

INVESTIGACIONES

EXUDACIÓN DE CITRATO Y ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA EN RAÍCES DE LUPINO BLANCO EN RESPUESTA A VARIACIONES EN LA DISPONIBILIDAD DE FÓSFORO¹

Citrate release and activity of phosphoenolpyruvate carboxylase in roots of white lupin in response to varying phosphorus supply

Enrique Peñaloza H.², Nelson Carvajal B.³, Luis J. Corcuera⁴ y José Martínez O.²

ABSTRACT

It has been proposed that one of the functions of the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCase) in the roots of white lupines consists in providing the carbon required to support the significant quantity of citrate that is excreted by P-starved plants. To demonstrate that citrate excretion by roots is an event more sensitive to P concentration than PEPCase, the activity of the enzyme extracted from roots of white lupines growing in soil as well as its activity and citrate release in plants growing in a nutrient solution were measured. PEPCase activity of plants growing in soil at five P treatments (with P added to obtain shoot P ranging from deