostró una respuesta diferente a aplicaciones de Phi en la solución nutritiva, en la Figura 6 podemos observar que a medida que se incrementó la concentración de Phi, se presentó una disminución en la concentración de aminoácidos libres totales. Si comparamos los resultados obtenidos en col con los obtenidos en lechuga (Figura 7 del Capítulo 2), y con los obtenidos en acelga (Cuadro 5 del Capítulo 4), partimos de que los tratamientos de Phi utilizados fueron los mismos, sin embargo en cada caso se obtuvieron diferentes resultados, esto es, mientras que en lechuga la concentración de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ promovió la concentración de aminoácidos con respecto al testigo, en acelga no se vio afectada la concentración de aminoácidos por efecto de los tratamientos con Phi, pero en el caso de la col se obtuvieron efectos negativos, ya que se dió una disminución de la concentración de aminoácidos al realizar aplicaciones de Phi, por lo que la respuesta de los cultivos a aplicaciones de Phi es diferencial en el caso de aminoácidos libres totales.

Capítulo 6

Berkowitz *et al.* (2013) realizaron experimentos en *Arabidopsis* en donde realizaron aplicaciones de Phi en plantas con suficiencia de Pi (0.5 mM Pi + 2.5 mM Phi) comparándolas con plantas con limitación de Pi (0.05 mM Pi) y reportan que en plantas tratadas con Phi se produjo una reducción entre 40 y 60% en aminoácidos como asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico y serina, y en contraste en plantas con limitación de Pi, pero sin Phi, los mismos aminoácidos se incrementaron entre un 10 y 20% tomando como referencia un testigo con 0.5 mM de Pi. Lo cual concuerda con nuestros resultados al haber una disminución de aminoácidos al incrementar Phi, en el caso de col.

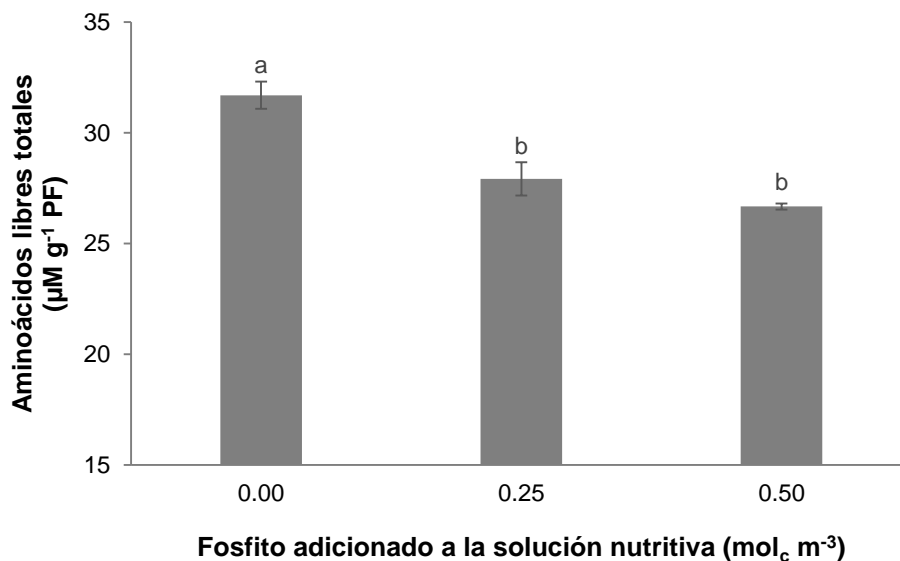


Figura 6. Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0039$). PF= peso fresco.

6.3.3.4. Proteínas solubles totales

En la Figura 7, se observa que aplicaciones de 0.25 mol_c m⁻³ de Phi en la solución nutritiva, incrementan la concentración de proteína soluble total en hojas de col en un 17%, en comparación con el testigo. Comparando los resultados obtenidos en col con los obtenidos en lechuga (Figura 8 del Capítulo 2), es evidente que en col hay mayor

Capítulo 6

concentración de proteína en hoja, sin embargo, en ambos cultivos la adición de 0.25 mol_c m⁻³ incrementó la concentración de proteínas solubles totales en porcentajes similares, ya que en lechuga la incrementó en un 18.2% y en ambos cultivos, cantidades superiores de Phi en la solución nutritiva mostraron tendencia a disminución en concentración de proteína. Por otro lado los resultados en acelga son contrastantes a los de col y lechuga, debido a que aplicaciones de Phi en la solución nutritiva disminuyen la concentración de proteínas en hojas (Figura 6 del Capítulo 4).

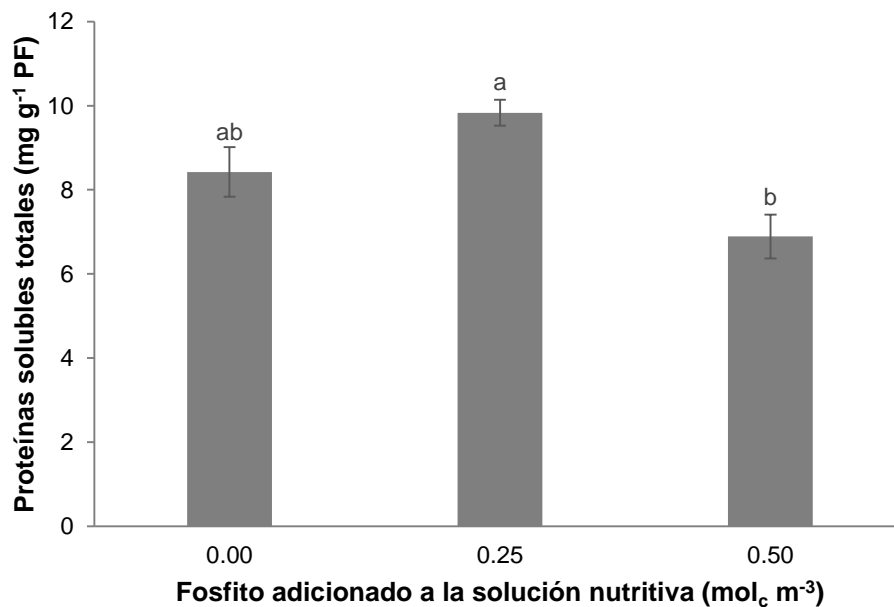


Figura 7. Concentración de proteínas solubles totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0069$). PF= peso fresco.

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

Capítulo 6

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 fosfato o como componentes de la traducción de señales relacionadas con la detección del estatus de fosfato en planta; aparentemente no discriminan entre fosfato y fosfito (McDonald *et al.*, 2001). Lo anteriormente mencionado coincide con los resultados ya que aplicaciones de Phi, en especial de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ no afectó la concentración de proteína, sino que la incrementó, pero sin superar estadísticamente al testigo.

6.3.4. Concentración nutrimental

De manera general en col con tratamientos de Phi en la solución nutritiva, se observó que los nutrimentos se encuentran en mayor concentración en raíz que en vástago; sin embargo, en los Cuadros 5 y 6 podemos observar que N, K, Mg y B se encuentran en concentraciones mayores en vástago que en raíz.

En vástago no hubo efectos estadísticos por los tratamientos con Phi en N, P, Ca, Mg, S, Zn, B y Na. Por otro lado se observó que en K al incrementar la concentración de Phi en la solución, se incrementó también la concentración de K. Caso contrario en Fe y Mn se dió una disminución de la concentración de dichos nutrimentos con las aplicaciones de Phi.

En raíz, la concentración de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y B no fue afectada estadísticamente por las aplicaciones de Phi en la solución nutritiva. En cambio, otros nutrimentos como el N y Mn fueron afectados por aplicaciones de Phi, ya que al incrementar la concentración de Phi, disminuyó la concentración de N y Mn en raíz de col. En S ocurrió un caso opuesto a los anteriores, ya que la aplicación de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi, incrementó su concentración.

Thao *et al.* (2009) encontraron que la adición de Phi en la solución nutritiva incrementó la de N en vástago de lechuga bajo condiciones suficiencia de P (0.3 mM de Pi). En este experimento se manejaron condiciones de suficiencia de P en forma de Pi, sin embargo lo observado en la concentración de N, fue opuesta, ya que al incrementar la

Capítulo 6

concentración de Phi en la solución se disminuyó la concentración de N. Constán-Aguilar *et al.* (2014) encontraron que adicionar Phi en diferentes concentraciones, en la solución nutritiva no modificó la concentración de P total en parte aérea de plantas de pepino, sin importar si tenía condiciones de suficiencia o insuficiencia de P en forma de Pi.

Cuadro 5. Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de col cv. Copenhagen Market en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Tejido	Phi (mol _c m ⁻³)	Concentración (g kg ⁻¹ PS ^x)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Vástago	0.00	34.64 a ^z	3.70 a	11.77 b	15.73 a	5.92 a	10.24 a
	0.25	29.16 a	3.81 a	13.20 ab	15.51 a	5.96 a	9.84 a
	0.50	30.27 a	4.24 a	15.44 a	15.74 a	6.45 a	10.45 a
	DHS	9.38	0.59	2.89	1.94	0.97	1.410
	Pr>F	0.2761	0.0680	0.0188	0.9315	0.2887	0.5031
Raíz	0.00	26.83 a	8.82 a	7.80 a	25.39 a	4.55 a	9.43 ab
	0.25	26.58 ab	7.13 a	7.75 a	16.82 a	3.58 a	6.62 b
	0.50	23.98 b	10.73 a	11.06 a	25.95 a	5.35 a	10.33 a
	DHS ^y	2.64	4.36	4.80	9.77	2.25	3.18
	Pr>F	0.0266	0.1234	0.1417	0.0493	0.1423	0.0241

^zValores con distintas letras en cada columna en cada órgano, son estadísticamente diferentes (Tukey).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Capítulo 6

Cuadro 6. Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de col cv. Copenhagen Market en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Tejido	Phi	Concentración (mg kg ⁻¹ PS ^x)					
	(mol _c m ⁻³)	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Vástago	0.00	128.83 a ^z	3.48 a	21.63 a	114.96 a	98.57 a	4160.40 a
	0.25	115.64 a	2.84 b	18.90 a	120.52 a	105.51 a	4129.20 a
	0.50	78.43 b	3.11 ab	19.48 a	101.71 b	96.03 a	4564.50 a
	DHS	33.81	0.64	7.79	11.64	35.89	2041.20
	Pr>F	0.0064	0.0583	0.6058	0.0041	0.7541	0.8062
Raíz	0.00	2464.40 a	77.18 a	46.05 a	2634.30 a	79.42 a	4006.80 a
	0.25	1573.70 a	54.57 a	33.67 a	343.31 b	56.95 a	3841.30 a
	0.50	2049.50 a	86.86 a	46.55 a	520.04 b	88.43 a	6128.30 a
	DHS ^y	9.44	36.89	20.71	272.26	40.59	2435.80
	Pr>F	0.0762	0.0921	0.1995	0.0001	0.1380	0.0496

^zValores con distintas letras en cada columna en cada órgano, son estadísticamente diferentes (Tukey).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

6.4. CONCLUSIONES

Aplicaciones de Phi en concentraciones de 0.25 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva, incrementan la concentración de proteínas solubles totales en hojas de col. Así mismo, concentraciones iguales o superiores a 0.25 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva, incrementan la actividad antioxidante total, concentración de fenoles totales, ácido ascórbico, azúcares totales en hojas y K en vástago de col.

Por otro lado concentraciones iguales o superiores a 0.25 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva disminuyen materia fresca en vástago, concentraciones de aminoácidos solubles totales, así como N y Na en raíz y Fe y Mn en vástago.

Capítulo 6

6.5. LITERATURA CITADA

- Abel, S.; Ticconi, C. A.; Delatorre, C. A. 2002. Phosphate sensing in higher plants. *Physiol. Plant.* 115: 1-8.
- Albrigo, L. G. 1999. Effects of foliar applications of urea or Nutriphite on flowering and yields of Valencia orange trees. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 112: 1-4.
- Berkowitz, O.; Jost, R.; Kollehn, D. O.; Fenske, R.; Finnegan, P. M.; O'Brien, P. A.; Hardy, G. E. St. J.; Lambers, H. 2013. Acclimation responses of *Arabidopsis thaliana* to sustained phosphite treatments. *J. Exp. Bot.* 64(6): 1731-1743.
- Brooks, J. D.; Paton, V. G.; Vidanes, G. 2001. Potent induction of phase 2 enzymes in human prostate cells by sulforaphane. *Cancer Epidemiol. Prevent.* 9: 949-954.
- Carswell, M. C.; Grant, B. R.; Plaxton, W. C. 1997. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta* 203: 67-74.
- Carswell, M. C.; Grant, B. R.; Theodorou, M. E.; Harris, J.; Niere, J. O.; Plaxton, W. C. 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol.* 10: 105-110.
- Chalker-Scott, L. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochem. Photobiol.* 70: 1-9.
- Constán-Aguilar, C.; Sánchez-Rodríguez, E.; Rubio-Wilhelmi, M. M.; Camacho, M. A.; Romero, L.; Ruiz, J. M.; Blasco, B. 2014. Physiological and nutritional evaluation of the application of phosphite as a phosphorus source in cucumber plants. *Communications Soil Sci. Plant Anal.* 45: 204-222.
- Cordell, D.; Rosemarin, A.; Schroder, J. J.; Smit, A. L. 2011. Towards global phosphorus security: A systems framework for phosphorus recovery and reuse options. *Chemosphere.* 84: 747-758.
- Danova-Alt, R.; Dijkema, C.; Waard, P. D.; Kock, M. 2008: Transport and compartmentation of phosphite in higher plant cells – kinetic and ³¹P nuclear magnetic resonance studies. *Plant Cell Environ.* 31: 1510-1521.

Capítulo 6

- Forster, H.; Adaskaveg, J. E.; Kim, D. H.; Stanghellini, M. E. 1998. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of peppers to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Dis.* 82: 1165-1170.
- Hanrahan, G.; Salmassi, T. M.; Khachikian, C. S.; Förster, K. L. 2005. Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: Significance, speciation and determination. *Talanta.* 66: 435-444.
- 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
- Lovatt, C. J.; Mikkelsen, R. L. 2006. Phosphite fertilizers: what are they? Can you use them? What can they do? *Better Crops.* 90: 11-13.
- McDonald, A. E.; Grant, B. R.; Plaxton, W. C. 2001: Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture, and influence on the plant phosphate starvation response. *J. Plant Nutr.* 24: 1505-1519.
- Petridis, A.; Therios, I.; Samouris, G.; Tananaki, C. 2012. Salinity induced changes in phenolic compounds in leaves and roots of four olive cultivars (*Olea europea* L.) and their relationship to antioxidant activity. *Environ. Exp. Bot.* 79: 37-43.
- Podsdek, A. 2007. Natural antioxidants and antioxidant capacity of *Brassica* vegetables: A review. *Lwt-Food Sci. Technol.* 40(1): 1-11.
- Raghothama, K. G. 1999. Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Mol. Biol.* 50: 665-693.
- Rickard, D. A. 2000. Review of phosphorus acid and its salts as fertilizer materials. *J. Plant Nutr.* 23: 161-180.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schroetter, S.; Angeles-Wedler, D.; Kreuzig, R.; Schnug, E. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschung Volk.* 3/4, 56: 87-99.

Capítulo 6

- Singh, J.; Upadhyay, A. K.; Bahadur, A.; Singh, B.; Singh, K. P.; Rai, M. 2006. *Scientia Hort.* 108: 233-237.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution, *In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands.* pp. 633-649.
- Steiner, A.; van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.* 46: 862-863.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2010. Phosphate absorption of intact komatsuna plants as influenced by phosphite. *Soil Science and Plant Nutrition.* 56: 133-139.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite- phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 378-384.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K.; Sarr, P. S.; Myin, A. K. 2008. Growth response of komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruviridis*) to root and foliar applications of phosphite. *Plant Soil.* 308: 1-10.
- Ticconi, C. A., Delatorre, C. A., Abel, S. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 963-972.
- Vance, C. P.; Uhde-Stone, C.; Allan, D. 2003. Phosphorus acquisition and use: critical adaptation by plants for securing non-renewable resources. *New Phytologist.* 15: 423-447.
- 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.
- Watanabe, K. 2005. A new fertilizer for foliar application, phosphite fertilizer. *Fertilizer.* 101: 91-96.

CAPÍTULO 7. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DE COL A APLICACIONES FOLIARES DE FOSFITO

7.1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un macronutriente esencial en las plantas, el cual juega un papel muy importante en muchos procesos fisiológicos y metabólicos. Es un constituyente estructural clave de moléculas como fosfolípidos y ácidos nucleicos, así como un componente en reacciones de transferencia de energía y señales de transducción, activador metabólico y regulador de actividad enzimática (Marschner, 2012).

Para poder ser metabolizado por la planta el fosfato (Pi) reacciona con la enzima fosfatasa, esta enzima reconoce tres de los cuatro átomos de oxígeno del ión y el otro oxígeno queda disponible para reaccionar en otras catálisis. El fosfito (Phi) sólo tiene tres átomos de oxígeno y un hidrógeno toma el lugar del otro oxígeno. Por dichas diferencias el Phi no puede ser metabolizado por la planta, por lo cual el Phi no participa en las mismas reacciones bioquímicas que Pi. El Phi es descartado por la mayoría de enzimas que participan en las reacciones de transferencia de P (Plaxton, 1998).

Diversos trabajos mencionan los efectos de el Phi en las plantas, como por ejemplo, el Phi mejora el balance nutrimental, promueve la maduración e incrementa la calidad de los frutos así como la calidad en postcosecha (Nojosa *et al.*, 2005; Lobato *et al.*, 2008; Moor *et al.*, 2009). El Phi es más soluble que Pi, de manera que se eficientiza su absorción tanto en raíz como en hojas de las plantas; se menciona que el Phi además de tener propiedades fungicidas, tiene propiedades estimulantes del crecimiento si se utiliza en las cantidades adecuadas (Lovatt y Mikkelsen, 2006).

La col es una de las hortalizas cultivadas en el mundo de mayor importancia, pertenece a la familia de las crucíferas y es originaria del oeste de Europa. Se ha demostrado que la col tiene tanto excelentes propiedades nutricionales como medicinales, por su amplio contenido de antioxidantes capaces de prevenir diversas enfermedades degenerativas como cáncer, así como enfermedades cardiovasculares (Block *et al.*, 1992). Las

Capítulo 7

propiedades benéficas de las crucíferas se atribuyen principalmente a la gran cantidad de fitoquímicos antioxidantes como el ácido ascórbico (Prior y Cao, 2000).

Resulta especialmente interesante poder evaluar el efecto de el Phi en cultivos con gran cantidad de antioxidantes, para observar su posible efecto estimulante. En esta investigación, se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de el Phi aplicadas de manera foliar, sobre indicadores agronómicos, fisiológicos y de calidad, en el cultivo de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cv. Copenhagen Market.

7.2. MATERIALES Y MÉTODOS

7.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante los meses de diciembre de 2012 a febrero de 2013, en un invernadero tipo túnel, localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cv. Copenhagen Market, cultivada en un sistema hidropónico de raíz flotante con oxigenación. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento dentro del invernadero fueron 40.8, 3.4 y 17 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 273 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

7.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron cuatro tratamientos de Phi, los cuales fueron suministrados de manera foliar. Las concentraciones de Phi evaluadas fueron 0, 0.25, 0.50 y 0.75%. Los tratamientos fueron suministrados a los días 20 y 30 después del trasplante. El Phi se obtuvo a partir de ácido fosforoso grado analítico (Sigma-Aldrich). El pH de la solución foliar se mantuvo en 5, para ello se ajustó adicionando KOH 1 N.

La unidad experimental se constituyó por seis plantas, cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se utilizó diseño experimental completamente al azar.

Capítulo 7

7.2.3. Manejo del cultivo

El 25 de octubre de 2012, se pusieron a germinar semillas de col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) cv. Copenhagen Market, en una mezcla de turba con perlita (70:30 V/V) previamente humedecida y colocada en charolas de unicel de 200 cavidades. Posteriormente a la siembra se cubrieron con un plástico negro para mantener en oscuridad y conservar la humedad hasta su emergencia. Posteriormente se realizaron riegos con agua durante una semana, a fin de mantener la humedad. Después de ello se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 25% hasta el momento del trasplante, a fin de tener plantas vigorosas.

Para la preparación de la solución nutritiva se empleó agua de pozo profundo, de la cual se obtuvo el análisis nutrimental (Cuadro 1) y de esta manera poder saber de qué disposición nutrimental se partió para la elaboración de la solución nutritiva.

Cuadro 1. Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento en miliequivalentes (en $\text{mol}_c \text{m}^{-3}$).

	N-NO₃⁻	P- H₂PO₄⁻	S- SO₄²⁻	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
mol_c m⁻³	0.294	0.062	0.186	0.100	1.356	2.527

Antes del trasplante se instaló el sistema hidropónico raíz flotante, el cual constó de cajas de madera de 80 x 40 x 20 (largo x ancho x profundidad) forradas con plástico negro calibre 600, considerando cada caja como unidad experimental. El sistema de oxigenación se colocó pegado al fondo de las cajas, para lo cual se utilizó manguera negra tipo espagueti, la cual fue conectada en una línea principal y ésta a su vez fue conectada a un compresor de aire, lo cual permitió tener oxigenada la raíz y evitar su pudrición.

Cada unidad experimental tuvo como soporte láminas de fibra de vidrio, las cuales además sirvieron para mantener aislado al material vegetal de la solución nutritiva y evitar daños en tejido aéreo por quemaduras.

Capítulo 7

Previo al trasplante, se preparó solución nutritiva Steiner al 50% y se ajustó el pH a 5.5 y se colocaron los soportes de fibra de vidrio. El 15 de diciembre de 2012 en la tarde, se realizó el trasplante, para lo cual se utilizaron vasos de plástico no. 4 (118 mL) previamente perforados en el fondo, en los cuales se colocó la plántula de col, rellenando los espacios libres con agrolita.

Todos los tratamientos fueron nutridos con la misma solución y a medida que se desarrolló el cultivo, la solución se llevó al 100%, fue formulada tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984), siendo preparada con reactivos tipo analítico, utilizando 1.06 g L^{-1} de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.30 g L^{-1} de KNO_3 ; 0.14 g L^{-1} de KH_2PO_4 ; 0.49 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.26 g L^{-1} de K_2SO_4 . La solución nutritiva se complementó con micronutrientes en las siguientes concentraciones: 1.6 mg L^{-1} de Mn; 0.11 mg L^{-1} de Cu; 0.86 mg L^{-1} de B; 0.023 mg L^{-1} de Zn; 0.048 mg L^{-1} de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L^{-1} a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970). El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5.5 y 5.8, el cual se ajustó adicionando H_2SO_4 al 97% y NaOH 1 N.

El sistema de oxigenación se programó con un temporizador, realizando catorce programaciones distribuidas de la siguiente manera: cada hora de 8:00 AM a 8:00 PM durante el día y a las 12:00 AM y 4:00 AM durante la noche teniendo una duración cada una de un minuto, dando un total de 14 minutos de oxigenación diarios durante todo el experimento.

El nivel de la solución nutritiva y el pH se ajustaron cada tercer día. Realizando un cambio de la solución nutritiva cada 10 días, incrementando la concentración de la solución nutritiva Steiner de acuerdo al desarrollo del cultivo hasta llevarla al 100%.

La cosecha de col se realizó 56 días después del trasplante. Al momento de la cosecha se realizaron muestreos de todos los tratamientos, congelando las muestras a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ para su posterior análisis. De igual manera se muestreo el peso de materia fresca y

Capítulo 7

posteriormente dichas muestras se llevaron a la estufa de secado para posteriormente evaluar el peso de materia seca.

7.2.4. Variables evaluadas

Se evaluaron variables agronómicas (materia fresca de vástago y volumen de raíz, materia seca de vástago y raíz), indicadores de calidad (actividad antioxidante total método DPPH, fenoles totales, flavonoides totales, concentración de ácido ascórbico), e indicadores fisiológicos (concentración de clorofilas a, b y total, azúcares totales en hojas, aminoácidos libres totales, proteínas solubles totales, concentración nutrimental en hojas), de la misma manera como se describe en el Capítulo 2.

7.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlet para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$ %), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Indicadores agronómicos

7.3.1.1. Peso fresco de vástago y volumen de raíz

Los resultados de tratamientos foliares de Phi en el cultivo de col nos indican que el tratamiento con 0.50% de Phi vía foliar promovió el incremento en volumen de raíz, peso fresco en vástago, de igual manera se observó que cantidades superiores de Phi afectan negativamente tanto volumen de raíz, como peso fresco de vástago (Cuadro 2). Los resultados obtenidos en lechuga y acelga en los experimentos con tratamientos foliares de Phi fueron muy diferentes a los obtenidos en col, debido a que tanto en

Capítulo 7

lechuga como acelga el volumen de raíz no se vio afectado estadísticamente por los tratamientos con Phi, por otro lado el vástago en lechuga no se vio afectado por los tratamientos (Cuadro 2 del Capítulo 3), pero en acelga los resultados fueron negativos en peso fresco al causar una disminución al incrementar la concentración foliar de Phi (Cuadro 2 del Capítulo 5).

Cuadro 2. Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de col cv. Copenhagen Market con aplicaciones de fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Volumen de raíz (cm³ planta⁻¹)	Vástago (g planta⁻¹ PF^x)
0.00	30.00 ab	307.69 b ^z
0.25	29.88 ab	380.01 a
0.50	37.00 a	411.21 a
0.75	23.13 b	283.38 b
DHS ^y	8.19	66.30
Pr>F	0.0010	0.0001

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

Thao *et al.* (2008) reportan en espinaca una disminución en crecimiento de plantas de espinaca a medida que se incrementó la concentración de aplicaciones foliares de Phi en las plantas, y además observaron toxicidad en todas las aplicaciones de Phi. Lo cual no concuerda con nuestros resultados, ya que concentraciones de 0.50% de Phi en raíz incrementó el volumen de raíz y concentraciones de 0.25 y 0.50% de Phi incrementaron el peso fresco en vástago siempre aplicando suficiencia de Pi.

7.3.1.2. Peso seco de vástago y raíz

Los tratamientos con Phi vía foliar no afectaron estadísticamente el peso seco de raíz, sin embargo al igual como sucedió con el peso fresco, el tratamiento con 0.50% de Phi vía foliar incrementó en este caso el peso seco de vástago en col (Cuadro 3). Comparando los resultados con los del experimento realizado en lechuga (Cuadro 3 del Capítulo 3) encontramos que para raíz tanto en lechuga como en col no se vio afectado

Capítulo 7

el peso de materia seca con los tratamientos de Phi foliares, e incluso en lechuga tampoco se vio afectado vástago, por otro lado en acelga (Cuadro 3 del Capítulo 5) el vástago no se vio afectado por los tratamientos, pero en raíz el Phi aplicado vía foliar tuvo efectos negativos en acumulación de materia seca.

Cuadro 3. Acumulación de materia seca en raíz y vástago de col cv. Copenhagen Market en respuesta a aplicaciones con fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Raíz (g planta⁻¹ PS^x)	Vástago (g planta⁻¹ PS)
0.00	2.24 a ^z	32.69 bc
0.25	2.60 a	38.18 ab
0.50	2.60 a	39.48 a
0.75	2.17 a	29.35 c
DHS ^y	0.50	6.16
Pr>F	0.0401	0.0001

^zValores con letras distintas en cada columna, son estadísticamente diferentes (Tukey). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Estos resultados muestran concordancia en vástago, con lo obtenido por Schroetter *et al.* (2006); por un lado, el peso seco de plantas de maíz con deficiencias de P se vio fuertemente disminuido estadísticamente con aplicaciones de Phi, en comparación con el testigo y plantas con Pi; sin embargo, se registró que en plantas de maíz con suficiencia de P no hubo diferencias significativas al aplicar Phi, con respecto al testigo y a las tratadas con fosfato.

7.3.2. Indicadores de calidad

7.3.2.1. Actividad antioxidante total

En actividad antioxidante la respuesta del cultivo de col fue muy diferente entre tratamientos foliares y tratamientos a la solución nutritiva, ya que como se observa en la Figura 1 los tratamientos de Phi fueron tuvieron un efecto negativo en la actividad antioxidante; en cambio cuando los tratamientos fueron a la solución nutritiva se

Capítulo 7

incrementó ampliamente la actividad antioxidante a medida que se aumentó la concentración de Phi (Figura 1 del Capítulo 6).

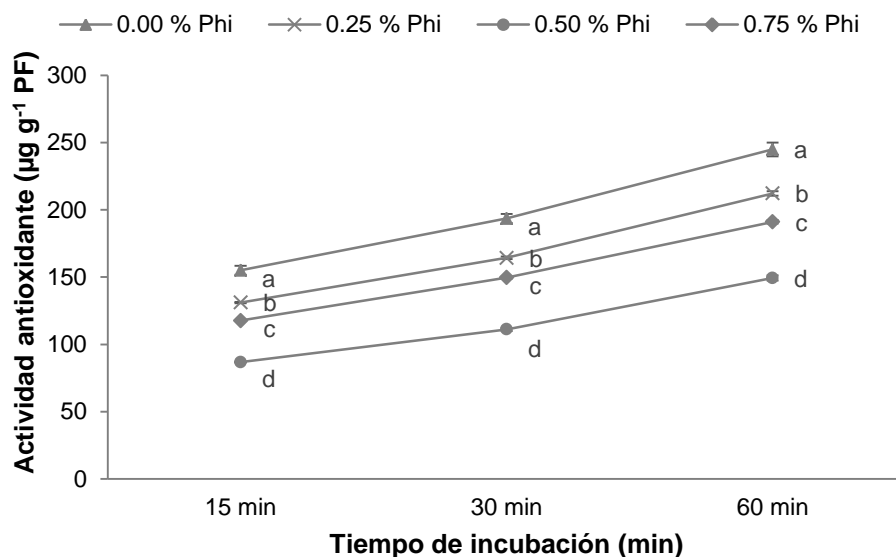


Figura 1. Actividad antioxidante total en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.0001$; 30, $p=0.0001$; 60, $p=0.0001$). PF=peso fresco.

Ávila *et al.* (2013) encontraron una disminución de la fosfatasa ácida al incrementar las concentraciones de Phi en condiciones de insuficiencia de Pi. Además mencionan que bajo condiciones de suficiencia de Pi, el Phi incrementa la concentración de catalasa, lo cual es ventajoso, ya que dicha enzima protege contra estrés oxidativo a la planta; con el incremento de la actividad de catalasa se está incrementando la actividad antioxidante en plantas de frijol. Sin embargo, con aplicaciones foliares de Phi en col se obtuvieron resultados que no coinciden con lo anteriormente mencionado.

7.3.2.2. Fenoles totales

Para fenoles totales, con tratamientos foliares de Phi, se obtuvo que aplicaciones de Phi de 0.50 y 0.75% igualaron al testigo sin Phi, sin embargo, el tratamiento de 0.25%

Capítulo 7

afectó negativamente la concentración de fenoles totales en hojas de col (Figura 2), por lo cual las aplicaciones foliares de Phi no incrementaron fenoles totales en col.

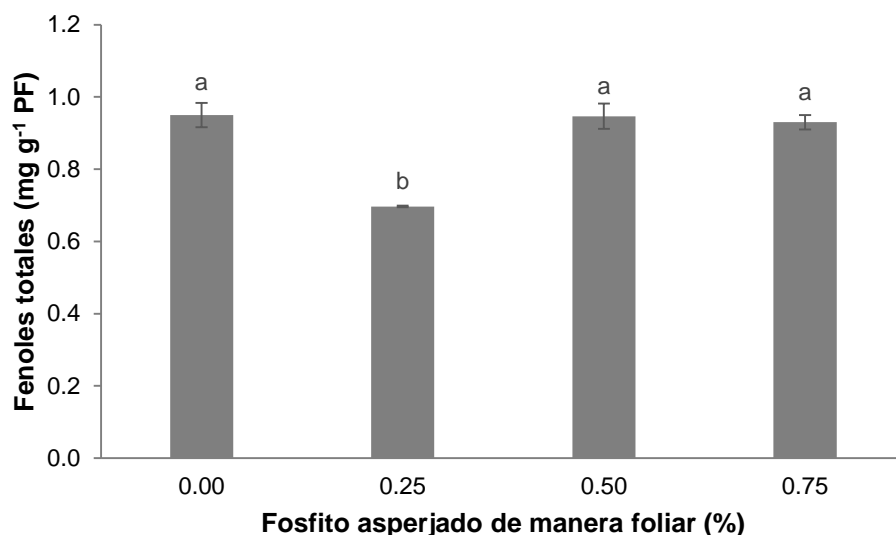


Figura 2. Concentración de fenoles totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0010$). PF=peso fresco.

Podsdek *et al.* (2006) obtuvieron valores de fenoles en col que fluctuaron entre 21 a 171 mg 100 g⁻¹ PMF, por otro lado Singh *et al.* (2006) realizaron determinación de fenoles totales en col y reportaron valores entre 12.58 a 34.41 mg 100 g⁻¹ PMF, resultados similares a los aquí obtenidos.

7.3.2.3. Flavonoides totales

La concentración de flavonoides totales fue afectada de manera negativa por los tratamientos con Phi vía foliar, debidos a que a medida que se incrementó la concentración de Phi en la solución nutritiva, la concentración de flavonoides totales fue en descenso (Figura 3). Los tratamientos foliares de Phi en lechuga y col ocasionaron

Capítulo 7

respuestas similares, en ambos cultivos disminuyeron la concentración de flavonoides totales (Figura 2 del Capítulo 3).

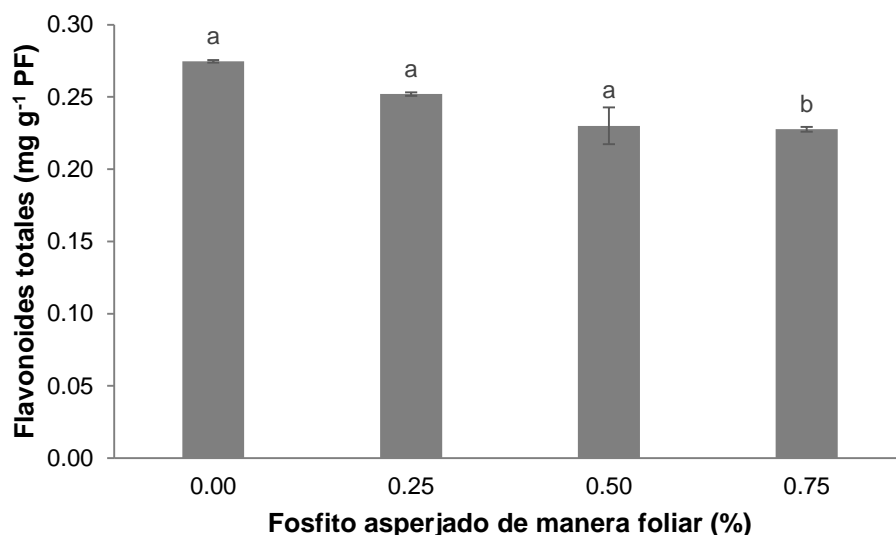


Figura 3. Concentración de flavonoides totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0067$). PF=peso fresco.

Los flavonoides son de los fitoquímicos más abundantes en plantas del género *Brassica* y tienen funciones muy importantes en la planta, ya que la protegen de la radiación UV, contra patógenos, insectos y de la ingesta por algunos animales, es por ello que someter plantas a estrés por mayor radiación, temperatura incrementa la concentración de flavonoides (Pinter *et al.*, 2007; Rice-Evans y Packer, 2003).

7.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico

Con aplicaciones foliares de Phi en col, se ha observado que hay una relación positiva entre aplicaciones de Phi y el incremento de la concentración de ácido ascórbico, ya que con aplicaciones foliares de Phi a 0.50% se incrementó en 2663% la concentración de ácido ascórbico al compararlo con el testigo (Figura 4).

Capítulo 7

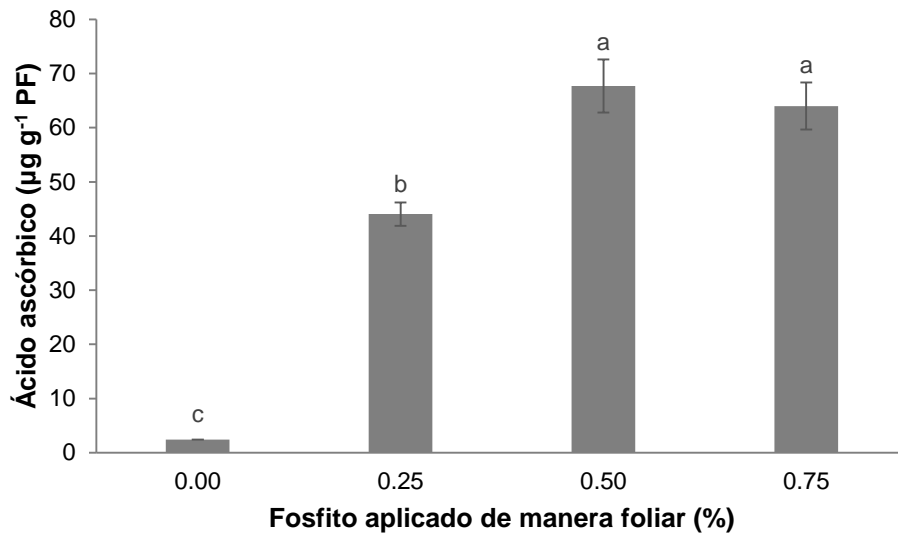


Figura 4. Concentración de ácido ascórbico en hojas de col cv. Copenhagen Market como respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

En el cultivo de col tanto con tratamientos de Phi foliares como en la solución nutritiva, se observó una fuerte tendencia en el incremento de ácido ascórbico al aplicar Phi (Figura 4 del Capítulo 6). De manera contrastante en el cultivo de lechuga se observó una disminución de ácido ascórbico a medida que se incrementó la concentración de tratamientos con Phi, tanto foliares como en la solución nutritiva (Figura 4 del Capítulo 2 y Figura 4 del Capítulo 3, respectivamente), por lo que se entiende que los cultivos tienen una respuesta diferencial a la dosis y vía de aplicación de Phi en lo que a la concentración de ácido ascórbico en hojas.

Moor *et al.* (2009) reportaron un incremento en la concentración de ácido ascórbico en plantas de fresa tratadas previo a su trasplante con una solución con fosfito, este incremento es atribuido al efecto promotor de los mecanismos de defensa de las plantas del Phi, los resultados en col aquí obtenidos muestran una respuesta positiva a las aplicaciones de Phi, por lo que si el objetivo es el aumento en la concentración de ácido ascórbico en col la utilización de Phi en concentraciones adecuadas es una alternativa viable.

Capítulo 7

7.3.3. Indicadores fisiológicos

7.3.3.1. Concentración de clorofila a, b y total

Se observó que aplicaciones foliares de 0.25% de Phi en col, incrementaron la concentración de clorofila a, b y total hasta en un 15.4, 13.9 y 14.9%, respectivamente en comparación con el testigo (Figura 5). Al contrastar estos resultados con los obtenidos en lechuga se observa que en ambos cultivos (col y lechuga), se incrementa la concentración de clorofilas con dosis bajas de Phi en la solución a asperjar, es decir 0.25% (Capítulo 3, Figura 5). Por otro lado con los mismos tratamientos en el cultivo de acelga no se registraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos en estas variables (Cuadro 4 del Capítulo 5).

En el cultivo de fresa aplicaciones de Phi del 30% del P total incrementaron la concentración de clorofilas a, b y total (Estrada-Ortiz *et al.*, 2011). En este experimento también hubo una respuesta positiva en la concentración de clorofilas cuando se asperjó solución foliar con Phi a concentración de 0.25%.

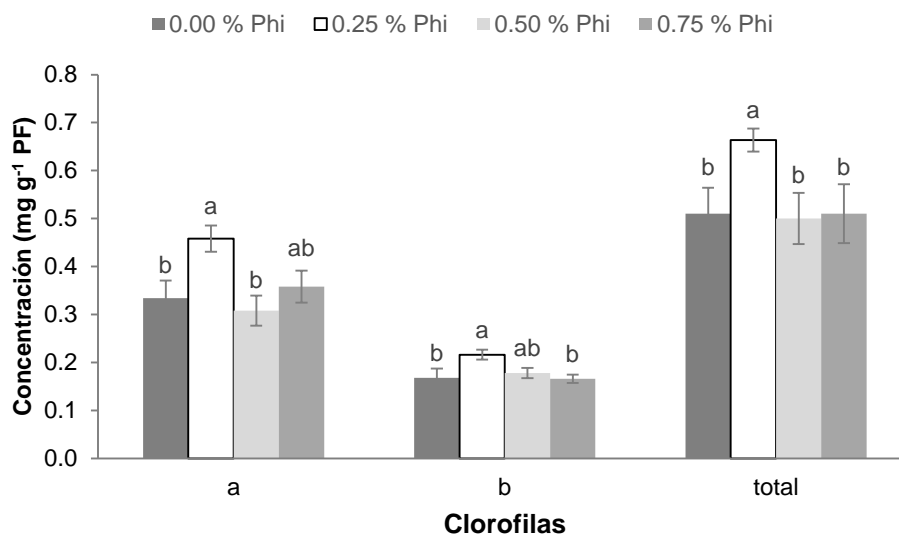


Figura 5. Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes aplicaciones de fosfito vía foliar. Medias con letras

Capítulo 7

distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0110$; Chl b, $p=0.0178$; Chl total, $p=0.0124$). PF= peso fresco.

7.3.3.2. Azúcares totales en hojas

En el cultivo de col no se obtuvieron diferencias estadísticas entre tratamientos sobre la variable azúcares totales en hojas; sin embargo, numéricamente se observa incremento en concentración de azúcares a medida que se aumenta la concentración en la aplicación foliar de Phi (Cuadro 4), lo cual permite hipotetizar que al asperjar en col concentraciones de Phi superiores a las aquí evaluadas, se podría incrementar más la concentración de azúcares y obtener diferencias estadísticas significativas, como sucedió en los tratamientos consistentes en suministro de Phi en la solución nutritiva en col (Figura 5 del Capítulo 6).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Estrada-Ortiz *et al.* (2011) y a que ellos realizaron un experimento en fresa y no encontraron diferencias significativas en la concentración de azúcares totales en hojas de fresa con diferentes concentraciones de Phi vía solución nutritiva.

Cuadro 4. Concentración de azúcares totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Concentración de azúcares totales (mg g ⁻¹ PF ^x)
0.00	2.81 a ^z
0.25	2.90 a
0.50	3.15 a
0.75	3.08 a
DHS ^y	0.44
Pr>F	0.1608

^zValores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

7.3.3.3. Aminoácidos libres totales

Al realizar aplicaciones foliares de Phi en el cultivo de col se observó que no afectan significativamente la concentración de aminoácidos libres totales en hojas (Cuadro 5).

Capítulo 7

En el cultivo de apio se obtuvieron las mismas tendencias en esta variable, es decir los tratamientos foliares con Phi no afectaron estadísticamente la concentración de aminoácidos (Cuadro 5 del Capítulo 9). Por otro lado en el cultivo de acelga la aplicación foliar de 0.25% de Phi incrementó la concentración de aminoácidos libres totales (Figura 5 del Capítulo 5).

Cuadro 5. Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Concentración de aminoácidos libres totales ($\mu\text{M g}^{-1} \text{PF}^x$)
0.00	31.67 a ^z
0.25	28.45 a
0.50	26.46 a
0.75	29.16 a
DHS ^y	7.13
Pr>F	0.2550

^zValores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

Berkowitz *et al.* (2013) encontraron que el Phi disminuye los niveles de aminoácidos como asparagina, aspartato, glutamato y serina en *Arabidopsis*. Sin embargo también se ha detectado que niveles de insuficiencia de Pi una disminución en la concentración de aminoácidos en *Arabidopsis* y en cebada (Morcuende *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2008).

7.3.3.4. Proteínas solubles totales

Se observó que aplicaciones foliares de Phi en el cultivo de col tuvieron efectos negativos en la concentración de proteínas solubles totales en hojas (Figura 6). En otro experimento realizado en el cultivo de acelga también se encontró que las aplicaciones de Phi al follaje tuvieron efectos negativos en la concentración de proteína en hojas (Figura 6 del Capítulo 5). Por otro lado en un experimento realizado en lechuga se obtuvo que las aplicaciones foliares de Phi no afectaron estadísticamente la concentración de proteínas solubles totales (Capítulo 3 del Cuadro 5).

Capítulo 7

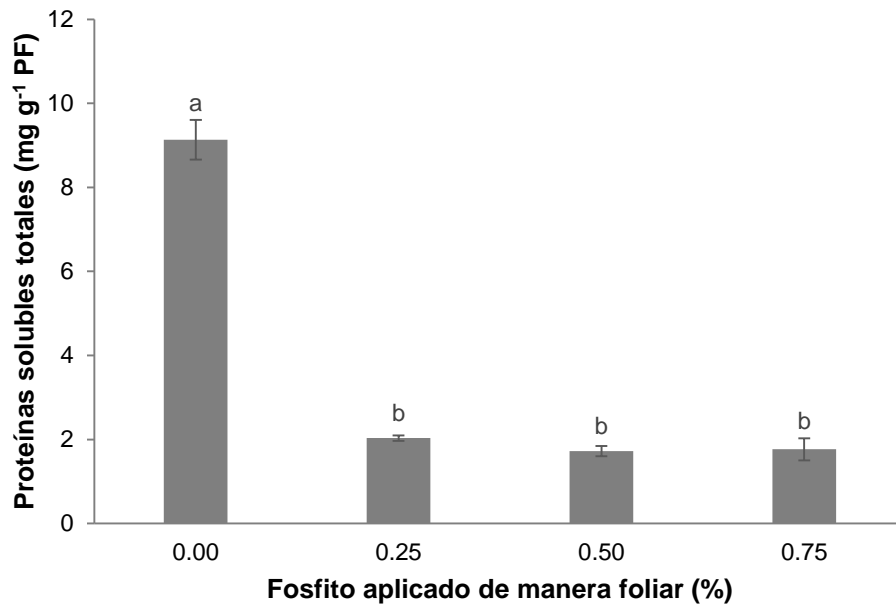


Figura 6. Concentración de proteínas solubles totales en hojas de col cv. Copenhagen Market en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF= peso fresco.

El Phi inhibe múltiples respuestas inducidas por niveles insuficiencia de fosfato (Carswell *et al.*, 1997). El Phi inhibe la fosforilación de proteínas cuando existe estrés por P, condición en la que el Phi suprime la actividad de enzimas nucleolíticas y la expresión de la fosfatasa ácida y de genes transportadores de P en *A. thaliana* (Ticconi *et al.*, 2001). Esto fue muy notorio en este experimento, ya que las aplicaciones de Phi foliares disminuyeron fuertemente la concentración de proteína, a pesar de que siempre hubo Pi en suficiencia.

7.3.4. Concentración nutrimental

En vástago de col no se observaron diferencias estadísticas significativas en macronutrientes al realizar aplicaciones foliares de Phi, mientras que en micronutrientes la aplicación de Phi disminuyó la concentración de Fe en vástago (Cuadros 6 y 7). En raíz no se afectó en forma significativa la concentración de P, S, Fe, Cu, Zn y B con aplicaciones foliares de Phi; sin embargo, se observó que

Capítulo 7

aplicaciones de 0.50% de Phi incrementaron la concentración de N, K, Mn y Na en raíz de col y la aplicación de 0.75% de Phi vía foliar incrementó la concentración de Mg en raíz de col (Cuadros 6 y 7).

Ávila *et al.* (2012), reportaron que las concentraciones de N, Mg, S, B, Zn, Cu y Fe en plantas con insuficiencia de Pi y las concentraciones de N, Ca, Mg, S, B, Zn, Cu y Mn en plantas con suficiencia de Pi, se incrementó su concentración en vástago de frijol cuando se aplicaron elevados niveles de Phi (50 y 100 mg de P dm⁻³).

Cuadro 6. Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de col cv. Copenhagen Market en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Tejido	Phi (%)	Concentración (g kg ⁻¹ PS ^x)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Vástago	0.00	34.64 a ^z	3.70 a	11.77 a	15.73 a	5.92 a	10.24 a
	0.25	34.39 a	4.07 a	12.86 a	17.34 a	6.22 a	10.47 a
	0.50	35.59 a	3.55 a	11.34 a	15.14 a	5.27 a	8.74 a
	0.75	29.50 a	4.56 a	15.69 a	16.63 a	6.33 a	10.29 a
	DHS ^y	8.98	1.78	5.49	7.38	2.79	4.09
	Pr>F	0.2326	0.3772	0.1364	0.8209	0.6753	0.5802
Raíz	0.00	26.83 b	8.82 a	7.80 b	25.39 a	4.55 ab	9.43 a
	0.25	27.83 b	7.57 a	8.09 b	17.43 b	3.64 b	8.14 a
	0.50	29.93 a	9.94 a	13.93 a	17.52 b	4.54 ab	9.36 a
	0.75	28.21 ab	10.15 a	11.72 a	22.25 ab	5.04 a	8.91 a
	DHS	2.43	2.99	3.44	5.68	1.34	2.26
	Pr>F	0.0143	0.0874	0.0004	0.0030	0.0564	0.3449

^zValores con distintas letras en cada columna por órgano son estadísticamente diferentes (Tukey). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Capítulo 7

Cuadro 7. Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de col cv. Copenhagen Market en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Tejido	Phi (%)	Concentración (mg kg ⁻¹ PS ^x)					
		Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Vástago	0.00	128.83 a	3.48 a	21.63 a	114.96 a	98.57 a	4160.40 a
	0.25	73.38 b ^z	2.39 a	16.00 a	108.26 a	95.52 a	4168.50 a
	0.50	73.51 b	2.31 a	15.17 a	82.00 a	78.62 a	4124.80 a
	0.75	92.77 ab	3.40 a	18.52 a	106.11 a	98.29 a	5170.30 a
	DHS	45.91	1.54	8.89	44.40	45.62	1430.80
	Pr>F	0.0116	0.0736	0.1865	0.1918	0.5338	0.1362
Raíz	0.00	2464.40 a	77.18 a	46.05 a	2634.30 a	79.42 a	4006.80 ab
	0.25	2084.60 a	62.74 a	42.95 a	1065.80 b	69.70 a	3222.70 b
	0.50	2285.70 a	63.77 a	46.17 a	2886.60 a	83.72 a	5018.70 a
	0.75	2292.10 a	74.91 a	45.05 a	2543.60 a	88.05 a	5126.50 a
	DHS	8.49	25.51	18.46	430.11	28.35	1280.60
	Pr>F	0.6333	0.2631	0.9485	0.0001	0.3041	0.0024

^zValores con distintas letras en cada columna por órgano son estadísticamente diferentes (Tukey). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

7.4. CONCLUSIONES

Aplicaciones foliares de Phi en col, incrementan la concentración de ácido ascórbico en hojas.

Aplicaciones de Phi vía hoja en concentraciones de 0.25% incrementan la concentración de clorofilas a, b y totales.

Al realizar aplicaciones foliares de Phi de 0.50% se incrementa el volumen de raíz y el peso de materia fresca y seca de vástago.

La concentración de flavonoides totales, proteínas solubles totales, Fe en vástago y actividad antioxidante en hojas de col se ve disminuida con aplicaciones foliares de Phi.

Capítulo 7

7.5. LITERATURA CITADA

- Ávila, F. W.; Faquin, V.; Ramos, S. J.; Pinheiro, G. L.; Marques, D. J.; da Silva, L. A. K.; Ferreira de Oliveira, N.C.; Ávila, P. A. 2012. Effects of phosphite and phosphate supply in a weathered tropical soil on biomass yield, phosphorus status and nutrient concentrations in common bean. *J. Food, Agric. Environ.* 10(2): 312-317.
- Ávila, F.W., Faquin, V., da Silva, L. A. K., Andressa, A.P., Marques, D. J., Silva, G. E. M., Yuen, T. D. K. 2013. Effect of phosphite supply in nutrient solution on yield, phosphorus nutrition and enzymatic behavior in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Aust. J. Crop Sci.* 7(5): 713-722.
- Berkowitz, O.; Jost, R.; Kollehn, D. O.; Fenske, R.; Finnegan, P. M.; O'Brien, P. A.; Hardy, G. E. St. J.; Lambers, H. 2013. Acclimation responses of *Arabidopsis thaliana* to sustained phosphite treatments. *J. Exp. Bot.* 64(6): 1731-1743.
- Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. 1992. Fruits vegetables and cáncer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutr. Cancer.* 18: 1-29.
- Carswell, M.C.; Grant, B.R.; Plaxton, W.C. 1997. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta.* 203: 67-74.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2011. Biochemical responses in strawberry plants supplying phosphorus in the form of phosphite. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 17: 129-138.
- Huang, C. Y.; Roessner, U.; Eickmeier, I.; Genc, Y.; Callahan, D. L.; Shirley, N.; Langridge, P.; Bacic, A. 2008. Metabolite profiling reveals distinct changes in carbon and nitrogen metabolism in phosphate- deficient barley plants (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Physiol.* 49: 691-703.
- Lobato, M. C.; Olivieri, F. P.; González, A. E. A.; Wolski, E. A.; Daleo, G. R.; Caldiz, D. O.; Andreu, A. B. 2008. Phosphite compounds reduce disease severity in potato seed tubers and foliage. *E. J. P.P.* 122(3): 349-358.

Capítulo 7

- Lovatt, C. J.; Mikkelsen, R. L. 2006. Phosphite fertilizers: what are they? Can you use them? What can they do? *Better Crops*. 90: 11-13.
- Marschner, P. 2012. Mineral nutrition of higher plants. Third Edition. London, UK. Academic Press.
- Moor, U.; Pöldmaa, P.; Tõnutarea, T.; Karpa, K.; Starasta, M.; Vool, E. 2009. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Scientia Hort.* 119(3): 264-269.
- Morcuende, R.; Bari, R.; Gibon, Y. Zhen, W.; Pant, P.B.; Bläsing, O.; Czechowski, T.; Udvardi, M.K.; Stitt, M.; Scheible, W.R. 2007. Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant, Cell Environ.* 30: 85-112.
- Nojosa, A. B. A.; Resende, M. L. V.; Resende, A. V. 2005. Usos de fosfitos e silicatos na indução de resistência. *In: Cavalcanti, L. S.; Di Pierp, R.; Cia, P.; Pascholati, S. F.; Resende, M. L. V.; Romeiro, R. S. (Eds.) Indução de resistência de plantas a patógenos e insetos. Piracicaba SP. Fealq. Pp. 139-153.*
- Pinter, J.; Kosa, E.; Hadi, G.; Hegyi, Z.; Spitko, T.; Toht, Z.; Szigeti, Z.; Paldi, E.; Mrton, L.C. 2007. Effect of increased UV-B radiation on the anthocyanin content of maize (*Zea mays* L.) leaves. *Acta Agron. Hung.* 55: 7-17.
- Plaxton, W. C. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants, phosphorus. *In: Lynch, J. P.; Deikman, J. (Ed.) Plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes. Rockville: Am. Soc. Plant Physiol. pp. 229-241.*
- Podsedek, A.; Sosnowska, D.; Redzynia, M.; Anders, B. 2006. Antioxidant capacity and content of *Brassica oleracea* dietary antioxidants. *I. J. F. S.T.* 41(1): 49-58.
- Prior, R. L.; Cao, G. 2000. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implications. *Hortic. Sci.* 35: 588-592.
- Rice-Evans; Packer, L. 2003. Flavonoids in health and disease. Marcel Dekker Inc. New York. pp. 467-469.

Capítulo 7

- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schroetter, S., D. Angeles-Wedler, R. Kreuzig and E. Schnug. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). Landbauforschung Völkenrode 56: 87-99.
- Singh, J.; Upadhyay, A. K.; Bahadur, A.; Singh, B.; Singh, B.; Singh, K. P.; Rai, M. 2006. Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). Scientia Hort. 108: 233-237.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution, *In*: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. pp. 633-649.
- Steiner, A., van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. Plant Physiol. 46: 862-863.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K.; Sarr, P. S.; Myint, A. K. 2008. Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth and phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea* L.). Soil Sci. Plant Nut. 54: 761-768.
- Ticconi, C. A.; Delatorre, C. A.; Abel, S. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 127: 963-972.

CAPÍTULO 8. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL APIO A APLICACIONES EN LA RAÍZ DE FOSFITO

8.1. INTRODUCCIÓN

El fosfito (Phi) es un análogo estructural de fosfato (Pi), el cual es eficientemente absorbido por el sistema de transporte de fosfato y es movilizado rápidamente en el xilema y floema de las plantas (McDonald *et al.*, 2001; Ouimette y Coffey, 1990). El Phi, una forma reducida de fósforo (P), fue propuesto como una alternativa prometedora de fertilización después de la segunda guerra mundial, debido a que encontraron en el Phi propiedades que no encontraban en el Pi (Abelson, 1999; Ruthbaum y Baille, 1964), como mayor solubilidad, menor reactividad con los componentes del suelo y menor pérdida dado que los microorganismos del suelo no lo pueden utilizar como fuente de P (Morton *et al.*, 2005; Pasek, 2008; White y Metcalf, 2007). Sin embargo, las plantas no pueden metabolizar el Phi, limitando ello su posible uso como fertilizante (Carswell *et al.*, 1996; Carswell *et al.*, 1997; Förster *et al.*, 1998; Ouimette y Coffey, 1989; Schroetter *et al.*, 2006; Ticconi *et al.*, 2001; Varadarajan *et al.*, 2002).

El Phi aplicado como única fuente de P, inhibe el crecimiento de la planta y ha sido propuesto para ser utilizado en un sistema de manejo de malezas (McDonald *et al.*, 2001). También se han reportado respuestas benéficas del Phi en la productividad de plantas, los cuales se han debido a un doble efecto, la inhibición del crecimiento de malezas y propiedades en la reducción de la incidencia de enfermedades causadas por especies de *Phytophthora*. Dicha disminución en incidencia de enfermedades se debe a que el Phi inhibe el crecimiento de Oomicetos y activa los mecanismos de defensa de las plantas (Förster *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 2001; Saindrenan *et al.*, 1988).

Se han hipotetizado también efectos benéficos de Phi con propiedades nutrimentales como fuente de P para las plantas. Sin embargo, hay reportes que evidencian que el Phi no puede ser metabolizado por las células, lo que se refleja en la reducción del crecimiento de diversos cultivos como *Arabidopsis*, tomate, pimiento, maíz y *Brassica nigra* (Förster *et al.*, 1998; López-Arredondo y Herrera-Estrella, 2012; Schroetter *et al.*

Capítulo 8

al.,2006; Thao *et al.*, 2008; Ticconi *et al.*, 2001; Varadarajan *et al.*, 2002); por lo anterior, no se recomienda ser aplicado como única fuente de P.

En fresa, Moor *et al.* (2009) encontraron que la fertilización con Phi no inhibe ni promueve el crecimiento en plantas de fresa, así mismo, encontraron que la fertilización a base de Phi, no tiene ventajas sobre la fertilización con Pi, en cuanto a rendimiento, sin embargo encontraron que aplicaciones foliares de Phi, modificaron el sabor, al incrementar la acidez y disminuir la concentración de azúcares. Estrada-Ortiz *et al.* (2011), encontraron que la adición del 30% de P en forma de el Phi en la solución nutritiva en etapa de fructificación en fresa, se estimuló el metabolismo de la planta, incrementándose la concentración de clorofilas a, b y total, de aminoácidos y de proteínas.

El apio (*Apium graveolens* L.) ha sido utilizado como alimento, al igual que es utilizado en la medicina tradicional, ya que tiene diversas propiedades como bajar la presión arterial y regular las funciones cardiacas, también es utilizado para la regularización del azúcar en la sangre (Kolarovic *et al.*, 2010). Además el apio es una planta que contiene una cantidad alta de flavonoides, los cuales tienen grandes propiedades antioxidantes.

Debido a que hay gran controversia del efecto del Phi en los cultivos, es interesante realizar aplicaciones bajo suficiencia de Pi y observar posibles ventajas de la utilización del Phi en apio. En ese contexto en esta investigación, se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Phi aplicadas en la solución nutritiva, sobre indicadores agronómicos, fisiológicos y de calidad, en el cultivo de apio (*Apium graveolens* L.) cv. Tall Utha 52-70.

8.2. MATERIALES Y MÉTODOS

8.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante los meses de diciembre de 2012 a febrero de 2013, en un invernadero tipo túnel, localizado a 19° 29´ latitud norte, 98° 53´ longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue apio (*Apium graveolens* L.)

Capítulo 8

cv. Tall Utha 52-70, cultivado en un sistema hidropónico de raíz flotante con oxigenación. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento dentro del invernadero fueron 40.8, 3.4 y 17 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 273 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

8.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron tres diferentes soluciones nutritivas diferenciándose entre sí por las concentraciones de Phi. Las soluciones se formularon tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984) al 100% preparada con reactivos tipo analítico, utilizando 1.06 g L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ 4H₂O, 0.30 g L⁻¹ de KNO₃, 0.14 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0.49 g L⁻¹ de MgSO₄ 7H₂O y 0.26 g L⁻¹ de K₂SO₄. La solución nutritiva se complementó con micronutrientes en las siguientes concentraciones: 1.6 mg L⁻¹ de Mn, 0.11 mg L⁻¹ de Cu, 0.86 mg L⁻¹ de B, 0.023 mg L⁻¹ de Zn, 0.048 mg L⁻¹ de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L⁻¹ a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970).

Para la preparación de la solución nutritiva se empleó agua de pozo profundo, de la cual se obtuvo el análisis nutrimental (Cuadro 1) y de manera poder saber de qué disposición nutrimental se partió para la elaboración de la solución nutritiva.

Cuadro 1. Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes (en mol_c m⁻³).

	N-NO₃⁻	P- H₂PO₄⁻	S- SO₄²⁻	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
mol_c m⁻³	0.294	0.062	0.186	0.100	1.356	2.527

La concentración de Phi en la solución fue evaluada a las siguientes concentraciones: 0, 0.25 y 0.5 mol_c m⁻³. El Phi se obtuvo a partir de ácido fosforoso grado analítico (Sigma-Aldrich). El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5.5 y 5.8, ya que se considera un pH óptimo para la disponibilidad de Phi (Hanrahan *et al.*, 2005), el cual se ajustó adicionando H₂SO₄ al 97% y NaOH 1 N.

Capítulo 8

La unidad experimental se constituyó por 6 plantas. Cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se utilizó diseño experimental completamente al azar.

8.2.3. Manejo del cultivo

El 25 de octubre de 2012, se pusieron a germinar semillas de apio (*Apium graveolens* L.) cv. Tall Utha 52-70, en una mezcla de turba con perlita (70:30 V/V) previamente humedecida y colocada en charolas de unicel de 200 cavidades. Posteriormente a la siembra se cubrieron con un plástico negro para mantener en oscuridad y conservar la humedad hasta su emergencia.

Posteriormente se realizaron riegos con agua durante una semana, a fin de mantener la humedad. Después de ello se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 25% hasta el momento del trasplante, a fin de tener plantas vigorosas.

Antes del trasplante se instaló el sistema hidropónico raíz flotante, el cual constó de cajas de madera de 80 x 40 x 20 (largo x ancho x profundidad) forradas con plástico negro calibre 600, considerando cada caja como unidad experimental. El sistema de oxigenación se colocó pegado al fondo de las cajas, para lo cual se utilizó manguera negra tipo espagueti, la cual fue conectada en una línea principal y ésta a su vez fue conectada a un compresor de aire, lo cual permitió tener oxigenada la raíz.

Cada unidad experimental tuvo como soporte láminas de fibra de vidrio, las cuales además sirvieron para mantener aislado al material vegetal de la solución nutritiva y evitar daños en tejido aéreo por quemaduras.

Previo al trasplante, se preparó la solución nutritiva de Steiner al 50%; se ajustó el pH a 5.5 y se colocaron los soportes de fibra de vidrio. El 1 de enero de 2013 por la tarde, se realizó el trasplante, para lo cual se utilizaron vasos de plástico no. 4 (118 mL) previamente perforados en el fondo, en los cuales se colocó la plántula de apio, rellenando los espacios libres con agrolita. Cabe señalar que la aplicación de tratamientos se inició el mismo día del trasplante.

Capítulo 8

El sistema de oxigenación se programó con un temporizador, realizando catorce programaciones distribuidas de la siguiente manera: cada hora de 8:00 AM a 8:00 PM durante el día y a las 12:00 AM y 4:00 AM durante la noche, teniendo una duración cada una de un minuto, dando un total de 14 minutos de oxigenación diarios durante todo el experimento.

El nivel de la solución nutritiva y el pH se ajustaron cada tercer día. Realizando un cambio de la solución nutritiva cada 10 días. La concentración de la solución nutritiva Steiner se incrementó a lo largo del experimento hasta llevarla al 100%.

La cosecha de apio se realizó 41 días después del trasplante. Al momento de la cosecha se realizaron muestreos de todos los tratamientos, congelando las muestras a -80 °C para su posterior análisis. De igual manera se muestreo el peso de materia fresca y posteriormente dichas muestras se llevaron a la estufa de secado para posteriormente evaluar el peso de materia seca.

8.2.4. Variables evaluadas

Se evaluaron variables agronómicas (materia fresca de vástago, volumen de raíz, materia seca vástago y raíz), indicadores de calidad (actividad antioxidante total método DPPH, fenoles totales, flavonoides totales, concentración de ácido ascórbico), e indicadores fisiológicos (concentración de clorofilas a, b y total, azúcares totales en hojas, aminoácidos libres totales, proteínas solubles totales, concentración nutrimental en hojas), de la misma manera como se describe en el Capítulo 2.

8.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlet para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$ %),

Capítulo 8

para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

8.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.3.1. Indicadores agronómicos

8.3.1.1. Peso fresco de vástago y volumen de raíz

El volumen de raíz en el cultivo de apio no se vio afectado por los tratamientos con Phi en la solución nutritiva; sin embargo, el peso de materia fresca de vástago se vio disminuido al aplicar Phi en la concentración de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de solución nutritiva (Cuadro 2). Una respuesta similar se observó en acelga y col, ya que no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos en volumen de raíz en respuesta a la adición de Phi a la solución nutritiva; mientras que sí se registró reducción en el peso de materia fresca de vástago (Cuadro 2 del Capítulo 4 y Cuadro 2 del Capítulo 6).

Thao y Yamakawa (2010) encontraron que hay una fuerte inhibición por competencia entre Phi y Pi por los sitios de absorción en plantas de komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruvidis* cv. Ajisai) tanto en altas como en bajas concentraciones de fósforo en forma de Pi; en consecuencia, el crecimiento de la raíz de la planta es afectado al adicionar Phi lo cual tiene repercusiones en la absorción de Pi. Por el contrario, los resultados aquí presentados referentes al volumen de raíz en apio no se vieron afectados estadísticamente con los tratamientos de Phi en la solución nutritiva.

Thao y Yamakagua (2009) señalan que el Phi por sí solo no promueve ningún tipo de estimulación del crecimiento de plantas saludables, ni tampoco en combinación con Pi y que para que pueda tener algún efecto benéfico en la planta, el Phi debiera ser convertido a Pi lo cual hasta el momento no se ha evidenciado. Existe coincidencia con los resultados obtenidos en vástago de apio (Cuadro 2), ya que al incrementar la concentración de Phi a $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ el peso de materia fresca en vástago disminuyó.

Capítulo 8

Cuadro 2. Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de apio cv. Tall Utha 52-70 con aplicaciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol_c m⁻³)	Volumen de raíz (cm³ planta⁻¹)	Vástago (g planta⁻¹ PF)
0.00	68.88 a ^z	147.59 a
0.25	69.75 a	145.49 a
0.50	62.38 a	132.16 b
DHS ^y	7.79	12.06
Pr>F	0.0526	0.0066

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

8.3.1.2. Peso seco de vástago y raíz

El peso seco de raíz de apio no fue afectado estadísticamente por la aplicación de tratamientos con Phi, sin embargo en vástago, aplicaciones superiores a 0.25 mol_c m⁻³ mostraron que tienden a disminuir el peso de materia seca (Cuadro 3). Los resultados en apio concuerdan con los resultados obtenidos en acelga, debido a que también cantidades superiores a 0.25 mol_c m⁻³ disminuyeron el peso seco de vástago (Cuadro 3 del Capítulo 4). Al comparar estos resultados con los que se obtuvieron en otras especies en esta investigación, se contrasta que a diferencia del apio, en lechuga y col el Phi no redujo el peso de materia seca de vástago (Cuadro 3 del Capítulo 2 y Cuadro 3 del Capítulo 6).

Ratjen y Gerendás (2009) observaron un descenso muy marcado en el crecimiento y disminución de materia seca en plantas de calabacita cuando se aplicó Phi al suelo, como fuente de P. Por otro lado, Thao *et al.* (2008) reportan que aplicaciones de diferentes relaciones Pi-Phi causan un decremento en materia seca en comparación con el control sin Phi.

Capítulo 8

Cuadro 3. Acumulación de materia seca en raíz y vástago de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a aplicaciones con fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol_c m⁻³)	Raíz (g planta⁻¹ PS^x)	Vástago (g planta⁻¹ PS)
0.00	3.53 a ^z	15.80 a
0.25	3.48 a	14.98 ab
0.50	3.32 a	14.18 b
DHS ^y	0.26	1.10
Pr>F	0.1459	0.0037

^zValores con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

8.3.2. Indicadores de calidad

8.3.2.1. Actividad antioxidante total

En actividad antioxidante de hojas en el cultivo de apio se observaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, en especial en los 30 min de incubación; se observó un incremento de 4.1, 3.1 y 0.4% de actividad antioxidante en hojas de apio, en los tiempos 15, 30 y 60 min de incubación, respectivamente, cuando se aplicó 0.50 mol_c m⁻³ de Phi en la solución nutritiva, en comparación con el testigo (Figura 1). Comparando estos resultados con los observados en acelga (Figura 1 del Capítulo 4), nos percatamos de que en ambos cultivos se da un incremento en la actividad antioxidante, siendo el mejor tratamiento la aplicación de 0.50 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva; sin embargo, el aumento de la actividad antioxidante por efecto de Phi fue mucho muy superior en acelga. Por otro lado, en col el tratamiento con Phi en la solución que incremento en mayor medida la actividad antioxidante fue el de 0.25 mol_c m⁻³ de Phi (Figura 1 del Capítulo 6).

En un experimento realizado en apio, durante su almacenamiento en postcosecha, con tratamiento de exposición continua a la luz como fuente de estrés (2000 lux), reportaron reducción de la actividad de la polifenol oxidasa y de la peroxidasa, e incremento en la actividad de la fenilalanina amonio liasa y en la capacidad antioxidante, encontrando

Capítulo 8

una correlación positiva con estos últimos (Zhan *et al.*, 2013). Dado que, normalmente las plantas responden con un incremento en la actividad antioxidante con una fuente de estrés moderada, esto también ocurrió en este experimento al aplicar $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi.

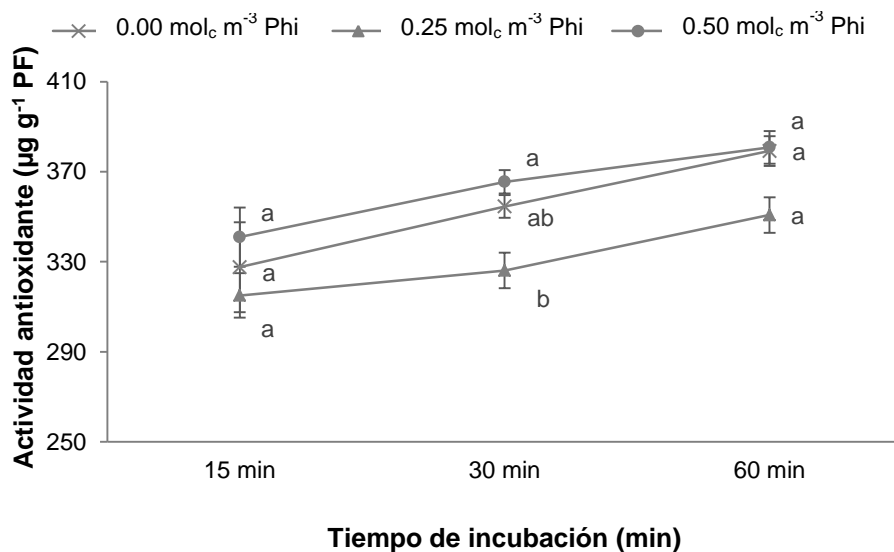


Figura 1. Actividad antioxidante total en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.4176$; 30, $p=0.0195$; 60, $p=0.0755$). PF=peso fresco.

8.3.2.2. Fenoles totales

En la variable fenoles totales en hojas de apio, resultó como mejor tratamiento la aplicación de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva al incrementar en un 11.6% la concentración de fenoles totales, respecto al testigo (Figura 2). En los cultivos de lechuga y acelga se obtuvieron resultados similares, ya que se encontró que el tratamiento de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva incrementó la concentración de fenoles totales en hojas y al mismo tiempo cantidades superiores de Phi, tienden a disminuir la concentración de fenoles (Figura 2 del Capítulo 2 y Figura 2 del Capítulo 4).

Capítulo 8

Por otro lado, en col el mejor tratamiento resultó ser la aplicación de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ (Figura 2 del Capítulo 6).

Los fenoles totales de *Apium graveolens* L. son flavonoides (apigenina, luteolina, kaempferol) y ácidos fenólicos (ácido cafeico, ferúlico, p-coumarico) (Yao *et al.*, 2010). Estos compuestos fenólicos pueden ser inducidos por algún tipo de estrés como heridas, temperatura, ataque de patógenos entre otros (Dixon y Paiva, 1995). En este caso el factor de estrés fue la aplicación de Phi en la solución nutritiva y se observó que también estimuló el incremento de fenoles totales en apio.

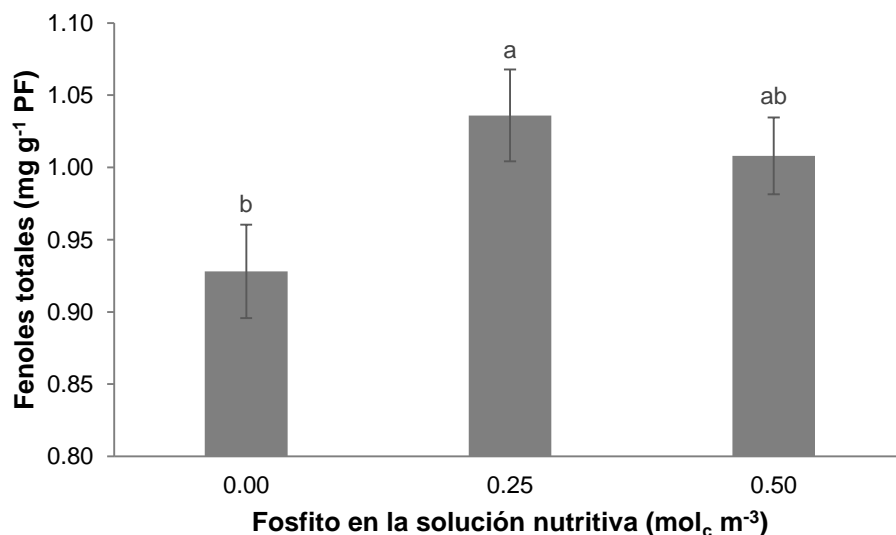


Figura 2. Concentración de fenoles totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0401$). PF=peso fresco.

8.3.2.3. Flavonoides totales

En apio se observó que la aplicación de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución no fue diferente estadísticamente al testigo en concentración de flavonoides totales en hojas (Figura 3). En lechuga se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en apio al ser

Capítulo 8

estadísticamente iguales los tratamientos testigo y el consistente en $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva (Figura 3 del Capítulo 2). En acelga se obtuvieron resultados negativos, ya que al incrementar la concentración de Phi en la solución, disminuyó la concentración de flavonoides totales (Figura 3 del Capítulo 4); pero un resultado totalmente opuesto al encontrado en acelga se obtuvo en col, ya que hubo una relación positiva entre el incremento de la concentración de tratamientos con Phi y el incremento en la concentración de flavonoides totales (Figura 3 del Capítulo 6).

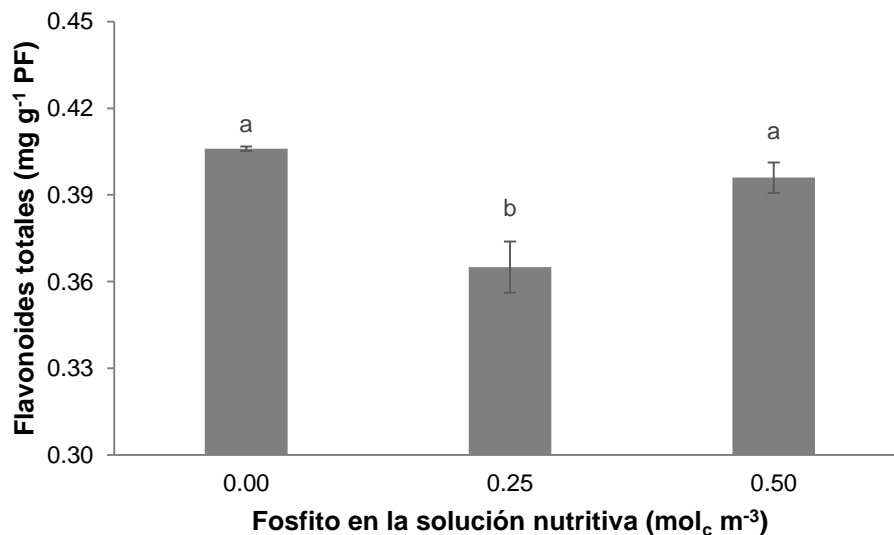


Figura 3. Concentración de flavonoides totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0128$). PF=peso fresco.

Los flavonoides más comúnmente encontrados en apio son apifenina, luteolina y kaempferol. Yao *et al.* (2010) reportan una media de flavonoides totales de $142.53 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ en base a peso seco. Hay muchos factores que ocasionan un cambio en concentración de flavonoides en apio, entre los cuales encontramos, el factor genético, y cambios en el ambiente como localización geográfica, radiación UV, presencia de enfermedades, plagas, parte de la planta muestreada, horario de toma de muestra entre muchas otras (Li *et al.*, 1993; Lois, 1994; Kim y Lee, 2004; Shan *et al.*, 2005). En

Capítulo 8

nuestro caso no está bien definida la tendencia obtenida con los tratamientos de Phi en la solución nutritiva.

8.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico

En concentración de ácido ascórbico en hojas de apio, los tratamientos con Phi en la solución nutritiva, no fueron significativos (Cuadro 4). Los datos en la variable ácido ascórbico resultaron ser muy contrastantes entre cultivos, ya que por un lado en lechuga los tratamientos con Phi en la solución nutritiva, causaron una disminución en la concentración de ácido ascórbico (Figura 4 del Capítulo 2); pero por otro lado se encontró en col que los mismos tratamientos causaron un incremento significativo en la concentración de vitamina C (Figura 4 del Capítulo 6).

El ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble derivada del metabolismo de la glucosa. Actúa como agente reductor y es necesario para la síntesis de las fibras de colágeno a través del proceso de hidroxilación de la prolina y de la lisina. También protege al organismo del daño causado por los radicales libres. Los humanos no podemos sintetizar ácido ascórbico al carecer de una enzima denominada gulonolactona oxidasa (Valdés, 2006).

Thao *et al.* (2009) no encontraron efecto de aplicaciones de fosfito en hojas de lechuga y señalan que no tiene efecto en la biosíntesis de ácido ascórbico; en este experimento en el caso de apio no se encontraron efectos de las aplicaciones de Phi en la solución nutritiva, en la concentración de vitamina C en hojas.

Cuadro 4. Concentración de ácido ascórbico en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol _c m ⁻³)	Concentración de ácido ascórbico (µg g ⁻¹ PF ^x)
0.00	57.85 a ^z
0.25	56.46 a
0.50	51.44 a
DHS ^y	13.44

Capítulo 8

Pr>F

0.4119

^zValores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

8.3.3. Indicadores fisiológicos

8.3.3.1. Concentración de clorofila a, b y total

La concentración de clorofila a y total en hojas de apio no fue afectada estadísticamente, por los tratamientos con Phi en la solución nutritiva; mientras que en la clorofila b se tuvo mayor concentración al aplicar $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ en la solución nutritiva (Cuadro 5). En experimentos realizados en lechuga y acelga, aplicaciones de Phi en la solución nutritiva incrementaron las concentraciones de clorofila. En acelga, aplicaciones de Phi a razón de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ incrementaron la concentración de clorofila a, b y total (Figura 5 del Capítulo 4), mientras que en lechuga el mejor tratamiento fue $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ (Figura 5 del Capítulo 2). Por otro lado, en el cultivo de col, los tratamientos con Phi no tuvieron efecto significativo en la concentración de clorofilas (Cuadro 4 del Capítulo 6).

El P es un nutrimento que tiene gran influencia sobre la estabilidad de la molécula de clorofila (Bojović y Stojanović, 2006), nuestro experimento se realizó bajo condiciones de suficiencia de P en forma de Pi, y la concentración de clorofila a y total no se vieron afectadas; sin embargo, la concentración de la clorofila b se redujo con el aumento de la concentración de Phi.

Cuadro 5. Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (%)	Clorofilas ($\text{mg g}^{-1} \text{ PF}^x$)		
	a	b	Total
0.00	1.32 a ^z	0.41 b	1.75 a
0.25	1.44 a	0.44 a	1.90 a
0.50	1.41 a	0.43 ab	1.87 a
DHS ^y	0.13	0.03	0.15

Capítulo 8

Pr>F 0.0602 0.0270 0.0475

^zValores con distintas letras en cada columna, son estadísticamente diferentes (Tukey). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

8.3.3.2. Azúcares totales en hojas

La concentración de azúcares totales en apio no fue modificada estadísticamente por las aplicaciones de Phi en la solución nutritiva (Cuadro 6). Los resultados obtenidos en acelga muestran la misma tendencia que los obtenidos en apio, debido a que en ambos cultivos no hubo respuesta en concentración por los tratamientos con Phi (Cuadro 4 del Capítulo 4). Por otro lado, en lechuga y en col, se obtuvieron incrementos en concentración de azúcares totales al aplicar Phi en la solución nutritiva (Figura 6 del Capítulo 2 y Figura 5 del Capítulo 6, respectivamente).

Cuadro 6. Concentración de azúcares totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fosfito (mol_c m⁻³)	Concentración de azúcares totales (mg g⁻¹ PF^x)
0.00	2.84 a ^z
0.25	3.18 a
0.50	3.22 a
DHS ^y	0.56
Pr>F	0.1530

^zValores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

En un trabajo previo realizado en fresa (Estrada-Ortiz *et al.*, 2011) encontramos que bajo suficiencia de P en forma de Pi, en etapa de floración se observó un incremento en la concentración de azúcares totales en hojas de fresa al adicionar 20% de Phi del P total; mientras que en etapa de fructificación no se observaron diferencias estadísticas en concentración de azúcares al adicionar Phi. En el presente experimento se observa

Capítulo 8

una situación similar a lo ocurrido en fresa en etapa de fructificación al no observar diferencias estadísticas con las aplicaciones de Phi y habiendo suficiencias de Pi.

8.3.3.3. Aminoácidos libres totales

Se observó una disminución en la concentración de aminoácidos libres totales en hojas de apio, a medida que incrementó la concentración de Phi en la solución nutritiva (Figura 4). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el cultivo de col, con los mismos tratamientos con Phi, al disminuir la concentración de aminoácidos libres totales al incrementarse las concentraciones de Phi (Figura 6 del Capítulo 6), pero difieren de los resultados obtenidos en el cultivo de lechuga y acelga, ya que en lechuga se incrementó la concentración de aminoácidos al aplicar $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi y en acelga no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Figura 7 del Capítulo 2 y Cuadro 5 del Capítulo 4, respectivamente).

Los resultados obtenidos en apio aplicando Phi en la solución nutritiva, coinciden con lo obtenido por Berkowitz *et al.* (2013), ellos realizaron experimentos en *Arabidopsis* en donde realizaron aplicaciones de Phi en plantas con suficiencia de Pi (0.5 mM Pi + 2.5 mM Phi) comparándolas con plantas con limitación de Pi (0.05 mM Pi) y reportan que en plantas tratadas con Phi se produjo una reducción de entre 40 y 60% en aminoácidos como asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico y serina, y en contraste, en plantas con limitación de Pi, pero sin Phi, los mismos aminoácidos se incrementaron entre un 10 y 20% tomando como referencia un testigo con 0.5 mM de Pi.

Capítulo 8

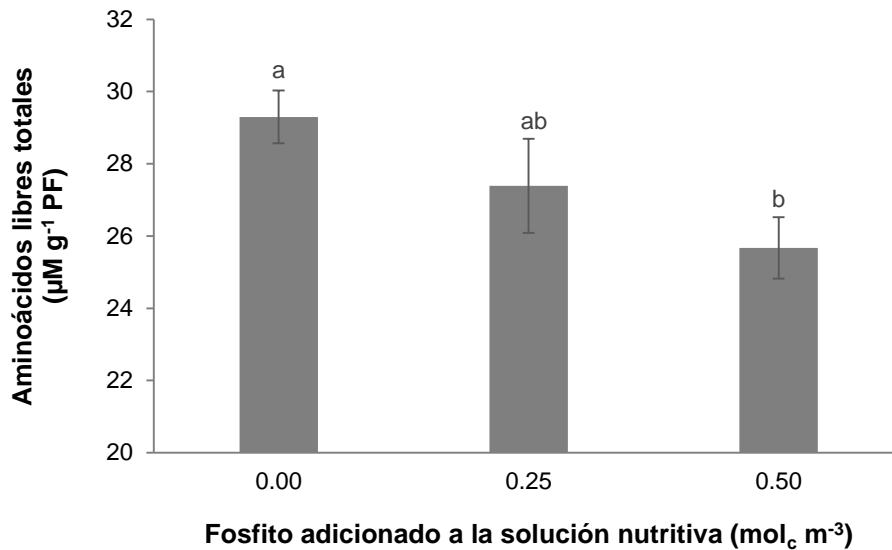


Figura 4. Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0420$). PF= peso fresco.

8.3.3.4. Proteínas solubles totales

Se observó en apio, que el tratamiento con $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva, incrementó un 24.7% la concentración de proteínas solubles totales en relación al testigo (Figura 5). Los resultados obtenidos en concentración de proteínas solubles totales, también son diferentes entre cultivos, debido a que en cultivos como lechuga y col, el mejor tratamiento, que incrementó la concentración de proteínas solubles totales fue la aplicación de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva (Figura 8 del Capítulo 2 y Figura 7 del Capítulo 6, respectivamente), por otro lado se observó que solamente en el cultivo de acelga la aplicación de Phi en la solución nutritiva causó un decremento en la concentración de proteínas en hojas (Figura 6 del Capítulo 4).

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

Capítulo 8

metabolismo vegetal, siendo los productos primarios de la asimilación inorgánica del nitrógeno y precursores de proteínas y ácidos nucleicos (Hsu y Kao, 2003).

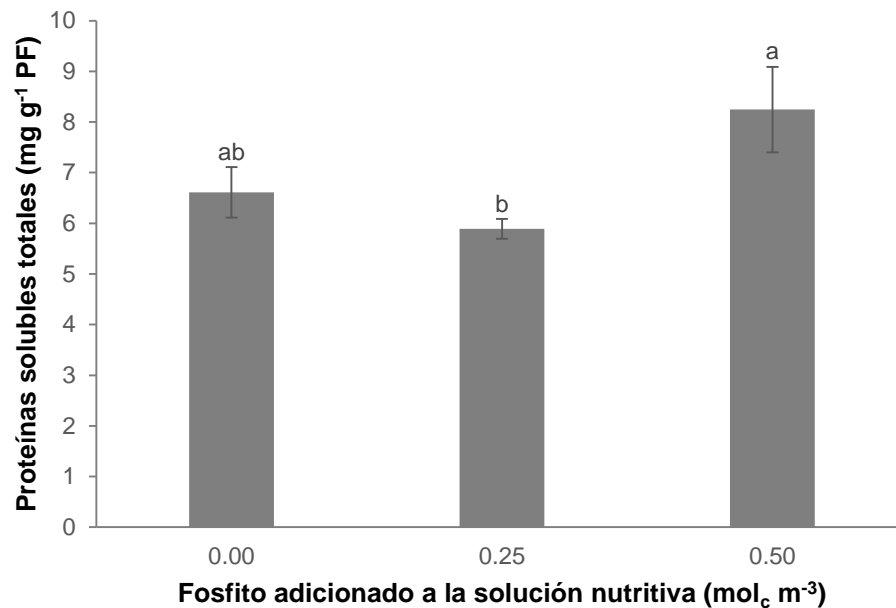


Figura 5. Concentración de proteínas solubles totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0473$). PF= peso fresco.

8.3.4. Concentración nutrimental

En macronutrientes observamos que hay una mayor acumulación de los mismos en raíz, a excepción de Ca y S, los cuales se encuentran en mayor concentración en vástago. Por otro lado, los micronutrientes y el Na, se observaron en mayor concentración en raíz (Cuadros 7 y 8).

En vástago, no se observó algún efecto significativo por las aplicaciones de Phi, en la concentración de N, K, Zn, Mn y B en apio. En otros elementos como P, Fe y Na, se observó que aplicaciones de 0.25 mol_c m⁻³ de Phi en la solución nutritiva incrementó su concentración en vástago, mientras el tratamiento con 0.50 mol_c m⁻³ disminuyó la concentración de Ca, Mg, S, Cu en vástago de apio (Cuadros 7 y 8).

Capítulo 8

En raíz de apio, también se encontró que la concentración de algunos nutrimentos no fue afectada por los tratamientos con Phi, entre éstos se encuentran N, Ca, Mg, S, Zn y B, así como el Na. También se observó que la aplicación de 0.50 mol_c m⁻³ en la solución nutritiva, incrementó la concentración de P, pero disminuyó la concentración de K. Concentraciones de 0.25 mol_c m⁻³ incrementaron la concentración de Mn, pero disminuyeron la concentración de Fe y Cu (Cuadros 7 y 8).

Cuadro 7. Concentración de macronutrimentos en vástago y raíz de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Tejido	Phi (mol _c m ⁻³)	Concentración (g kg ⁻¹ PS ^x)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Vástago	0.00	36.62 a ^z	7.55 b	12.38 a	13.91 a	4.48 a	7.68 a
	0.25	35.93 a	8.87 a	14.61 a	13.26 a	4.55 a	7.66 a
	0.50	35.88 a	5.07 c	9.49 a	9.14 b	3.10 b	5.21 b
	DHS	2.84	0.60	6.42	3.85	0.74	1.31
	Pr>F	0.7306	0.0001	0.1370	0.0144	0.0006	0.0007
Raíz	0.00	36.79 a	10.38 c	17.66 a	6.34 a	7.35 a	2.88 a
	0.25	38.67 a	12.41 b	16.07 ab	6.12 a	6.77 a	2.70 a
	0.50	37.79 a	14.06 a	12.09 b	6.28 a	7.17 a	2.76 a
	DHS ^y	4.09	1.05	4.65	0.44	0.61	0.22
	Pr>F	0.4668	0.0001	0.0225	0.4139	0.0698	0.1113

^zValores con distintas letras en cada columna por órgano son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso fresco.

Capítulo 8

Cuadro 8. Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a tratamientos con fosfito en la solución nutritiva.

Tejido	Phi (mol _c m ⁻³)	Concentración (mg kg ⁻¹ PS ^x)					
		Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Vástago	0.00	107.10 ab ^z	5.88 a	32.61 a	83.68 a	99.59 a	4969.1 ab
	0.25	119.61 a	6.13 a	29.71 a	78.42 a	98.94 a	5974.6 a
	0.50	80.74 b	4.21 b	26.46 a	92.59 a	79.21 a	3796.5 b
	DHS	26.50	1.33	13.12	33.57	23.37	1274.30
	Pr>F	0.0078	0.0057	0.4563	0.5173	0.0625	0.0034
Raíz	0.00	750.28 a	37.96 a	54.60 a	2178.79 b	102.92 a	13224.6 a
	0.25	658.79 b	31.93 b	52.79 a	2417.766 a	105.23 a	12376.40 a
	0.50	779.10 a	40.86 a	51.80 a	2361.41 a	98.53 a	12435.70 a
	DHS ^y	63.62	4.42	7.83	149.89	15.74	2408.7 0
	Pr>F	0.0013	0.0010	0.6156	0.0040	0.5088	0.5681

^zValores con distintas letras en cada columna por órgano son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Estrada-Ortiz *et al.* (2010) en una investigación en fresa, encontraron en un muestreo realizado en etapa vegetativa, que la mayor concentración de N se presentó en el tratamiento sin Phi, los tratamientos con 20 y 30% de Phi presentaron las menores concentraciones de N; las concentraciones de P y Mg siguieron una tendencia similar a la del N, encontrándose las de P en niveles adecuados en todos los tratamientos, y las de Mg excediendo el intervalo considerado óptimo. Por otro lado, observaron que las plantas sin Phi presentaron menor concentración de K que el resto de los tratamientos; caso contrario fueron las concentraciones de Ca donde plantas sin Phi registraron la mayor concentración.

Capítulo 8

8.4. CONCLUSIONES

Aplicaciones de 0.25 mol_c m⁻³ de Phi en la solución nutritiva incrementan la concentración de fenoles totales y clorofila b en hojas, así como de P, Fe y Na en vástago de apio, pero disminuyen la concentración de aminoácidos libres totales.

Aplicaciones de Phi en la solución nutritiva de 0.50 mol_c m⁻³ incrementan la actividad antioxidante total y la concentración de proteínas solubles totales en hojas, así como la concentración de P en vástago de apio, pero al mismo tiempo disminuyen la acumulación de materia fresca y seca, así como la concentración de Ca, Mg, S y Cu de vástago de apio.

8.5. LITERATURA CITADA

Abelson, P. H. 1999. A potential phosphate crisis. *Science*. 283:2015.

Berkowitz, O.; Jost, R.; Kollehn, D.O.; Fenske, R.; Finnegan, P.M.; O'Brien, P.A.; Hardy, G.E.St.J.; Lambers, H. 2013. Acclimation responses of *Arabidopsis thaliana* to sustained phosphite treatments. *J.Exp. Bot.* 64(6): 1731-1743.

Bojović, B.; Stojanović, J. 2006. Some wheat leaf characteristics in dependence of fertilization. *K. J. S.* 28: 139-146.

Carswell, C.; Grant, B. R.; Theodorou, M. E.; Harris, J.; Niere, J. O.; Plaxton, W. C. 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol.* 110: 105-110.

Carswell, M. C.; Grant, B. R.; Plaxton, W. C. 1997. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta.* 203: 67-74.

Dixon, R. A.; Paiva, N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell.* 7: 1085-1097.

Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2010. Fosfito en la producción de fresa. Colegio de Postgraduados. Tesis de Maestría.

Capítulo 8

- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2011. Biochemical responses in strawberry plants supplying phosphorus in the form of phosphite. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 17: 129-138.
- Förster, H.; Adaskaveg, J. E.; Kim, D. H.; Stanghellini, M. E. 1998. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of pepper to *Phytophthora* root and crown rot in hydroponic culture. *Plant Dis.* 82: 1165-1170.
- Hanrahan, G.; Salmassi, T. M.; Khachikian, C. S.; Förster, K. L. 2005. Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: Significance, speciation and determination. *Talanta.* 66: 435-444.
- Hsu, 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.
- Kim, D. O.; Lee, C. Y. 2004. Comprehensive study on vitamin C equivalent antioxidant capacity (VEAC) of various polyphenolics in scavenging a free radical and its structural relationship. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44(4): 253-73.
- Kolarovic, J.; Popovic, M.; Zlinská, J.; Trivic, S.; Vojnovic, M. 2010. Antioxidant activities of celery and parsley juices in rats treated with doxorubicin. *Molecules.* 15: 6193-6204.
- Li, Y.; Out-Lee, T. M.; Raba, R.; Amudson, R. G. 1993. *Arabidopsis* flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell.* 5(2): 171-179.
- Lois, R. 1994. Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in *Arabidopsis thaliana* L. *Planta.* 194(4): 498-503.
- López-Arredondo, D. L.; Herrera-Estrella, L. 2012. Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system. *Nat. Biotechnol.* 30: 889-893.
- McDonald, A. E.; Grant, R. G.; Plaxton, W. C. 2001. Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. *J. Plant Nutr.* 24: 1505-1519.

Capítulo 8

- Moor, U.; Põldma, P.; Tõnutare, T.; Karp, K.; Starast, M.; Vool, E. 2009. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Scientia Hort.* 119: 264-269.
- Morton, S. C.; Glindemann, D.; Wang, X.; Niu, X.; Edwards, M. 2005. Analysis of reduced phosphorus in samples of environmental interest. *Environ. Sci. Technol.* 39: 4369-4376.
- Ouimette, D. G.; Coffey, M. D. 1989. Phosphonate levels in avocado (*Persea americana*) seedlings and soil following treatment with fosetyl-Al or potassium phosphonate. *Plant Dis.* 73: 212-215.
- Ouimette, D. G.; Coffey, M. D. 1990. Symplastic entry and phloem translocation of phosphonate. *Pestic. Biochem. Physiol.* 38:18-25.
- Pasek, M. 2008. Rethinking early earth phosphorus geochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 853-858.
- Ratjen, A.M.; Gerendás, J. 2009. A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 821-828.
- Ruthbaum, H. P.; Baille, W. J. H. 1964. The use of red phosphorus as a fertilizer. Part 4. Phosphite and phosphate retention in soil. *N. Z. J. Sci.* 7, 446–451.
- Saindrenan, P.; Barchietto, T.; Gilbert, B. 1988. Modification of the phosphite induced resistance response in leaves of cowpea infected with *Phytophthora cryptogea* by α -aminooxyacetate. *Plant Sci.* 58:245-252.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schroetter, S.; Angeles-Wedler, D.; Kreuzig, R.; Schnug, E. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschung Volkenrode.* 56: 87-99.
- Shan, B.; Cai, Y.Z.; Corke, H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *J. Agric. Food Chem.* 105(3): 940-949.

Capítulo 8

- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution, *In*: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands. pp. 633-649.
- Steiner, A., van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.* 46: 862-863.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2009. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator. Review article. *Soil Sci. Plant Nut.* 55: 228-234.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2010. Phosphate absorption of intact komatsuna plants influenced by phosphite. *Soil Sci. Plant Nut.* 56: 133-139.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite-phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Plant Nutr Sci.* 172: 378-384.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. T.; Shibata, K.; Sarr, P. S.; Myint, A. K. 2008. Growth response of komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruviridis*) to root and foliar applications of phosphite. *Plant Soil.* 308: 1-10.
- Ticconi, C. A.; Delatorre, C. A.; Abel, S. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127: 963-972.
- Valdés, F. 2006. Vitamina C. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* 97(9):557-568.
- Varadarajan, D. K.; Karthikeyan, A. S.; Matilda, P. D.; Raghobama, K. G. 2002. Phosphite, an analog of phosphate, suppresses the coordinated expression of genes under phosphate starvation. *Plant Physiol.* 129: 1232-1240.
- White, A. K.; Metcalf, W. W. 2007. Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. *Annu. Rev. Microbiol.* 61: 379-400.
- Yao, Y.; Sang, W.; Zhou, M.; Ren, G. 2010. Phenolic composition and antioxidant activities of 11 celery cultivars. *J. Food Sci.* 75: C9-C13.
- Zhan, L.; Hu, J.; Lim, L. T.; Pang, L.; Li, Y.; Shao, J. 2013. Light exposure inhibiting tissue browning and improving antioxidant capacity of fresh-cut celery (*Apium graveolens* var. *dulce*). *Food Chemistry.* 141(3): 2473-2478.

Capítulo 8

Capítulo 9

CAPÍTULO 9. RESPUESTAS FISIOLÓGICAS Y BIOQUÍMICAS DEL APIO A APLICACIONES FOLIARES DE FOSFITO

9.1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) está relacionado con varias funciones en diferentes rutas metabólicas en las plantas y forma parte de muchas macromoléculas. Sin embargo el fósforo es uno de los nutrientes más limitantes debido a su baja disponibilidad en el suelo, así como su baja solubilidad. El P se absorbe comúnmente por la raíz de las plantas en forma de H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , transportado a las células en donde es metabolizado e incorporado en compuestos orgánicos (Plaxton, 1998).

El fosfato (Pi) y fosfito (Phi) son las dos formas más comunes de fósforo utilizadas en la agricultura en donde hay varias formas de P presentes en el medio ambiente. El anión Pi (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) es indudablemente la mayor forma de P utilizada por las plantas, para un adecuado crecimiento y desarrollo; mientras que el anión Phi (H_2PO_3^- y HPO_3^{2-}) es muy efectivo controlando algunas enfermedades importantes en las plantas, especialmente causadas por organismos Oomicetos, como *Phytophthora* (Ávila *et al.*, 2013). La acción del Phi está basada en dos mecanismos, una que afecta directamente a los patógenos y un efecto indirecto en la planta, debido a que el Phi estimula positivamente el metabolismo de las plantas, incrementando respuestas de defensa durante situaciones de estrés biótico y abiótico (Silva *et al.*, 2011; Olivieri *et al.*, 2012). Aplicaciones de Phi en papa refuerza los mecanismos de defensa contra patógenos, ya que refuerza la pared celular incrementando el contenido de pectina; de igual manera, incrementa la quitinasa presente en tejidos de la peridermis (Olivieri *et al.*, 2012). Lobato *et al.* (2011) realizaron aplicaciones de Phi en papa como estrategia de manejo contra *Phytophthora* y encontraron un incremento en fitoalexinas, así como un incremento de peroxidasa y polifenol oxidasa, por lo que dichas enzimas pueden formar parte de los mecanismos de defensa inducidos por Phi.

En años recientes los compuestos fenólicos y otros compuestos antioxidantes derivados de plantas están tomando funciones muy importantes en la nutrición humana (Tapiero *et al.*, 2002).

Capítulo 9

El apio pertenece a la familia de las umbelíferas, es una planta que en años recientes se ha incrementado mucho su consumo, en especial en países como China, es ampliamente cultivado por el interés que se ha generado por las diversas funciones que se le han descubierto a esta planta, como por ejemplo que su consumo ayuda a disminuir los niveles de colesterol (Tsi y Tan, 2000), tiene también propiedades antiinflamatorias (Misic *et al.*, 2008), propiedades anticancerígenas debido al alto contenido de fenoles (Sultana *et al.*, 2005; Yildiz *et al.*, 2008), debido a éstas y otras propiedades el apio está siendo ampliamente estudiado. Con aplicaciones de Phi se espera estimular un poco el metabolismo de apio, de manera que nos permita incrementar algunas de sus propiedades.

En esta investigación se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Phi aplicadas de manera foliar, sobre indicadores agronómicos, fisiológicos y de calidad, en el cultivo de apio (*Apium graveolens* L.) cv. Tall Utha 52-70.

9.2. MATERIALES Y MÉTODOS

9.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante los meses de diciembre de 2012 a febrero de 2013, en un invernadero tipo túnel, localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue apio (*Apium graveolens* L.) cv. Tall Utha 52-70, cultivado en un sistema hidropónico de raíz flotante con oxigenación. Las temperaturas máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento dentro del invernadero fueron 40.8, 3.4 y 17 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 273 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

9.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Se evaluaron cuatro tratamientos de Phi, los cuales fueron suministrados de manera foliar. Las concentraciones de Phi evaluadas fueron 0, 0.25, 0.50 y 0.75%. Los tratamientos fueron suministrados a los días 20 y 30 después del trasplante. El Phi se

Capítulo 9

obtuvo a partir de ácido fosforoso grado analítico (Sigma-Aldrich). El pH de la solución foliar se mantuvo en 5, para ello se ajustó adicionando KOH 1 N.

La unidad experimental se constituyó por seis plantas y cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. Se utilizó diseño experimental completamente al azar.

9.2.3. Manejo del cultivo

El 25 de octubre de 2012, se pusieron a germinar semillas de apio (*Apium graveolens* L.) cv. Tall Utha 52-70, en una mezcla de turba con perlita (70:30 V/V) previamente humedecida y colocada en charolas de unicel de 200 cavidades. Posteriormente a la siembra se cubrieron con un plástico negro para mantener en oscuridad y conservar la humedad hasta su emergencia. Posteriormente se realizaron riegos con agua durante dos semanas, a fin de mantener la humedad. Después de ello se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 25% hasta el momento del trasplante, a fin de tener plantas vigorosas.

Para la preparación de la solución nutritiva se empleó agua de pozo profundo, de la cual se obtuvo el análisis nutrimental (Cuadro 1) y de esta manera poder saber de qué disposición nutrimental se partió para la elaboración de la solución nutritiva.

Cuadro 1. Análisis nutrimental del agua de riego utilizada en el experimento, en miliequivalentes (en $\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$).

	N-NO₃⁻	P- H₂PO₄⁻	S- SO₄²⁻	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
mol_c m⁻³	0.294	0.062	0.186	0.100	1.356	2.527

Antes del trasplante se instaló el sistema hidropónico raíz flotante, que constó de cajas de madera de 80 x 40 x 20 (largo x ancho x profundidad) forradas con plástico negro calibre 600, considerando cada caja como unidad experimental. El sistema de oxigenación se colocó pegado al fondo de las cajas, para lo cual se utilizó manguera negra tipo espagueti, que fue conectada en una línea principal y ésta a su vez fue conectada a un compresor de aire, lo que permitió tener oxigenada la raíz.

Capítulo 9

Cada unidad experimental tuvo como soporte láminas de fibra de vidrio, las cuales además sirvieron para mantener aislado al material vegetal de la solución nutritiva y evitar daños en tejido aéreo por quemaduras.

Previo al trasplante, se preparó solución nutritiva Steiner al 50% y se ajustó el pH a 5.5 y se colocaron los soportes de fibra de vidrio. El 1 de enero de 2013 por la tarde se realizó el trasplante, para lo cual se utilizaron vasos de plástico no. 4 (118 mL) previamente perforados en el fondo, en los cuales se colocó la plántula de apio, rellenando los espacios libres con agrolita.

Todos los tratamientos fueron nutridos con la misma solución y a medida que se desarrolló el cultivo, la solución se llevó al 100%, fue formulada tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984), siendo preparada con reactivos grado analítico, utilizando 1.06 g L^{-1} de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 0.30 g L^{-1} de KNO_3 ; 0.14 g L^{-1} de KH_2PO_4 ; 0.49 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.26 g L^{-1} de K_2SO_4 . La solución nutritiva se complementó con micronutrientes en las siguientes concentraciones: 1.6 mg L^{-1} de Mn; 0.11 mg L^{-1} de Cu; 0.86 mg L^{-1} de B; 0.023 mg L^{-1} de Zn y 0.048 mg L^{-1} de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L^{-1} a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970). El pH de la solución nutritiva se mantuvo entre 5.5 y 5.8, el cual se ajustó adicionando H_2SO_4 al 97% y NaOH 1 N.

El sistema de oxigenación se programó con un temporizador, realizando catorce programaciones distribuidas de la siguiente manera: cada hora de 8:00 AM a 8:00 PM durante el día y a las 12:00 AM y 4:00 AM durante la noche teniendo una duración cada una de un minuto, dando un total de 14 min de oxigenación diarios durante todo el experimento.

El nivel de la solución nutritiva y el pH se ajustaron cada tercer día. Realizando un cambio de la solución nutritiva cada 10 días, incrementando la concentración de la solución nutritiva Steiner de acuerdo al desarrollo del cultivo hasta llevarla al 100%.

Capítulo 9

La cosecha de apio se realizó 41 días después del trasplante. Al momento de la cosecha se realizaron muestreos de todos los tratamientos, congelando las muestras a -80 °C para su posterior análisis. De igual manera se determinó el peso fresco y posteriormente dichas muestras se llevaron a la estufa de secado para posteriormente evaluar el peso seco.

9.2.4. Variables evaluadas

Se evaluaron variables agronómicas (materia fresca de vástago y volumen de raíz, materia seca de vástago y raíz), indicadores de calidad (actividad antioxidante total método DPPH, fenoles totales, flavonoides totales, concentración de ácido ascórbico), e indicadores fisiológicos (concentración de clorofilas a, b y total, azúcares totales en hojas, aminoácidos libres totales, proteínas solubles totales, concentración nutrimental en hojas), de la misma manera como se describe en el Capítulo 2.

9.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlet para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$ %), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

9.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.3.1. Indicadores agronómicos

9.3.1.1. Peso fresco de vástago y volumen de raíz

Se observó que cantidades superiores a 0.50% de Phi vía foliar disminuyeron el volumen de raíz y peso fresco de vástago en el cultivo de apio (Cuadro 2). Dichos resultados se respaldan con los obtenidos en el cultivo de acelga y col con aplicaciones

Capítulo 9

foliares de Phi, ya que en esos casos también hubo una tendencia en disminución de volumen de raíz en ambos cultivos y peso fresco en col, con aplicaciones de Phi mayores a 0.50% (Cuadro 2 del Capítulo 5 y Cuadro 2 del Capítulo 7).

Hirosse *et al.* (2012) realizaron un experimento en cultivo *in vitro* de papa dulce, en donde utilizaron tratamientos consistentes en relaciones Pi/Phi en el medio de cultivo, teniendo los siguientes tratamientos en porcentajes: 100/0, 87.5/12.5, 75/25, 50/50 y 0/100; reportaron una disminución del crecimiento a medida que se incrementó el Phi en el medio de cultivo, estos autores plantearon poder utilizar el Phi como fuente de P para su cultivo. Sin embargo ya se ha comprobado que el Phi no puede ser utilizado como fuente de P metabolizable para las plantas, a menos que se realice en plantas genéticamente modificadas en donde se les inserta la enzima fosfito reductasa para que puedan utilizar Phi como fuente de P (Thao *et al.*, 2008; Thao *et al.*, 2009; López-Arredondo y Herrera-Estrella, 2012).

En nuestro experimento utilizamos en todos los tratamientos niveles de suficiencia de P en forma de Phi y encontramos que aspersiones de 0.75% de Phi disminuyeron el crecimiento tanto en raíz como en vástago de apio.

Cuadro 2. Volumen de raíz y acumulación de materia fresca de apio cv. Tall Utha 52-70 con aplicaciones de fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Volumen de raíz (cm³ planta⁻¹)	Vástago (g planta⁻¹ PF^x)
0.00	68.88 a ^z	147.59 a
0.25	64.38 ab	152.17 a
0.50	65.50 ab	145.59 a
0.75	55.88 b	129.31 b
DHS ^y	12.21	12.29
Pr>F	0.0446	0.0001

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

9.3.1.2. Peso seco de vástago y raíz

Capítulo 9

En raíz, los tratamientos con Phi no afectaron significativamente la acumulación de materia seca; en vástago se observó nuevamente al igual que en peso fresco que aplicaciones foliares de Phi superiores a 0.50% disminuyeron la acumulación de materia seca en el cultivo de apio (Cuadro 3). Por otro lado, en el cultivo de lechuga se observó que no se vieron afectados estadísticamente por tratamientos con Phi (Cuadro 3 del Capítulo 3). De manera similar, el experimento realizado en acelga, la acumulación de materia seca de vástago no se vio afectada por tratamientos con Phi; sin embargo, en raíz se observó una disminución en peso seco al asperjar cantidades superiores a 0.50% de Phi, lo cual corresponde con los resultados obtenidos en apio (Cuadro 3 del Capítulo 5).

Hirosse *et al.* (2012) en un experimento en cultivo *in vitro* de papa dulce, utilizaron tratamientos de Pi/Phi en el medio de cultivo, teniendo los siguientes tratamientos en porcentajes: 100/0, 87.5/12.5, 75/25, 50/50 y 0/100; y encontraron una disminución de la materia seca de los explantes a medida que se incrementó el Phi en el medio de cultivo. Por otro lado, bajo niveles de suficiencia de Pi, Moor *et al.* (2009) encontraron que el fosfito no suprime ni promueve el crecimiento en plantas de fresa. Lo cual es similar a los resultados obtenidos en este experimento, sin embargo cantidades superiores a 0.50% de Phi asperjado vía foliar disminuyó el peso seco en vástago.

Cuadro 3. Acumulación de materia seca en raíz y vástago de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a aplicaciones con fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Raíz (g planta ⁻¹ PS ^x)	Vástago (g planta ⁻¹ PS)
0.00	3.53 a ^z	15.80 a
0.25	3.63 a	16.02 a
0.50	3.68 a	15.60 a
0.75	3.37 a	14.24 b
DHS ^y	0.33	1.31
Pr>F	0.0784	0.0030

Capítulo 9

^zValores con letras distintas en cada columna son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

9.3.2. Indicadores de calidad

9.3.2.1. Actividad antioxidante total

En apio se observó que aspersiones de Phi en concentraciones superiores a 0.50% disminuyeron marcadamente la actividad antioxidante de las hojas. Se observó también que la aplicación de Phi a una concentración 0.50% ocasionó incrementos en actividad antioxidante de 2.3, 3.1, 0.2% con respecto al testigo en los tiempos 15, 30 y 60 min de incubación aunque estadísticamente no hubiera diferencias con el testigo (Figura 1). En la variable actividad antioxidante, en respuesta a la aplicación de tratamientos foliares de Phi, se observaron diferentes resultados incluso hasta contrastantes entre los cultivos evaluados, ya que por un lado en el cultivo de col las aplicaciones foliares de Phi causaron una disminución en actividad antioxidante (Figura 1 del Capítulo 7); por el contrario, en acelga las aplicaciones foliares de Phi incrementaron la actividad antioxidante en hojas (Figura 1 del Capítulo 5), por lo que la cuestión sería encontrar las concentraciones óptimas en cada cultivo en función de la sensibilidad de cada especie al Phi.

Eshraghi *et al.* (2011) mencionan que Phi no solo potencializa una rápida respuesta de defensa de la planta contra el patógeno, sino que también induce la expresión de genes de defensa en la ausencia del patógeno. Lo anterior está muy relacionado con el incremento de la actividad antioxidante que generan las aplicaciones de Phi.

Capítulo 9

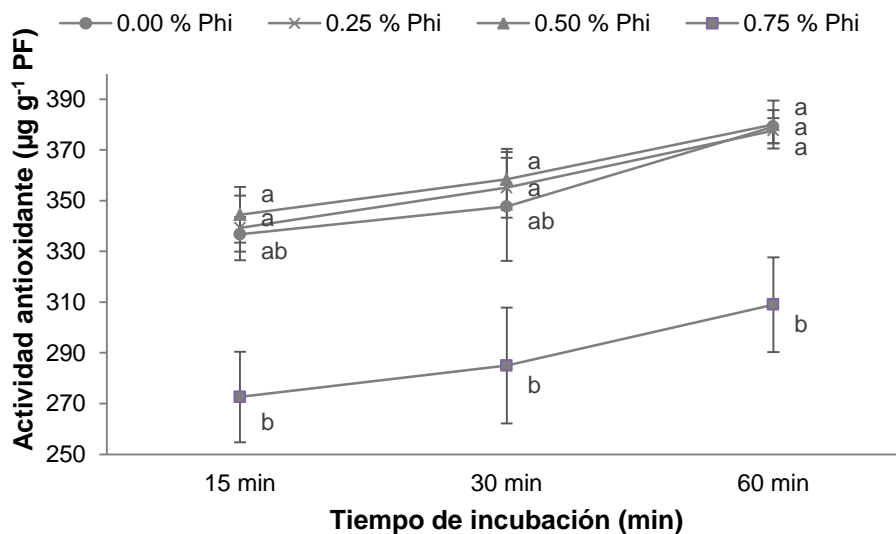


Figura 1. Actividad antioxidante total en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (15, $p=0.0261$; 30, $p=0.0148$; 60, $p=0.0113$). PF=peso fresco.

9.3.2.2. Fenoles totales

Se observó que el mejor tratamiento foliar de Phi, que representó un incremento significativo de 14% con respecto al testigo fue el de 0.50%, cantidades superiores tienden a disminuir la concentración de fenoles totales en hojas de apio (Figura 2). Los resultados obtenidos en apio son muy similares a los obtenidos en acelga utilizando los mismos tratamientos, ya que en ese cultivo de igual manera el mejor tratamiento fue la aplicación de 0.50% de Phi (Figura 2 del Capítulo 5).

El apio es una planta que se distingue por ser rica en una serie de compuestos bioactivos como vitaminas, aminoácidos, aceites volátiles y otros compuestos como apigenina, que es un compuesto perteneciente a las flavonas, el cual tiene muchos beneficios importantes para la salud, incluida la disminución en la hipertensión arterial (Li *et al.*, 2014). Desde este punto de vista es muy interesante poder incrementar la concentración de fitoquímicos *in planta*, como se ha observado que el Phi incrementó considerablemente la concentración de fenoles totales, y es importante siempre tener

Capítulo 9

en cuenta que las dosis de aplicación son de suma importancia, ya que el Phi causa un tipo de estrés en la planta que promueve el incremento de fenoles y en cantidades superiores tiende a disminuirlos.

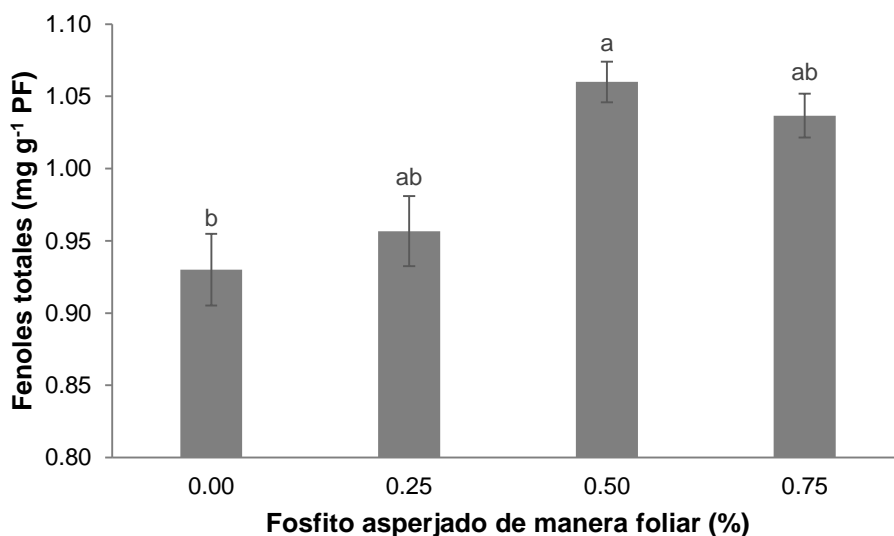


Figura 2. Concentración de fenoles totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0132$). PF=peso peso fresco.

9.3.2.3. Flavonoides totales

En la variable de flavonoides totales, se observó que aplicaciones foliares de 0.25 y 0.50% de Phi son iguales estadísticamente al testigo, pero aplicaciones superiores a 0.50% tienden a disminuir la concentración de flavonoides totales en hojas de apio (Figura 3). En el cultivo de col se observó la misma tendencia que en el cultivo de apio; sin embargo en el cultivo de acelga el tratamiento de 0.50% de Phi vía foliar incrementó la concentración de flavonoides totales por encima de los demás tratamientos.

En apio hay una gran cantidad de flavonoides uno muy representativo la apiina, la cual le confiere al apio una excelente actividad antioxidante; esta actividad antioxidante conferida puede contribuir a prevenir el estrés oxidativo (Li *et al.*, 2014). La aplicación

Capítulo 9

foliar no mejoró estadísticamente la concentración de flavonoides y en aplicaciones foliares superiores a 0.75% disminuyó incluso la concentración de flavonoides, estos resultados permiten suponer que en apio las dosis positivas de Phi debieran ser aún más bajas a las empleadas.

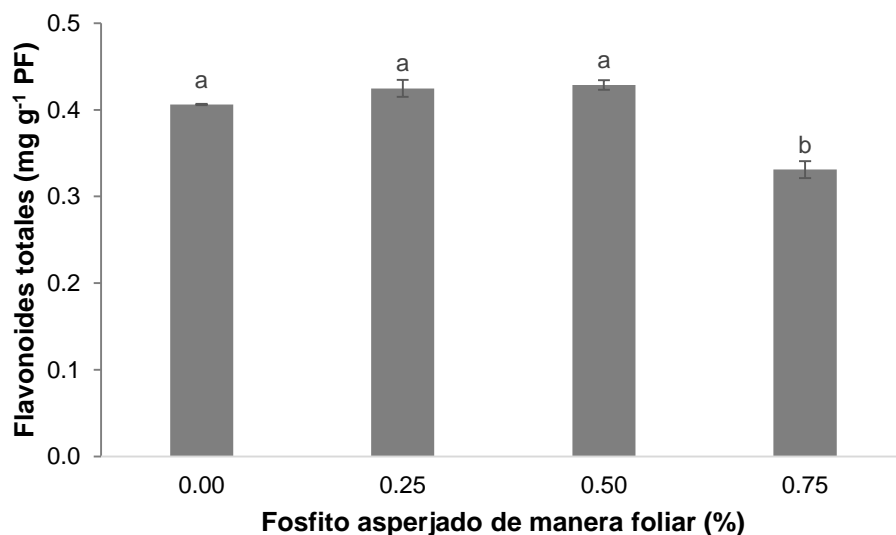


Figura 3. Concentración de flavonoides totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0001$). PF=peso fresco.

9.3.2.4. Concentración de ácido ascórbico

Los tratamientos foliares con Phi no afectaron estadísticamente la concentración de ácido ascórbico en hojas de apio (Cuadro 4). Los resultados que obtuvimos en acelga y col por otro lado mostraron que las aplicaciones foliares de Phi, tuvieron efectos benéficos en el incremento de la concentración de ácido ascórbico, especialmente en col (Figura 4 del Capítulo 5 y Figura 4 del Capítulo 7, respectivamente). Por otro lado en lechuga se observaron efectos opuestos, debido a que los resultados mostraron que las aplicaciones de Phi disminuyeron la concentración de ácido ascórbico (Figura 4 del Capítulo 3).

Capítulo 9

Moor *et al.* (2009) encontraron que aplicaciones de Phi incrementaron la concentración de ácido ascórbico en frutos de fresa. En este experimento en apio, no se observó una influencia de la aplicación foliar de Phi sobre la concentración de ácido ascórbico y coincide con lo obtenido por Thao *et al.* (2009) ya que estos autores no encontraron efecto de aplicaciones de fosfito en hojas de lechuga y señalan que no tiene efecto en la biosíntesis de ácido ascórbico.

Cuadro 4. Concentración de ácido ascórbico en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a aplicaciones de fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Concentración de ácido ascórbico ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF^x)
0.00	60.22 a ^z
0.25	55.50 a
0.50	58.33 a
0.75	73.50 a
DHS ^y	31.43
Pr>F	0.3331

^zValores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

9.3.3. Indicadores fisiológicos

9.3.3.1. Concentración de clorofila a, b y total

Se observó que aplicaciones foliares de 0.25% de Phi, favorecieron el incremento de la concentración de clorofilas a, b y total en 15.4, 13.9 y 14.9%, respectivamente, en comparación con el testigo en hojas de apio (Figura 4). Los resultados obtenidos en apio coincidieron con los obtenidos en los cultivos de lechuga y col, debido a que en los tres cultivos se obtuvo un incremento en clorofilas al asperjar 0.25% de Phi (Figura 5 del Capítulo 3 y Figura 5 del Capítulo 5). Por otro lado, en acelga no se observó algún efecto estadístico significativo en la concentración de clorofilas al asperjar Phi (Cuadro 4 del Capítulo 5).

Capítulo 9

Estrada-Ortiz *et al.* (2011) encontraron que al aplicar 30% del total de P en forma de Phi en la solución nutritiva incrementó la concentración de clorofila a, b y total en hojas de fresa en etapa de fructificación; lo cual es acorde a lo observado en apio, es decir, que las aplicaciones de Phi vía foliar estimulan la producción de clorofilas.

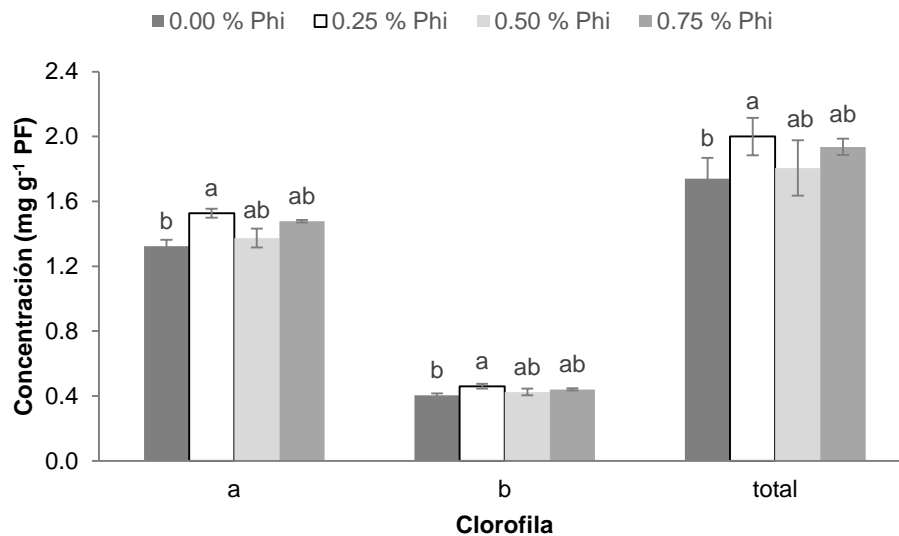


Figura 4. Concentración de clorofilas a, b y total en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes aplicaciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). (Chl a, $p=0.0367$; Chl b, $p=0.0449$; Chl total, $p=0.0172$). PF= peso fresco.

9.3.3.2. Azúcares totales en hojas

Los resultados obtenidos en concentración de azúcares totales en hojas de apio son interesantes, debido a que se observó que aplicaciones foliares de Phi, incrementaron la concentración de azúcares, en especial la aplicación de 0.50% que incrementó en un 29.7% la concentración de azúcares totales de hojas, en comparación con el testigo (Figura 5). En los cultivos de lechuga, acelga y col las aplicaciones foliares no tuvieron efectos significativos en la concentración de azúcares (Cuadro 4 del Capítulo 3, Cuadro 5 del Capítulo 5 y Cuadro 4 del Capítulo 7, respectivamente).

Capítulo 9

El incremento en la concentración de azúcares totales favorece un desarrollo rápido (precoz) de la planta e incluso puede representar un incremento en rendimiento (Stapleton *et al.*, 2001). Los tratamientos de Phi incrementaron la concentración de azúcares, principalmente a 0.50% de Phi vía foliar.

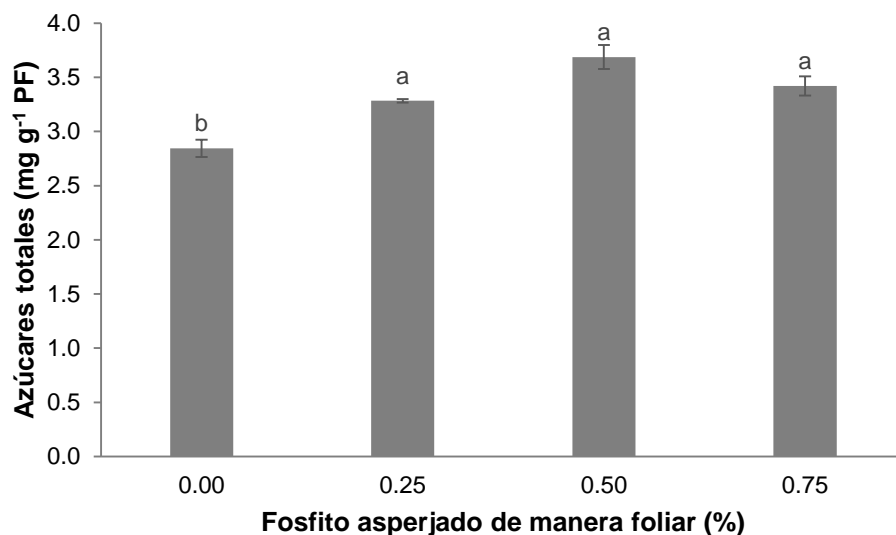


Figura 5. Concentración de azúcares totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0016$). PF= peso fresco.

9.3.3.3. Aminoácidos libres totales

Los tratamientos foliares con Phi, no tuvieron efectos significativos en el cultivo de apio (Cuadro 5). En el cultivo de col se obtuvieron resultados similares, ya que las aplicaciones foliares de Phi tampoco afectaron significativamente los resultados (Cuadro 5 del Capítulo 7). Sin embargo, en el cultivo de acelga, la aplicación de 0.25% de Phi incrementó significativamente la concentración de aminoácidos totales con respecto al testigo (Figura 5 del Capítulo 5).

Berkowitz *et al.* (2013) realizaron aplicaciones de Phi en *Arabidopsis* en plantas con suficiencia de Pi (0.5 mM Pi + 2.5 mM Phi) comparándolas con plantas con limitación de Pi (0.05 mM Pi) y reportan que en plantas tratadas con Phi se produjo una reducción

Capítulo 9

entre 40 y 60% en aminoácidos como asparagina, ácido glutámico, ácido aspártico y serina. Sin embargo estos resultados difieren de los obtenidos en apio, con aspersiones foliares de Phi, ya que no se observaron diferencias estadísticas significativas con el testigo.

Cuadro 5. Concentración de aminoácidos libres totales en hojas de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar.

Fosfito (%)	Concentración de aminoácidos libres totales ($\mu\text{M g}^{-1} \text{PF}^x$)
0.00	29.50 a ^z
0.25	27.73 a
0.50	30.77 a
0.75	31.96 a
DHS ^y	4.45
Pr>F	0.0749

^zValores con las mismas letras son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). ^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPF: peso fresco.

9.3.3.4. Proteínas solubles totales

La concentración de proteínas solubles totales se vio incrementada estadísticamente por aplicaciones foliares de Phi en hojas de apio. Se observó que los tratamientos con 0.25 y 0.75% incrementaron significativamente la concentración de proteínas en relación al testigo en un 14.8 y 26.4%, respectivamente, obteniéndose como mejor tratamiento la aplicación de 0.75% de Phi vía foliar (Figura 6). De manera opuesta, en los cultivos de acelga y col se obtuvieron resultados negativos con la aplicación foliar de Phi en la concentración de proteínas en hojas (Figura 6 del Capítulo 5 y Figura 6 del Capítulo 7); por otro lado, en lechuga no se observaron diferencias estadísticas en concentración de proteína en hojas, al aplicar Phi de manera foliar (Cuadro 5 del Capítulo 3).

Concentraciones de 30% de P total en forma de Phi suministrado a la solución nutritiva, incrementó la concentración de proteínas en hojas de fresa y concentraciones mayores la disminuyeron (Estrada-Ortiz *et al.*, 2011). Dicho comportamiento es muy similar a lo

Capítulo 9

encontrado en esta investigación; sin embargo, en este experimento las aplicaciones de Phi fueron foliares y hay una tendencia al incremento en proteína.

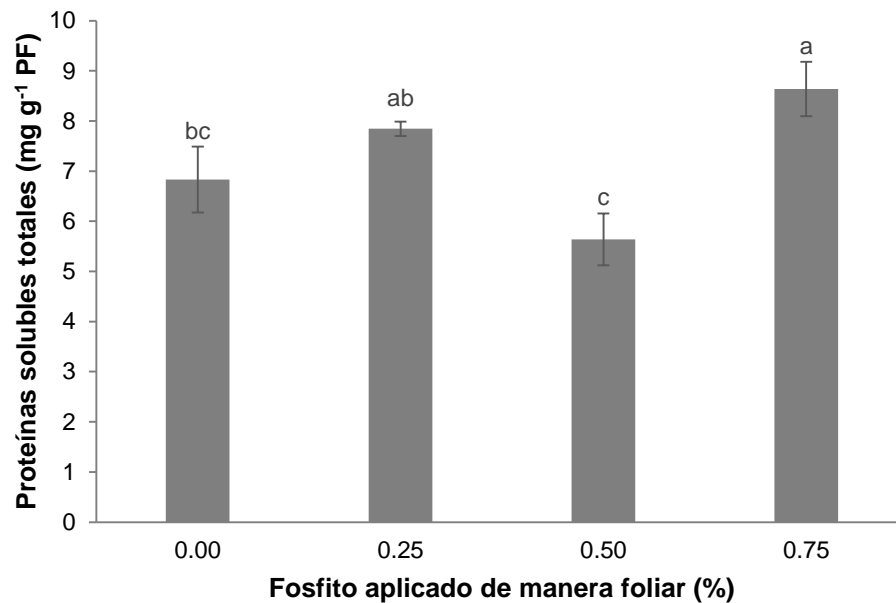


Figura 6. Concentración de proteínas solubles totales en hojas de apio en respuesta a diferentes concentraciones de fosfito vía foliar. Medias con letras distintas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). ($p=0.0003$). PF= peso fresco.

9.3.4. Concentración nutrimental

Se observó que las aplicaciones de Phi vía foliar no modificaron significativamente la concentración de nutrimentos en vástago (Cuadros 6 y 7). Mientras que en raíz no se observaron diferencias estadísticas significativas por aplicación foliar de Phi en N, Ca, Mg, S, Zn y B; por otro lado, en K, Cu y Na se observó una disminución en su concentración en raíz, a medida que se incrementó la concentración de Phi en la soluciones foliares. Además se observó que las aplicaciones de 0.25, 0.50 y 0.75% de Phi incrementaron la concentración en raíz de Fe, P y Mn, respectivamente.

Capítulo 9

Cuadro 6. Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Tejido	Phi (%)	Concentración (g kg ⁻¹ PS ^x)					
		N	P	K	Ca	Mg	S
Vástago	0.00	36.62 a ^z	7.55 a	12.38 a	13.91 a	4.48 a	7.68 a
	0.25	38.16 a	7.90 a	11.67 a	12.82 a	4.15 a	6.75 a
	0.50	36.36 a	6.83 a	9.91 a	10.84 a	3.59 a	5.88 a
	0.75	36.87 a	7.46 a	12.37 a	12.45 a	3.61 a	6.29 a
	DHS	2.34	2.90	4.49	4.25	1.57	2.45
	Pr>F	0.1582	0.7450	0.3549	0.2472	0.3101	0.2121
Raíz	0.00	36.79 a	10.38 b	17.66 a	6.34 a	7.35 a	2.88 a
	0.25	36.19 a	10.24 b	12.20 b	6.59 a	6.87 a	2.90 a
	0.50	37.56 a	11.66 a	13.80 ab	6.33 a	7.01 a	2.77 a
	0.75	40.05 a	11.13 ab	12.13 b	6.46 a	6.88 a	2.94 a
	DHS ^y	4.62	0.92	4.39	0.44	0.60	0.20
	Pr>F	0.1207	0.0020	0.0089	0.3043	0.1066	0.1597

^zValores con distintas letras en cada columna por órgano son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Capítulo 9

Cuadro 7. Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de apio cv. Tall Utha 52-70 en respuesta a tratamientos con fosfito vía foliar.

Tejido	Phi (mol _c m ⁻³)	Concentración (mg kg ⁻¹ PS ^x)					
		Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Vástago	0.00	107.1 a ^z	5.88 a	32.61 a	83.68 a	99.59 a	4969.10 a
	0.25	111.92 a	5.24 a	38.46 a	85.23 a	92.82 a	4662.70 a
	0.50	101.32 a	9.51 a	22.88 a	79.03 a	100.09 a	4572.40 a
	0.75	107.49 a	4.64 a	25.82 a	99.43 a	84.78 a	3183.30 a
	DHS	39.34	10.72	22.79	28.76	58.09	2555.7
	Pr>F	0.8839	0.5516	0.2886	0.2305	0.8466	0.2195
Raíz	0.00	750.28 ab	37.96 a	54.60 a	2178.79 b	102.92 a	13224.60 a
	0.25	811.06 a	36.45 ab	52.96 a	2206.56 ab	97.04 a	10823.50 bc
	0.50	682.95 b	37.06 ab	52.02 a	2313.90 ab	102.03 a	12528.4 ab
	0.75	666.45 b	33.55 b	50.97 a	2377.58 a	98.40 a	9858.90 c
	DHS ^y	99.51	4.02	5.60	182.27	14.78	1922.70
	Pr>F	0.0037	0.0353	0.3095	0.0234	0.6015	0.0008

^zValores con distintas letras en cada columna por órgano son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

^yDHS: Diferencia honesta significativa. ^xPS: peso seco.

Thao *et al.* (2009) encontraron que la adición de Phi en la solución nutritiva incrementó la de N en vástago de lechuga bajo condiciones suficiencia de P (0.3 mM de Pi). Constán-Aguilar *et al.* (2014) encontraron que la adición de Phi en diferentes concentraciones, en la solución nutritiva no modificó la concentración de P total en parte aérea de plantas de pepino, sin importar si tenía condiciones de suficiencia o insuficiencia de P en forma de Pi. En este experimento se manejaron condiciones de suficiencia de P en forma de Pi, y por tanto las aplicaciones de Phi, no tuvieron influencia en la concentración de macronutrientos en raíz y vástago y solo se observó una disminución en Fe, Cu y Na al incrementar Phi.

Capítulo 9

9.4. CONCLUSIONES

Aplicaciones de 0.25% de Phi vía foliar en apio incrementan la concentración de clorofilas a, b y total en hojas.

Aplicar Phi en concentraciones de 0.50% en apio, incrementan fenoles totales y la actividad antioxidante total, pero en cantidades superiores la disminuyen; mientras que aplicaciones foliares superiores a 0.50% de Phi vía foliar disminuyen el volumen de raíz y materia fresca y seca de vástago, así como fenoles totales en hojas.

Aplicaciones foliares de 0.75% incrementan la concentración de proteínas solubles totales.

De manera general, aplicaciones foliares de Phi en apio incrementan la concentración de azúcares totales en hojas.

9.5. LITERATURA CITADA

- Ávila, F. W.; Faquin, V.; da Silva, L. A. K.; Andressa, A. P.; Marques, D. J.; Silva, G. E. M.; Yuen, T. D. K. 2013. Effect of phosphite supply in nutrient solution on yield, phosphorus nutrition and enzymatic behavior in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants. *Aust. J. Crop Sci.* 7(5): 713-722.
- Berkowitz, O.; Jost, R.; Kollehn, D. O.; Fenske, R.; Finnegan, P. M.; O'Brien, P. A.; Hardy, G. E. St. J.; Lambers, H. 2013. Acclimation responses of *Arabidopsis thaliana* to sustained phosphite treatments. *J. Exp. Bot.* 64(6): 1731-1743.
- Constán-Aguilar, C.; Sánchez-Rodríguez, E.; Rubio-Wilhelmi, M. M.; Camacho, M. A.; Romero, L.; Ruiz, J. M.; Blasco, B. 2014. Physiological and nutritional evaluation of the application of phosphite as a phosphorus source in cucumber plants. *C. S. S. P. A.* 45: 204-222.
- Eshraghi, L.; Anderson, J.; Aryamanesh, N.; Shearer, B; McComb, J.; Hardy, G. E. St. J.; O'Brien, P. A. 2011. Phosphite primed defence responses and enhanced

Capítulo 9

- expression of defence genes in *Arabidopsis thaliana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. Plant Pathol. 60:1086-1095.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2011. Biochemical responses in strawberry plants supplying phosphorus in the form of phosphite. Rev. Chapingo Ser. Hortic. 17: 129-138.
- Hirosse, E. H.; Creste, J. E.; Custodio, C. C.; Machado-Neto, N.B. 2012. *In vitro* growth of sweet potato fed with potassium phosphite. Acta Scientiarum. 34(1): 85-91.
- Li, P.; Jia, J.; Zhang, D.; Xie, J.; Xu, X.; Wei, D. 2014. In vitro and in vivo antioxidant activities of a flavonoid isolated from celery (*Apium graveolens* L. var. dulce). Food and Function. 5: 50-56.
- Lobato, M. C.; Machinandiarena, M. F.; Tambascio, C.; Dosio, G. A. A.; Caldiz, D. O.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B.; Olivieri, F. P. 2011. Effect of foliar applications of phosphite on post-harvest potato tubers. Eur. J. Plant Pathol. 130: 155-163.
- López-Arredondo, D. L.; Herrera-Estrella, L. 2012. Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system. Nature Biotechnol. 30(9): 889-895.
- Misic, D.; Zizovic, I.; Stamenic, M; Asanin, R.; Ristic, M.; Petrovic, S.D.; Skala, D. 2008. Antimicrobial activity of celery fruit isolates and SFE process modeling. J. Biomech Engr. 42(2): 148-52.
- Moor, U.; Pöldma, P.; Tõnutare, T.; Karp, K.; Starast, M.; Vool, E. 2009. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. Scientia Hort. 119: 264-269.
- Olivieri, F. P.; Feldman, M. L.; Machinandiarena, M. F.; Lobato, M. C.; Caldiz, D. O.; Daleo, G. R.; Andreu, A. B. 2012. Phosphite applications induce molecular modifications in potato tuber periderm and cortex that enhance resistance to pathogens. Crop Prot. 32: 1-6.
- Plaxton, W. C. 1998. Metabolic aspects of phosphate starvation in plants. *In*: J.P. Lynch and J. Deikman (eds.), Phosphorous in plant biology: regulatory roles in molecular,

Capítulo 9

- cellular, organismic and ecosystem processes. Am. Soc. Plant Physiologists, Rockville (MD), USA.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Silva, O. C.; Santos H. A. A.; Dalla Pria, M.; May-De Mio, L. L. 2011. Potassium phosphite for control of downy mildew of soybean. *Crop Prot.* 30: 598-604.
- Stapleton, S. C.; Chandler, K. Legard, E. D.; Price, E. J.; Sumler, C. J. 2001. Transplant source affects fruiting performance and pest of 'Sweet Charlie' strawberry in Florida. *Hort. Technology.* 11: 61-65.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution, *In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands.* pp. 633-649.
- Steiner, A.; van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.* 46: 862-863.
- Sultana, S.; Ahmed, S.; Jahangir, T.; Sharma, S. 2005. Inhibitory effect of celery seeds extract on chemically induced hepatocarcinogenesis: modulation of cell proliferation, metabolism and altered hepatic foci development. *Cancer Lett.* 221(1): 11-20.
- Tapiero, H.; Tew, K. D.; Nguyen, B. G.; Mathe, G. 2002. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother.* 56(4): 200-207.
- Thao, H. T. B., T. Yamakawa, K. Shibata, P. S. Sarr, and A. K. Myint. 2008. Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth and phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Soil Sci. Plant Nut.* 54: 761-768.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite-phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa*). *J. Plant Nutr. Sci.* 172: 378-384.

Capítulo 9

Tsi, D.; Tan, B.K. 2000. The mechanism underlying the hypocholesterolaemic activity of aqueous celery extract, its butanol and aqueous fractions in genetically hypercholesterolaemic rats. *Life Sci.* 66(8): 755-767.

Yildiz, L.; Baskan, K. S.; Tutem, E. T.; Apak, R. 2008. Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle. *Talanta.* 77(1): 304-13.

CAPÍTULO 10. EFECTO DE DOS FUENTES DE FOSFITO EN LA SOLUCIÓN NUTRITIVA SOBRE CRECIMIENTO Y FISIOLÓGÍA EN PLANTAS DE LECHUGA

10.1. INTRODUCCIÓN

La forma convencional de absorción de P por las plantas es el fosfato (Pi). Actualmente existen varios productos químicos de uso agrícola, que han sido presentados como fertilizantes para suplemento de P principalmente vía foliar y que utilizan como fuente primaria de este elemento, formas reducidas tales como fosfito (Phi) en forma de fosfonato, a estos productos se les reconoce su efecto fungicida sobre Oomicetos (Carswell *et al.*, 1996; Orovic *et al.*, 2008).

El Phi (H_2PO_3^-) es un isómero del anión Pi (H_2PO_4^-) en donde uno de los átomos de oxígeno es reemplazado por un hidrógeno (Ouimette y Coffey, 1990). Por la similitud en la estructura de estos dos aniones y sus propiedades cinéticas son absorbidos por los mismos transportadores (d'Arcy-Lameta y Bompeix, 1991).

El Phi tiene un claro efecto fungicida en Oomicetos (Rebollar *et al.*, 2010). Pero por otro lado, los reportes del efecto que tiene el Phi sobre crecimiento y rendimiento son contradictorios. En especies como *Allium cepa* y *Brassica nigra* se han encontrado efectos negativos (Sukarno *et al.*, 1993; Carswell *et al.*, 1996). Varadarajan *et al.* (2002) mencionan que dichos efectos negativos son disminuidos suministrando Pi a la planta. Por el contrario, Moor *et al.* (2009) indican que el fosfito no tiene efectos negativos en el crecimiento y rendimiento de fresa; sino que incrementa la calidad de fruta y activa mecanismos que aumentan la síntesis de ácido ascórbico y antocianinas.

Con base en lo anteriormente mencionado se planteó como objetivo determinar el efecto de la adición de Phi en la solución nutritiva utilizando dos fuentes y seis concentraciones sobre variables fisiológicas, nutrimentales y de crecimiento en el cultivo de lechuga.

Capítulo 10

10.2. MATERIALES Y MÉTODOS

10.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante los meses de febrero a abril de 2012, en un invernadero tipo cenital, localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Climax, cultivada en sustrato perlita. La temperatura máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento dentro del invernadero fueron 37, 3.2 y 18.2 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 279 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

10.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Las soluciones se formularon tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984) al 50% preparada con reactivos grado analítico, utilizando 0.531 g L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ · 4H₂O; 0.152 g L⁻¹ de KNO₃; 0.068 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0.247 g L⁻¹ de MgSO₄ · 7H₂O y 0.131 g L⁻¹ de K₂SO₄. La solución nutritiva se complementó con micronutrientes en las siguientes concentraciones: 1.6 mg L⁻¹ de Mn; 0.11 mg L⁻¹ de Cu; 0.86 mg L⁻¹ de B; 0.023 mg L⁻¹ de Zn y 0.048 mg L⁻¹ de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L⁻¹ a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970).

El arreglo de tratamientos fue un factorial 2 x 6, en donde el primer factor fue la fuente de Phi (Na₂HPO₃ · 5H₂O y H₃PO₃, Sigma-Aldrich), el segundo factor la concentración de Phi en la solución nutritiva (0.00, 0.25, 0.50, 1.00, 1.50 y 2.00 mol_c m⁻³), dando un total de 12 tratamientos, los cuales fueron distribuidos en un diseño experimental completamente al azar, en donde cada planta se consideró como unidad experimental, teniendo 39 repeticiones por tratamiento. El pH de la solución nutritiva se mantuvo en 5.8 ya que se considera un pH óptimo para la disponibilidad de Phi (Hanrahan *et al.*, 2005), el cual se ajustó adicionando H₂SO₄ al 97% y NaOH 1 N.

La aplicación de tratamientos comenzó 14 días después de la siembra, aplicando en un inicio 30 mL de solución diariamente, posteriormente se adicionaron 50 mL.

Capítulo 10

10.2.3. Manejo del experimento

El 23 de febrero de 2012, se germinaron semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Climax, en sustrato perlita previamente humedecida y utilizando como contenedores vasos de plástico. En cada vaso se colocó una semilla, para mantener la humedad durante el periodo de germinación, se realizaron riegos con agua. Diez días después concluyó la germinación y posteriormente, entre el día dos al trece después de la germinación se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 10%. El agua empleada para realizar las soluciones nutritivas fue destilada.

La aplicación de tratamientos con Phi comenzó 14 días después de la siembra (9 de marzo de 2012), utilizando a partir de ese momento la solución Steiner al 50%; se aplicó diariamente 30 mL de solución nutritiva por vaso en un inicio y posteriormente 50 mL.

10.2.4. Variables evaluadas

10.2.4.1. Materia seca

La parte aérea y raíz de plantas de lechuga se colocaron en una estufa de aire forzado (Riossa, HCF-125D, México) durante 48 h a una temperatura de 70 °C, asegurándose de tener un peso constante en el material vegetal. Posteriormente se evaluó el peso de biomasa seca de vástago, raíz en una balanza analítica, lo anterior se midió con material vegetal de 15, 26, 32 y 39 días después de la siembra.

10.2.4.2. Número de hojas

Se realizó el conteo de hojas de 12 plantas de lechuga por tratamiento, los días 14, 19, 29, 35 y 40 después de la siembra.

10.2.4.3. Área foliar

Capítulo 10

Utilizando un método destructivo, se midió el área foliar de cuatro plantas por tratamiento, los días 15, 26, 32 y 39 después de la siembra, para ello se utilizó el integrador electrónico de área foliar LICOR LI-300, reportándose ésta en $\text{cm}^2 \text{planta}^{-1}$.

10.2.4.4. Lecturas Spad

Las lecturas se realizaron los días 14, 19, 29, 35 y 40 después de la siembra, evitando la interferencia de las nervaduras y realizándose en 12 plantas por tratamiento, para lo cual se utilizó el medidor portátil Minolta SPAD-510.

10.2.4.5. Tasa de crecimiento absoluto (TCA)

Para su cálculo, se realizaron muestreos destructivos, los días 15, 26, 32 y 39 después de la siembra, utilizando cuatro repeticiones por tratamiento, posteriormente se metieron a secar a 70°C durante 48 h en una estufa de aire forzado, y se registró el peso seco de las muestras. La TCA se calculó mediante la siguiente ecuación (Escalante y Kohashi, 1993):

$$\text{TCA} = \frac{(\text{PS}_2 - \text{PS}_1)}{(t_2 - t_1)}$$

Donde:

PS_2 y PS_1 representan el peso seco de la planta en los tiempos t_2 y t_1 , respectivamente.

10.2.4.6. Tasa de crecimiento relativo (TCR)

Para calcularla, se realizaron cuatro muestreos destructivos, los días 15, 26, 32 y 39 dds, utilizando cuatro repeticiones por tratamiento, posteriormente se metieron a secar a 70°C durante 48 h en una estufa de aire forzado, y se procedió a registrar el peso seco de las muestras. La TCR se calculó mediante la siguiente ecuación (Escalante y Kohashi, 1993):

$$\text{TCR} = \frac{(\ln\text{PS}_2 - \ln\text{PS}_1)}{(t_2 - t_1)}$$

Capítulo 10

Donde:

$\ln PS_2$ y $\ln PS_1$ son el logaritmo natural del peso seco de la planta en el tiempo t_2 y t_1 , respectivamente.

10.2.4.7. Concentración nutrimental

Utilizando material vegetal secado en la estufa y finamente molido, se realizó el análisis de N total empleando el método Semimicro-Kjeldahl (Bremner, 1965). Las determinaciones de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B se realizaron mediante digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). De los extractos obtenidos se tomó lectura en un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-VARIAN 725-ES).

10.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlet para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$ %), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

10.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.3.1. Peso seco

En el Cuadro 1 se observó el efecto de la fuente de Phi sobre la acumulación de materia seca de vástago y raíz. En las tres primeras fechas de muestreo no hubo diferencias estadísticas significativas entre las fuentes de Phi según la prueba de Tukey al 5%; mientras que para el cuarto muestreo (39 dds), se encontró que la fuente de ácido fosforoso (H_3PO_3) favoreció la acumulación de materia seca tanto en vástago como en raíz, estos resultados contrastan con lo obtenido por Bertsch *et al.* (2008)

Capítulo 10

quienes reportan que el ácido fosforoso no puede ser utilizable en la solución nutritiva ya que causa daños al cultivo.

Al analizar los resultados obtenidos por efecto del factor concentración de Phi en la solución nutritiva, se observó que para vástago no hay diferencias en PMS a los 15 y 26 dds, mientras que para el día 32 se observó que el testigo fue el que mayor peso seco acumuló; para el día 39, se siguió acumulando mayor peso seco en el testigo, pero sin haber diferencias significativas con las concentraciones de Phi, excepto $1.5 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi, el cual tuvo la menor acumulación de peso seco (Cuadro 1).

En raíz se observó que 15, 26 y 32 dds no se encontraron diferencias estadísticas significativas, mientras que 39 dds se observó un comportamiento diferente al de vástago, ya que las concentraciones que más favorecieron a peso seco en raíz fueron 0.5 y $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ seguidas por el testigo y $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ sin haber diferencias estadísticas entre ellos; sin embargo para las concentraciones más altas de Phi (1.5 y $2 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$) se observó una disminución drástica en acumulación de materia seca de raíz (Cuadro 1).

Thao *et al.* (2009) encontraron que el Phi es absorbido sin ningún problema por la raíz de lechuga, pero no estimula el crecimiento de plantas, este efecto es similar al observado en vástago en esta investigación, se observó que la adición de Phi redujo la acumulación de materia seca; sin embargo contrasta con lo obtenido en raíz, en donde se promovió el crecimiento al adicionar $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$.

En el Cuadro 1 se muestra también la interacción de los factores de estudio y su efecto en acumulación de materia seca tanto en raíz como en vástago. En vástago se observó que 15 y 26 dds no se encontraron diferencias estadísticas entre interacciones; por el contrario, 32 y 39 dds, los tratamientos testigo (tratamiento sin Phi) tanto para fosfito de sodio como para ácido fosforoso tuvieron la mayor acumulación de materia seca en vástago, siguiendo la misma tendencia observada en el factor concentración de Phi, en donde al agregar fosfito a la solución se reduce la acumulación de materia seca en vástago. En raíz, solo se encontraron diferencias estadísticas significativas 39 dds y se

Capítulo 10

observó de manera general, que la mejor interacción fue ácido fosforoso con una concentración de Phi de $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ y donde se registró la menor materia seca tanto en raíz como en vástago, al utilizar como fuente fosfito de sodio con una con una concentración de Phi de $1.5 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$.

Thao y Yamakawa (2010) encontraron que hay una fuerte inhibición por competencia en la absorción de Phi y Pi en plantas de komatsuna (*Brassica rapa var. peruvidis cv. Ajisai*) tanto en altas como en bajas concentraciones de fósforo en forma de Pi; por tanto, el crecimiento de la raíz de la planta es afectado al adicionar Phi lo cual tiene repercusiones en la absorción de Pi, esto contrasta con los resultados que se obtuvieron para materia seca de raíz en esta investigación ya que se encontró que concentraciones de Phi de $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ utilizando como fuente ácido fosforoso promovieron la acumulación de materia seca de la raíz.

Thao y Yamakagua (2009) señalan que Phi por sí solo no promueve ningún tipo de estimulación en crecimiento de plantas saludables, ni tampoco en combinación con Pi y que para que pueda tener algún efecto benéfico en la planta Phi debe ser convertido a Pi, lo cual contrasta con lo obtenido en raíz en este experimento.

Capítulo 10

Cuadro 1. Acumulación de materia seca en raíz y vástago de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva, en cuatro muestreos.

Fuente	Phi (mol _c m ⁻³)	Raíz (g PS ^y)				Vástago (g PS)			
		dds ^z				dds			
		15	26	32	39	15	26	32	39
Efectos principales									
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O		0.016 a ^x	0.055 a	0.149 a	0.232 b	0.040 a	0.131 a	0.388 a	0.553 b
H ₃ PO ₃		0.014 a	0.065 a	0.152 a	0.279 a	0.039 a	0.162 a	0.397 a	0.659 a
	0.00	0.015 a	0.065 a	0.190 a	0.270 ab	0.035 a	0.168 a	0.593 a	0.723 a
	0.25	0.019 a	0.055 a	0.157 a	0.271 ab	0.046 a	0.130 a	0.358 b	0.612 ab
Concentración de Phi	0.50	0.015 a	0.060 a	0.120 a	0.296 a	0.050 a	0.141 a	0.286 b	0.643 ab
	1.00	0.012 a	0.074 a	0.132 a	0.296 a	0.029 a	0.184 a	0.347 b	0.665 ab
	1.50	0.015 a	0.047 a	0.169 a	0.185 c	0.041 a	0.115 a	0.437 ab	0.442 b
	2.00	0.014 a	0.058 a	0.137 a	0.215bc	0.035 a	0.141 a	0.334 b	0.554 ab
Efectos simples									
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	0.015 a	0.065 a	0.190 a	0.270 abc	0.04 a	0.17 a	0.59 a	0.72 a
	0.25	0.023 a	0.061 a	0.164 a	0.233 abc	0.05 a	0.15 a	0.38 ab	0.52 ab
	0.50	0.013 a	0.037 a	0.094 a	0.286 ab	0.04 a	0.06 a	0.20 b	0.67 ab
	1.00	0.012 a	0.066 a	0.130 a	0.266 abc	0.02 a	0.17 a	0.38 ab	0.67 ab
	1.50	0.015 a	0.049 a	0.174 a	0.149 c	0.04 a	0.12 a	0.44 ab	0.30 b
	2.00	0.017 a	0.051 a	0.145 a	0.186 bc	0.05 a	0.12 a	0.34 ab	0.44 ab
H ₃ PO ₃	0.00	0.015 a	0.065 a	0.190 a	0.270 abc	0.04 a	0.17 a	0.59 a	0.72 a
	0.25	0.015 a	0.049 a	0.150 a	0.308 ab	0.04 a	0.11 a	0.34 ab	0.70 ab
	0.50	0.018 a	0.083 a	0.147 a	0.306 ab	0.06 a	0.23 a	0.37 ab	0.62 ab
	1.00	0.013 a	0.081 a	0.134 a	0.326 a	0.03 a	0.19 a	0.31 ab	0.66 ab
	1.50	0.015 a	0.046 a	0.164 a	0.220 abc	0.04 a	0.12 a	0.44 ab	0.59 ab
	2.00	0.011 a	0.066 a	0.128 a	0.243 abc	0.02 a	0.16 a	0.33 ab	0.67 ab
Fuente		ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	*
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	**	ns	ns	**	*
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	**	ns	ns	*	*

^xLetras distintas en cada columna por factor de estudio e interacción, indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^yPS, peso seco; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$.

Capítulo 10

10.3.2. Número de hojas

El factor fuente de Phi, no mostró diferencias significativas para número de hojas de plantas de lechuga, mientras que el factor concentración de fosfito mostró diferencias significativas 14, 29 y 35 dds, encontrándose una tendencia en disminución del número de hojas a medida que se incrementó la concentración de Phi en la solución nutritiva, por lo que se consideró como mejor tratamiento al testigo al presentar la mayor media en número de hojas (Cuadro 2). Mientras que 14 y 40 dds no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Carswell *et al.* (1996) encontraron efectos negativos de Phi, que van desde disminución en crecimiento de plantas de *Brassica nigra* desarrolladas bajo cultivo *in vitro*, hasta la muerte, lo cual coincide en parte con lo observado en este experimento ya que se ve afectado el número de hojas al adicionar Phi. Por otro lado, en la interacción de factores fuente de fosfito por concentración de fosfito no se observaron diferencias estadísticas significativas (Cuadro 2).

Capítulo 10

Cuadro 2. Número de hojas de plantas de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva, en cinco fechas después de la siembra.

Fuente	Phi (mol _c m ⁻³)	Número de hojas (planta ⁻¹)				
		dds ^z				
		14	19	29	35	40
Efectos principales						
Na ₂ HPO ₃ · 5H ₂ O		2.93 a ^y	3.89 a	4.93 a	5.74a	6.78a
H ₃ PO ₃		2.93 a	3.72 a	4.94 a	5.79a	6.61a
	0.00	3.17 a	3.92 a	5.42 a	6.33 a	7.00 a
	0.25	2.92 ab	3.79 a	4.92 ab	5.88 ab	6.50 a
Concentración	0.50	3.17 a	4.04 a	5.13 ab	5.92 ab	7.00 a
de Phi	1.00	2.71 ab	3.63 a	4.63 b	5.42 b	6.54 a
	1.50	2.67 b	3.79 a	4.83 ab	5.54 b	6.63 a
	2.00	2.96 ab	3.67 a	4.71 b	5.5 b	6.50 a
Efectos simples						
Na ₂ HPO ₃ · 5H ₂ O	0.00	3.17 a	3.92 a	5.42 a	6.33 a	7.00 a
	0.25	2.83 a	3.92 a	4.75 a	5.58 a	6.42 a
	0.50	3.17 a	4.08 a	5.08 a	5.75 a	7.08 a
	1.00	2.92 a	3.83 a	4.67 a	5.42 a	6.75 a
	1.50	2.50 a	3.83 a	4.92 a	5.75 a	6.75 a
	2.00	3.00 a	3.75 a	4.83 a	5.58 a	6.67 a
H ₃ PO ₃	0.00	3.17 a	3.92 a	5.42 a	6.33 a	7.00 a
	0.25	3.00 a	3.67 a	5.08 a	6.17 a	6.58 a
	0.50	3.17 a	4.00 a	5.17 a	6.08 a	6.92 a
	1.00	2.50 a	3.42 a	4.58 a	5.42 a	6.33 a
	1.50	2.83 a	3.75 a	4.75 a	5.33 a	6.50 a
	2.00	2.92 a	3.58 a	4.58 a	5.42 a	6.33 a
Fuente		ns	ns	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		*	ns	*	*	ns
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	ns

^yLetras distintas en cada columna por factor de estudio e interacción indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo; * significante a $p \leq 0.05$.

Capítulo 10

10.3.3. Área foliar

Al observar los resultados, se advierte que el factor fuente de Phi, no afectó significativamente el área foliar en los muestreos realizados. En el factor concentración de Phi, para área foliar solo se observaron diferencias significativas en los dos últimos muestreos (32 y 39 dds), en donde en particular, 32 dds se observó que el testigo fue significativamente mayor en área foliar con respecto de los demás tratamientos, pero en el muestreo realizado 39 dds se encontró que el mejor tratamiento para área foliar fue el de $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva seguido de 0.5, 0 y $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$, sin haber diferencias estadísticas significativas con éstos (Cuadro 3). Thao *et al.* (2009) encontraron en lechuga que al adicionar Phi y Pi a la solución nutritiva no hay ninguna estimulación en el crecimiento de las plantas, sin embargo aquí se observó que 35 dds, la concentración de Phi adicionada si tuvo un efecto positivo en el área foliar de la planta.

La interacción de los factores fuente por concentración de Phi afectó significativamente el área foliar a los 32 y 39 dds (Cuadro 3). A los 32 dds los mejores tratamientos fueron los testigos sin fosfito. Para el día 39 se observó que los testigos formaron parte de los mejores, además las interacciones fosfito de sodio con $0.5 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi y ácido fosforoso con $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi. La menor área foliar se registró en el tratamiento consistente en fosfito de sodio con $1.5 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi.

En estudios realizados utilizando relaciones fosfato-fosfito, en cultivos de espinaca, apio, komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruvidis* cv. Ajisai) y lechuga, encontraron que a medida que se incrementaba la concentración de Phi, el crecimiento de las plantas disminuyó (Thao y Yamakawa, 2008; Thao *et al.*, 2008a, 2008b), lo cual se ve reflejado para algunas concentraciones utilizadas en éste experimento, sin embargo, aquí encontramos que la concentración de $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi utilizando como fuente ácido fosforoso, fue estadísticamente igual al testigo.

Capítulo 10

Cuadro 3. Área foliar de plantas de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva, en cuatro muestreos después de la siembra.

Fuente	Phi (mol _c m ⁻³)	Área foliar (cm ² planta ⁻¹)			
		dds ^z			
		15	26	32	39
Efectos principales					
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O		10.82 a	49.46 a	78.64 a	116.49 a
H ₃ PO ₃		10.76 a	56.87 a	81.02 a	122.83 a
		0.00	66.58 a	103.61 a	131.38 ab
		0.25	49.10 a	78.91 ab	122.24 ab
Concentración de Phi	0.50	13.21 a	52.58 a	59.37 b ^y	132.31 ab
	1.00	8.39 a	57.49 a	78.16 ab	136.42 a
	1.50	10.61 a	41.14 a	84.47 ab	88.88 c
	2.00	9.50 a	52.12 a	74.48 ab	106.73 bc
	Efectos simples				
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	10.83 a	66.58 a	103.61 a	131.38 a
	0.25	14.58 a	51.71 a	83.46 ab	122.95 ab
	0.50	10.48 a	31.30 a	46.36 b	135.25 a
	1.00	7.50 a	55.13 a	77.01 ab	129.96 ab
	1.50	10.23 a	43.06 a	83.66 ab	82.08 b
	2.00	11.30 a	49.01 a	77.78 ab	97.34 ab
H ₃ PO ₃	0.00	10.83 a	66.58 a	103.61 a	131.38 a
	0.25	9.83 a	46.49 a	74.36 ab	121.53 ab
	0.50	15.95 a	73.86 a	72.38 ab	129.37 ab
	1.00	9.28 a	59.85 a	79.31 ab	142.88 a
	1.50	11.00 a	39.23 a	85.28 ab	95.68 ab
	2.00	7.70 a	55.24 a	71.18 ab	116.14 ab
Fuente		ns	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	*	**
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	*	*

^yLetras distintas en cada columna por factor de estudio e interacción indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$.

10.3.4. Lecturas Spad

La fuente de Phi no influyó estadísticamente en las lecturas Spad, por otro lado se observó que la concentración de Phi en la solución nutritiva no modificó las lecturas Spad en los muestreos realizados 14, 29, 35 y 40 dds. En el muestreo realizado 19

Capítulo 10

dds, el tratamiento con $1.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi tuvo el mayor valor de lecturas Spad, sin diferir estadísticamente con los demás tratamientos, excepto con el de $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi. Además se observó que las interacciones de fuentes de Phi por concentraciones de Phi no tuvieron ningún efecto estadístico sobre las lecturas Spad (Cuadro 4).

Cuadro 4. Lecturas Spad en hojas de lechuga cv. Climax, con dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva, en cinco muestreos después de la siembra.

Fuente	Phi ($\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$)	Lecturas Spad					
		dds ^z					
		14	19	29	35	40	
Efectos principales							
$\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		31.01 a ^y	31.90 a	33.40 a	33.24 a	32.19 a	
	H_3PO_3	30.56 a	31.46 a	33.08 a	32.88 a	32.14 a	
		0.00	30.83 a	32.18 ab	33.19 a	33.81 a	32.19 a
		0.25	30.80 a	31.05 ab	32.45 a	32.70 a	32.40 a
Concentración de Phi	0.50	31.77 a	32.19 ab	33.51 a	33.35 a	32.79 a	
	1.00	29.50 a	30.56 b	32.78 a	32.98 a	32.03 a	
	1.50	32.07 a	32.75 a	33.87 a	33.07 a	31.83 a	
	2.00	29.73 a	31.36 ab	33.51 a	32.45 a	31.75 a	
Efectos simples							
$\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.00	30.83 a	32.19 a	33.39 a	33.81 a	32.19 a	
	0.25	30.22 a	30.83 a	32.30 a	32.06 a	32.43 a	
	0.50	31.63 a	32.08 a	33.63 a	33.95 a	32.67 a	
	1.00	29.93 a	30.98 a	33.42 a	32.84 a	32.06 a	
	1.50	32.89 a	33.70 a	32.24 a	33.98 a	31.68 a	
	2.00	30.56 a	31.63 a	33.43 a	32.83 a	32.12 a	
H_3PO_3	0.00	30.83 a	32.19 a	33.39 a	33.81 a	32.19 a	
	0.25	31.39 a	31.27 a	32.59 a	33.33 a	32.38 a	
	0.50	31.91 a	32.30 a	33.39 a	32.76 a	32.91 a	
	1.00	29.08 a	30.13 a	32.13 a	33.13 a	32.01 a	
	1.50	31.24 a	31.80 a	33.50 a	32.16 a	31.98 a	
	2.00	20.91 a	31.10 a	33.46 a	32.08 a	31.38 a	
Fuente		ns	ns	ns	ns	ns	
Phi ($\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$)		ns	*	ns	ns	ns	
Fuente * Phi ($\text{mol}_c \text{ m}^{-3}$)		ns	ns	ns	ns	ns	

^yLetras distintas en cada columna por factor de estudio indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo; * significante a $p \leq 0.05$.

Bachiega *et al.* (2011) realizaron experimentos en portainjertos de cítricos, utilizando los siguientes tratamientos: testigo (Sin P), 0.5 mM de Pi, 0.25 mM Pi + 0.25 mM Phi y

Capítulo 10

0.5 mM Phi, ellos realizaron toma de lecturas Spad y encontraron que los tratamientos testigo (sin P) y el tratamiento con Phi, tuvieron lecturas alrededor de un 15% más bajas que el resto de los tratamientos, mientras que estadísticamente fueron superiores los tratamientos con 0.5 mM de Pi, 0.25 mM Pi + 0.25mM Phi. Debido a que en este experimento todos los tratamientos tuvieron suficiencia de P en forma de Pi, no se vieron afectadas estadísticamente las lecturas Spad, coincidiendo con lo mencionado en lo realizado por Bachiega y colaboradores.

10.3.5. Tasa de crecimiento absoluto (TCA)

Se encontró que las dos fuentes de Phi utilizadas tuvieron un comportamiento similar en los primeros intervalos de crecimiento de lechuga; sin embargo, la fuente que tiene un efecto positivo sobre la tasa de crecimiento absoluto fue el ácido fosforoso en el intervalo de 32 a 39 dds, de manera independiente a las concentraciones empleadas (Cuadro 5). Estos resultados contrastan con los obtenidos por Bertsch *et al.* (2008) quienes encontraron que el ácido fosforoso no se debe utilizar en la solución nutritiva como fuente de Phi ya que causa daños a los cultivos de plátano, tomate y lechuga.

Capítulo 10

Cuadro 5. Tasa de crecimiento absoluto de plantas de lechuga cv. Climax, con aplicaciones de dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fuente	Phi (mol _c m ⁻³)	Tasa de crecimiento absoluto (TCA)			
		dds ^z			
		1-15	15-26	26-32	32-39
Efectos principales					
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O		0.004 a ^y	0.017a	0.089 a	0.112 b
H ₃ PO ₃		0.004 a	0.021 a	0.091 a	0.134 a
	0.00	0.004 a	0.021 a	0.130 a	0.142 a
	0.25	0.005 a	0.017 a	0.085 ab	0.126 ab
Concentración	0.50	0.004 a	0.018 a	0.067 b	0.134 a
de Phi	1.00	0.003 a	0.023 a	0.080 b	0.137 a
	1.50	0.004 a	0.015 a	0.101 ab	0.089 b
	2.00	0.003 a	0.018 a	0.078 b	0.110 ab
Efectos simples					
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	0.004a	0.021 a	0.013 a	0.142 a
	0.25	0.005 a	0.019 a	0.090 ab	0.108 ab
	0.50	0.004 a	0.008 a	0.048 b	0.137 a
	1.00	0.003 a	0.022 a	0.086 ab	0.134 ab
	1.50	0.004 a	0.015 a	0.102 ab	0.063 b
	2.00	0.005 a	0.015 a	0.080 ab	0.089 ab
H ₃ PO ₃	0.00	0.004 a	0.021 a	0.013 a	0.142 a
	0.25	0.004 a	0.014 a	0.081 ab	0.144 a
	0.50	0.005 a	0.028 a	0.087 ab	0.132 ab
	1.00	0.003 a	0.025 a	0.074 ab	0.141 a
	1.50	0.004 a	0.015 a	0.100 ab	0.115 ab
	2.00	0.002 a	0.021 a	0.076 ab	0.131 a
Fuente		ns	ns	ns	*
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	**	**
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	*	*

^yLetras distintas en cada columna por factor de estudio indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo; * significativo a $p \leq 0.05$; ** significativo a $p \leq 0.01$.

Por otro lado, en el factor de estudio concentración de Phi, se observaron diferencias estadísticas significativas para la TCA en los intervalos 26 a 32 y 32 a 39 días después de la siembra, observándose la mayor TCA en el testigo sin Phi.

Capítulo 10

En el Cuadro 5 se observan los efectos que tuvo la interacción de los factores de estudio, en donde para la variable TCA se observaron diferencias significativas en los intervalos 26 a 32 y 32 a 39 dds; sin embargo, el comportamiento de las interacciones de ácido fosforoso independientemente de la concentración de fosfito, muestra mejores efectos sobre la TCA.

Berkowitz *et al.* (2013) encontraron efectos negativos en el crecimiento de *Arabidopsis* al incrementar la concentración de fosfito en la solución nutritiva, pero algunos de sus tratamientos los realizaron bajo deficiencia de fósforo. Asimismo, Thao *et al.* (2008a) mencionan que el fosfito tiene efectos negativos en el crecimiento de raíz de espinaca y que no proporciona ningún beneficio su uso. Por el contrario, Estrada-Ortiz *et al.* (2012) encontraron que bajo suficiencia de fósforo en forma de fosfato no hubo efecto negativo de aplicaciones de fosfito en el cultivo de fresa en la acumulación de materia seca. Lo que coincide con los resultados obtenidos en este experimento en casi todos los tratamientos y periodos de muestreo.

10.3.6. Tasa de crecimiento relativo (TCR)

Es importante reiterar que en este ensayo siempre se tuvieron condiciones de suficiencia el P en forma de P_i , por lo que la fuente y la concentración de P_i , fueron los factores que determinaron los resultados.

Observando los resultados obtenidos en el factor fuente de P_i , no se advierten diferencias estadísticas significativas en la TCR. Por otro lado, en el factor concentración de P_i , se observaron diferencias significativas en el intervalo de 32 a 39 dds en la TCR, obteniéndose como mejor concentración la de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de P_i en la solución nutritiva al obtener la mayor TCR. Mientras que para la interacción fuente por concentración de P_i , se obtuvieron resultados significativos para ambas variables en los intervalos 26 a 32 y 32 a 39 dds (Cuadro 6) observándose un mejor comportamiento de las interacciones de ácido fosforoso independientemente de la concentración de fosfito al igual que sucedió para la TCA (Cuadro 6).

Capítulo 10

Bertsch *et al.* (2009) realizaron experimentos en lechuga, tomate y banano, evaluaron la capacidad de Pi y Phi y su combinación para suplir las necesidades de P vía raíz, ellos también realizaron análisis de TCR para expresar el crecimiento de cada tejido en referencia al peso inicial y encontraron que Phi no suplió la necesidad de P en las plantas y además su presencia afectó negativamente tanto a raíz como a vástago, mientras que tratamientos de combinación Pi + Phi igualaron e incluso superaron un poco al tratamiento de Pi en la TCR. Sabemos que Phi no es una fuente de P asimilable para la planta por ello eran evidentes los resultados obtenidos al emplear como única fuente de P al Phi; por otro lado nuestros resultados coinciden con lo obtenido por Bertsch *et al.* (2009) cuando utilizaron la combinación Pi + Phi ya que igualan al testigo sin Phi.

Capítulo 10

Cuadro 6. Tasa de crecimiento relativo de plantas de lechuga cv. Climax, con aplicaciones de dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito en la solución nutritiva.

Fuente	Phi (mol _c m ⁻³)	Tasa de crecimiento relativo (TCR)			
		dds ^z			
		1-15	15-26	26-32	32-39
Efectos principales					
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O		0.271 a ^y	0.106 a	0.181 a	0.062 a
H ₃ PO ₃		0.262 a	0.138 a	0.155 a	0.086 a
	0.00	0.269 a	0.139 a	0.209 a	0.0348 bc
	0.25	0.276 a	0.096 a	0.194 a	0.0785 abc
Concentración de Phi	0.50	0.274 a	0.100 a	0.137a	0.1373 a
	1.00	0.252 a	0.163 a	0.106 a	0.1090 ab
	1.50	0.275 a	0.093 a	0.229 a	0.0003 c
	2.00	0.253 a	0.141 a	0.133 a	0.0839 abc
Efectos simples					
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	0.269 a	0.139 a	0.209 a	0.035 ab
	0.25	0.294 a	0.081 a	0.184 ab	0.051 ab
	0.50	0.266 a	0.057 a	0.174 b	0.191 a
	1.00	0.247 a	0.016 a	0.123 ab	0.098 ab
	1.50	0.274 a	0.099 a	0.216 ab	-0.040 b
	2.00	0.277 a	0.096 a	0.179 ab	0.039 ab
H ₃ PO ₃	0.00	0.269 a	0.139 a	0.209 a	0.035 a
	0.25	0.257 a	0.111 a	0.204 ab	0.106 ab
	0.50	0.282 a	0.144 a	0.099 ab	0.084 ab
	1.00	0.258 a	0.162 a	0.089 ab	0.121 ab
	1.50	0.277 a	0.086 a	0.243 ab	0.041 ab
	2.00	0.230 a	0.186 a	0.087 ab	0.129 a
Fuente		ns	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	**
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	*	*

^yLetras distintas en cada columna por factor de estudio indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo; * significativo a $p \leq 0.05$; ** significativo a $p \leq 0.01$.

10.3.7. Concentración nutrimental

Se observó que en raíz, la fuente de Phi (fosfito de sodio) ocasionó una mayor concentración de macronutrientes como P, Ca, Mg y S; sin embargo, para N se

Capítulo 10

presentó un caso opuesto debido a que se concentró mayormente con la fuente de ácido fosforoso, además se observó que para K no hubo diferencias significativas en concentración, entre las fuentes de Phi (Cuadro 7).

No se observaron efectos significativos de la concentración de Phi en la concentración de K en raíz de lechuga. La mayor concentración de N se observó en el testigo sin Phi, mientras que las mayores concentraciones de P, Ca y Mg se tuvieron con la aplicación de $2 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi. En S sucede un caso particular, debido a que el tratamiento sin Phi es inferior estadísticamente al resto de los tratamientos, pero la mayor concentración de S se presentó con la aplicación de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ (Cuadro 7).

Cuando observamos las interacciones entre fuente y concentración de Phi para el caso de raíz pudimos notar que no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos para el caso de K, Ca, Mg y S. En N se observaron diferencias estadísticas, obteniéndose la mayor concentración de N al aplicar $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de ácido fosforoso. En P se observó una respuesta diferente, dado que la mayor concentración se obtuvo al aplicar $2 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de fosfito de sodio en la solución nutritiva (Cuadro 7).

En vástago, contrario a los resultados en raíz, no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas entre fuentes de Phi en las concentraciones de macronutrientes como Ca, Mg y S; pero si hubieron diferencias estadísticas para N y P observándose una mayor concentración al aplicar fosfito de sodio, mientras que para K se registraron las mayores concentraciones al aplicar ácido fosforoso en la solución nutritiva (Cuadro 7).

No se observaron efectos estadísticos significativos de las concentraciones de Phi en las concentraciones de Ca, Mg y S en vástago. Por el contrario, las concentraciones más altas de N y K en vástago, se observaron en el testigo sin Phi, e incluso fue perceptible para el caso de N un decremento a medida que se incrementó la concentración de Phi. Caso contrario fue el observado en P, dado que a medida que se aumentó la concentración de Phi en la solución, se incrementó la concentración de P, siendo la mayor con aplicaciones de $2 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ (Cuadro 7).

Capítulo 10

Si observamos los datos obtenidos de la interacción de factores en vástago, encontramos que para el caso de N la mayor concentración se obtuvo en el testigo sin Phi y al incrementar la concentración de Phi, sin importar la fuente, se dio un decremento en concentración de N. Para P se observó que las aplicaciones que incrementaron mayormente su concentración fueron 1, 1.5 y 2 mol_c m⁻³ a partir de fosfito de sodio y 2 mol_c m⁻³ a partir de ácido fosforoso, sin haber diferencias estadísticas entre ellas. Mientras que para K se observó que aplicaciones de 0.25 mol_c de Phi m⁻³ a partir de ácido fosforoso, proporcionaron la mayor concentración de K en vástago (Cuadro 7).

Las concentraciones de micronutrientos y sodio tanto para raíz como vástago no fueron influenciadas por las fuentes de Phi evaluadas.

En raíz, no existió efecto estadístico del factor concentración de Phi en las concentraciones de Zn y B. Por el contrario, las concentraciones de Fe, Cu, Mn y Na en raíces mostró una relación positiva con la concentración de Phi en la solución nutritiva, registrándose los mayores valores de concentración con la aplicación de 2 mol_c m⁻³ (Cuadro 8). Las concentraciones de Phi no tuvieron efecto en las concentraciones de Fe, Cu, Zn, Mn y B en vástago. En el caso de la concentración de Na se observó un aumento en ésta a medida que se incrementó la concentración de Phi en la solución nutritiva.

El efecto de las interacciones de fuente y concentración de Phi en la concentración de micronutrientos y Na tanto en raíz como en vástago no fue estadísticamente significativo (Cuadro 8).

Thao *et al.* (2009) encontraron que la adición de Phi en la solución nutritiva incrementó la de N en vástago de lechuga bajo condiciones suficiencia de P (0.3 mM de Pi). En este experimento se manejaron condiciones de suficiencia de P en forma de Pi, sin embargo lo observado en la concentración de N, fue opuesto, dado que al incrementar la concentración de Phi en la solución se disminuyó la de N.

Capítulo 10

Constán-Aguilar *et al.* (2014) encontraron que al adicionar Phi en diferentes concentraciones, en la solución nutritiva no modificó la concentración de P total en parte aérea de plantas de pepino, sin importar si tenía condiciones de suficiencia o insuficiencia de P en forma de Pi. Por otro lado, en este experimento se observó un efecto opuesto ya que a medida que se aumenta la concentración de Phi en la solución, bajo condiciones de suficiencia de Pi, se incrementó la concentración de P en vástago de lechuga. Estrada-Ortiz *et al.* (2013) reportan incrementos en la concentración de P en hojas de fresa en etapa de fructificación al adicionar 40% de fósforo en forma de Phi manteniendo siempre un nivel de suficiencia de Pi.

Capítulo 10

Cuadro 7. Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con dos fuentes de fosfito a diferentes concentraciones en la solución nutritiva.

Fuente	Phi (mol _c m ⁻³)	(g kg ⁻¹ PS ^y)											
		Raíz						Vástago					
		N	P	K	Ca	Mg	S	N	P	K	Ca	Mg	S
Efectos principales													
Na ₂ HPO ₃ · 5H ₂ O		32.28 b ^z	3.86 a	21.84 a	5.56 a	3.55 a	3.32 a	31.49 a	2.89 a	13.69 b	5.45 a	2.58 a	2.06 a
H ₃ PO ₃		32.70 a	3.17 b	20.79 a	5.25 b	3.33 b	3.01 b	30.56 b	2.68 b	15.01 a	5.56 a	2.71 a	2.03 a
Concentración de Phi	0.00	32.82 a	1.80 e	16.83 a	4.69 c	2.35 d	2.75 b	35.70 a	2.11 d	16.52 a	4.94 a	2.68 a	2.49 a
	0.25	32.40 b	2.31 de	18.83 a	5.14 bc	3.21 c	3.51 a	32.27 b	2.47 d	14.09 ab	5.80 a	2.90 a	1.96 a
	0.50	32.32 b	2.52 d	19.03 a	5.11 bc	3.24 c	3.22 ab	30.52 c	2.58 cd	14.64 ab	5.55 a	2.69 a	1.88 a
	1.00	32.47 b	3.83 c	23.99 a	5.71 ab	3.65 bc	3.27 ab	30.42 c	2.99 bc	12.71 b	5.60 a	2.56 a	1.91 a
	1.50	32.55 b	4.79 b	24.73 a	5.78 ab	3.98 ab	3.03 ab	28.85 d	3.07 ab	13.82 ab	5.38 a	2.47 a	1.88 a
	2.00	32.40 b	5.85 a	24.5 a	5.99 a	4.20 a	3.19 ab	28.42 e	3.50 a	14.33 ab	5.77 a	2.56 a	2.16 a
Efectos simples													
Na ₂ HPO ₃ · 5H ₂ O	0.00	32.82 b	1.80 g	16.83 a	4.69 a	2.35 a	2.75 a	35.70 a	2.11 d	16.52 ab	4.94 a	2.68 a	2.49 a
	0.25	32.00 e	2.30 g	17.16 a	5.16 a	3.17 a	3.84 a	32.50 c	2.33 cd	10.67 c	5.32 a	2.66 a	1.80 a
	0.50	31.37 f	2.71 gf	21.40 a	5.30 a	3.37 a	3.32 a	33.30 b	2.78 abcd	14.60 abc	5.68 a	2.71 a	1.94 a
	1.00	32.30 cde	4.33 cd	23.41 a	6.06 a	4.12 a	3.47 a	30.00 e	3.43 a	13.47 abc	6.05 a	2.72 a	2.05 a
	1.50	32.97 ab	5.50 b	25.79 a	6.07 a	4.10 a	3.23 a	28.90 f	3.16 a	12.82 abc	5.40 a	2.38 a	1.98 a
	2.00	32.23 cde	6.54 a	26.47 a	6.07 a	4.19 a	3.31 a	28.57 f	3.54 a	14.08 abc	5.33 a	2.34 a	2.12 a
H ₃ PO ₃	0.00	32.82 b	1.80 g	16.83 a	4.69 a	2.35 a	2.75 a	35.70 a	2.11 d	16.52 ab	4.94 a	2.68 a	2.49 a
	0.25	32.80 b	2.32 g	20.50 a	5.12 a	3.24 a	3.17 a	32.03 c	2.60 bcd	17.52 a	6.28 a	3.15 a	2.11 a
	0.50	33.27 a	2.33 g	16.67 a	4.92 a	3.11 a	3.13 a	27.73 h	2.37 cd	14.68 abc	5.42 a	2.67 a	1.82 a
	1.00	32.63 bc	3.34 ef	24.57 a	5.36 a	3.18 a	3.07 a	30.83 d	2.56 bcd	11.96 bc	5.16 a	2.41 a	1.78 a
	1.50	32.13 de	4.08 ed	23.66 a	5.50 a	3.86 a	2.84 a	28.80 f	2.97 abc	14.82 abc	5.36 a	2.56 a	1.79 a
	2.00	32.57 bcd	5.16 cb	22.52 a	5.92 a	4.21 a	3.08 a	28.27 h	3.45 a	14.59 abc	6.22 a	2.78 a	2.20 a
Fuente		****	****	ns	*	*	**	****	*	*	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		****	****	ns	****	****	**	****	****	**	ns	ns	ns
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		****	***	ns	ns	ns	ns	****	*	*	ns	ns	ns

^zValores con distintas letras en cada columna por factor de estudio e interacciones son estadísticamente diferentes (Tukey). ^yPS: peso seco. ns, no significativo;

*, **, ***, **** significativa a $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$ y $p \leq 0.0001$, respectivamente.

Capítulo 10

Cuadro 8. Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con dos fuentes de fosfito a diferentes concentraciones en la solución nutritiva.

Fuente	Phi (mol _c m ⁻³)	(mg kg ⁻¹ PS ^y)											
		Raíz					Vástago						
		Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Efectos principales													
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O		411.91 a	13.78 a	28.50 a	8.74 a	116.78 a	4815.60 a	309.52 a	5.43 a	23.04 a	9.29 a	120.88 a	2805.40 a
H ₃ PO ₃		417.01 a	13.80 a	27.36 a	8.78 a	114.53 a	4660.00 a	308.07 a	6.79 a	24.00 a	9.02 a	125.85 a	2757.50 a
	0.00	316.39 c ^z	9.22 c	24.02 a	7.13 c	104.26 a	2995.70 d	521.67 a	7.73 a	28.53 a	11.98 a	109.24 a	2260.50 b
	0.25	452.65 ab	13.00 b	26.00 a	8.39 bc	110.44 a	4367.10 bcd	277.27 a	7.06 a	25.23 a	8.97 a	129.02 a	2415.00 b
Concentración de Phi	0.50	362.48 bc	13.61 ab	26.60 a	7.64 c	115.23 a	4069.40 cd	255.52 a	5.24 a	21.72 a	8.08 a	124.00 a	2575.20 b
	1.00	403.46 abc	14.71 ab	24.84 a	8.52 bc	119.49 a	4918.10 bc	255.00 a	5.33 a	21.57 a	8.07 a	123.44 a	2804.00 b
	1.50	452.83 ab	15.98 ab	33.95 a	9.65 b	120.76 a	5706.2 ab	282.47 a	5.41 a	22.44 a	8.87 a	120.04 a	2936.50 ab
	2.00	498.95 a	16.23 a	32.17 a	11.25 a	123.78 a	6370.20 a	260.82 a	5.90 a	21.62 a	8.96 a	134.43 a	3697.40 a
Efectos simples													
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	316.39 a	9.22 a	24.02 a	7.13 a	104.26 a	2995.70 a	521.70 a	7.73 a	28.53 a	11.98 a	109.24 a	2260.50 a
	0.25	470.25 a	12.52 a	27.31 a	8.17 a	111.76 a	4210.20 a	258.00 a	4.48 a	25.46 a	8.81 a	121.94 a	2133.50 a
	0.50	374.04 a	13.81 a	25.17 a	8.09 a	116.86 a	4131.60 a	273.60 a	5.35 a	19.08 a	8.57 a	120.78 a	2562.90 a
	1.00	426.54 a	14.11 a	23.60 a	8.63 a	120.14 a	5053.80 a	281.70 a	5.22 a	22.40 a	8.97 a	123.90 a	2734.00 a
	1.50	423.52 a	16.88 a	42.75 a	9.54 a	127.13 a	5608.50 a	259.80 a	4.90 a	21.78 a	8.33 a	118.57 a	3185.50 a
	2.00	460.71 a	16.16 a	28.13 a	10.91 a	120.56 a	6893.60 a	262.40 a	4.94 a	20.98 a	9.08 a	130.83 a	3956.00 a
H ₃ PO ₃	0.00	316.39 a	9.22 a	24.02 a	7.13 a	104.26 a	2995.70 a	521.70 a	7.73 a	28.53 a	11.98 a	109.24 a	2260.50 a
	0.25	435.05 a	13.47 a	24.68 a	8.62 a	109.12 a	4523.90 a	296.60 a	9.64 a	25.01 a	9.13 a	136.09 a	2696.40 a
	0.50	350.92 a	13.41 a	28.03 a	7.19 a	113.60 a	4007.20 a	237.50 a	5.14 a	24.35 a	7.59 a	127.23 a	2587.50 a
	1.00	380.39 a	15.31 a	26.07 a	8.41 a	118.83 a	4782.50 a	228.40 a	5.45 a	20.73 a	7.17 a	122.98 a	2874.00 a
	1.50	482.14 a	15.09 a	25.16 a	9.76 a	114.39 a	5803.90 a	305.10 a	5.92 a	23.10 a	9.41 a	121.52 a	2687.60 a
	2.00	537.19 a	16.31 a	36.20 a	11.60 a	126.99 a	5846.80 a	259.20 a	6.87 a	22.27 a	8.84 a	138.02 a	3438.70 a
Fuente		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		***	****	ns	****	ns	****	ns	ns	ns	ns	ns	****
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

^zValores con distintas letras en cada columna por factor de estudio e interacciones son estadísticamente diferentes (Tukey). ^yPS: peso seco. ns, no significativo; ***, **** significante a $p \leq 0.001$ y $p \leq 0.0001$, respectivamente.

Capítulo 10

10.4. CONCLUSIONES

Aplicaciones de Phi en forma de ácido fosforoso en la solución nutritiva en lechuga, incrementan la materia seca de raíz y vástago con respecto a aplicaciones con fosfito de sodio.

Aplicaciones de ácido fosforoso en la solución nutritiva a concentraciones de $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi, incrementan la materia seca de raíz, así como la tasa de crecimiento absoluto en el periodo del día 32 a 35 después de la siembra.

Aplicar fosfito de sodio a la solución nutritiva en concentraciones de $0.5 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi, incrementa la tasa de crecimiento relativo y absoluto en el periodo comprendido entre 32 a 39 después de la siembra.

Aplicaciones de fosfito en lechuga, independientemente de la fuente utilizada, disminuye la materia seca de vástago y el número de hojas 14, 29 y 35 después de la siembra.

Al aumentar la concentración de Phi en la solución nutritiva, se incrementa la concentración de fósforo en raíz y vástago, pero la concentración de N y K disminuyen.

10.5. LITERATURA CITADA

- Alcántar, G. G.; Sandoval V., M. 1999. Manual de análisis químico de tejido vegetal. Guía de muestreo, preparación, análisis e interpretación. Publicación Especial No. 10 de la Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo A. C., Chapingo, México.
- Bachiega Z., F. C.; Mattos Jr., D. Syvertsen, J. P. 2011. Plant growth, leaf photosynthesis, and nutrient-use efficiency of citrus rootstocks decrease with phosphite supply. J. Plant Nutr. Soil Sci. 174: 487-495.
- Berkowitz, O.; Jost, R.; Kollehn, D. O.; Fenske, R.; Finnegan, P. M.; O'Brien, P. A.; Hardy, G. E. St. J.; Lambers, H. 2013. Acclimation responses of *Arabidopsis thaliana* to sustained phosphite treatments. J. Exp. Bot. 64(6): 1731-1743.

Capítulo 10

- Bertsch, F.; Ramírez, F.; Enríquez, C. 2008. Evaluación del fosfito como fuente fertilizante de fósforo vía radical y foliar. XI Congreso ecuatoriano de la ciencia del suelo. Quito, Ecuador, 29-31 de octubre.
- Bertsch, F.; Ramírez, F.; Henríquez, C. 2009. Evaluación del fosfito como fuente fertilizante de fósforo vía radical y foliar. *Agronomía Costarricense*. 33(2): 249-265.
- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. *In: Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9.* Black, C. A. (ed.). Am. Soc Agron. Madison, WI, USA. pp. 1149-1178.
- Carswell, M. C.; Grant, B. R.; Theodorou, M. E.; Harris, J.; Niere, J. O.; Plaxton, W. C. 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol.* 110: 105-110.
- Constán-Aguilar, C.; Sánchez-Rodríguez, E.; Rubio-Wilhelmi, M.M.; Camacho, M.A.; Romero, L.; Ruiz, J.M.; Blasco, B. 2014. Physiological and nutritional evaluation of the application of phosphite as a phosphorus source in cucumber plants. *C. S. S. P. A.* 45: 204-222.
- d'Arcy-Lameta, A.; Bompeix, G. 1991. Systemic transport of tritiated phosphonate in tomato plantlets (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Pestic Sci.* 32: 7-14.
- Escalante-Estrada, J. A.; Kohashi-Shibata, J. 1993. El rendimiento y crecimiento del frijol. Manual para toma de datos. Colegio de Postgraduados. Montecillo Municipio de Texcoco. 84 p.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2012. Phosphite on growth and fruit quality in strawberry. *Acta Hort.* 947: 277-282.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2013. The effects of phosphite on strawberry yield and fruit quality. *J. Sci. Plant Nut.* 13(3): 612-620.
- Hanrahan, G.; Salmassi, T. M.; Khachikian, C. S.; Förster, K. L. 2005. Reduced inorganic phosphorus in the natural environment: Significance, speciation and determination. *Talanta.* 66: 435-444.

Capítulo 10

- Moor, U.; Põldma, P.; Tõnutare, T.; Karp, K.; Starast, M.; Vool, E. 2009. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Scientia Hort.* 119: 264-269.
- Orbović, V.; Syvertsen, J. S.; Bright, D.; Van Clief, D. L.; Graham, J. H. 2008. Citrus seedling growth and susceptibility to root rot as affected by phosphite and phosphate. *J. Plant Nutr.* 31:774-787.
- Ouimette, D. G.; Coffey, M. D. 1990. Symplastic entry and problem translocation of phosphonate. *Pestic Biochem Physiol.* 38: 18-25.
- Rebollar-Alviter, A.; Willson, L. L.; Madden, L. V.; Ellis, M. A. 2010. A comparative evaluation of post-infection efficacy of mefenoxam and potassium phosphite for controlling leather rot of strawberry caused by *Phytophthora cactorum*. *Crop Prot.* 29: 349-353.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution, *In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands.* pp. 633-649.
- Steiner, A.; van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.* 46: 862-863.
- Sukarno, N.; Smith, S. E.; Scott, E. S. 1993. The effect of fungicides on vesicular arbuscular mycorrhizal symbiosis: I. The effects on vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth. *New Phytol.* 25: 139-147.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2008. Growth of celery (*Apium graveolens* var. dulce) as influenced by phosphite. *Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University.* 53: 375-378.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2009. Phosphite (phosphorous acid): fungicide, fertilizer or bio-stimulator. Review article. *Soil Sci. Plant Nutr.* 55: 228-234.

Capítulo 10

- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T. 2010. Phosphate absorption of intact komatsuna plants influenced by phosphite. *Soil Sci. Plant Nutr.* 56: 133-139.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Sarr, P.S.; Myint, A. K. 2008a. Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth and phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 761-768.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K.; Sarr, P. S.; Myint, A. K. 2008b. Growth response of komatsuna (*Brassica rapa* var. *Peruviridis*) to root and foliar applications of phosphite. *Plant Soil.* 308: 1-10.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite-phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa*). *J Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 378-384.
- 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.

CAPÍTULO 11. CRECIMIENTO Y FISIOLÓGÍA DE PLANTAS DE LECHUGA EN FUNCIÓN DE FUENTES DE FOSFITO VÍA FOLIAR

11.1. INTRODUCCIÓN

El fosfito (Phi) es una forma reducida del ion fosfato (Pi), el cual es una sal que se deriva del ácido fosforoso (H_3PO_3), aunque también se puede obtener de otras fuentes, una de ellas es el fosfito de sodio ($Na_2HPO_3 \cdot 5H_2O$). La lista de productos comerciales que son fuente de fosfito es muy amplia, es vendido como fertilizante, bioestimulante y fungicida por más de 10 compañías tanto en Estados Unidos como en Europa (Leymonie, 2007). Hay varias publicaciones que indican que el Phi puede ser absorbido por las hojas y por las raíces (Carswell *et al.*, 1996; Forster *et al.*, 1998; Schroetter *et al.*, 2006).

Lovatt y Mikkelsen (2006) reportan que el Phi es químicamente diferente a Pi, y que estas diferencias pueden ser tomadas en consideración para evitar la toxicidad de Phi en las plantas, y que si se utiliza Phi en concentraciones apropiadas puede promover una estimulación de plantas que no ocurre con Pi, y que combinaciones de Pi y Phi pueden ser más efectivas para promover dicha estimulación.

Se ha observado que hay efectos positivos de Phi en árboles de cítricos, en donde se asperjaron con Phi en el invierno y ésto incrementó la floración, los sólidos solubles totales del jugo y el rendimiento (Albrigo, 1999). Moor *et al.* (2009) encontraron que al adicionar Phi se incrementó el ácido ascórbico y el contenido de antocianinas en frutos de fresa. Lovatt y Mikkelsen (2006) reportaron que Phi puede estimular la ruta del ácido shikimico.

Thao *et al.* (2008b) señalan que el efecto de Phi en komatsuna (*Brassica rapa* var. *peruvidis* cv. Ajisai) es fuertemente dependiente del estatus nutrimental de P en forma de Pi, y que la insuficiencia de Pi en la planta la puede dejar vulnerable a efectos negativos de Phi. En fresa, en condiciones de suficiencia de P, no se encontraron efectos de la adición de Phi a la solución nutritiva en el peso de materia seca, pero mostró efectos positivos en calidad de fruta y el suministro de 20% de P en forma de

Capítulo 11

Phi en la solución nutritiva puede mejorar la cantidad de sólidos solubles totales, °Brix y firmeza de frutos (Estrada-Ortiz *et al.*, 2012).

En el contexto anterior en esta investigación se planteó investigar el efecto que tiene adicionar Phi asperjado vía foliar, utilizando dos fuentes y seis concentraciones en variables fisiológicas, nutrimentales y de crecimiento, en el cultivo de lechuga.

11.2. MATERIALES Y MÉTODOS

11.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

La investigación se realizó durante los meses de febrero a abril de 2012, en un invernadero tipo cenital, localizado a 19° 29' latitud norte, 98° 53' longitud oeste y a una altitud de 2,250 m. El material vegetal utilizado fue lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Climax, cultivada en sustrato perlita. La temperatura máxima, mínima y promedio durante el desarrollo del experimento dentro del invernadero fueron 37, 3.2 y 18.2 °C, respectivamente. La intensidad luminosa tuvo un promedio de 279 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

11.2.2. Tratamientos y diseño experimental

Las soluciones se formularon tomando como referencia la solución nutritiva Steiner (1984) al 50% preparada con reactivos tipo analítico, utilizando 0.531 g L⁻¹ de Ca(NO₃)₂ 4H₂O; 0.152 g L⁻¹ de KNO₃; 0.068 g L⁻¹ de KH₂PO₄; 0.247 g L⁻¹ de MgSO₄ 7H₂O y 0.131 g L⁻¹ de K₂SO₄. La solución nutritiva se complementó con micronutrientes en las concentraciones siguientes: 1.6 mg L⁻¹ de Mn; 0.11 mg L⁻¹ de Cu; 0.86 mg L⁻¹ de B; 0.023 mg L⁻¹ de Zn y 0.048 mg L⁻¹ de Mo. El hierro se abasteció como Fe-EDTA a una concentración de 5 mg L⁻¹ a partir de una solución concentrada preparada según lo describen Steiner y van Winden (1970). El pH de la solución nutritiva se mantuvo en 5.8, el cual se ajustó adicionando H₂SO₄ al 97% y NaOH 1 N.

El arreglo de tratamientos fue un factorial 2 x 7, en donde el primer factor fue la fuente de Phi (Na₂HPO₃ 5H₂O y H₃PO₃, Sigma-Aldrich), el segundo factor fue la concentración de Phi aplicado vía foliar (0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.50 y 2.00%), dando un total de 14 tratamientos, los cuales fueron distribuidos en un diseño experimental

Capítulo 11

completamente al azar, en donde cada planta se consideró como unidad experimental, teniendo 40 repeticiones por tratamiento.

Se realizaron dos aplicaciones foliares de tratamientos a un pH de 5. La primera aplicación se realizó 25 días después de la siembra (19 de marzo de 2012) y la segunda 32 días después de la siembra (26 de marzo de 2012).

11.2.3. Manejo del experimento

El 23 de febrero de 2012, se pusieron a germinar semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Climax, en perlita previamente humedecida y utilizando como contenedores vasos de plástico. En cada vaso se puso a germinar una semilla, para mantener la humedad durante el periodo de germinación, se realizaron riegos con agua. Diez días después concluyó la germinación, posteriormente, entre el día dos al trece después de la germinación se comenzaron a realizar riegos con solución nutritiva Steiner al 10%. El agua empleada para elaborar la solución nutritiva fue destilada.

Catorce días después de la siembra (9 de marzo de 2012), se comenzó a aplicar la solución Steiner al 50%. Aplicando diariamente 30 mL de solución nutritiva por vaso en un inicio y posteriormente 50 mL.

11.2.4. Variables evaluadas

Se evaluó materia seca, número de hojas, área foliar, lecturas Spad, tasa de crecimiento absoluto, tasa de crecimiento relativo y concentración nutrimental, de la misma manera como se describe en el Capítulo 10.

11.2.5. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlett para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos y las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$ %),

Capítulo 11

para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute Inc., 2011).

11.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.3.1. Peso seco

No existieron efectos significativos de los factores de estudio y sus interacciones en la acumulación de biomasa seca de raíz y vástago de lechuga (Cuadro 1).

Comparando estos resultados con otros de los aquí reportados, en particular lechuga pero aplicando Phi vía raíz, donde a pesar de no existir diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, se observa un efecto negativo del Phi en la acumulación de materia seca 39 dds (Cuadro 1 del Capítulo 10). Estos resultados refuerzan la hipótesis de que aplicaciones foliares de Phi, no causan estrés en la planta.

Thao *et al.* (2008b, 2008a, 2009) realizaron experimentos en *Brassica rapa*, *Spinacia oleracea* y *Lactuca Sativa* y observaron que el efecto de aplicaciones de Phi vía foliar depende del estatus de Pi en la planta y que las plantas con déficit de Pi en el suelo son más vulnerables a los diferentes tipos de estrés y pueden presentar efectos negativos en su crecimiento después de aplicaciones foliares de Phi. En este experimento se mantuvo la suficiencia de Pi, y los resultados obtenidos coinciden con lo mencionado por Thao y colaboradores.

Moor *et al.* (2009) indican que la fertilización con Phi no afecta el crecimiento de las plantas, ni representa ventajas en términos de incremento del rendimiento en comparación con la fertilización tradicional con Pi.

Capítulo 11

Cuadro 1. Acumulación de materia seca en raíz y vástago de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar, en cuatro muestreos.

Fuente	Phi (%)	Raíz (g PS ^y)				Vástago (g PS)			
		dds ^z				dds			
		15	26	32	39	15	26	32	39
Efectos principales									
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O		0.02 a ^x	0.07 a	0.152 a	0.220 a	0.034 a	0.206 a	0.423 a	0.531 a
H ₃ PO ₃		0.01 a	0.06 a	0.168 a	0.212 a	0.027 a	0.210 a	0.488 a	0.537 a
	0.00	0.012 a	0.080 a	0.186 a	0.217 a	0.027 a	0.234 a	0.568 a	0.560 a
	0.25	0.015 a	0.072 a	0.179 a	0.222 a	0.032 a	0.214 a	0.479 a	0.525 a
	0.50	0.018 a	0.064 a	0.162 a	0.244 a	0.033 a	0.208 a	0.398 a	0.603 a
Concentración de Phi	0.75	0.012 a	0.062a	0.161 a	0.229 a	0.022 a	0.169 a	0.446 a	0.612 a
	1.00	0.019 a	0.065 a	0.146 a	0.220 a	0.041 a	0.188 a	0.400 a	0.535 a
	1.50	0.016 a	0.071 a	0.162 a	0.204 a	0.031 a	0.241 a	0.535 a	0.468 a
	2.00	0.014 a	0.062 a	0.126 a	0.177 a	0.028 a	0.201 a	0.363 a	0.436 a
Efectos simples									
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	0.012 a	0.080 a	0.186 a	0.217 a	0.027 a	0.234 a	0.568 a	0.560 a
	0.25	0.013 a	0.082 a	0.162 a	0.257 a	0.022 a	0.220 a	0.448 a	0.620 a
	0.50	0.018 a	0.071 a	0.160 a	0.257 a	0.036 a	0.218 a	0.370 a	0.575 a
	0.75	0.013 a	0.056 a	0.159 a	0.230 a	0.022 a	0.124 a	0.459 a	0.583 a
	1.00	0.021 a	0.078 a	0.108 a	0.207 a	0.043 a	0.213 a	0.320 a	0.462 a
	1.50	0.020 a	0.068 a	0.163 a	0.209 a	0.041 a	0.200 a	0.534 a	0.495 a
	2.00	0.018 a	0.077 a	0.125 a	0.159 a	0.035 a	0.266 a	0.329 a	0.377 a
H ₃ PO ₃	0.00	0.012 a	0.080 a	0.186 a	0.217 a	0.027 a	0.234 a	0.568 a	0.560 a
	0.25	0.017 a	0.062 a	0.196 a	0.186 a	0.041 a	0.208 a	0.510 a	0.430 a
	0.50	0.018 a	0.057 a	0.164 a	0.231 a	0.030 a	0.199 a	0.425 a	0.631 a
	0.75	0.011 a	0.069 a	0.163 a	0.227 a	0.022 a	0.213 a	0.432 a	0.642 a
	1.00	0.017 a	0.052 a	0.184 a	0.234 a	0.038 a	0.164 a	0.480 a	0.607 a
	1.50	0.012 a	0.075 a	0.160 a	0.199 a	0.020 a	0.283 a	0.536 a	0.441 a
	2.00	0.009 a	0.050 a	0.125 a	0.194 a	0.022 a	0.135 a	0.398 a	0.494 a
Fuente		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

^xLetras iguales en cada columna por factor de estudio e interacciones indican que no hay diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^yPS, peso seco; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo.

11.3.2. Número de hojas

Los muestreos de número de hojas se realizaron a lo largo del ciclo del cultivo con la finalidad de observar posibles diferencias atribuibles a tratamientos consistentes en el suministro foliar de Phi; sin embargo, al analizar los datos se pudo observar que no

Capítulo 11

existieron diferencias en número de hojas al aplicar una u otra fuente de Phi. De la misma manera al analizar los datos por el factor concentración, es evidente que no existieron tampoco diferencias significativas. Finalmente la interacción de los factores concentración por fuente de Phi aplicados vía foliar, tampoco afectaron el número de hojas a través del tiempo (Cuadro 2). Al comparar los resultados obtenidos en este experimento con el realizado con Phi en la solución nutritiva en lechuga podemos observar que en ambos casos, de manera general no se vieron efectos en número de hojas atribuidos a los tratamientos (Cuadro 2 del Capítulo 10).

Estos resultados muestran concordancia con lo obtenido por Schroetter *et al.* (2006); por un lado, el peso de materia seca de plantas de maíz con deficiencias de P se vio fuertemente disminuido habiendo diferencias estadísticas significativas al aplicar fosfito, en comparación con el testigo y con las plantas tratadas con fosfato; no obstante, se registró que en plantas de maíz con suficiencia de P no existieron diferencias significativas al aplicar fosfito, respecto al testigo y a las tratadas con fosfato. Moor *et al.* (2009) encontraron que el fosfito no suprime ni promueve el crecimiento de plantas de fresa.

Capítulo 11

Cuadro 2. Número de hojas de plantas de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar, en cinco fechas después de la siembra.

Fuente	Phi (%)	Número de hojas (planta ⁻¹)				
		dds ^z				
		14	19	29	35	40
Efectos principales						
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O		3.08 a ^y	3.92 a	5.00 a	5.40 a	5.86 a
H ₃ PO ₃		3.10 a	3.81 a	4.94 a	5.49 a	6.04 a
	0.00	3.21 a	3.88 a	5.13 a	5.71 a	6.08 a
	0.25	3.13 a	4.00 a	5.00 a	5.42 a	6.00 a
	0.50	2.92 a	3.79 a	4.96 a	5.42 a	6.17 a
Concentración de Phi	0.75	3.00 a	3.92 a	4.79 a	5.46 a	6.04 a
	1.00	3.13 a	3.88 a	5.00 a	5.46 a	5.88 a
	1.50	3.08 a	3.71 a	4.83 a	5.25 a	5.58 a
	2.00	3.17 a	3.88 a	5.08 a	5.42 a	5.88 a
Efectos simples						
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	3.21 a	3.88 a	5.13 a	5.71 a	6.08 a
	0.25	3.08 a	3.92 a	5.08 a	5.58 a	5.83 a
	0.50	2.83 a	3.83 a	4.83 a	5.42 a	6.33 a
	0.75	3.00 a	4.00 a	5.00 a	5.50 a	6.00 a
	1.00	3.08 a	3.92 a	4.92 a	5.33 a	5.92 a
	1.50	2.92 a	3.67 a	4.92 a	5.25 a	5.50 a
	2.00	3.33 a	4.08 a	5.00 a	5.25 a	5.58 a
H ₃ PO ₃	0.00	3.21 a	3.88 a	5.13 a	5.71 a	6.08 a
	0.25	3.17 a	4.08 a	4.92 a	5.25 a	6.71 a
	0.50	3.00 a	3.75 a	5.08 a	5.42 a	6.00 a
	0.75	3.00 a	3.83 a	4.58 a	5.42 a	6.08 a
	1.00	3.17 a	3.83 a	5.08 a	5.58 a	5.83 a
	1.50	3.25 a	3.75 a	4.75 a	5.25 a	5.67 a
	2.00	3.00 a	3.67 a	5.17 a	5.58 a	6.17 a
Fuente		ns	ns	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	ns
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	ns

^yLetras iguales en cada columna por factor de estudio e interacciones indican que no hay diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo.

Capítulo 11

11.3.3. Área foliar

En el Cuadro 3 se observa que no se presentaron diferencias estadísticas significativas en el área foliar al asperjar el Phi proveniente de fosfito de sodio o de ácido fosforoso. Por otro lado también observamos que a lo largo del tiempo, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre las diferentes concentraciones de Phi asperjadas; sin embargo, para el día 39 dds, de manera numérica ya se observó una tendencia a disminución del área foliar en las concentraciones más altas de Phi asperjadas, aunque éstas no sean significativas.

Por otro lado, al analizar los efectos de las interacciones de los factores de estudio, se observa que a lo largo de los muestreos no hubo efectos estadísticos de los tratamientos en el área foliar de lechuga (Cuadro 3). Al comparar los resultados con los obtenidos en el experimento donde se aplicó Phi en la solución nutritiva en lechuga, se observan resultados diferentes, ya que en aquel experimento en los dos últimos muestreos se observaron diferencias estadísticas entre tratamientos, atribuibles a Phi (Cuadro 3 del Capítulo 10). En el experimento con suministro de Phi vía foliar, las aplicaciones realizadas fueron dos, lo cual permite suponer que no fue suficiente tanto en frecuencia como en concentración para causar algún efecto en la planta, ya fuera positivo o negativo (Cuadro 3).

Bertsch *et al.* (2009) en un experimento con plantas de banano, lechuga y tomate, encontraron que cuando dichas plantas crecieron en soluciones nutritivas con fosfato y fosfato-fosfito, la acumulación de peso seco resultó significativamente mayor que el de las plantas que crecieron en soluciones nutritivas que contenían únicamente fosfito, ya que éstos mostraron un comportamiento similar al tratamiento sin P. Por otro lado, Ratjen y Gerendás (2009) observaron una disminución drástica del crecimiento y de materia seca de plantas de calabacita al aplicar al suelo fosfito como fuente de P. De forma similar, Thao *et al.* (2008a) obtuvieron que en plantas de espinaca, aplicaciones de diferentes relaciones fosfato-fosfito, causaron una disminución significativa en el peso seco de la planta con respecto al testigo con fosfato, dicho decremento fue mayor a medida que se aumentaba la proporción de fosfito. Los resultados de los

Capítulo 11

experimentos anteriormente mencionados coinciden en que puede haber efectos benéficos de Phi si se aplica bajo condiciones de suficiencia de P en forma de Pi, es por ellos que en este experimento las aplicaciones foliares de Phi no tuvieron efectos adversos en el área foliar. Constán-Aguilar *et al.* (2014) reportan un incremento en área foliar, manteniendo suficiencia de Pi (0.5 mM), realizar aplicaciones de 0.5 y 1 mM de Phi vía foliar.

Cuadro 3. Área foliar de plantas de lechuga cv. Climax, en respuesta a dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar, en cuatro muestreos después de la siembra.

Fuente	Phi (%)	Área foliar (cm ² planta ⁻¹)			
		dds ^z			
		15	26	32	39
Efectos principales					
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O		11.61 a ^y	51.90 a	85.64 a	101.19 a
H ₃ PO ₃		9.23 a	50.86 a	97.44 a	102.83 a

	0	9.45 a	58.59 a	103.81 a	100.92 a
	0.25	10.23 a	49.13 a	95.15 a	100.19 a
	0.5	11.04 a	50.04 a	94.90 a	107.05 a
Concentración de Phi	0.75	9.19 a	47.26 a	89.72 a	113.50 a
	1	12.49 a	54.49 a	81.44 a	117.87 a
	1.5	10.84 a	42.38 a	98.87 a	88.11 a
	2	9.71 a	57.78 a	76.88 a	86.45 a

Efectos simples					
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0	9.45 a	58.59 a	103.81 a	100.92 a
	0.25	8.25 a	52.23 a	89.24 a	115.45 a
	0.5	12.58 a	49.55 a	88.05 a	109.57 a
	0.75	9.83 a	35.50 a	88.16 a	98.92 a
	1	13.28 a	61.63 a	67.82 a	119.50 a
	1.5	14.13 a	48.48 a	95.21 a	90.29 a
	2	12.43 a	59.75 a	72.24 a	71.87 a
H ₃ PO ₃	0	9.45 a	58.59 a	103.81 a	100.92 a
	0.25	12.20 a	46.03 a	101.07 a	84.93 a
	0.5	9.50 a	50.53 a	101.75 a	104.53 a
	0.75	8.55 a	59.03 a	91.29 a	128.07 a
	1	11.70 a	47.35 a	95.07 a	116.24 a
	1.5	7.55 a	36.28 a	102.53 a	85.92 a
	2	7.00 a	55.81 a	81.52 a	101.02 a

Fuente		ns	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns

^yLetras iguales en cada columna por factor de estudio e interacciones indican tratamientos estadísticamente iguales;

^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo; * significativa a $p \leq 0.05$.

Capítulo 11

11.3.4. Lecturas Spad

Los resultados obtenidos al evaluar el efecto de las dos fuentes de Phi vía foliar en lechuga sobre las lecturas Spad, mostraron que no hay efectos estadísticos (Cuadro 4). Así mismo no se encontraron diferencias estadísticas al utilizar diferentes concentraciones de Phi vía foliar, independientemente de la fuente de Phi utilizada. Las interacciones fuente por concentración tampoco afectaron los valores de lecturas Spad (Cuadro 4). Los resultados en el experimento con aplicaciones de Phi en la solución nutritiva en lechuga, fueron muy similares al no encontrar diferencias significativas en la mayoría de los datos (Cuadro 4 del Capítulo 10).

Cuadro 4. Lecturas Spad en hojas de lechuga cv. Climax, con dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar, en cinco muestreos después de la siembra.

Fuente	Phi (%)	Lecturas Spad				
		14	19	29	35	40
Efectos principales						
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O		29.05 a ^y	31.52 a	33.92 a	33.5 a	34.25 a
H ₃ PO ₃		28.83 a	31.61 a	33.55 a	32.93 a	33.36 a
Concentración de Phi	0.00	29.53 a	32.45 a	33.71 a	33.33 a	34.66 a
	0.25	29.83 a	31.38 a	33.20 a	32.96 a	33.65 a
	0.50	28.65 a	31.30 a	34.33 a	33.61 a	34.20 a
	0.75	28.44 a	31.78 a	33.66 a	33.78 a	33.53 a
	1.00	28.83 a	31.80 a	33.38 a	33.35 a	32.48 a
	1.50	28.72 a	30.86 a	33.42 a	32.62 a	34.18 a
	2.00	28.58 a	31.38 a	34.43 a	32.82 a	33.93 a
Efectos simples						
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	29.53 a	32.45 a	33.71 a	33.33 a	34.66 a
	0.25	30.83 a	31.54 a	33.08 a	33.61 a	33.31 a
	0.50	28.31 a	30.37 a	34.37 a	33.61 a	34.44 a
	0.75	28.67 a	31.42 a	33.94 a	33.92 a	32.18 a
	1.00	28.08 a	32.21 a	32.99 a	32.98 a	32.83 a
	1.50	28.29 a	30.61 a	33.52 a	33.68 a	35.02 a
	2.00	28.80 a	31.58 a	35.64 a	33.14 a	34.04 a
H ₃ PO ₃	0.00	29.53 a	32.45 a	33.71 a	33.33 a	34.66 a
	0.25	28.83 a	31.30 a	33.32 a	32.32 a	34.01 a
	0.50	29.00 a	32.23 a	34.30 a	33.62 a	33.95 a
	0.75	28.20 a	32.15 a	33.38 a	33.64 a	32.89 a
	1.00	29.59 a	31.39 a	33.77 a	33.72 a	32.13 a
	1.50	29.14 a	31.11 a	33.32 a	31.56 a	33.35 a
	2.00	28.37 a	31.17 a	33.23 a	32.49 a	33.81 a
Fuente		ns	ns	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	ns
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	ns

^yLetras iguales en cada columna por factor de estudio e interacciones indican que no hay diferencias estadísticas entre tratamientos; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo.

Capítulo 11

Generalmente las lecturas Spad se asocian con el nivel de clorofila en la planta. Estrada-Ortiz *et al.* (2011) encontraron un incremento en la concentración de clorofilas a, b y total al adicionar 30% de P en forma de Phi a la solución nutritiva en hojas de fresa en etapa de fructificación.

11.3.5. Tasa de crecimiento absoluto (TCA)

Los tratamientos empleados en este experimento no la acumulación de la materia seca, por lo que era posible predecir que los resultados obtenidos del análisis de crecimiento de los cultivos, tampoco serían diferentes entre tratamientos como se observa en el Cuadro 5.

Constán-Aguilar *et al.* (2014) reportan un incremento en la tasa de crecimiento absoluta (TCA) de raíz, de hojas y total, con suficiencia de Pi (0.5 mM), cuando se aumentó la concentración de Phi en las soluciones foliares (0,0.1, 0.25, 0.5 y 1 mM de Phi).

11.3.6. Tasa de crecimiento relativo (TCR)

La tasa de crecimiento relativo en lechuga no fue afectada por la fuente de Phi utilizada en las aspersiones foliares; así tampoco por efecto de concentración de Phi y por la interacción de los factores de estudio (Cuadro 6). La TCR fue decreciendo en los últimos periodos de medición, esto se atribuye al tamaño de contenedor, que de cierta manera cuando la planta lo llenó se vio disminuido el crecimiento relativo (Cuadro 6).

Al comparar los resultados obtenidos en la TCR con tratamientos de Phi en la solución nutritiva, se observa que en los dos primeros intervalos se presentaron resultados muy similares; sin embargo, en los intervalos de 26-32 y 32-39 dds, los tratamientos en la solución nutritiva comenzaron a tener influencia en los resultados, debido a que desarrollaron diferencias estadísticas significativas siendo mejores de manera general, los tratamientos utilizados con la fuente ácido fosforoso (Cuadro 6 del Capítulo 10).

Capítulo 11

Cuadro 5. Tasa de crecimiento absoluto de plantas de lechuga cv. Climax, con aplicaciones de dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar.

Fuente	Phi (%)	Tasa de crecimiento absoluto (TCA)				
		dds ^z				
		1-15	15-26	26-32	32-39	
Efectos principales						
Na ₂ HPO ₃ · 5H ₂ O		0.004 a ^y	0.025 a	0.096 a	0.107 a	
H ₃ PO ₃		0.003 a	0.025 a	0.109 a	0.107 a	
Concentración de Phi		0.00	0.003 a	0.029 a	0.126 a	0.111 a
		0.25	0.003 a	0.026 a	0.110 a	0.106 a
		0.50	0.004 a	0.025 a	0.093 a	0.121 a
		0.75	0.003 a	0.021 a	0.101 a	0.120 a
		1.00	0.004 a	0.023 a	0.091 a	0.108 a
		1.50	0.003 a	0.028 a	0.116 a	0.096 a
		2.00	0.003 a	0.024 a	0.081 a	0.087 a
Efectos simples						
Na ₂ HPO ₃ · 5H ₂ O	0.00	0.003 a	0.029 a	0.126 a	0.111 a	
	0.25	0.003 a	0.028 a	0.102 a	0.125 a	
	0.50	0.004 a	0.026 a	0.088 a	0.119 a	
	0.75	0.003 a	0.016 a	0.103 a	0.116 a	
	1.00	0.005 a	0.027 a	0.071 a	0.096 a	
	1.50	0.004 a	0.024 a	0.116 a	0.100 a	
	2.00	0.004 a	0.031 a	0.076 a	0.076 a	
H ₃ PO ₃	0.00	0.003 a	0.029 a	0.126 a	0.111 a	
	0.25	0.004 a	0.024 a	0.118 a	0.088 a	
	0.50	0.004 a	0.023 a	0.098 a	0.123 a	
	0.75	0.002 a	0.026 a	0.099 a	0.124 a	
	1.00	0.004 a	0.020 a	0.111 a	0.120 a	
	1.50	0.002 a	0.032 a	0.116 a	0.091 a	
	2.00	0.002 a	0.016 a	0.087 a	0.098 a	
Fuente		ns	ns	ns	ns	
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	

^yLetras iguales en cada columna por factor de estudio e interacciones indican que no hay diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo.

Capítulo 11

Cuadro 6. Tasa de crecimiento relativo de plantas de lechuga cv. Climax, con aplicaciones de dos fuentes y diferentes concentraciones de fosfito vía foliar.

Fuente	Phi (%)	Tasa de crecimiento relativo (TCR)			
		dds ^z			
		ene-15	15-26	26-32	32-39
Efectos principales					
Na ₂ HPO ₃ · 5H ₂ O		0.265 a	0.160 a	0.110 a	0.046 a
H ₃ PO ₃		0.245 a	0.177 a	0.160 a	0.018 a

	0.00	0.243 a	0.200 a	0.145 a	0.006 a
	0.25	0.258 a	0.162 a	0.139 a	0.034 a
	0.50	0.266 a	0.154 a	0.121 a	0.066 a
Concentración de Phi	0.75	0.240 a	0.170 a	0.173 a	0.043 a
	1.00	0.274 a	0.137 a	0.128 a	0.051 a
	1.50	0.260 a	0.178 a	0.134 a	-0.004 a
	2.00	0.244 a	0.179 a	0.107 a	0.029 a

Efectos simples					
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	0.243 a	0.200 a	0.145 a	0.006 a
	0.25	0.245 a	0.188 a	0.085 a	0.093 a
	0.50	0.276 a	0.153 a	0.079 a	0.079 a
	0.75	0.242 a	0.152 a	0.206 a	0.032 a
	1.00	0.286 a	0.139 a	0.054 a	0.071 a
	1.50	0.285 a	0.134 a	0.156 a	0.004 a
	2.00	0.265 a	0.182 a	0.040 a	0.018 a
H ₃ PO ₃	0.00	0.243 a	0.200 a	0.145 a	0.006 a
	0.25	0.271 a	0.135 a	0.193 a	-0.026 a
	0.50	0.255 a	0.155 a	0.163 a	0.054 a
	0.75	0.239 a	0.188 a	0.141 a	0.053 a
	1.00	0.263 a	0.135 a	0.203 a	0.032 a
	1.50	0.236 a	0.222 a	0.112 a	-0.012 a
	2.00	0.224 a	0.175 a	0.174 a	0.040 a

Fuente		ns	ns	ns	ns
Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns

^yLetras distintas en cada columna por factor de estudio e interacciones indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ^zdds, días después de la siembra; Phi, fosfito; ns, no significativo; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$.

Bertsch *et al.* (2009) realizaron experimentos en lechuga, tomate y banano, evaluaron tratamientos de Pi, Phi y combinación P+Phi para suplir las necesidades de P vía raíz,

Capítulo 11

realizaron análisis de TCR para expresar el crecimiento de cada tejido en referencia al peso inicial y encontraron que la combinación de tratamientos Pi + Phi igualaron e incluso superaron ligeramente al tratamiento de Pi en la TCR. Sin embargo, en este experimento con condiciones diferentes, hay suficiencia de Pi, pero con aplicaciones foliares de Phi y éstas no causaron diferencias estadísticas en la TCR con respecto al testigo, y además no existió efecto atribuido a la fuente de Phi empleada.

11.3.7. Concentración nutrimental

La concentración de N en raíces fue incrementada significativamente cuando el Phi fue suministrado a partir de ácido fosforoso. Por otra parte, la fuente de Phi no influyó las concentraciones de P, K, Ca, Mg y S en raíz (Cuadro 7).

El factor concentración de Phi en la solución foliar solo influyó las concentraciones de N y P en raíz; observándose incremento en éstas cuando la concentración de Phi asperjada fue de 2% (Cuadro 7).

Las interacciones entre fuente y concentración de Phi en la solución foliar solo tuvieron efecto estadístico significativo en la concentración de N, siendo la más alta con el suministro de Phi al 2% (Cuadro 7).

En vástago se obtuvieron resultados diferentes a los observados en raíz, debido a que más nutrimentos presentaron diferencias estadísticas con los tratamientos. El suministro de Phi a partir de ácido fosforoso incrementó la concentración de N en vástago; mientras que la de S fue aumentada con el empleo de fosfito de sodio (Cuadro 7). Es importante destacar que en lechuga, la adición de Phi a la solución nutritiva incrementó la concentración de N en vástago (Cuadro 7 del Capítulo 10); lo cual es contrario a lo aquí reportado.

El factor concentración de Phi en vástago mostró diferencias estadísticas significativas para N, P y S, observándose en los tres macronutrimentos su concentración se incrementó con el aumento en la concentración de Phi foliar, dándose su mayor

Capítulo 11

concentración al asperjar 2% de Phi. Mientras que para K, Ca y Mg no se observaron diferencias estadísticas por efecto de concentración de Phi (Cuadro 7).

La interacción de factores de estudio, afectó significativamente las concentraciones de N, P y S en vástago, observándose que para N y P se registró la mayor concentración con aplicaciones foliares de ácido fosforoso al 2% de Phi, y para S al aplicar 2% de Phi utilizando como fuente fosfito de sodio (Cuadro 7).

Analizando los resultados obtenidos para micronutrientos y Na, encontramos que la fuente de Phi vía foliar, tuvo diferencias estadísticas para Mn y Na en raíz y en vástago, encontrando que el ácido fosforoso incrementó la concentración de Mn, mientras que, el fosfito de sodio incrementó la concentración de Na (Cuadro 8). En el resto de micronutrientos (Fe, Cu, Zn y B) no hubo diferencias estadísticas significativas atribuibles a la fuente de Phi.

En raíz, se observó que hubo un efecto de la concentración de Phi sobre Fe y Mn, encontrando que la concentración de Fe y Mn se incrementó en raíz a medida de que se aumentaron las concentraciones de las soluciones foliares de Phi, mientras que Cu, Zn, B y Na no se vieron afectados estadísticamente. Por otro lado en vástago se observó un incremento en la concentración de Na al aplicar 2% de Phi vía foliar, mientras que Fe, Cu, Mn y Zn no se vieron afectados estadísticamente (Cuadro 8).

En las interacciones de fuente y concentración de Phi aplicados vía foliar, sobre los micronutrientos y Na, se observó en raíz que no hubo efecto sobre ninguno de los elementos; por otro lado, en vástago, se observaron diferencias estadísticas significativas solo para Na, encontrándose su mayor concentración al aplicar fosfito de sodio al 2% de Phi vía foliar (Cuadro 8).

Ratjen y Gerendás (2009) observaron que las aplicaciones de Phi vía foliar incrementaron la concentración de P y K en tejido vegetal. Ávila *et al.* (2012) encontraron que bajo condiciones de suficiencia de P, al adicionar Phi en concentraciones altas en frijol (50 y 100 mg de Phi dm^{-3} de suelo seco), observaron un incremento de N, Ca, Mg, S, B, Zn, Cu, Mn en vástago, mencionan también que en las

Capítulo 11

mismas condiciones pero suministrando bajas concentraciones de Phi (0, 3.125, 6.25, 12.5 y 25 mg de Phi dm^{-3} de suelo seco) no observaron incremento en concentración de nutrimentos.

Capítulo 11

Cuadro 7. Concentración de macronutrientos en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con dos fuentes de fosfito a diferentes concentraciones vía foliar.

Fuente	Phi (%)	(g kg ⁻¹ PS ^y)											
		Raíz						Vástago					
		N	P	K	Ca	Mg	S	N	P	K	Ca	Mg	S
Efectos principales													
Na ₂ HPO ₃ · 5H ₂ O		37.83 b ^z	3.69 a	19.77 a	4.68 a	2.68 a	2.49 a	29.64 b	3.64 a	13.18 a	4.27 a	2.02 a	2.19 a
H ₃ PO ₃		40.17 a	3.61 a	23.21 a	4.77 a	2.65 a	2.34 a	34.57 a	3.58 a	14.85 a	4.47 a	2.15 a	1.74 b
Concentración de Phi	0.00	36.30 g	1.81 d	19.64 a	4.41 a	2.34 a	2.50 a	29.47 d	2.64 cd	16.26 a	4.52 a	2.23 a	1.73 bc
	0.25	37.27 f	2.20 d	21.85 a	4.49 a	2.49 a	2.38 a	30.53 c	2.24 d	11.81 a	4.39 a	2.10 a	1.66 c
	0.50	38.03 e	2.83 cd	19.25 a	4.57 a	2.64 a	2.47 a	32.20 b	2.64 cd	13.08 a	3.93 a	1.85 a	1.64 c
	0.75	38.78 d	3.59 bcd	22.97 a	4.80 a	2.88 a	2.50 a	32.32 b	3.41 bc	14.22 a	4.68 a	2.19 a	1.90 bc
	1.00	40.12 c	4.25 abc	24.53 a	4.75 a	2.81 a	2.34 a	32.50 b	3.56 bc	13.77 a	4.25 a	1.96 a	1.94 bc
	1.50	41.02 b	5.12 ab	21.57 a	5.00 a	2.72 a	2.35 a	33.98 a	4.31 b	13.13 a	4.13 a	1.94 a	2.14 b
	2.00	41.50 a	5.76 a	20.60 a	5.07 a	2.76 a	2.35 a	33.75 a	6.45 a	15.84 a	4.71 a	2.34 a	2.78 a
Efectos simples													
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	36.30 g	1.81 a	19.64 a	4.41 a	2.34 a	2.50 a	29.47 f	2.64 cde	16.26 a	4.52 a	2.23 a	1.73 cd
	0.25	35.23 h	2.06 a	18.79 a	4.28 a	2.48 a	2.35 a	28.27 h	2.31 de	10.99 a	4.38 a	2.01 a	1.67 cd
	0.50	38.10 e	2.82 a	17.47 a	4.55 a	2.74 a	2.51 a	29.20 fg	3.05 cde	14.44 a	4.18 a	1.99 a	1.93 bcd
	0.75	37.27 f	3.31 a	22.62 a	4.58 a	2.75 a	2.50 a	28.70 gh	3.31 cde	13.8 a	4.58 a	2.12 a	2.03 bcd
	1.00	37.93 e	4.51 a	21.49 a	4.84 a	2.96 a	2.52 a	31.53 e	3.46 cde	12.17 a	4.16 a	1.92 a	2.02 bcd
	1.50	40.30 c	5.18 a	17.48 a	4.93 a	2.65 a	2.49 a	31.40 e	4.45 bc	12.53 a	4.06 a	1.92 a	2.62 ab
	2.00	39.70 cd	6.16 a	20.88 a	5.19 a	2.84 a	2.53 a	28.93 fgh	6.24 ab	12.11 a	4.03 a	1.97 a	3.34 a
H ₃ PO ₃	0.00	36.30 g	1.81 a	19.64 a	4.41 a	2.34 a	2.50 a	29.47 f	2.64 cde	16.26 a	4.52 a	2.23 a	1.73 cd
	0.25	39.30 d	2.33 a	24.91 a	4.69 a	2.49 a	2.42 a	32.80 d	2.17 e	12.64 a	4.40 a	2.19 a	1.64 cd
	0.50	37.97 e	2.84 a	21.04 a	4.58 a	2.54 a	2.43 a	35.20 c	2.24 e	11.71 a	3.68 a	1.70 a	1.35 d
	0.75	40.30 c	3.87 a	23.32 a	5.03 a	3.02 a	2.51 a	35.93 b	2.52 cde	14.65 a	4.78 a	2.26 a	1.77 cd
	1.00	42.30 b	4.00 a	27.57 a	4.66 a	2.65 a	2.16 a	33.47 d	3.67 cde	15.38 a	4.34 a	2.00 a	1.86 cd
	1.50	41.73 b	5.05 a	25.65 a	5.07 a	2.79 a	2.22 a	36.57 b	4.18 cd	13.73 a	4.20 a	1.96 a	1.65 cd
	2.00	43.30 a	5.37 a	20.31 a	4.96 a	2.69 a	2.16 a	38.57 a	6.65 a	19.58 a	5.39 a	2.73 a	2.21 bc
Fuente		****	ns	ns	ns	ns	ns	****	ns	ns	ns	ns	****
Phi (mol _c m ⁻³)		****	****	ns	ns	ns	ns	****	****	ns	ns	ns	****
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		****	ns	ns	ns	ns	ns	****	***	ns	ns	ns	***

^zValores con distintas letras en cada columna por factor de estudio e interacciones son estadísticamente diferentes (Tukey). ^yPS: peso fresco. ns, no significativo;

, * significante a $p \leq 0.001$ y $p \leq 0.0001$, respectivamente.

Capítulo 11

Cuadro 8. Concentración de micronutrientos y sodio en vástago y raíz de lechuga cv. Climax en respuesta a tratamientos con dos fuentes de fosfito a diferentes concentraciones vía foliar.

Fuente	Phi (%)	(mg kg ⁻¹ PS ^y)											
		Raíz						Vástago					
		Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na	Fe	Cu	Zn	Mn	B	Na
Efectos principales													
Na ₂ HPO ₃ · 5H ₂ O		302.96 a ^z	11.98 a	35.67 a	7.25 b	97.22 a	3731.00 a	259.34 a	4.43 a	24.16 a	7.75 b	111.23 a	4901.30 a
H ₃ PO ₃		326.85 a	11.80 a	33.82 a	7.99 a	102.87 a	2916.80 b	279.24 a	7.49 a	27.50 a	8.53 a	114.06 a	2170.70 b
Concentración de Phi	0.00	294.75 ab	11.9 a	35.34 a	7.17 ab	96.15 a	2889.00 a	252.68 a	5.51 a	26.56 a	7.31 a	106.98 a	2248.60 d
	0.25	265.93 b	10.58 a	42.36 a	6.86 b	98.25 a	2962.70 a	252.88 a	4.11 a	28.58 a	7.54 a	111.35 a	2315.20 d
	0.50	291.49 ab	11.82 a	32.07 a	7.16 ab	101.22 a	3344.10 a	232.28 a	3.75 a	25.35 a	7.93 a	107.89 a	2854.60 cd
	0.75	310.00 ab	12.32 a	31.96 a	7.29 ab	96.22 a	3416.70 a	282.27 a	8.13 a	26.31 a	8.51 a	113.00 a	3117.00 c
	1.00	322.94 ab	12.43 a	28.22 a	7.47 ab	100.98 a	3613.50 a	295.93 a	6.80 a	24.86 a	8.08 a	109.76 a	3369.10 c
	1.50	349.92 a	12.95 a	34.27 a	8.58 ab	107.30 a	3474.90 a	269.57 a	4.41 a	24.11 a	8.50 a	114.00 a	4621.90 b
	2.00	369.31 a	11.21 a	39.00 a	8.82 a	100.20 a	3566.30 a	298.42 a	8.99 a	25.05 a	9.12 a	125.63 a	6225.40 a
Efectos simples													
Na ₂ HPO ₃ 5H ₂ O	0.00	294.75 a	11.90 a	35.34 a	7.17 a	96.15 a	2889.00 a	253.68 a	5.51 a	26.56 a	7.31 a	106.98 a	2248.60 d
	0.25	269.86 a	10.62 a	44.89 a	6.87 a	94.82 a	3170.30 a	256.84 a	4.07 a	29.12 a	7.42 a	108.15 a	2606.30 d
	0.50	302.43 a	12.17 a	33.75 a	6.84 a	99.96 a	3969.00 a	234.24 a	3.98 a	22.52 a	7.29 a	107.74 a	3936.00 c
	0.75	276.06 a	11.72 a	28.37 a	6.37 a	92.89 a	3676.30 a	264.64 a	3.78 a	24.39 a	7.72 a	113.24 a	4115.20 c
	1.00	328.99 a	12.39 a	28.82 a	7.84 a	99.81 a	4265.20 a	269.99 a	4.02 a	21.08 a	7.86 a	105.90	4459.70 c
	1.50	325.20 a	12.69 a	36.19 a	7.55 a	97.73 a	3805.30 a	268.89 a	4.44 a	23.46 a	8.15 a	119.06 a	7208.30 b
	2.00	323.43 a	12.35 a	42.33 a	8.14 a	99.15 a	4341.90 a	267.12 a	5.22 a	22.02 a	8.53 a	117.55 a	9734.80 a
H ₃ PO ₃	0.00	294.75 a	11.90 a	35.34 a	7.17 a	96.15 a	2889.00 a	253.68 a	5.51 a	26.56 a	7.31 a	106.98 a	2248.60 d
	0.25	262.00 a	10.55 a	39.82 a	6.86 a	101.68 a	2755.20 a	248.92 a	4.15 a	28.04 a	7.67 a	114.54 a	2024.10 d
	0.50	280.56 a	11.47 a	30.38 a	7.48 a	102.49 a	2719.20 a	230.33 a	3.52 a	28.19 a	8.58 a	107.86 a	1773.20 d
	0.75	343.94 a	12.94 a	35.54 a	8.22 a	99.54 a	3157.10 a	299.89 a	12.48 a	28.23 a	9.30 a	112.76 a	2118.80 d
	1.00	316.88 a	12.47 a	27.63 a	7.10 a	102.14 a	2961.90 a	321.86 a	9.58 a	28.63 a	8.30 a	113.62 a	2278.40 d
	1.50	374.64 a	13.02 a	32.34 a	9.60 a	116.88 a	3144.60 a	270.25 a	4.39 a	24.77 a	8.84 a	108.94 a	2035.60 d
	2.00	415.18 a	10.06 a	35.67 a	9.49 a	101.24 a	2790.70 a	329.73 a	12.77 a	28.09 a	9.70 a	133.70 a	2716.00 d
Fuente		ns	ns	ns	*	ns	****	ns	ns	ns	ns	ns	****
Phi (mol _c m ⁻³)		**	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****
Fuente * Phi (mol _c m ⁻³)		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	****

^zValores con distintas letras en cada columna por factor de estudio e interacciones son estadísticamente diferentes (Tukey). ^yPS: peso fresco. ns, no significativo; *, **, **** significante a $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ y $p \leq 0.0001$, respectivamente.

Capítulo 11

11.4. CONCLUSIONES

Aplicaciones foliares de ácido fosforoso a una concentración del 2% y un pH de 5, incrementan a concentración de N en raíz como en vástago, y Na en vástago.

Aplicaciones foliares de fosfito de sodio al 2% incrementan la concentración de S y Na en vástago.

La fuente y la concentración de Phi, no influyen en materia seca de raíz y vástago, número de hojas, área foliar, lecturas Spad, tasa de crecimiento absoluto y relativo de lechuga.

11.5. LITERATURA CITADA

Albrigo, L. G. 1999. Effects of foliar applications of urea or Nutriphite on flowering and yields of Valencia orange trees. Proc. Fla. State Hort. Soc. 112: 1-4.

Ávila, F. W.; Faquin, V.; Ramos, S. J.; Pinheiro, G. L.; Marques, D. J.; da Silva, L. A. K.; Ferreira de Oliveira, N.C.; Ávila, P. A. 2012. Effects of phosphite and phosphate supply in a weathered tropical soil on biomass yield, phosphorus status and nutrient concentrations in common bean. J. Food Agric. Environ. 10(2): 312-317.

Bertsch, F.; Ramírez, F.; Henríquez, C. 2009. Evaluación del fosfito como fuente fertilizante de fósforo vía radical y foliar. Agronomía Costarricense 33: 249–265.

Carswell, M. C.; Grant, B. R.; Theodorou, M. E.; Harris, J.; Niere, J. O.; Plaxton, W. C. 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. Plant Physiol. 110: 105-110.

Constán-Aguilar, C.; Sánchez-Rodríguez, E.; Rubio-Wilhelmi, M. M.; Camacho, M. A.; Romero, L.; Ruiz, J. M.; Blasco, B. 2014. Physiological and nutritional evaluation of the application of phosphite as a phosphorus source in cucumber plants. C. S. S. P. A. 45: 204-222.

Capítulo 11

- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2012. Phosphite on growth and fruit quality in strawberry. *Acta Hort.* 947: 277-282.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2011. Biochemical responses in strawberry plants supplying phosphorus in the form of phosphite. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 17: 129-138.
- Förster, H.; Adaskaveg, J. E.; Kim, D. H.; Stanghellini, M. E. 1998. Effect of phosphite on tomato and pepper plants and on susceptibility of peppers to *Phytophthora* root and Crown rot in hydroponic culture. *Plant Dis.* 82: 1165-1170.
- Leymonie, J. P. 2007: Phosphites and phosphates: When distributors and growers alike could get confused. Courtesy of New Ag International. Available from URL: http://www.spectrumanalytic.com/support/library/pdf/Phosphites_and_Phosphates_When_distributors_and_growers_alike_could_get_confused.pdf (Consultado, septiembre 2012).
- Lovatt, C. J.; Mikkelsen, R. L. 2006. Phosphite Fertilizers: What Are They? Can You Use Them? What Can They Do? *Better Crops* 90:11-13.
- Moor, U.; Põldma, P.; Tõnutare, T.; Karp, K.; Starast, M.; Vool, E. 2009. Effect of phosphite fertilization on growth, yield and fruit composition of strawberries. *Sci. Hort.* 119: 264-269.
- Ratjen, A. M.; Gerendás, J. 2009. A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 821-828.
- SAS Institute Inc. 2011. *SAS/STAT Users Guide. Version 9.3.* SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schroetter, S.; Angeles-Wedler, D.; Kreuzig, R.; Schnug, E. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschu. Volk.* 56: 87-99.
- Steiner, A. 1984. The universal nutrient solution. *In: ISOSC Proceedings 6th International Congress on Soilless Culture. The Netherlands.* pp. 633-649.

Capítulo 11

Steiner, A.; van Winden, H. 1970. Recipe for ferric salts of ethylenediaminetetraacetic acid. *Plant Physiol.* 46: 862-863.

Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Sarr, P.S.; Myint, A. K. 2008a. Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth and phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 761-768.

Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K.; Sarr, P. S.; Myint, A. K. 2008b. Growth response of komatsuna (*Brassica rapa* var. *Peruviridis*) to root and foliar applications of phosphite. *Plant Soil.* 308: 1-10.

Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite-phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa*). *J Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 378-384.

CAPÍTULO 12. CAMBIOS EN COMPUESTOS ANTIOXIDANTES INDUCIDOS POR DIFERENTES FUENTES DE FÓSFORO Y NIVELES DE RADIACIÓN EN DOS ESPECIES DE *Brassica*.

12.1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, los flavonoides y glucosinolatos han sido el foco de investigación, debido a su potencial como fitoquímicos promotores de la salud. Los flavonoides son polifenoles, presentes en muchas plantas, muestran capacidad antioxidante, propiedades antimicrobianas y pueden disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Lin *et al.*, 2007; Volden *et al.*, 2009). Algunos tipos de flavonoides se han asociado con efectos de protección contra diferentes tipos de cáncer y enfermedades crónicas. Dentro de ellos, la quercetina es el flavonoide que mayores beneficios ha mostrado en la salud humana (Knekt *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2004).

Aunado a esto, los flavonoides tienen una gran cantidad de funciones en las plantas. Por ejemplo, los flavonoides incoloros suelen acumularse en las capas más superficiales de las plantas y captan hasta el 90% de las radiaciones UV, impidiendo los efectos nocivos de las radiaciones en los tejidos internos. Algunos flavonoides tienen funciones de defensa contra herbívoros, generando sabores desagradables, principalmente amargos, o texturas poco palatables, lo que les estimula a elegir otras plantas. También participan en el transporte de auxinas, al demostrarse que plantas mutantes que carecen de la enzima chalcona, que forma parte de la ruta biosintética de los flavonoides, muestran un crecimiento irregular, debido a una deficiencia en transporte de auxina a través de la planta (Cruz, 2009).

La síntesis de flavonoides puede ser afectada por condiciones climáticas como temperatura y radiación. A bajas temperaturas aumentan compuestos fenólicos y flavonoides totales (Klimov *et al.*, 2008). Una reducción en la radiación fotosintéticamente activa fue asociada con bajas concentraciones de flavonoides para especies perenes como *Ligustrum vulgare* y *Phillyrea latifolia* (Agati y Tattini, 2010) y

Capítulo 12

para especies anuales como *Brassica rapa* y *Brassica juncea* (Falovo *et al.*, 2011). Otro de los factores que afectan la biosíntesis de flavonoides es el fósforo (P), nutrimento de esencial importancia para el crecimiento y desarrollo de plantas. La deficiencia de P aumenta la acumulación de antocianinas o flavonoles (Hammond y Broadley, 2004). Estudios cuantitativos han demostrado que deficiencias de fosfato (Pi) incrementan al menos cinco veces más el nivel de antocianinas en *Arabidopsis* (Bariola *et al.*, 1999; Misson *et al.*, 2005). Otra investigación señala que deficiencias de Pi incrementa significativamente los niveles de tres flavonoles (quercetina, kaempferol, isorhamnetina) tanto en *Arabidopsis* como en tomate. Sin embargo, las funciones precisas de los cambios biológicos de flavonoides bajo condiciones de bajas concentraciones de Pi siguen siendo desconocidas en plantas superiores (Stewart *et al.*, 2001).

Deficiencia de Pi induce modificaciones importantes en varias vías metabólicas primarias, como el metabolismo del azúcar, y también se ha demostrado su influencia en el metabolismo secundario. La alteración de actividades enzimáticas del metabolismo secundario en tejidos de la raíz bajo deficiencia de P parece ser una respuesta que permite a la planta modificar las propiedades de la rizósfera, tanto química como biológicamente, para aumentar la absorción de P. Cualquiera que sea el mecanismo fisiológico involucrado, el metabolismo fenólico mejora en condiciones de escasez de nutrimentos y puede ayudar a las plantas a hacer frente a un entorno desfavorable, y también actúan como agentes alelopáticos que ayudan reducir la competencia por los nutrimentos (Malusa *et al.*, 2006).

Los glucosinolatos (GLS), se encuentran principalmente en la familia Brassicaceae. Algunos glucosinolatos y el producto de su hidrólisis han atraído una intensa investigación debido a sus atributos en la prevención de cáncer (Stoin *et al.*, 2007). Recientemente isotiocianatos alifáticos, derivados de 2-propenil glucosinolato han mostrado fuertes propiedades anticancerígenas (Verkerk *et al.*, 2009). De la misma manera, glucobrasicina, gluconasturtina y productos derivados de su hidrólisis reducen el cáncer de colon (Plate y Gallaher, 2006).

Capítulo 12

El efecto del P en la producción de GLS como isotiocianatos es relativamente insignificante en mostaza (*Sinapis alba* cv. IdaGold) y rábano (*Raphanus sativa* cv. Colonel). Estos cultivos difieren apreciablemente en su capacidad de absorción y acumulación de P, y el efecto de P sobre el contenido de nutrimentos como N, K, Ca y S y GLS en mostaza y rábano prácticamente fue nula (Brown *et al.*, 2008).

De acuerdo con Yang *et al.* (2009) la deficiencia de P aumentó la concentración de GLS totales en *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis* en una intensidad de luz normal (164%), pero este efecto no fue significativo con poca intensidad de luz. Sin embargo, los efectos del nivel de suministro de P y la intensidad de la luz en siete GLS individuales y tres clases de GLS (alifáticos, aromáticos e indol) fueron bastante diferentes. Las concentraciones de gluconapina, glucobrasicanapina, glucobrasicina, neoglucobrasicina, 4-metoxiglucobrasicina y gluconasturtina se incrementaron bajo deficiencias de P, especialmente con intensidades de luz normal, resultando en un incremento de la concentración de los glucosinolatos antes mencionados en 122, 497, 352, 115, 225 y 46 % respectivamente. La intensidad de luz baja disminuyó la concentración de gluconapina, glucobrasicanapina, glucobrasicina y neoglucobrasicina con deficiencia de P, e incrementó la concentración de glucobrasicina, 4-metoxiglucobrasicina y neoglucobrasicina bajo condiciones de suficiencia de P.

Muchos estudios se enfocan en la influencia de nitrógeno (N) y azufre (S) (Schonhof *et al.*, 2007; Fallovo *et al.*, 2011) sobre GLS, obviamente porque estos nutrimentos tienen una fuerte influencia como precursores de aminoácidos e intermediarios, que participan en la síntesis de glucosinolatos. Sin embargo, está documentado que hay una alta demanda de Pi para la formación de cofactores fosforilados como UDPG (glucosa uridina difosfato) y co-sustratos como PAPS (3'- fosfoadenosina 5'-fosfosulfato) requeridos a lo largo de la ruta de biosíntesis de GLS (Wittstock y Halkier, 2002).

Fosfito (H_2PO_3^-) es un isómero del anión fosfato (H_2PO_4^-) en el cual uno de los átomos de oxígeno unidos al átomo de P es reemplazado por un hidrógeno. Debido a la similitud estructural de estos aniones y las propiedades cinéticas de los transportadores de fosfato de plantas, el fosfito es transportado por los transportadores de fosfato de

Capítulo 12

alta afinidad. Aunque el fosfito puede ser transportado en el interior de la célula, el ion no está involucrado en el metabolismo de P (producción de ATP, fotosíntesis o respiración), y la similitud entre fosfato y fosfito parece estar relacionada con la absorción y translocación de P. El fosfito no se convierte a fosfato dentro de la planta y no participa en ninguna ruta bioquímica (Vararajan *et al.*, 2002), pero interrumpe la fosforilación de proteínas durante deficiencia de fosfato. En *Arabidopsis*, el fosfito suprime la actividad de enzimas nucleolíticas, la expresión de fosfatasas ácidas y los portadores genéticos de fosfato (Ticconi *et al.*, 2001). También se ha demostrado que fosfito induce respuestas antioxidantes (Estrada-Ortiz *et al.*, 2013), y los efectos finales de fosfito en plantas dependen fuertemente del estado de P en la planta (Thao y Yamakawa, 2009).

Dado que hay poca información sobre el efecto que ejerce el fósforo (Pi y Phi) sobre la concentración de flavonoides y GLS, en esta investigación se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fosfato y fosfito (Phi) adicionadas a la solución nutritiva, sobre flavonoides y glucosinolatos en los cultivos de *Brassica juncea* cv Red Giant y *Brassica campestris* cv Mibuna Early cultivados bajo dos intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR).

12.2. MATERIALES Y MÉTODOS

12.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Se realizaron dos experimentos en un sistema hidropónico, bajo condiciones de invernadero, en el Leibniz Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau ubicado en Großbeeren, Alemania (13° 20' longitud este y 52° 22' latitud norte) considerando dos niveles medios diarios de PAR: el primer experimento con 29.7 mol m⁻², realizado del 29 de agosto al 23 de septiembre de 2013 y el segundo con 22.2 mol m⁻², del 30 de septiembre al 4 de noviembre 2013. Ambos experimentos se desarrollaron con una temperatura promedio de 17.4 °C, y una humedad relativa promedio de 77 %. Para cada experimento se germinaron semillas de *Brassica juncea* cv. Red Giant y *Brassica campestris* cv. Mibuna Early en cubos de lana de roca, bajo condiciones de

Capítulo 12

invernadero. Después de 22 días de germinadas, plantas de 'Red Giant' y 'Mibuna Early' con 2 y 3 hojas verdaderas respectivamente, fueron trasplantadas en un sistema de solución nutritiva recirculante soportado por canaletas de fibra de vidrio de 7.5 m de largo, teniendo 44 plantas por canaleta siendo la mitad de cada cultivar; la distancia entre plantas fue de 15 cm. Dieciocho canaletas se aleatorizaron dentro del invernadero y cada uno constituyó una repetición, teniendo tres repeticiones por tratamiento y un diseño experimental completamente al azar.

Se condujo un experimento factorial con seis tratamientos resultantes de las combinaciones de los niveles de dos factores de estudio: Pi y Phi. El factor Pi fue ensayado en niveles bajo y medio (0.1 mM y 0.5 mM, respectivamente). El Phi se ensayó en niveles bajo, medio y alto (0.1 mM Phi, 0.5 mM Phi y 2.5 mM Phi, respectivamente). El Pi se obtuvo a partir de ácido fosfórico y el Phi a partir de ácido fosforoso, ambos grado reactivo (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Los demás nutrimentos fueron adicionados a la solución nutritiva en las siguientes concentraciones (mM): NO₃-N 7.82; NH₄-N 0.33; K 3.93; Ca 1.95; Mg 0.77 y S 0.77; la solución nutritiva se complementó con micronutrimentos a las siguientes concentraciones (µM): Fe 40.0; Mn 5.0; Zn 4.0; B 30; Cu 0.5 y Mo 0.5. La conductividad eléctrica se mantuvo en 2 dS m⁻¹ al preparar la solución nutritiva en ambos experimentos y se cambió una vez por semana. El pH se mantuvo entre 5.5 y 6.0 adicionando ácido nítrico 4 N o hidróxido de sodio concentrado según fuera necesario.

12.2.2. Acondicionamiento de las muestras

A madurez comercial (25 y 35 días después del trasplante para experimentos con 29.7 y 22.2 mol m² de radiación fotosintéticamente activa, respectivamente), 10 plantas fueron cosechadas de cada tratamiento y sus repeticiones. La madurez comercial para *B. campestris*, fue definida por la presencia de al menos 49 hojas y para *B. juncea* de 7 a 8 hojas. Para *B. juncea* se tomó al azar una hoja de cada una de las 10 plantas cosechadas, posteriormente se le cortó y desechó la nervadura central. En *B. campestris*, a las 10 plantas cosechadas se les cortó el peciolo, y posteriormente se

Capítulo 12

tomó muestras por duplicado de entre 100-150 g de cada tratamiento y sus repeticiones.

Las muestras para análisis de flavonoides y glucosinolatos congelaron a -20 °C en un congelador marca Poron (Erfurt, Germany). Ya congeladas, las muestras se liofilizaron en un equipo marca Christ, (Martin Christ, Osterode, Germany) durante aproximadamente una semana. Posterior a ello las muestras se molieron finamente en un molino marca Retsch (F. Kurt Retsch GmbH & Co., Haan, Germany) y se guardaron para su posterior análisis.

Las muestras utilizadas para análisis de nitrato se secaron en una estufa de secado marca Binder durante 72 h a 70 °C, y posteriormente se molieron finamente en el mismo molino Retsch, y se guardaron para su posterior análisis.

12.2.3. Variables evaluadas

12.2.3.1. Análisis de flavonoides

Los flavonoides fueron determinados como agliconas después de hidrólisis ácida (Falovo *et al.*, 2011). Para ello, se pesaron 0.25 g de material vegetal liofilizado, y se agregaron 20 mL de metanol acuoso (62.5%), y 5 mL de HCl (8 M). Después se mantuvo en reflujo por 2 h en baño de agua caliente (100 °C). Pasado este tiempo, el extracto fue enfriado sumergiéndose en agua fría, y se aforó a 50 mL con metanol al 50% y se sonicó (Bandelin Sonorex RK 100, Berlin, Germany) durante 5 min. Posteriormente, una muestra del extracto previamente homogenizado se pasó a través de un filtro PTFE (0.45 µm, politetrafluoroetileno; Roth, Karlsruhe, Germany) y se colocó en un vial para su posterior análisis en HPLC-DAD-ESI-MS (Agilent, Waldbronn, Germany).

La composición y concentración de flavonoides fueron determinadas utilizando un HPLC serie 1100 (Agilent, Waldbronn, Germany) equipado con un sistema de detección de arreglo de diodos. Los extractos fueron separados con una columna Prodigy (ODS 3, 150 x 3.0 mm, 5 µm, 100 Å) (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany)

Capítulo 12

con sistema de seguridad C18 (ODS 3, 4 x 3.0 mm, 5 μm , 100 Å) a una temperatura de 25 °C utilizando un gradiente agua/acetonitrilo (Th Geyer GmbH, Renningen, Germany). El solvente A consistió de 99.5% agua y 0.5% ácido acético (VWR International, Dresden, Germany), mientras que el solvente B fue 100% acetonitrilo. En este análisis se utilizó el siguiente gradiente: 30-35% B (5 min), 35-39% B (12 min), 39-90% B (5 min), 90% B isocrático (5 min), 90-30% B (5 min), y 30% B isocrático (5 min). El volumen de inyección fue de 50 μL , utilizando un flujo de 0.3 mL min^{-1} , a una longitud de onda de 370 nm (para quercetina, kaempferol e isorhamnetina) y 520 nm (para cianidina). Se utilizaron dihidroquercetina, kaempferol, isorhamnetina y cianidina (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) como estándares para la realización de las curvas de calibración. Los compuestos fueron identificados como iones moleculares desprotonados y fragmentos característicos por HPLC-DAD-ESI-MS, utilizando un equipo MSD Agilent series 1100, con ESI como fuente de iones en modo negativo. El nitrógeno fue utilizado como gas para secar (12 L min^{-1} , 350 °C) y gas nebulizador (40 psi).

12.2.3.2. Análisis de glucosinolatos

Los glucosinolatos fueron analizados por HPLC como desulfo-glucosinolatos. Se pesaron 20 mg de material vegetal previamente liofilizado y finamente molido, por duplicado y fue colocado en tubos de plástico de 2 mL a los cuales se les agregaron 750 μL de metanol al 70% a 70 °C, se agitó por 10 min a 1400 rpm y a 70 °C en un equipo Ditabis (Modelo MHL 23, Pforzheim, Germany); posteriormente se centrifugó 5 min a 4500 rpm a 20 °C (Centrifuga Heraeus, D-37520, Osterode, Germany). El sobrenadante se colocó en un tubo de plástico. El residuo fue extraído dos veces más con 500 μL de metanol al 70% a 70 °C, se agitó por 5 min a 1400 rpm y a 70 °C; posteriormente se centrifugó 5 min a 4500 rpm a 20 °C, el sobrenadante se colectó en el mismo tubo de plástico del paso anterior. Dicho sobrenadante se agregó a una columna SPE, la cual previamente se acondicionó con 500 μL de suspensión sephadex-DEAE A-25 intercambiador de iones (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Sweden) activado con ácido acético (VWR International, Dresden, Germany), lavado dos veces con 1 mL de solución de imidazol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) y

Capítulo 12

posteriormente dos veces con 1 mL de agua ultrapura. Después de agregar el extracto el tubo que lo contenía se enjuagó con 1 mL de agua ultrapura. Posteriormente las columnas se pasaron a los tubos de reacción, en donde se les agregó 75 μL de solución purificada de arilsulfatasa (Th Geyer GmbH, Renningen, Germany) y se taparon en la parte superior dejándose incubar por 12 h. Los desulfo-glucosinolatos se eluyeron de las columnas con dos aplicaciones de 0.5 mL de agua ultrapura, posteriormente se colocaron en tubos de filtrado (Costar Spin-X 0.22 μm de acetato de celulosa en tubos de 2 mL de polipropileno, Corning Incorporated, U.S.A.) y se centrifugaron 5 min a 3000 rpm a 20 °C para su lectura. El análisis se realizó en un HPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies, Germany) con una columna Poroshell 120 EC-C18 (2.1 x 100mm 2.7 Micron, Agilent Technologies, U.S.A.), a una temperatura de 30 °C utilizando un gradiente agua/acetonitrilo (Th Geyer GmbH, Renningen, Germany). El solvente A consistió de agua 100%, el B acetonitrilo al 40% en agua. Se utilizó el siguiente gradiente: 99.5% A, 0.5% B (12 min); 50.5% A, 49.5% B (3 min), 0.5% A, 99.5% B (3 min), 99.5% A, 0.5% B (1 min). El volumen de inyección fue de 5 μL , utilizando un flujo de 0.4 mL min^{-1} , utilizando una longitud de onda de 229 nm. La concentración de glucosinolatos fue calculada utilizando 2-propenil glucosinolato como estándar para la curva de calibración, empleando un factor de conversión a partir de 2-propenyl a otros glucosinolatos. Glucosinolatos totales se determinaron a partir de la suma de glucosinolatos individuales.

12.2.3.3. Análisis de nitrato

La concentración de nitrato fue medida en extractos de material vegetal por fotometría, a través de reducción a nitrito. Para ello, se utilizó material vegetal finamente molido. El extracto estuvo formado en una proporción $\frac{1}{4}$ con una solución de CaCl_2 (12.5 mmol L^{-1}), incubando durante una hora, posteriormente se filtró. La medición se realizó utilizando el principio de flujo continuo, en donde el filtrado se mezcló con una solución tampón de imidazol de pH 7.5. Ya en el reactor de cadmio, el nitrato se redujo a nitrito por el cadmio revestido con cobre, formando sulfanilamida de nitrito. Posteriormente en otro reactor, tiene lugar una reacción de acoplamiento con una sal de diazonio y N (1 naftil)-etilendiamina, lo cual conduce a la formación de un colorante rojo, que es

Capítulo 12

proporcional a la concentración del nitrato y se determina a través de la medición de absorbancia a una longitud de onda de 546 nm en un equipo FIA modula (Gesellschaft für Analysetechnik HLS, Salzwedel, Germany).

12.2.4. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlet para verificar la homogeneidad de varianzas. Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos. Los datos se analizaron por separado en cada experimento, utilizando como factores niveles fosfato y niveles de fosfito. La medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05\%$). Además se realizó un análisis de regresión para determinar la relación entre flavonoides y nitrato, para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute, 2011).

12.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

12.3.1. Flavonoides

Se cuantificaron tres flavonoides en hojas de *B. campestris* el más abundante fue kaempferol, seguido de isoramnetina y quercetina, esto en todos los tratamientos evaluados. En trabajos previos se han identificado derivados de kaempferol y derivados de isoramnetina en *B. campestris* (Harbaum *et al.*, 2007; Harbaum-Piayda *et al.*, 2010); mientras que en hojas de *B. juncea* se identificaron cuatro flavonoides. El orden de concentración de estos compuestos, independientemente de los tratamientos, fue el siguiente: kaempferol, isorhamnetina, cianidina y quercetina (Cuadro 1). Recientemente en esta especie se ha reportado la presencia de kaempferol, quercetina, isoramnetina, pero no cianidina (Falovo *et al.*, 2011).

En *B. juncea* y con la PAR más alta (29.7 mol m^{-2}) se observó que el Phi incrementó significativamente la concentración de quercetina y cianidina, pero no en condiciones de PAR más baja. Sin embargo con la PAR más baja (22.2 mol m^{-2}) se observó un

Capítulo 12

incremento de quercetina y cianidina cuando se tuvo deficiencia de Pi (Cuadro 1). Se ha observado que en tejidos vegetales hay diversas condiciones como algunos tipos de estrés que traen consigo el incremento de algunos flavonoides como las antocianinas, como es el caso de deficiencias de nitrógeno y fósforo (Stewart *et al.*, 2001). Lo anterior corresponde con lo observado en nuestra investigación ya que se ve incrementada la concentración de quercetina y cianidina cuando hay deficiencias de Pi o cuando se generó un estrés causado por Phi.

En *B. campestris* no se observan efectos estadísticos atribuidos a Phi, pero se puede observar que con la PAR más alta hay un incremento de quercetina cuando hay deficiencia de Pi. Por otro lado, cuando se tuvo PAR más baja, se observó que cuando hubo deficiencia de Pi se incrementó significativamente la concentración de kaempferol y al ser éste la aglicona en mayor concentración en *B. campestris* también se observó un incremento significativo en flavonoides totales (Cuadro 1).

En *B. juncea* se observó un incremento en flavonoides totales (Cuadro 1) cuando se desarrolló el cultivo con la PAR más baja (22.2 mol m^{-2}), debido a que el kaempferol se incrementó de manera considerable con respecto a la PAR más alta (29.7 mol m^{-2}). Por su parte, en *B. campestris* se observó una respuesta opuesta a *B. juncea*, ya que hubo una mayor concentración de flavonoides totales cuando se tuvo la mayor PAR.

En otras investigaciones se ha reportado que la concentración de flavonoides en brócoli, kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*), *B. juncea* y *B. rapa*, se incrementa cuando se aumenta el nivel de PAR (Gliszczynska-Swigzosa *et al.*, 2007; Schmidt *et al.*, 2010; Fallovo *et al.*, 2011), lo cual es acorde a lo observado en *B. campestris* en nuestro experimento, difiriendo de los resultados obtenidos para *B. juncea* (Cuadro 1), en donde particularmente se observó un incremento en kaempferol con la PAR más baja (22.2 mol m^{-2}).

Capítulo 12

Cuadro 1. Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración de flavonoides (mg g⁻¹ PS) en dos especies de *Brassica*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	<i>Brassica juncea</i>					<i>Brassica campestris</i>				
			Total	Quercetina	Kaempferol	Isorhamnetina	Cianidina	Total	Quercetina	Kaempferol	Isorhamnetina	
29.7	Efectos simples											
	0.5	0.1	3.51 a	0.21 a	1.76 a	0.96 a	0.58 a	3.65 a	0.10 a	2.19 a	1.36 a	
			0.5	3.64 a	0.21 a	1.83 a	1.04 a	0.56 a	3.11 a	0.09 a	1.85 a	1.16 a
			2.5	4.49 a	0.29 a	2.23 a	1.13 a	0.84 a	3.29 a	0.10 a	1.97 a	1.21 a
		0.1	0.1	3.56 a	0.23 a	1.70 a	1.09 a	0.54 a	3.52 a	0.10 a	2.11 a	1.31 a
			0.5	4.09 a	0.29 a	1.77 a	1.17 a	0.86 a	3.60 a	0.13 a	1.96 a	1.51 a
			2.5	4.17 a	0.29 a	1.85 a	1.18 a	0.85 a	4.26 a	0.15 a	2.23 a	1.88 a
	Efectos principales											
	Pi	0.5	3.88 a	0.24 a	1.94 a	1.04 a	0.66 a	3.35 a	0.10 b	2.00 a	1.24 a	
			0.1	3.94 a	0.27 a	1.77 a	1.15 a	0.75 a	3.79 a	0.13 a	2.10 a	1.57 a
	Phi	0.1	3.53 a	0.22 b ^z	1.73 a	1.02 a	0.56 b	3.58 a	0.10 a	2.15 a	1.33 a	
			0.5	3.87 a	0.25 ab	1.80 a	1.10 a	0.71 ab	3.35 a	0.11 a	1.91 a	1.34 a
			2.5	4.33 a	0.29 a	2.04 a	1.15 a	0.84 a	3.77 a	0.13 a	2.10 a	1.55 a
	Nivel de significancia											
	Pi			ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	
	Phi			ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	
	Pi *Phi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
	22.2	Efectos simples										
0.5		0.1	4.60 a	0.22 a	2.45 a	1.36 a	0.57 a	2.51 a	0.05 a	1.67 a	0.79 a	
			0.5	4.36 a	0.21 a	2.33 a	1.21 a	0.61 a	2.30 a	0.06 a	1.47 a	0.77 a
			2.5	4.06 a	0.17 a	2.31 a	1.10 a	0.48 a	2.27 a	0.04 a	1.46 a	0.77 a
		0.1	0.1	4.90 a	0.25 a	2.54 a	1.37 a	0.74 a	2.58 a	0.05 a	1.64 a	0.89 a
			0.5	4.60 a	0.24 a	2.37 a	1.26 a	0.73 a	2.94 a	0.06 a	1.83 a	1.06 a
			2.5	4.34 a	0.22 a	2.23 a	1.23 a	0.66 a	2.67 a	0.06 a	1.65 a	0.96 a
Efectos principales												
Pi		0.5	4.34 a	0.20 b	2.36 a	1.22 a	0.55 b	2.36 b	0.05 a	1.54 b	0.78 a	
			0.1	4.61 a	0.24 a	2.38 a	1.29 a	0.71 a	2.73 a	0.05 a	1.71 a	0.97 a
Phi		0.1	4.75 a	0.23 a	2.50 a	1.36 a	0.66 a	2.54 a	0.05 a	1.65 a	0.84 a	
			0.5	4.48 a	0.23 a	2.35 a	1.23 a	0.67 a	2.62 a	0.06 a	1.65 a	0.91 a
			2.5	4.20 a	0.19 b	2.27 a	1.17 a	0.57 a	2.47 a	0.05 a	1.56 a	0.87 a
Nivel de significancia												
Pi				ns	**	ns	ns	**	**	ns	*	ns
Phi				ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pi *Phi				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

^z Letras diferentes en cada columna por factor de estudio e interacciones indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$.

Capítulo 12

12.3.2. Concentración de nitrato

También se determinó la influencia de Pi y Phi sobre la concentración de nitrato en ambas especies analizadas. Se pudo observar que en hojas de *B. juncea*, Pi y Phi no tuvieron efectos significativos sobre la acumulación de nitrato en hojas, sin embargo en *B. campestris* cultivada con PAR alta (29.7 mol m^{-2}), se observó que bajas concentraciones de Pi, promovieron mayor concentración de nitrato (Cuadro 2). En árboles de manzano, con el suministro de altas concentraciones de nitrógeno se ve disminuida la producción de flavonoides en hojas; lo anterior es atribuido a la disminución de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) cuando se incrementa la disponibilidad de nitrógeno ocasionando así la disminución de la concentración de flavonoides; PAL es la primer enzima que participa en la ruta de los fenilpropanoides, es precursora de los flavonoides y encargada de la conversión de fenilalanina a ácido cinámico (Strissel *et al.*, 2005). Lo anterior se ve reflejado en *B. campestris*, ya que cuando hubo una mayor concentración de nitrato en hojas se observó disminución en la concentración de flavonoides, sin embargo el coeficiente de determinación es muy bajo para atribuir completamente al nitrato presente en hojas la disminución de flavonoides (Cuadro 2, Figura); por el contrario en *B. juncea* se observó que al incrementarse el nitrato en hojas, también se incrementaron los flavonoides, sin embargo los resultados obtenidos mediante regresión resultaron ser no significativos.

Capítulo 12

Cuadro 2. Influencia de Pi, Phi y PAR en la concentración de nitrato en hojas sin nervadura central de dos especies de *Brassica*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	NO ₃ -N (mg g ⁻¹ PS)	
			<i>Brassica juncea</i>	<i>Brassica campestris</i>
Efectos simples				
29.7	0.5	0.1	12.37 a	12.07 a
		0.5	15.63 a	9.23 a
		2.5	11.13 a	13.13 a
	0.1	0.1	16.07 a	15.33 a
		0.5	12.50 a	10.70 a
		2.5	15.27 a	15.00 a
Efectos principales				
Pi	0.5		13.04 a	11.48 b ^z
	0.1		14.61 a	13.68 a
Phi		0.1	14.22 a	13.70 a
		0.5	14.07 a	9.97 b
		2.5	13.20 a	14.07 a
Nivel de significancia				
	Pi		ns	*
	Phi		ns	**
	Pi *Phi		ns	ns
Efectos simples				
22.2	0.5	0.1	17.67 a	32.00 a
		0.5	20.43 a	25.13 a
		2.5	17.27 a	27.23 a
	0.1	0.1	16.43 a	24.70 a
		0.5	19.67 a	26.20 a
		2.5	21.43 a	24.37 a
Efectos principales				
Pi	0.5		18.29 a	28.12 a
	0.1		19.18 a	25.09 a
Phi		0.1	16.80 a	28.35 a
		0.5	20.05 a	25.67 a
		2.5	19.35 a	25.80 a
Nivel de significancia				
	Pi		ns	ns
	Phi		ns	ns
	Pi *Phi		ns	ns

^zLetras diferentes en cada columna por factor de estudio e interacciones indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$; PAR, radiación fotosintéticamente activa.

Capítulo 12

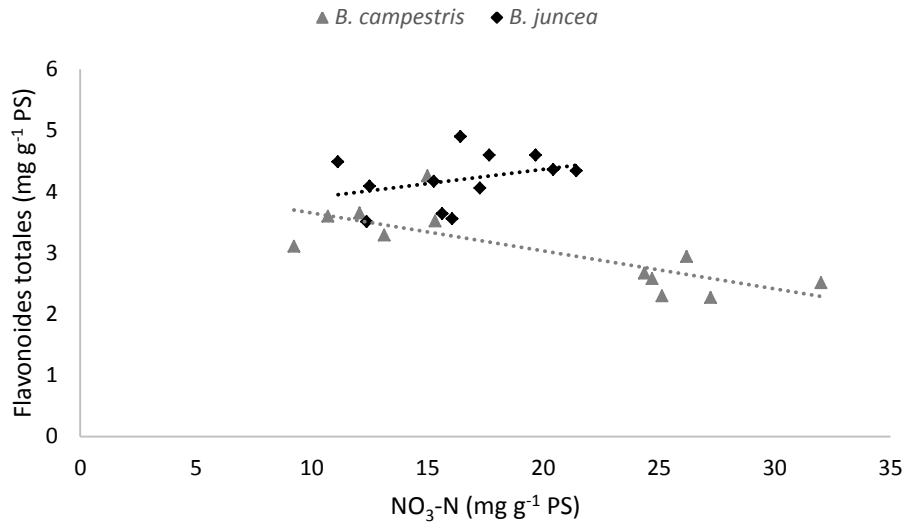


Figura 1. Relación entre concentración de flavonoides totales y concentración de nitrato en hojas de *B. campestris* y *B. juncea*. Flavonoides totales en *B. juncea* = $3.4295 + 0.0468 (\text{NO}_3\text{-N})$ ($R^2=0.1167$). Flavonoides totales en *B. campestris* = $4.2729 - 0.062 (\text{NO}_3\text{-N})$ ($R^2=0.5968^*$). *significativo a $p \leq 0.05$.

12.3.3. Glucosinolatos

En hojas de *B. juncea* los glucosinolatos (GLS) identificados en mayor concentración fueron los alquenil GLS, también denominados GLS alifáticos, dentro de los cuales se encontró en mayor abundancia, el 2-propenil (Cuadro 3). Estos resultados concuerdan con lo reportado en otras investigaciones, en las que un 90% del total de GLS corresponden a alil glucosinolatos (2-propenil) (Falovo *et al.*, 2011; Tong *et al.*, 2014), lo cual coincide con nuestros resultados. Interesantemente, en nuestro experimento con PAR alta (29.7 mol m^{-2}) obtuvimos cerca del doble de lo que reportan Falovo *et al.* (2011) en *B. juncea* con PAR de 5, 6.8 y 9 mol m^{-2} .

Cuando se tuvo PAR baja (22.2 mol m^{-2}) se observó una reducción de GLS totales en *B. juncea*, observándose una disminución de un 30.9% en los alquenil GLS, y dentro de este grupo, específicamente se redujo de manera notoria el 2-propenil. Por otro lado, se observó un incremento del 2-propenil cuando se suministró 2.5 mM de Phi, cuando

Capítulo 12

la PAR fue baja (22.2 mol m^{-2}) (Cuadro 3). Se ha reportado que la reducción en PAR resulta en la disminución de la concentración de glucosinolatos en colza (*Brassica napus*) (Walsgrove *et al.*, 1995), lo cual concuerda con la reducción de glucosinolatos totales y en particular 2-propenil en *B. juncea* en esta investigación.

Del grupo de los aril GLS o GLS aromáticos, solo se identificó en hojas de *B. juncea*, el 2-feniletil, observándose que cuando se aplica una concentración deficiente de Pi (0.1 mM) se da un incremento de este GLS aromático. Bajo condiciones de baja PAR (22.2 mol m^{-2}) se incrementó 2-feniletil al suministrar 2.5 mM de Phi (Cuadro 3).

En hojas de *B. juncea* también se identificaron los indole GLS, dentro de los cuales se encuentran 3-indolilmetil, 4-hidroxi-3-indolilmetil, 4-metoxi-3-indolilmetil y 1-metoxi-3-indolilmetil. En condiciones de alta PAR (29.7 mol m^{-2}) se observó que concentraciones bajas de Pi (0.1 mM) incrementaron la concentración de 4-hidroxi-3-indolilmetil. Por otro lado, se observó que concentraciones de Phi superiores a 0.5 mM bajo deficiencias de Pi (0.1 mM) reducen la concentración de 3-indolilmetil (Cuadro 3). Cuando se tuvo PAR baja (22.2 mol m^{-2}) se observó que al adicionar 2.5 mM de Phi con bajas concentraciones de Pi (0.1 mM) incrementó la concentración de 4-hidroxi-3-indolilmetil. De igual manera se observó que suministrar bajas concentraciones de Pi (0.1 mM) incrementaron la concentración de 3-indolilmetil (Cuadro 3).

En hojas *B. campestris* se observó mayor diversidad de GLS en comparación con *B. juncea*, ya que se identificaron dos alqui GLS (4-metilsulfinitilbutil y 5-metilsulfinitilpentil), tres alquenil GLS (3-butenil, 4-pentenil y 2-hidroxi-3-butenil), un aril GLS (2-feniletil) y cuatro indole GLS (3-indolilmetil, 4-hidroxi-3-indolilmetil, 4-metoxi-3-indolilmetil y 1-metoxi-3-indolilmetil) (Cuadro 4). Sin embargo, si comparamos la concentración total de GLS en ambas especies, observamos que en *B. campestris* se reduce en cuanto a concentración total de GLS ya que es alrededor de un 50% de lo encontrado en *B. juncea* (Cuadros 3 y 4).

En *B. campestris* se observó que el glucosinolato más representativo en cuanto a su abundancia fue el 3-butenil, el cual pertenece a los alquenil GLS, seguido en

Capítulo 12

concentración por los indole GLS, alqui GLS y por último aril GLS (Cuadro 4). Se ha reportado gluconapina (3-butenil) como glucosinolato alifático en mayor concentración en varias subespecies pertenecientes a *B. campestris* (Chen *et al.*, 2008), lo cual corresponde a los resultados obtenidos en esta investigación. De igual manera Verkerk *et al.* (2009) reportaron en *B. campestris* ssp *pekinensis* a los glucosinolatos alifáticos glucobrasicanapina (4-pentenil) en mayor abundancia.

Cuando *B. campestris* se cultivó bajo la PAR más alta (29.7 mol m^{-2}), la aplicación de 2.5 mM Phi y 0.1 mM Pi (baja concentración de Pi) se incrementó la concentración total de alquil GLS y del alquenil GLS 2-hidroxi-3-butenil; aunado a ellos, concentraciones de 0.1 mM de Pi incrementan la concentración del indole GLS 4-metoxi-3-indolilmetil (Cuadro 4). Por otro lado cuando *B. campestris* se cultivó bajo la PAR más baja (22.2 mol m^{-2}), y se adicionó 0.1 mM de Pi se observó un incremento en la concentración total de alqui GLS, de manera contrastante se observó que concentraciones medias de Pi y Phi (0.5 mM) incrementaron la concentración del indole GLS 1-metoxi-3-indolilmetil (Cuadro 3). Yang *et al.* (2009) reportan un incremento de glucosinolatos bajo deficiencias de Pi (0.1mM) y condiciones normales de luz ($640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), particularmente de GLS alifáticos e indol GLS, y encontraron que la concentración de muchos de los aminoácidos libres se incrementó por suministrar a la planta bajas concentraciones de Pi en particular bajo condiciones normales de luz. Entre los aminoácidos incrementados se encuentra la metionina, la cual se encuentra en línea como precursor de GLS alifáticos, tirosina y fenilalanina también se incrementaron y funcionan como precursores de GLS aromáticos.

Al igual que en *B. juncea*, se observó una reducción en la concentración total de GLS en *B. campestris* cuando se desarrolló bajo la PAR más baja (22.2 mol m^{-2}) (Cuadro 4). Anteriormente se han reportado efectos negativos en concentración de glucosinolatos al disminuir la PAR (Falovo *et al.*, 2011), lo cual explica que a baja PAR, se reduce el contenido de glucosinolatos debido a la disminución de flavina monooxigenasa la cual cataliza la formación de aldoxima alifática, siendo éste un compuesto clave en la formación de glucosinolatos alifáticos (Walsgrove *et al.*, 1995).

Capítulo 12

Interesantemente, Cierieszko *et al.* (2005) reportan un efecto aditivo entre deficiencias de Pi y luminosidad en la expresión de genes, mejorando la actividad de UDPG pirofosforilasa, teniendo con esto un incremento en azúcares, los cuales se ven más marcados con deficiencias de Pi. Aunado a ello, Wittstock y Halkier (2002), ilustran un paso importante en la ruta de síntesis de GLS, en donde por acción de C-S liasa se libera el ácido tihdroxímico del S-alquiltihdroximato; el ácido tihdroxímico es glucosilado por acción de UDPG formando desulfo-GLS. Lo anterior sugiere una posible razón por la cual se da una acumulación de GLS, bajo deficiencias de Pi (0.1mM), en particular en condiciones de alta PAR, por lo que la acumulación de GLS por acción de Phi puede deberse a que hay una respuesta a un estrés de deficiencias de Pi.

Capítulo 12

Cuadro 3. Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración de glucosinolatos (mg g⁻¹ PS) en *Brassica juncea*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	Alquenil GS				Aril GS	Indole GS					
			Total GS	Total	2-propenil	3-butenil	4-pentenil	2-feniletil	Total	4-hidroxi-3-indolilmetil	3-indolilmetil	4-metoxi-indolilmetil	1-metoxi-3-indolilmetil
29.7	Efectos simples												
	0.5	0.1	11.03 a	10.65 a	10.15 a	0.48 a	0.02 a	0.07 a	0.31a	0.08 a	0.15 a	0.07 a	0.01 a
		0.5	10.86 a	10.50 a	10.03 a	0.45 a	0.02 a	0.07 a	0.29a	0.07 a	0.14 ab	0.07 a	0.01 a
		2.5	10.91 a	10.54 a	10.00 a	0.51 a	0.02 a	0.06 a	0.31a	0.08 a	0.14 ab	0.08 a	0.01 a
	0.1	0.1	12.82 a	12.36 a	11.84 a	0.50 a	0.02 a	0.10 a	0.36a	0.12 a	0.15 a	0.08 a	0.00 a
		0.5	11.51 a	11.09 a	10.57 a	0.50 a	0.02 a	0.08 a	0.33a	0.08 a	0.16 a	0.08 a	0.01 a
		2.5	11.12 a	10.76 a	10.26 a	0.48 a	0.02 a	0.07 a	0.29a	0.09 a	0.11 b	0.08 a	0.01 a
	Efectos principales												
	Pi	0.5	10.93 a	10.56 a	10.06 a	0.48 a	0.02 a	0.07 b	0.30 a	0.08 b	0.15 a	0.07 a	0.01 a
		0.1	11.81 a	11.41 a	10.89 a	0.49 a	0.02 a	0.09 a	0.32 a	0.10 a	0.14a	0.08 a	0.01 a
	Phi	0.1	11.93 a	11.51 a	11.00 a	0.49 a	0.02 a	0.09 a	0.33 a	0.10 a	0.15 a	0.08 a	0.01 a
		0.5	11.18 a	10.80 a	10.30 a	0.48 a	0.02 a	0.08 ab	0.31 a	0.08 a	0.14 ab	0.07 a	0.01 a
		2.5	11.01 a	10.65 a	10.13 a	0.50 a	0.02 a	0.06 b	0.30 a	0.09 a	0.13 b	0.08 a	0.01 a
	Nivel de significancia												
	Pi			ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	**	ns	ns
Phi			ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns
Pi *Phi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns
22.2	Efectos simples												
	0.5	0.1	8.35 a	8.06 a	7.64 a	0.40 a	0.02 a	0.04 b	0.25 a	0.08 ab	0.06 a	0.09 a	0.01 a
		0.5	6.36 a	6.13 a	5.79 a	0.32 a	0.02 a	0.03 bc	0.19 a	0.06 bc	0.05 a	0.08 a	0.01 a
		2.5	7.69 a	7.43 a	7.01 a	0.40 a	0.02 a	0.03 bc	0.22 a	0.07 abc	0.06 a	0.08 a	0.01 a
	0.1	0.1	8.22 a	7.97 a	7.57 a	0.38 a	0.02 a	0.03 bc	0.22 a	0.06 bc	0.06 a	0.09 a	0.02 a
		0.5	6.39 a	6.16 a	5.85 a	0.29 a	0.02 a	0.02 c	0.20 a	0.05 c	0.07 a	0.07 a	0.01 a
		2.5	10.02 a	9.68 a	9.20 a	0.46 a	0.02 a	0.07 a	0.26 a	0.09 a	0.08 a	0.07 a	0.01 a
	Efectos principales												
	Pi	0.5	7.47 a	7.21 a	6.82 a	0.37 a	0.02 a	0.03 b	0.23 a	0.07 a	0.06 b	0.08 a	0.01 a
		0.1	8.21 a	7.94 a	7.54 a	0.38 a	0.02 a	0.04 a	0.22 a	0.07 a	0.07 a	0.08 a	0.01 a
	Phi	0.1	8.29 ab	8.02 a	7.61 a	0.39 a	0.02 a	0.04 b	0.23 a	0.07 a	0.06 a	0.09 a	0.01 a
		0.5	6.37 b ^z	6.15 b	5.82 b	0.30 a	0.02 a	0.03 b	0.20 a	0.05 b	0.06 a	0.08 a	0.01 a
		2.5	8.85 a	8.56 a	8.12 a	0.43 a	0.02 a	0.05 a	0.24 a	0.08 a	0.07 a	0.07 a	0.01 a
	Nivel de significancia												
	Pi			ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	*	ns
Phi			*	*	**	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	ns
Pi *Phi			ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	**	ns	ns	ns

^zLetras diferentes en cada columna por factor de estudio e interacciones indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; * significativa a $p \leq 0.05$; ** significativa a $p \leq 0.01$; *** significancia a $p \leq 0.001$

Capítulo 12

Cuadro 4. Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración de glucosinolatos (mg g⁻¹ PS) en *Brassica campestris*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	Total GS	Alqui GS		Alquenil GS			Aril GS	Indole GS							
				Total	4-methyl sulfinilbutil	5-methyl sulfinilpentil	Total	3- butenil	4- pentenil	2-OH- 3-butenil	2- feniletal	Total	4-OH-indol- 3-ilmetil	Indol- 3-ilmetil	4-metoxi-indol- 3-ilmetil	1-metoxi-indol 3-ilmetil	
29.7	Efectos simples																
	0.5	0.1	4.67 a	0.05 b	0.02 b ^z	0.03 a	4.32 a	3.57 a	0.61 a	0.14 a	0.02 a	0.28 a	0.05 a	0.14 a	0.05 a	0.04 a	
			5.19 a	0.08 b	0.03 b	0.05 a	4.78 a	3.95 a	0.72 a	0.12 a	0.02 a	0.30 a	0.04 a	0.15 a	0.05 a	0.06 a	
			5.20 a	0.08 b	0.03 b	0.05 a	4.81 a	3.75 a	0.89 a	0.17 a	0.02 a	0.30 a	0.04 a	0.15 a	0.04 a	0.07 a	
			4.88 a	0.11 b	0.06 b	0.05 a	4.45 a	3.73 a	0.56 a	0.16 a	0.02 a	0.30 a	0.04 a	0.15 a	0.06 a	0.06 a	
			5.47 a	0.12 b	0.05 b	0.07 a	4.96 a	4.28 a	0.56 a	0.12 a	0.02 a	0.37 a	0.04 a	0.21 a	0.06 a	0.06 a	
			5.65 a	0.25 a	0.12 a	0.12 a	5.06 a	4.27 a	0.55 a	0.24 a	0.02 a	0.32 a	0.05 a	0.15 a	0.06 a	0.05 a	
	Efectos principales																
	Pi	0.5	5.02 a	0.07 b	0.03 b	0.04 b	4.64 a	3.76 a	0.74 a	0.14 b	0.02 a	0.29 a	0.04 a	0.15 a	0.05 b	0.06 a	
			5.33 a	0.16 a	0.09 a	0.08 a	4.83 a	4.10 a	0.56 b	0.17 a	0.02 a	0.33 a	0.05 a	0.17 a	0.06 a	0.05 a	
	Phi	0.1	4.78 a	0.08 b	0.04 a	0.04 b	4.38 a	3.65 a	0.59 a	0.15 b	0.02 a	0.29 a	0.04 a	0.15 a	0.05 a	0.05 a	
			5.33 a	0.10 b	0.04 a	0.06 ab	4.87 a	4.12 a	0.64 a	0.12 b	0.02 a	0.34 a	0.04 a	0.18 a	0.05 a	0.06 a	
			5.43 a	0.16 a	0.08 a	0.09 a	4.94 a	4.01 a	0.72 a	0.21 a	0.02 a	0.31 a	0.04 a	0.15 a	0.05 a	0.06 a	
	Nivel de significancia																
	Pi			ns	***	***	**	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	***	ns
	Phi			ns	**	*	**	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	Pi *Phi			ns	*	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	22.2	Efectos simples															
0.5		0.1	3.36 a	0.04 a	0.01 a	0.02 a	3.08 a	2.58 a	0.39 a	0.11 a	0.03 a	0.21 a	0.03 a	0.08 a	0.07 a	0.03 a	
			2.92 a	0.06 a	0.04 a	0.02 a	2.63 a	2.08 a	0.49 a	0.06 a	0.02 a	0.21 a	0.03 a	0.08 a	0.05 a	0.05 a	
			2.85 a	0.05 a	0.03 a	0.02 a	2.58 a	2.21 a	0.30 a	0.07 a	0.03 a	0.19 a	0.03 a	0.08 a	0.06 a	0.02 a	
			3.05 a	0.08 a	0.05 a	0.03 a	2.73 a	2.35 a	0.32 a	0.06 a	0.02 a	0.21 a	0.04 a	0.09 a	0.07 a	0.02 a	
			3.12 a	0.09 a	0.03 a	0.06 a	2.80 a	2.29 a	0.45 a	0.06 a	0.03 a	0.20 a	0.04 a	0.08 a	0.05 a	0.03 a	
			2.81 a	0.12 a	0.07 a	0.05 a	2.50 a	2.10 a	0.34 a	0.06 a	0.04 a	0.16 a	0.03 a	0.07 a	0.05 a	0.02 a	
Efectos principales																	
Pi		0.5	3.04 a	0.05 b	0.03 b	0.02 b	2.76 a	2.29 a	0.39 a	0.08 a	0.03 a	0.21 a	0.03 a	0.08 a	0.06 a	0.03 a	
			3.00 a	0.10 a	0.05 a	0.04 a	2.68 a	2.25 a	0.37 a	0.06 a	0.03 a	0.19 a	0.03 a	0.08 a	0.06 a	0.02 b	
Phi		0.1	3.20 a	0.06 a	0.03 a	0.02 a	2.91 a	2.46 a	0.36 a	0.09 a	0.03 a	0.21 a	0.03 a	0.08 a	0.07 a	0.03 b	
			3.02 a	0.07 a	0.04 a	0.04 a	2.72 a	2.19 a	0.47 a	0.06 a	0.03 a	0.20 a	0.03 a	0.08 a	0.05 a	0.04 a	
			2.83 a	0.09 a	0.05 a	0.04 a	2.54 a	2.16 a	0.32 a	0.06 a	0.03 a	0.18 a	0.03 a	0.08 a	0.05 a	0.02 b	
Nivel de significancia																	
Pi				ns	**	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**
Phi				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***
Pi *Phi				ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

^z Letras diferentes por factor de estudio e interacciones indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$; *** significancia a $p \leq 0.001$

12.4. CONCLUSIONES

En conclusión en este estudio se pudo observar que las deficiencias de Pi tienen un efecto positivo en la acumulación de algunos flavonoides y GLS, principalmente bajo alta PAR; se observó que bajas PAR tienden a disminuir concentraciones de flavonoides y GLS. Puesto que el Phi no es metabolizado por la planta, sus aplicaciones tienden a incrementar deficiencias de Pi, por lo que favorece el incremento de algunos flavonoides y GLS como posible mecanismo de defensa a estrés.

12.5. LITERATURA CITADA

- Agati, G.; Tattini, M. 2010. Multiple functional roles of flavonoids in photoprotection. *New Phytol.* 186, 786-793.
- Bariola, P. A.; MacIntosh, G. C.; Green, P. J. 1999. Regulation of S-like ribonuclease levels in *Arabidopsis*. Antisense inhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. *Plant Physiol.* 119, 331-342.
- Brown, B. D.; Gibson, R. C.; Geary, B.; Morra, M. J. 2008. Biofumigant biomass, nutrient content, and glucosinolate response to phosphorus. *J. Plant Nutr.* 31, 743-752.
- Chen, X.; Zhu, Z.; Gerendás, J.; Zimmermann, N. 2008. Glucosinolates in *Brassica campestris* vegetables: Chinese cabbage, purple cai-tai, choysum, pakchoi, and turnip. *HortSci.* 43(2), 571-574.
- Ciereszko, I.; Johansson, H.; Kleczkowski, L. A. 2005. Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose and light/dark conditions on gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in *Arabidopsis*. *J. Plant Physiol.* 162, 343-353.
- Cruz, A. P. F. 2009. Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (*Matricaria glutinosa*), matico (*Aristiguetia glutinosa*) y marco (*Ambrosia arborescens*) para neo-fármaco. Tesis de grado. Escuela Superior de Chimborazo. Ecuador.

Capítulo 12

- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F.C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2013. The effects of phosphite on strawberry yield and fruit quality. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 13: 612–620.
- Falovo, C.; Schreiner, M.; Schwarz, D.; Colla, G.; Krumbein, A. 2011. Phytochemical changes induced by different nitrogen supply forms and radiation levels in two leafy *Brassica* species. *J. Agric. Food Chem.* 59, 4198-4207.
- Gliszczynska-Swigzoa, A.; Kazuzewicz, A.; Lemanska, K.; Knaflewski, M.; Tyrakowska, B. 2007. The effect of solar radiation on the flavonol content in broccoli inflorescence. *Food Chem.* 100, 241-245.
- Hammond, J. P.; Broadley, M. R.; White, P. J. 2004. Genetic responses to phosphorus deficiency. *Annals Bot.* 94, 323-332.
- Harbaum, B.; Hubbermans, E. V.; Wolff, C.; Herges, R.; Zhu, Z.; Schwarz, K. 2007. Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi varieties (*Brassica campestris* L. spp. *Chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MSⁿ and NMR and their quantification by HPLC-DAD. *J. Agric. Food Chem.* 55, 8251-8260.
- Harbaum-Piayda, B.; Walter, B.; Bengtsson, G. B.; Hubbermann, E. M.; Bilger, W.; Schwarz, K. 2010. Influence of pre-harvest UV-B irradiation and normal or controlled atmosphere storage on flavonoid and hydroxycinnamic acid contents of pak choi (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *communis*). *Postharv. Biol. Technol.* 56, 202-208.
- Klimov, S. V.; Burakhanova, E. A.; Dubinina, I. M.; Alieva, G. P.; Sal'nikova, E. B.; Olenichenko N. A.; Zagosquina N. V.; Trunova T. I. 2008. Suppression of the source activity affects carbon distribution and frost hardiness of vegetating winter wheat plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 55, 308-314.
- Knekt, A.; Kumpulainen, J.; Jarvinen, R.; Rissanen, H.; Heliovaara, M.; Reunanen, A.; Hakulinen, T.; Aromaa, A. 2002. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am. J. Clin. Nutr.* 76, 560-568.
- Lin, J.; Rexrode, K. M.; Hu, F.; Albert, C. M.; Chae, C. U.; Rimm, E. B.; Stampfer, M. J.; Manson, J. E. 2007. Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *Am. J. Epidemiol.* 165, 1305-1313.

Capítulo 12

- Malusa, E.; Russo, M. A.; Mozzetti, C.; Belligno, A. 2006. Modification of secondary metabolism and flavonoid biosynthesis under phosphate deficiency in bean roots. *J. Plant Nutr.* 29, 245-258.
- Misson, J.; Raghothama, K. G.; Jain, A.; Jouhet, J.; Block, M. A.; Bligny, R.; Ortet, P.; Creff, A.; Somerville, S.; Rollad, N.; Doumas, P.; Nacry, P.; Herrera-Estrella, L.; Nussaume, L.; Thibaud, M. C. 2005. A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *PNAS.* 102, 11934-11939.
- Plate, A.; Gallaher, D. 2006. Effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats. *Carcinogenesis.* 27, 287-292.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schmidt, S.; Zietz, M.; Schreiner, M.; Rohn, S.; Kroh, L. W.; Krumbein, A. 2010. Genotypic and climatic influences on the concentration and composition of flavonoids in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*). *Food Chem.* 119, 1293-1299.
- Schonhof, I.; Blankenburg, D.; Müller, S.; Krumbein, A. 2007. Sulfur and nitrogen supply influence growth, product appearance, and glucosinolate concentration of broccoli. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170, 65-72.
- Stewart, A. J.; Chapman, W.; Jenkins, G.I.; Graham, I.; Martin, T.; Crozier, A. 2001. The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant Cell Environ.* 24, 1189-1197.
- Stoin, D.; Radu, F.; Dogaru, D. 2007. Researches regarding the isolation, purification and analysis of sinigrin glucosinolate from *Brassica nigra* and *Armoracia rusticana*. *Bulletin USAMV-CN.* 63, 77-82.
- Strissel, T.; Halbwirth, H.; Hoyer, U.; Zistler, C.; Stich, K.; Treutter, D. 2005. Growth-promoting nitrogen nutrition affects flavonoid biosynthesis in young apple (*Malus domestica* Borkh.) leaves. *Plant Biol.* 7, 677-685.
- Thao, H.T.B.; Yamakawa, T. 2009. Phosphite (phosphorous acid): Fungicide, fertilizer or biostimulator? *Soil Sci. Plant Nutr.* 55, 228-234.

Capítulo 12

- Ticconi, C.A.; Delatorre, C.A.; Abel, S. 2001. Attenuation of phosphate starvation responses by phosphite in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 127, 963-972.
- Tong, Y.; Gabriel-Neumann, E.; Ngwene, B.; Krumbein, A.; George, E.; Platz, S.; Rohn, S.; Schreiner, M. 2014. Topsoil drying combined with increased sulfur supply leads to enhanced aliphatic glucosinolates in *Brassica juncea* leaves and roots. *Food Chem.* 152, 190-196.
- 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.
- Verkerk, R.; Schreiner, M.; Krumbein, A.; Ciska, E.; Holst, B.; Rowland, I.; De Schrijver, R.; Hansen, M.; Gerh-user, C.; Mithen, R.; Dekker, M. 2009. Glucosinolates in *Brassica* vegetables: The influence of the food supply chain on intake, bioavailability and human health. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, S219-S265.
- Volden, J.; Bengtsson, G. B.; Wicklund, T. 2009. Glucosinolates, L-ascorbic acid, total phenols, anthocyanins, antioxidant capacities and color in cauliflower (*Brassica oleracea* L. ssp. *botrytis*): effects of long-term freezer storage. *Food Chem.* 112, 967-976.
- Walsgrove, R. M.; Bennet, R. N. 1995. The biosynthesis of glucosinolates in *Brassicac*s. In *Amino acids and their derivatives in higher plants*; Wallsgrove, R. M., Ed.; Society for Experimental Biology Seminar 56; University Press. Cambridge. pp. 243-259.
- Williams, R. J.; Spencer, J. P. E.; Rice-Evans, C. 2004. Flavonoids: Antioxidants or signalling molecules? *Free Rad. Biol. Med.* 36, 838-849.
- Wittstock, U.; Halkier, B. A. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends Plant Sci.* 7(6), 263-270.
- Yang, J.; Zhu, Z.; Gerendás, J. 2009. Interactive effects of phosphorus supply and light intensity on glucosinolates in pakchoi (*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis* var. *communis*). *Plant Soil.* 323, 323-333.

CAPÍTULO 13. DIFERENTES FUENTES DE FÓSFORO Y NIVELES DE RADIACIÓN EN MATERIA FRESCA, SECA Y CONCENTRACIÓN NUTRIMENTAL DE DOS ESPECIES DE *Brassica*.

13.1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es uno de los macronutrientes de mayor importancia para las plantas, considerado como el segundo elemento esencial más limitante, después del nitrógeno. El P es principalmente crítico en las etapas tempranas de los cultivos, además mejora el rendimiento (Römer y Schilling, 1986). El P tiene funciones muy importantes en el metabolismo celular, como el transporte energético y constituyente de moléculas energéticas como ADT y ATP (Maschner, 1995). Se reporta al P como uno de los elementos con menor disponibilidad para la planta cuando se aplica en el suelo (Sander *et al.*, 1990; Sander *et al.*, 1991; Mosali *et al.*, 2006; Batten, 1992; Schachtman *et al.* 1998). En suelos ácidos, el P es adsorbido por aluminio y hierro, en suelos con pH de 6 a 6.5 reacciona con magnesio y en suelos alcalinos es adsorbido por carbonato de calcio y se convierte en un elemento no disponible para las plantas (Lindsay *et al.*, 1991). Más del 80% del P presente en el suelo no se encuentra disponible para la planta (Mosali *et al.*, 2006; Batten, 1992; Lindsay *et al.*, 1991).

El P se asimila como fosfato (Pi , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}) por la planta, siendo esta forma indispensable para un buen crecimiento y desarrollo (Ticconi *et al.*, 2001). El fosfito (Phi , H_2PO_3^-) es un isómero del anión Pi en el cual, uno de los oxígenos unidos al átomo de P es reemplazado por hidrógeno (Carswell *et al.*, 1996). Debido a la similitud estructural entre estos aniones y a las propiedades cinéticas de los sistemas de absorción, el Phi es absorbido por transportadores de Pi de alta afinidad a nivel membrana (d'Arcy-Lameta y Bompeix, 1991).

Las plantas superiores no presentan mecanismos selectivos que les permitan discriminar entre especies de P. La deficiencia de Pi en plantas superiores ocasiona el crecimiento radical, incremento de pelos radicales, y alargamiento de las raíces; así como el descenso regulado en la inducción de enzimas tales como la fosfatasa ácida,

Capítulo 13

la fosfoenolpiruvatofosfatasa y la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato orgánico (Carswell *et al.*, 1997). Ticconi *et al.* (2001) demostraron que estas respuestas no son observadas cuando se suministra Phi.

El Phi y Pi tienen una gran similitud en sus estructuras, debido a ello el Phi puede ser absorbido vía transportadores de Pi, y su velocidad de absorción es muy similar. Las diferencias entre Pi y Phi comienzan a verse al final de la traslocación, porque el Phi no puede ser convertido a Pi dentro de la planta y en consecuencia no participa en las rutas bioquímicas, y por ello se observan los efectos negativos de éste sobre el metabolismo vegetal (Varadarajan *et al.*, 2002). Los efectos negativos de Phi en la planta se pueden suprimir suministrando concentraciones suficientes de Pi a la planta, ya que el Phi no interfiere en las reacciones bioquímicas en presencia de Pi (Carswell *et al.*, 1996). El Phi es realmente absorbido por la planta y es móvil en xilema y floema (Varadarajan *et al.*, 2002).

Con base en lo anteriormente mencionado y dado que la respuesta de los cultivos no es la misma a el Phi, esta investigación se planteó como objetivo evaluar el efecto de diferentes concentraciones de fosfato y fosfito adicionadas a la solución nutritiva, sobre materia fresca, seca, número de hojas, área foliar y concentración nutrimental en los cultivos de *Brassica juncea* cv. Red Giant y *Brassica campestris* cv. Mibuna Early cultivados bajo dos intensidades de radiación fotosintéticamente activa (PAR).

13.2. MATERIALES Y MÉTODOS

13.2.1. Material vegetal y condiciones experimentales

Se realizaron dos experimentos en un sistema hidropónico, bajo condiciones de invernadero, en el Leibniz Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau ubicado en Großbeeren, Alemania (13° 20' longitud este y 52° 22' latitud norte) considerando dos niveles medios diarios de PAR: el primer experimento con 29.7 mol m⁻², realizado del 29 de agosto al 23 de septiembre de 2013 y el segundo con 22.2 mol m⁻², del 30 de septiembre al 4 de noviembre 2013. Ambos experimentos se desarrollaron con una temperatura promedio de 17.4 °C, y una humedad relativa promedio de 77 %. Para

Capítulo 13

cada experimento se germinaron semillas de *Brassica juncea* cv. Red Giant y *Brassica campestris* cv. Mibuna Early en cubos de lana de roca, bajo condiciones de invernadero. Después de 22 días de germinadas, plantas de 'Red Giant' y 'Mibuna Early' con 2 y 3 hojas verdaderas respectivamente, fueron trasplantadas en un sistema de solución nutritiva recirculante soportado por canaletas de fibra de vidrio de 7.5 m de largo, teniendo 44 plantas por canaleta siendo la mitad de cada cultivar; la distancia entre plantas fue de 15 cm. Dieciocho canaletas se aleatorizaron dentro del invernadero y cada uno constituyó una repetición, teniendo tres repeticiones por tratamiento y un diseño experimental completamente al azar.

Se condujo un experimento factorial con seis tratamientos resultantes de las combinaciones de los niveles de dos factores de estudio: Pi y Phi. El factor Pi fue ensayado en niveles bajo y medio (0.1 mM y 0.5 mM, respectivamente). El Phi se ensayó en niveles bajo, medio y alto (0.1 mM Phi, 0.5 mM Phi y 2.5 mM Phi, respectivamente). El Pi se obtuvo a partir de ácido fosfórico y el Phi a partir de ácido fosforoso, ambos grado reactivo (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Los demás nutrimentos fueron adicionados a la solución nutritiva en las siguientes concentraciones (mM): NO₃-N 7.82; NH₄-N 0.33; K 3.93; Ca 1.95; Mg 0.77 y S 0.77; la solución nutritiva se complementó con micronutrimentos a las siguientes concentraciones (µM): Fe 40.0; Mn 5.0; Zn 4.0; B 30; Cu 0.5 y Mo 0.5. La conductividad eléctrica se mantuvo en 2 dS m⁻¹ al preparar la solución nutritiva en ambos experimentos y se cambió una vez por semana. El pH se mantuvo entre 5.5 y 6.0 adicionando ácido nítrico 4 N o hidróxido de sodio concentrado según fuera necesario.

13.2.2. Acondicionamiento de las muestras

A madurez comercial (25 y 35 días después del trasplante para experimentos con 29.7 y 22.2 mol m² de radiación fotosintéticamente activa, respectivamente), 10 plantas fueron cosechadas de cada tratamiento y sus repeticiones. La madurez comercial para *B. campestris*, fue definida por la presencia de al menos 49 hojas y para *B. juncea* de 7 a 8 hojas. Las plantas cosechadas, tanto de *B. juncea* como *B. campestris*, fueron pesadas para obtener el peso de materia fresca, posteriormente se tomaron muestras

Capítulo 13

de hojas maduras, y nuevas, para posteriormente obtener el peso de materia seca en cada especie y realizar la determinación de la concentración nutrimental.

Las muestras utilizadas para análisis de nutrimental se secaron en una estufa de secado marca Binder durante 72 h a 70 °C, posterior a ello las muestras se molieron finamente en un molino marca Retsch (F. Kurt Retsch GmbH & Co., Haan, Germany) y se guardaron para su posterior análisis.

13.2.3. Variables evaluadas

13.2.3.1. Materia fresca

Al llegar a madurez comercial, se determinó el peso fresco de vástago, empleando una balanza (Marca Sartorius AG ED2202S, Göttingen, Germany).

13.2.3.2. Materia seca

Se tomaron dos tipos de muestras en cada especie, las primeras muestras para *B. juncea* se tomaron al azar una hoja de cada una de las 10 plantas cosechadas, posteriormente se les cortó y desechó la nervadura central. En *B. campestris*, a las 10 plantas cosechadas se les cortó el peciolo, y posteriormente se tomaron muestras por duplicado de entre 100 y 150 g de cada tratamiento y sus repeticiones. En las segundas muestras se realizó el mismo procedimiento, solo que se utilizaron las hojas completas en ambas especies (sin cortar nervadura central ni peciolo). Para obtener el peso de materia seca en cada especie se colocaron en una estufa de secado (WTC binder, Tutlingen, Germany) durante 72 h a una temperatura de 70 °C, asegurándose de tener un peso constante en el material vegetal. Posteriormente se evaluó el peso de materia seca de vástago en una balanza (Marca Sartorius AG ED2202S, Göttingen, Germany).

13.2.3.3. Número de hojas

En el primer experimento se realizó el conteo de hojas de 9 plantas por tratamiento a cosecha. En el segundo experimento se realizó el conteo de hojas de 9 plantas por tratamiento en cada cultivar, los días 10, 17, 24, 35 después del transplante.

Capítulo 13

13.2.3.4. Área foliar

Utilizando un método no destructivo, se midió el área foliar de 9 plantas por tratamiento, los días 10, 17 y 24 después del trasplante, para ello se midió largo por ancho de hoja y se realizó un ajuste mediante el uso de una ecuación de acuerdo a lo mencionado por Schwarz y Kläring (2001), teniéndose:

$$\text{Área foliar} = a + L^b \times A^c$$

En donde a es una constante de integración, b y c son coeficientes alométricos, L y A es largo y ancho de la hoja, obteniendo el área foliar en $\text{m}^2 \text{planta}^{-1}$.

13.2.3.5. Fotosíntesis, conductancia y transpiración

En el cultivo de 'Mibuna Early' (*B. campestris*) se realizó la medición de fotosíntesis, conductancia y transpiración. En el primer experimento la medición se realizó 4 días antes de la cosecha y para el segundo se realizó siete días después de la cosecha, para lo cual se utilizó un sistema medidor de fotosíntesis portátil (LI-COR LI-6400 Xt system).

13.2.3.6. Concentración nutrimental

Utilizando material vegetal finamente molido y secado en la estufa, se realizó el análisis de N total empleando el método Semimicro-Kjeldahl (Bremner, 1965). La determinación de P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn y B se realizó mediante digestión húmeda del material seco con una mezcla de ácidos perclórico y nítrico (Alcántar y Sandoval, 1999). De los extractos obtenidos se tomó la lectura en un equipo de espectroscopia de emisión atómica de inducción por plasma (ICP-VARIAN 725-ES).

13.2.4. Análisis estadístico

Se realizaron pruebas preliminares de datos, entre ellas la de Shapiro-Wilk y Kolmororov-Smirnov para corroborar que los datos tuvieran una distribución normal y las pruebas de Levene, O'Brien y Bartlet para verificar la homogeneidad de varianzas.

Capítulo 13

Posteriormente se realizó un análisis de varianza (PROC ANOVA) de los datos obtenidos. Los datos se analizaron por separado en cada experimento, utilizando como factores niveles fosfato y niveles de fosfito. Las medias fueron comparadas usando la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05\%$), para lo cual se utilizó el programa estadístico System Analytic Statistical, versión 9.3 (SAS Institute, 2011).

13.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

13.3.1. Materia fresca

El peso de materia fresca en *Brassica campestris* no se vió modificado por la aplicación de tratamientos con Pi y Phi, lo cual se ve reflejado en los resultados del primer experimento (con PAR de 29.7 mol m^{-2}), en donde podemos observar los datos, ya sea analizados por factor (Pi y Phi), o por la interacción de niveles de los factores, no se generó ninguna diferencia estadística significativa, al igual que en el segundo experimento (PAR de 22.2 mol m^{-2}) (Cuadro 1).

En *Brassica juncea* en el experimento con PAR de 29.7 mol m^{-2} (Cuadro 2) no se observaron diferencias estadísticas significativas en resultados de los factores Pi y Phi al analizarlos por separado, o en la interacción de sus niveles. Por otro lado en el experimento con PAR mas baja (22.2 mol m^{-2}) se observó que concentraciones en el factor Pi de 0.5 mM incrementaron significativamente la acumulación de materia fresca. También se observó que concentraciones de Phi de 0.1 mM incrementaron la concentración de materia fresca. Por otro lado, al analizar la información resultante de la interacción de los niveles de los factores Pi y Phi, obtuvimos que la interacción fosfato-fosfito que incrementó el peso de materia fresca, en relación a las demás fue 0.5 mM de Pi con 0.1 mM de Phi (Cuadro 2).

Ávila *et al.* (2012) realizaron aplicaciones foliares de Phi ($40 \mu\text{M}$ de Phi via foliar) afectaron únicamente el crecimiento de vástago en frijol en la etapa de madurez fisiológica cuando se les suministró Pi de manera insuficiente ($40 \text{ mg de P por dm}^{-3}$ de suelo), también observaron que cuando se suministró Pi en suficiencia ($200 \text{ mg de P por dm}^{-3}$ de suelo) no hubo efectos negativos de Phi. Lo cual coincide con los

Capítulo 13

resultados del presente experimento, ya que al aplicarse Pi a la solución nutritiva en niveles de suficiencia no hubo diferencias estadísticas entre nuestros resultados.

Cuadro 1. Pi, Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en peso fresco, peso seco de hojas (PSH), peso seco de hojas sin nervadura central (PSHSN) y número de hojas a cosecha, en plantas de *Brassica campestris*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	PF (g planta ⁻¹)	PSH (%)	PSHSN (%)	Hojas (No. Planta ⁻¹)	
29.7	Efectos simples						
	0.5	0.1	212.44 a ^z	5.07 a	7.53 a	65.00 a	
		0.5	218.18 a	4.93 a	7.63 a	63.33 a	
		2.5	218.86 a	4.90 a	7.43 a	57.43 a	
	0.1	0.1	249.71 a	4.80 a	7.40 a	65.67 a	
		0.5	215.73 a	4.93 a	7.60 a	64.67 a	
		2.5	177.28 a	5.37 a	7.57 a	49.90 a	
	Efectos principales						
	Pi	0.5	216.50 a	4.97 a	7.53 a	61.92 a	
		0.1	214.24 a	5.03 a	7.52 a	60.08 a	
	Phi	0.1	231.08 a	4.93 a	7.47 a	65.33 a	
		0.5	216.96 a	4.93 a	7.62 a	64.00 a	
		2.5	198.07 a	5.13 a	7.50 a	53.67 a	
	Nivel de significancia						
	Pi			ns	ns	ns	ns
	Phi			ns	ns	ns	ns
	Pi *Phi			ns	ns	ns	ns
	22.2	Efectos simples					
0.5		0.1	212.13	4.70	6.27	81.55	
		0.5	224.42	4.57	6.97	82.22	
		2.5	213.71	4.53	6.50	80.44	
0.1		0.1	206.83	4.30	6.67	76.11	
		0.5	210.47	4.50	6.40	77.67	
		2.5	209.66	4.53	6.60	75.78	
Efectos principales							
Pi		0.5	216.75	4.60	6.58	81.41	
		0.1	208.99	4.44	6.56	76.52	
Phi		0.1	209.48	4.50	6.47	78.83	
		0.5	217.45	4.53	6.68	79.95	
		2.5	211.68	4.53	6.55	78.11	
Nivel de significancia							
Pi				ns	ns	ns	ns
Phi				ns	ns	ns	ns
Pi*Phi				ns	ns	ns	ns

^z Letras iguales o sin letras, indican que no hay diferencias estadísticas entre tratamientos, ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; PF, peso fresco.

Capítulo 13

13.3.2. Materia seca

En *Brassica campestris* la materia seca se midió de dos maneras, una fue porcentaje de la materia seca de hojas desde la base y la segunda porcentaje de la materia seca de hojas sin nervadura central, en tal caso las muestras tomadas para ambos muestreos no fueron del mismo tamaño y es por eso que la materia seca sin nervadura central siempre salió mayor. En ambos casos y en ambos experimentos (29.7 mol m⁻² y 22.2 mol m⁻² de PAR) el porcentaje de materia seca no se vió afectado por ninguno de los dos factores (Pi y Phi), ni su interacción (Cuadro 1).

El análisis estadístico realizado en *Brassica juncea* sobre las variables de porcentaje de materia seca en hojas y porcentaje de materia seca en hojas sin nervadura central, para el primer experimento (PAR, 29.7 mol m⁻²) mostró que no hubo diferencias estadísticas significativas por los factores Pi y Phi, ni por su interacción (Cuadro 2). Por otro lado en el segundo experimento (PAR, 22.2 mol m⁻²) mostró diferencias significativas para el factor Phi, encontrando que aplicaciones de 0.1mM de Phi incrementaron el porcentaje de materia seca en hojas sin nervadura central (Cuadro 2).

En experimento realizados en *Brassica rapa*, *Spinacia oleracea* y *Lactuca sativa* observaron que el efecto de aplicaciones de Phi foliar depende del estatus de Pi en la planta y que las plantas con déficit de Pi en el suelo son mas vulnerables a los diferentes tipos de estrés y pueden presentar efectos negativos en su crecimiento después de aplicaciones foliares de Phi (Thao *et al.*, 2008a; Thao *et al.*, 2008b; Thao *et al.*, 2009). En nuestro experimento, no se observaron diferencias estadísticas por los tratamientos de Phi en materia seca.

13.3.3. Número de hojas

El número de hojas por planta a cosecha, no se vió modificado estadísticamente en *Brassica campestris* en ninguno de los dos experimentos (PAR de 29.7 mol m⁻² y 22.2 mol m⁻²), por acción de los factores Pi y Phi, ni por la interacción de sus niveles (Cuadro 1). Aunque lo que si se observó fue la presencia de un número promedio de hojas a cosecha mayor, en el experimento con la menor PAR (22.2 mol m⁻², Cuadro 1). Por otro

Capítulo 13

lado en *Brassica juncea* tampoco se observaron diferencias estadísticas significativas en ninguno de los experimentos y por tanto no se observaron diferencias estadísticas entre niveles de factores, ni sus interacciones, pero a diferencia de *B. campestris*, en *B. juncea* se mantuvo el promedio de hojas por planta entre los dos experimentos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Pi, Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en peso de materia fresca, peso seco de hojas (PSH), peso seco de hojas sin nervadura central (PSHSN) y número de hojas en plantas de *Brassica juncea*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	PF (g planta ⁻¹)	PSH (%)	PSHSN (%)	Hojas (No. Planta ⁻¹)	
29.7	Efectos simples						
	0.5	0.1	145.76 a	5.10 a	6.97 a	8.77 a	
			145.62 a	5.17 a	6.43 a	8.77 a	
			159.39 a	5.07 a	7.33 a	9.57 a	
	0.1	0.1	179.25 a	5.03 a	6.53 a	9.33 a	
			145.82 a	5.10 a	6.70 a	8.57 a	
			141.37 a	5.03 a	6.63 a	9.37 a	
	Efectos principales						
	Pi	0.5		150.26 a	5.11 a	6.91 a	9.03 a
				155.48 a	5.06 a	6.62 a	9.09 a
	Phi		0.1	162.51 a	5.07 a	6.75 a	9.05 a
			0.5	145.72 a	5.13 a	6.57 a	8.67 a
			2.5	150.38 a	5.05 a	6.98 a	9.47 a
	Nivel de significancia						
	Pi			ns	ns	ns	ns
Phi			ns	ns	ns	ns	
Pi *Phi			ns	ns	ns	ns	
22.2	Efectos simples						
	0.5	0.1	147.00 a	4.97 a	7.10 a	9.44 a	
			135.06 ab	4.83 a	6.60 a	9.11 a	
			133.53 ab	4.90 a	6.97 a	9.11 a	
	0.1	0.1	136.53 ab	4.93 a	7.13 a	9.00 a	
			123.95 b	4.90 a	6.67 a	9.56 a	
			101.25 c ^z	5.90 a	6.33 a	8.55 a	
	Efectos principales						
	Pi	0.5		138.53 a	4.90 a	6.89 a	9.22 a
				120.58 b	5.24 a	6.71 a	9.04 a
	Phi		0.1	141.77 a	4.95 a	7.12 a	9.22 a
			0.5	129.51 b	4.87 a	6.63 b	9.33 a
			2.5	117.39 c	5.40 a	6.65 ab	8.83 a
	Nivel de significancia						
	Pi			***	ns	ns	ns
Phi			***	ns	*	ns	
Pi *Phi			*	ns	ns	ns	

^z Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; * significante a $p \leq 0.05$; *** significancia a $p \leq 0.001$; PF, peso fresco.

Capítulo 13

Se realizó un conteo de hojas a través del ciclo de cultivo en *B. juncea* y *B. campestris* en el segundo experimento (con PAR de 22.2 mol m⁻²), en el cual se analizó el efecto de los factores y su interacción sobre el número de hojas en cuatro fechas de muestreo y en los resultados obtenidos se observó que no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos para *B. campestris* (Cuadro 3). Por otro lado en *B. juncea* se observaron diferencias estadísticas significativas en el muestreo del día 17 después del trasplante, obteniendo que aplicaciones de Pi de 0.5 mM en la solución, incrementaron el número de hojas, por otro lado en el factor Phi se observó que aplicaciones de 0.1 mM obtuvieron el mayor número de hojas. En los resultados de la interacción de factores se obtuvo como mejor tratamiento la aplicación de 0.5mM de Pi con 0.1 mM de Phi, lo cual nos indica que bajo condiciones de suficiencia de fósforo en forma de fosfato, el fosfito tiene un buen efecto en esta variable (Cuadro 3).

Cuadro 3. Influencia de la concentración de Pi y Phi en número de hojas en dos especies de *Brassica*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	<i>Brassica juncea</i>				<i>Brassica campestris</i>			
			ddt				ddt			
			10	17	24	35	10	17	24	35
Efectos simples										
22.2	0.5	0.1	4.11 a	5.56 a	7.22 a	9.44 a	6.89 a	10.67 a	19.89 a	81.55 a
		0.5	3.89 a	5.44 ab	7.11 a	9.11 a	7.00 a	11.56 a	30.55 a	82.22 a
		2.5	4.00 a	5.00 ab	6.67 a	9.11 a	7.11 a	11.22 a	22.78 a	80.44 a
	0.1	0.1	4.11 a	5.22 ab	6.89 a	9.00 a	6.56 a	11.89 a	24.45 a	76.11 a
		0.5	4.11 a	4.89 b	6.34 a	9.56 a	7.33 a	11.78 a	22.33 a	77.67 a
		2.5	4.33 a	4.89 b ^z	6.45 a	8.55 a	7.44 a	11.44 a	25.89 a	75.78 a
Efectos principales										
Pi	0.5		4.00 a	5.33 a	7.00 a	9.22 a	7.00 a	11.15 a	24.41 a	81.41 a
	0.1		4.18 a	5.00 b	6.56 a	9.04 a	7.11 a	11.70 a	24.22 a	76.52 a
Phi		0.1	4.11 a	5.39 a	7.06 a	9.22 a	6.72 a	11.28 a	22.17 a	78.83 a
		0.5	4.00 a	5.17 ab	6.72 a	9.33 a	7.17 a	11.67 a	26.44 a	79.95 a
		2.5	4.17 a	4.95 b	6.56 a	8.83 a	7.28 a	11.33 a	24.33 a	78.11 a
Nivel de significancia										
Pi			ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Phi			ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pi *Phi			ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns

^z Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$; PAR, radiación fotosintéticamente activa; ddt, días después del trasplante.

Capítulo 13

Carswell *et al.* (1996) encontró efectos negativos de Phi, que van desde disminución en crecimiento de plantas de *Brassica nigra* desarrolladas bajo cultivo *in vitro*, hasta la muerte. Schroetter *et al.* (2006); mencionan que el peso de materia seca de plantas de maíz con deficiencias de P se vio fuertemente disminuido habiendo diferencias estadísticas significativas al aplicar fosfito. En nuestro experimento siempre se maneja suficiencia de Pi, y con las dosis suministradas no se observaron efectos negativos en número de hojas.

13.3.4. Área foliar

El área foliar se midió en tres fechas después del trasplante (los días 10, 17 y 24), en el segundo experimento (PAR 22.2 mol m⁻²) y al analizar los datos para el caso de *B. juncea* se obtuvo que no hubo efecto de las aplicaciones de tratamientos sobre el área foliar (Cuadro 4). Por otro lado en *B. campestris* en el tercer muestreo (24 ddt) se observaron diferencias estadísticas significativas en las interacciones de niveles de los factores, encontrando que el tratamiento que incrementó el área foliar fue el de la aplicación de 0.5 mM de Pi con 0.5 mM de Phi (Cuadro 4).

Ratjen y Gerendás (2009) observaron una disminución drástica del crecimiento y de materia seca de plantas de calabacita al aplicar al suelo fosfito como fuente de P. De forma similar, Thao *et al.* (2008a) obtuvieron que en plantas de espinaca aplicaciones de diferentes relaciones fosfato-fosfito, causaron una disminución significativa en el peso seco de la planta con respecto al testigo con fosfato, dicho decremento fue mayor a medida que se aumentaba la proporción de fosfito. Los resultados de los experimentos anteriormente mencionados difieren de los nuestros, ya que nosotros no obtuvimos efectos negativos de Phi en área foliar, sino que un tratamiento con 50% de Pi mas 50% de Phi incrementó el área foliar.

Capítulo 13

Cuadro 4. Influencia de la concentración de Pi y Phi en área foliar ($\text{m}^2 \text{planta}^{-1}$) de dos especies de *Brassica*.

PAR (mol m^{-2})	Pi (mM)	Phi (mM)	<i>Brassica juncea</i>			<i>Brassica campestris</i>		
			ddt			ddt		
			10	17	24	10	17	24
Efectos simples								
22.2	0.5	0.1	0.014 a	0.038 a	0.094 a	0.012 a	0.024 a	0.050 b ²
		0.5	0.012 a	0.037 a	0.094 a	0.013 a	0.028 a	0.077 a
		2.5	0.015 a	0.034 a	0.090 a	0.012 a	0.029 a	0.053 ab
	0.1	0.1	0.015 a	0.040 a	0.095 a	0.011 a	0.029 a	0.058 ab
		0.5	0.012 a	0.037 a	0.085 a	0.012 a	0.026 a	0.051 b
		2.5	0.013 a	0.030 a	0.076 a	0.013 a	0.027 a	0.061 ab
Efectos principales								
Pi	0.5		0.014 a	0.036 a	0.092 a	0.012 a	0.027 a	0.060 a
	0.1		0.013 a	0.036 a	0.086 a	0.012 a	0.028 a	0.057 a
Phi		0.1	0.014 a	0.039 a	0.095 a	0.011 a	0.03 a	0.054 a
		0.5	0.012 a	0.037 a	0.090 a	0.013 a	0.027 a	0.064 a
		2.5	0.014 a	0.032 a	0.083 a	0.012 a	0.028 a	0.057 a
Nivel de significancia								
Pi			ns	ns	ns	ns	ns	ns
Phi			ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pi *Phi			ns	ns	ns	ns	ns	**

² Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; ** significativo a $p \leq 0.01$; PAR, radiación fotosintéticamente activa; ddt, días después del trasplante.

13.3.5. Fotosíntesis, conductancia y transpiración

Las plantas de *B. campestris* que tuvieron tratamientos con altas concentraciones de Phi y bajas de Pi, presentaron cierto nivel de toxicidad, fue por ello que se tomó la decisión de medir fotosíntesis y al observar los resultados encontramos que no hubo diferencias estadísticas significativas, en la tasa fotosintética y en la transpiración (Cuadro 5) de los dos experimentos con diferentes niveles de Phi y Phi, realizados en *B. capestris* con dos PAR (29.7 y 22.2 mol m^{-2}).

Por otro lado, al observar los resultados obtenidos de las lecturas de conductancia, observamos que en el experimento con PAR mayor (29.7 mol m^{-2}) no se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, ya sea analizándolos como factor individual o como interacción de niveles de factores (Cuadro 5).

Capítulo 13

Cuadro 5. Pi, Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en fotosíntesis, conductancia y transpiración de *Brassica campestris*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	Tasa fotosintética (mmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹)	Conductancia (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	Transpiración (mmol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹)	
29.7	Efectos simples					
	0.5	0.1	20.356 a	1.444 a	0.005 a	
		0.5	19.413 a	1.525 a	0.005 a	
		2.5	20.080 a	1.723 a	0.005 a	
	0.1	0.1	20.239 a	1.966 a	0.005 a	
		0.5	19.939 a	2.421 a	0.006 a	
		2.5	20.430 a	2.368 a	0.005 a	
	Efectos principales					
	Pi	0.5		19.950 a	1.564 a	0.005 a
		0.1		20.203 a	2.252 a	0.005 a
	Phi		0.1	20.298 a	1.705 a	0.005 a
			0.5	19.676 a	1.973 a	0.005 a
			2.5	20.255 a	2.046 a	0.005 a
	Nivel de significancia					
		Pi		ns	ns	ns
	Phi		ns	ns	ns	
	Pi *Phi		ns	ns	ns	
22.2	Efectos simples					
	0.5	0.1	18.342 a	1.706 a	0.006 a	
		0.5	15.903 a	0.752 b ^z	0.003 a	
		2.5	16.154 a	0.798 b	0.003 a	
	0.1	0.1	15.459 a	1.095 ab	0.012 a	
		0.5	16.450 a	1.020 ab	0.004 a	
		2.5	15.382 a	1.317 ab	0.005 a	
	Efectos principales					
	Pi	0.5		16.800 a	1.085 a	0.004 a
		0.1		15.764 a	1.144 a	0.007 a
	Phi		0.1	16.900 a	1.401 a	0.009 a
			0.5	16.177 a	0.886 b	0.004 a
			2.5	15.768 a	1.057 ab	0.004 a
	Nivel de significancia					
		Pi		ns	ns	ns
	Phi		ns	*	ns	
	Pi *Phi		ns	**	ns	

^z Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$; PAR, radiación fotosintéticamente activa; ddt, días después del trasplante.

Capítulo 13

Sin embargo en el experimento realizado con una menor PAR (22.2 mol m^{-2}) se observó un efecto significativo en el factor Phi, observando que aplicaciones de 0.1 mM de Phi en la solución nutritiva incrementaron significativamente las lecturas de conductancia. De igual manera en la interacción de niveles de los factores Pi por Phi se observaron diferencias significativas, encontrando que el mayor valor de conductancia se obtuvo de la combinación de 0.5 mM de Pi con 0.1 mM de Phi, pero estadísticamente es igual a los tratamientos de 0.1 mM de Pi con 0.1, 0.5 y 2.5 mM de Phi; mientras que los valores mas bajos estadísticamente fueron los observados en las combinaciones de 0.5 mM de Pi con 0.5 y 2.5 mM de Phi (Cuadro 5).

Bojović y Stojanović (2006) mencionan que el P tiene una alta influencia sobre la estabilidad de la molécula de clorofila. Ticconi *et al.* (2001) reportaron en *Arabidopsis* que el Phi de alguna manera altera el color de la hoja, ya que altas concentraciones de Phi dan como resultado hojas de un color verde mas claro. Estrada-Ortiz *et al.* (2011) reportan un incremento en clorofilas a, b y total cuando se aplicó en 30% de P en forma de Phi en el cultivo de fresa, siempre considerando suficiencia de Pi.

13.3.6. Análisis nutrimental

Al observar los resultados de los análisis nutrimentales obtuvimos para el caso de *B. juncea*, se destaca que en el primer experimento (con PAR de 29.7 mol m^{-2}) se observaron diferencias estadísticas significativas en el factor Phi observándose un incremento en la concentración de fósforo al aplicar 2.5 mM de Phi lo cual era de esperarse, mientras que para el factor Pi, se observó también un incremento en la concentración de fósforo con aplicaciones de 0.1 mM de Pi (Cuadro 6). El resto de los nutrimentos tanto macro como micronutrimentos no presentaron diferencias estadísticas significativas en el primer experimento.

En el segundo experimento realizado con *B. juncea* (con PAR de 22.2 mol m^{-2}) a diferencia del primero, no se observaron diferencias estadísticas significativas en macronutrimentos para factores ni para interacciones de niveles, sin embargo en micronutrimentos se observaron diferencias estadísticas significativas para boro,

Capítulo 13

encontrando para el factor Pi, que aplicaciones de 0.1 mM de Pi incrementaron significativamente la concentración de boro en hojas de *B. juncea*, de igual manera en la interacción de factores se observó que los tratamientos con 0.1 mM de Pi se vió incrementada la concentración de boro y en particular en el tratamiento de 0.1 mM de Pi con 2.5 mM de Phi (Cuadro 6).

En el Cuadro 7 observamos los resultados obtenidos en *B. campestris* y se puede ver que en éste cultivo, en el primer ciclo (con PAR de 29.7 mol m⁻²) los factores Pi y Phi así como sus interacciones no influyeron de manera significativa en la concentración de micro y macronutrientos.

Sin embargo en el segundo experimento realizado en *B. campestris* cuando se tuvo una PAR de 22.2 mol m⁻², se observaron diferencias estadísticas significativas para el factor Phi obteniéndose una mayor concentración de fósforo cuando se aplicó 2.5 mM de Phi. Al observar las interacciones de los niveles de los factores Pi por Phi, se observó que la mayor concentración de fósforo se vió al aplicar en la solución nutritiva 0.1 mM de Pi con 2.5 mM de Phi, sin embargo no hubo diferencias significativas con las aplicaciones de 0.5 mM de Pi con 0.1, 0.5 y 2.5 mM de Phi, en el resto de macronutrientos no se detectaron diferencias estadísticas significativas (Cuadro 7). En *B. campestris* no se encontraron diferencias estadísticas significativas para algunos micronutrientos como Fe, Cu y B en el segundo experimento, sin embargo Mn y Zn presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos. En Zn se encontró que para el factor Pi la concentración de 0.1 mM incrementó la concentración de Zn y en el factor Phi la concentración de 2.5 mM fue la que obtuvo mayores concentraciones de Zn; en la interacción de factores, se observó que la combinación de 0.1 mM de Pi con 2.5 mM de Phi incrementó la concentración de Zn significativamente. En Mn se encontró algo opuesto a Zn, ya que concentraciones de 0.5 mM de Pi incrementaron significativamente la concentración de Zn al igual que 0.1 mM de Phi; en la interacción de niveles de factores se observó que la concentración de 0.5 mM de Pi con 0.1, 0.5 y 2.5 mM de Phi incrementaron la concentración de Mn sin haber diferencias estadísticas significativas entre ellas y tampoco con el tratamiento de 0.1 mM de Pi con 0.1 mM de Phi (Cuadro 7).

Capítulo 13

Ávila *et al.* (2012) encontraron que bajo condiciones de suficiencia de P, al adicionar Phi en concentraciones altas en frijol (50 y 100 mg de Phi dm^{-3} de suelo seco), observaron un incremento de N, Ca, Mg, S, B, Zn, Cu, Mn en vástago, mencionan también que en las mismas condiciones pero suministrando bajas concentraciones de Phi (0, 3.125, 6.25, 12.5 y 25 mg de Phi dm^{-3} de suelo seco) no observaron incremento en concentración de nutrimentos. Ratjen y Gerendás (2009) observaron que las aplicaciones de Phi vía fliar incrementaron la concentración de P y K en tejido vegetal.

Capítulo 13

Cuadro 6. Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración nutrimental en vástago de *Brassica juncea*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
			(g kg ⁻¹ PS)						(mg kg ⁻¹ PS)				
Efectos simples													
29.7	0.5	0.1	42.10 a	4.81 a	13.45 a	23.86 a	6.26 a	6.33 a	90.81 a	5.33 a	35.76 a	89.79 a	97.76 a
		0.5	39.66 a	4.36	9.88 a	18.58 a	4.78 a	5.63 a	49.77 a	4.25 a	29.73 a	75.74 a	85.68 a
		2.5	45.34 a	6.02	12.36 a	20.24 a	4.48 a	5.64 a	91.59 a	5.81 a	47.02 a	102.47 a	100.14 a
	0.1	0.1	41.33 a	6.21	12.25 a	24.29 a	5.86 a	5.80 a	146.31 a	6.08 a	36.73 a	88.67 a	91.84 a
		0.5	44.07 a	7.54	10.07 a	21.38 a	5.28 a	5.64 a	131.91 a	5.27 a	34.77 a	89.71 a	93.04 a
		2.5	41.52 a	8.16	12.08 a	24.56 a	4.76 a	5.87 a	131.59 a	5.07 a	42.64 a	125.43 a	101.95 a
Efectos principales													
Pi	0.5		42.37 a	5.06 b ^z	11.90 a	20.90 a	5.17 a	5.87 a	77.39 a	5.13 a	27.51 a	89.34 a	94.53 a
	0.1		42.30 a	7.30 a	11.13 a	23.41 a	5.30 a	5.77 a	136.60 a	5.47 a	38.05 a	101.27 a	95.61 a
Phi		0.1	41.71 a	5.51 b	12.35 a	24.08 a	6.06 a	6.07 a	118.56 a	5.71 a	36.24 a	89.23 a	94.80 a
		0.5	41.86 a	5.95 ab	9.98 a	19.98 a	5.03 a	5.63 a	90.84 a	4.76 a	32.25 a	82.73 a	89.36 a
		2.5	43.43 a	7.09 a	12.22 a	22.40 a	4.62 a	5.76 a	111.59 a	5.44 a	44.83 a	113.95 a	101.04 a
Nivel de significancia													
Pi			ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Phi			ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pi *Phi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Efectos simples													
22.2	0.5	0.1	43.55 a	5.30 a	20.58 a	19.24 a	3.41 a	4.93 a	96.11 a	3.69 a	34.62 a	76.17 a	87.63 c
		0.5	41.17 a	5.40 a	19.59 a	20.87 a	3.84 a	4.88 a	57.45 a	4.41 a	36.42 a	71.24 a	88.86 abc
		2.5	45.69 a	6.66 a	19.55 a	17.83 a	3.47 a	5.57 a	58.65 a	4.61 a	130.34 a	67.97 a	82.37 c
	0.1	0.1	46.39 a	4.78 a	17.42 a	19.71 a	3.51 a	5.79 a	84.79 a	4.30 a	44.21 a	72.20 a	88.49 abc
		0.5	45.58 a	4.89 a	16.02 a	19.17 a	3.63 a	5.12 a	74.16 a	3.45 a	43.13 a	62.32 a	101.82 ab
		2.5	42.79 a	6.76 a	17.11 a	20.27 a	3.66 a	4.87 a	86.34 a	4.49 a	45.60 a	64.27 a	107.12 a
Efectos principales													
Pi	0.5		43.47 a	5.79 a	19.91 a	19.31 a	3.57 a	5.13 a	70.73 a	4.24 a	67.13 a	71.79 a	86.29 b
	0.1		44.92 a	5.47 a	16.85 a	19.71 a	3.60 a	5.26 a	81.76 a	4.08 a	44.31 a	66.26 a	99.15 a
Phi		0.1	44.97 a	5.04 a	19.00 a	19.47 a	3.46 a	5.36 a	90.45 a	3.99 a	39.41 a	74.18 a	88.06 a
		0.5	43.37 a	5.14 a	17.81 a	20.02 a	3.73 a	5.00 a	65.80 a	3.93 a	39.78 a	66.78 a	95.34 a
		2.5	44.24 a	6.71 a	18.33 a	19.05 a	3.56 a	5.22 a	72.50 a	4.55 a	87.97 a	66.12 a	94.75 a
Nivel de significancia													
Pi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**
Phi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pi *Phi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*

^z Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$; *** significante a $p \leq 0.001$; PAR, radiación fotosintéticamente activa; PS, peso seco.

Capítulo 13

Cuadro 7. Influencia de la concentración de Pi y Phi y nivel de radiación fotosintéticamente activa (PAR) en concentración nutrimental en vástago de *Brassica campestris*.

PAR (mol m ⁻²)	Pi (mM)	Phi (mM)	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mn	B
			(g kg ⁻¹ PS)						(mg kg ⁻¹ PS)				
Efectos simples													
29.7	0.5	0.1	41.86 a	4.72 a	9.89 a	29.02 a	5.09 a	6.78 a	91.99 a	3.08 a	32.79 a	113.27 a	80.34 a
		0.5	38.85 a	5.58 a	9.76 a	28.39 a	5.22 a	7.16 a	67.79 a	3.69 a	21.23 a	119.82 a	96.51 a
		2.5	43.72 a	6.78 a	11.40 a	30.34 a	4.66 a	6.46 a	69.54 a	3.87 a	27.07 a	127.38 a	97.91 a
	0.1	0.1	43.37 a	4.57 a	8.02 a	25.32 a	4.11 a	5.86 a	77.08 a	3.03 a	29.24 a	103.39 a	70.37 a
		0.5	40.41 a	5.73 a	9.40 a	25.60 a	4.47 a	6.42 a	114.39 a	4.06 a	47.02 a	114.98 a	90.24 a
		2.5	45.00 a	7.53 a	12.01 a	26.00 a	4.19 a	6.09 a	116.45 a	4.22 a	45.48 a	128.93 a	115.80 a
Efectos principales													
Pi	0.5		41.48 a	5.69 a	10.35 a	29.25 a	4.99 a	6.80 a	76.44 a	3.54 a	27.03 a	120.16 a	91.58 a
	0.1		42.93 a	5.94 a	9.81 a	25.64 a	4.26 a	6.12 a	102.64 a	3.77 a	40.58 a	115.77 a	92.14 a
Phi		0.1	42.62 a	4.64 a	8.95 a	27.17 a	4.60 a	6.32 a	84.54 a	3.05 a	31.02 a	108.33 a	75.35 a
		0.5	39.63 a	5.66 a	9.58 a	27.00 a	4.85 a	6.79 a	91.09 a	3.87 a	34.13 a	117.40 a	93.37 a
		2.5	44.36 a	7.16 a	11.71 a	28.17 a	4.42 a	6.27 a	93.00 a	4.04 a	36.28 a	128.15 a	106.86 a
Nivel de significancia													
Pi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Phi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Pi *Phi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Efectos simples													
22.2	0.5	0.1	52.02 a	5.53 ab	21.95 a	33.48 a	4.44 a	6.63 a	95.77 a	3.48 a	29.23 c	101.46 a	96.64 a
		0.5	46.27 a	5.89 ab	17.80 a	31.33 a	4.11 a	6.53 a	93.76 a	3.98 a	41.45 abc	102.44 a	91.48 a
		2.5	48.47 a	6.26 ab	20.24 a	29.17 a	3.80 a	6.41 a	123.23 a	3.86 a	40.82 bc	84.31 ab	95.02 a
	0.1	0.1	51.84 a	4.32 b	20.64 a	31.34 a	4.10 a	7.12 a	146.57 a	3.58 a	43.58 ab	107.30 a	101.34 a
		0.5	52.42 a	4.68 b	20.24 a	25.10 a	3.43 a	5.99 a	130.61 a	4.14 a	39.93 bc	70.03 b	109.99 a
		2.5	52.30 a	7.45 a	19.62 a	24.34 a	3.35 a	6.07 a	103.38 a	4.10 a	54.79 a	68.63 b	123.20 a
Efectos principales													
Pi	0.5		48.92 a	5.89 a	20.00 a	31.33 a	4.11 a	6.52 a	104.25 a	3.77 a	37.17 b	96.07 a	94.38 a
	0.1		52.19 a	5.48 a	20.17 a	26.93 a	3.63 a	6.39 a	126.85 a	3.94 a	46.10 a	81.99 b	111.51 a
Phi		0.1	51.93 a	4.92 b	21.29 a	32.41 a	4.27 a	6.87 a	121.17 a	3.53 a	36.41 b	104.38 a	98.99 a
		0.5	49.34 a	5.28 b	19.02 a	28.22 a	3.77 a	6.26 a	112.18 a	4.06 a	40.69 ab	86.24 b	100.73 a
		2.5	50.39 a	6.86 a	19.93 a	26.75 a	3.57 a	6.24 a	113.31 a	3.98 a	47.80 a	76.47 b	109.11 a
Nivel de significancia													
Pi			ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	*	ns
Phi			ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	**	ns
Pi *Phi			ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	*	ns

² Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre tratamientos; ns, no significativo; Pi, fosfato; Phi, fosfito; * significante a $p \leq 0.05$; ** significante a $p \leq 0.01$; PAR, radiación fotosintéticamente activa; PS, peso seco.

Capítulo 13

13.4. CONCLUSIONES

En *B. campestris* las relaciones Pi-Phi no afectaron la acumulación de número de hojas, peso de materia fresca y seca.

Aplicaciones de 0.5 mM de Pi con 0.1 mM de Phi incrementan la conductancia bajo una PAR de 22.2 mol m⁻² en *B. campestris*.

Aplicar 0.5 mM de Pi con 0.5 mM de Phi incrementa el área foliar en *B. campestris*.

Aplicaciones de 0.1 mM de Pi con 2.5 mM de Phi incrementa la concentración de Zn en vástago de *B. campestris*.

Relaciones Pi-Phi no afectaron la acumulación de materia seca y número de hojas en *B. juncea*.

Aplicaciones de 0.5 mM de Pi con 0.1 mM de Phi incrementa la materia fresca y número de hojas en el día 17 después del trasplante en *B. juncea* cuando se tiene una PAR de 22.2 mol m⁻².

Concentraciones de Phi de 2.5 mM incrementan la concentración de fósforo en vástago bajo una PAR de 29.7 mol m⁻².

13.5. LITERATURA CITADA

- Ávila, F. W.; Faquin, V.; Ramos, S. J.; Pinheiro, G. L.; Marques, D. J.; da Silva, L. A. K.; Ferreira de Oliveira, N. C.; Ávila, P. A. 2012. Effects of phosphite and phosphate supply in a weathered tropical soil on biomass yield, phosphorus status and nutrient concentrations in common bean. *J. Food, Agric. Environ.* 10(2): 312-317.
- Batten, G. D. 1992. A review of phosphorus efficiency in wheat. *Plant Soil.* 146(1-2): 163-168.
- Bojović, B.; Stojanović, J. 2006. Some wheat leaf characteristics in dependence of fertilization. *K. J. S.* 28: 139-146.

Capítulo 13

- Bremner, J. M. 1965. Total nitrogen. *In: Methods of soil analysis. Part 2. Agronomy 9.* Black, C. A. (ed.). American Society of Agronomy. Madison, WI, USA. pp. 1149-1178.
- Carswell, C.; Grant, B. R.; Theodorou, M. E.; Harris, J.; Niere, J. O.; Plaxton, W. C. 1996. The fungicide phosphonate disrupts the phosphate starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiol.* 110: 105-110.
- Carswell, M. C.; Grant, B. R.; Plaxton, W. C. 1997. Disruption of the phosphate-starvation response of oilseed rape suspension cells by the fungicide phosphonate. *Planta.* 203: 67-74.
- d'Arcy-Lameta, A.; Bompeix, G. 1991. Systemic transport of tritiated phosphonate in tomato plantlets (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Pestic. Sci.* 32: 7-14.
- Estrada-Ortiz, E.; Trejo-Téllez, L. I.; Gómez-Merino, F. C.; Núñez-Escobar, R.; Sandoval-Villa, M. 2011. Biochemical responses in strawberry plants supplying phosphorus in the form of phosphite. *Rev. Chapingo Ser. Hortic.* 17: 129-138.
- Lindsay, W. L.; Vlek, P. L. G.; Chien, S. H. 1989. Phosphate minerals. *In: Minerals in Soil Environment.* (J. B. Dixon and S. B. Weed, Eds.). Soil Science Society of America, Madison, Wis, USA, 2nd edition. pp. 1089-1130.
- Maschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press. London, UK. 2nd edition.
- Mosali, J.; Desta, K.; Teal, R. K.; Freeman, K. W.; Martin, K. L.; Lawles, J. W.; Raun, W. R. 2006. Effect of foliar application of phosphorus on Winter wheat grain yield, phosphorus uptake, and use efficiency. *J. Plant Nutr.* 29(12): 2147-2163.
- Ratjen, A. M.; Gerendás, J. 2009. A critical assessment of the suitability of phosphite as a source of phosphorus. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 821-828.
- Römer, W.; Schilling, G. 1986. Phosphorus requirements of the wheat plant in various stages of its life cycle. *Plant Soil.* 91(2): 221-229.

Capítulo 13

- Sander, D.H.; Penas, E.J.; Eghball, B. 1990. Residual effects of various phosphorus application methods on winter wheat and grain sorghum. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 54(5): 1473-1478.
- Sander, D. H.; Penas, E. J.; Walters, D. T. 1991. Winter wheat phosphorus fertilization as influenced by glacial till and loess soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55(5): 1474-1479.
- SAS Institute Inc. 2011. SAS/STAT Users Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, N. C., USA.
- Schachtman, D.P; Reid, R. J.; Ayling, S.M. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116(2): 447-453.
- Schroetter, S.; Angeles-Wedler, D.; Kreuzig, R.; Schnug, E. 2006. Effects of phosphite on phosphorus supply and growth of corn (*Zea mays*). *Landbauforschu Volk.* 56: 87-99.
- Schwarz, D.; Kläring, H. P. 2001. Allometry to estimate leaf area of tomato. *J. Plant Nutri.* 24: 1291-1309.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Sarr, P. S.; Myint, A. K. 2008a. Effects of phosphite, a reduced form of phosphate, on the growth and phosphorus nutrition of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Soil Sci. Plant Nutr.* 54: 761-768.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K. 2009. Effect of phosphite-phosphate interaction on growth and quality of hydroponic lettuce (*Lactuca sativa*). *J Plant Nutr. Soil Sci.* 172: 378-384.
- Thao, H. T. B.; Yamakawa, T.; Shibata, K.; Sarr, P. S.; Myint, A. K. 2008b. Growth response of komatsuna (*Brassica rapa* var. *Peruviridis*) to root and foliar applications of phosphite. *Plant Soil.* 308: 1-10.
- 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.

CAPÍTULO 14. CONCLUSIONES GENERALES

14.1. Lechuga

14.1.1. Fosfito en la solución nutritiva

El suministro de Phi en la solución nutritiva a una concentración de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$, bajo condiciones de suficiencia de Phi en lechuga, incrementa la actividad antioxidante total, fenoles totales, azúcares totales, aminoácidos libres totales y proteínas solubles totales, sin afectar materia fresca y seca del cultivo. Por el contrario, la adición de Phi en la solución nutritiva ocasionó un efecto negativo en la concentración de ácido ascórbico.

14.1.2. Fosfito vía foliar

Aplicaciones foliares de 0.25% Phi en lechuga, incrementan el peso de materia fresca de bola, de la misma manera incrementa la actividad antioxidante de hojas de lechuga.

La aplicación de Phi foliar en lechuga incrementa la concentración de clorofila a, b y total, obteniendo mejores resultados al asperjar 0.25% de Phi.

La aspersión foliar de Phi a una concentración de 0.75% en lechuga incrementa la concentración de flavonoides totales.

14.2. Acelga

14.2.1. Fosfito en la solución nutritiva

Aplicaciones de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva en acelga, incrementan la actividad antioxidante, la concentración de fenoles totales y clorofila a y total en hojas de acelga.

Capítulo 14

Aplicar cantidades superiores a $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva disminuye la materia fresca de vástago y la materia seca de raíz en acelga. Aplicaciones de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva en acelga disminuyen la materia seca de vástago.

Se observó que aplicaciones de Phi en la solución nutritiva disminuyen la concentración de flavonoides totales y proteínas solubles totales en hojas de acelga.

14.2.2. Fosfito vía foliar

Aplicaciones de 0.25% de Phi vía foliar en acelga incrementan la concentración de aminoácidos libres totales, así como la mayor concentración de N en vástago.

Asperjar concentraciones de 0.50% de Phi en acelga promueve el incremento de concentraciones en actividad antioxidante total, fenoles totales, así como de flavonoides totales.

Concentraciones de 0.75% de Phi vía foliar incrementan la concentración de ácido ascórbico en hojas de acelga.

Aplicaciones de Phi vía foliar superiores a 0.25% en acelga disminuyen la acumulación de materia fresca en vástago, materia seca en raíz, concentración de proteínas solubles totales.

14.3. Col

14.3.1. Fosfito en la solución nutritiva

Aplicaciones de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ en la solución nutritiva, incrementan la concentración de proteínas solubles totales en hojas de col. Así mismo, concentraciones iguales o superiores a $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ en la solución nutritiva, incrementan la actividad antioxidante total, concentración de fenoles totales, ácido ascórbico, azúcares totales en hojas y K en vástago de col.

Capítulo 14

Por otro lado concentraciones iguales o superiores a $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ en la solución nutritiva disminuyen materia fresca en vástago, concentraciones de aminoácidos solubles totales, así como N y Na en raíz y Fe y Mn en vástago.

14.3.2. Fosfito vía foliar

Aplicaciones foliares de Phi en col, incrementan la concentración de ácido ascórbico en hojas.

Aplicaciones de Phi en concentraciones de 0.25% incrementan la concentración de clorofilas a, b y totales.

Al realizar aplicaciones foliares de Phi de 0.50% se incrementa el volumen de raíz y materia fresca y seca de vástago.

La concentración de flavonoides totales, proteínas solubles totales, Fe en vástago y actividad antioxidante en hojas de col se ve disminuida con aplicaciones foliares de Phi.

14.4. Apio

14.4.1. Fosfito en la solución nutritiva

Aplicaciones de $0.25 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi en la solución nutritiva incrementan la concentración de fenoles totales y clorofila b en hojas, así como de P, Fe y Na en vástago de apio, pero disminuyen la concentración de aminoácidos libres totales.

Aplicaciones de Phi en la solución nutritiva de $0.50 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ incrementan la actividad antioxidante total y la concentración de proteínas solubles totales en hojas, así como la concentración de P en vástago de apio, pero al mismo tiempo disminuyen la acumulación de materia fresca y seca, así como la concentración de Ca, Mg, S y Cu de vástago de apio.

Capítulo 14

14.4.2. Fosfito vía foliar

Aplicaciones de 0.25% de Phi vía foliar en apio incrementan la concentración de clorofilas a, b y total en hojas.

Aplicar Phi en concentraciones de 0.50% en apio, incrementan fenoles totales y actividad antioxidante total, pero en cantidades superiores la disminuyen. Mientras que aplicaciones foliares superiores a 0.50% de Phi vía foliar disminuyen el volumen de raíz y materia fresca y seca de vástago, así como fenoles totales en hojas.

Aplicaciones foliares de 0.75% incrementan la concentración de proteínas solubles totales.

De manera general, aplicaciones foliares de Phi en apio incrementan la concentración de azúcares totales en hojas.

14.5. Fuente de fosfito en lechuga

14.5.1. Fosfito en la solución nutritiva

Aplicaciones de Phi en forma de ácido fosforoso en la solución nutritiva en lechuga, incrementan la materia seca de raíz y vástago con respecto a aplicaciones con fosfito de sodio.

Aplicaciones de ácido fosforoso en la solución nutritiva a concentraciones de $1 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi, incrementan la materia seca de raíz, así como la tasa de crecimiento absoluto en el periodo del día 32 a 35 después de la siembra.

Aplicar fosfito de sodio a la solución nutritiva en concentraciones de $0.5 \text{ mol}_c \text{ m}^{-3}$ de Phi, incrementa la tasa de crecimiento relativo y absoluto en el periodo del día 32 a 39 después de la siembra.

Capítulo 14

14.5.2. Fosfito vía foliar

Aplicaciones foliares de ácido fosforoso a una concentración del 2% y un pH de 5, incrementan a concentración de N en raíz y N y Na en vástago.

Aplicaciones foliares de fosfito de sodio al 2% incrementan la concentración de S y Na en vástago.

La fuente y la concentración de Phi, no influyen en materia seca de raíz y vástago, número de hojas, área foliar, lecturas Spad, tasa de crecimiento absoluto y relativo de lechuga.

14.6. *Brassica campestris* cv. Mibuna Early

En *B. campestris* las relaciones Pi-Phi no afectaron la acumulación de número de hojas, peso de materia fresca y seca.

Aplicaciones de 0.5 mM de Pi con 0.1 mM de Phi incrementan la conductancia bajo una PAR de 22.2 mol m⁻².

Aplicar 0.5 mM de Pi con 0.5 mM de Phi incrementa el área foliar.

14.7. *Brassica juncea* cv. Red Giant

En *B. campestris* las relaciones Pi-Phi no afectaron la acumulación de número de hojas, peso de materia fresca y seca.

Aplicaciones de 0.5 mM de Pi con 0.1 mM de Phi incrementan la conductancia bajo una PAR de 22.2 mol m⁻².

Aplicar 0.5 mM de Pi con 0.5 mM de Phi incrementa el área foliar.

Relaciones Pi-Phi no afectaron la acumulación de materia seca y número de hojas en *B. juncea*.

Capítulo 14

Tanto para *B. campestris* como para *B. juncea*, se pudo observar que las deficiencias de Pi tienen un efecto positivo en la acumulación de algunos flavonoides y GLS, principalmente bajo alta PAR; y que bajas PAR tienden a disminuir concentraciones de flavonoides y GLS. Puesto que el Phi no es metabolizado por la planta, sus aplicaciones tienden a incrementar deficiencias de Pi, por lo que favorece el incremento de algunos flavonoides y GLS como posible mecanismo de defensa a estrés.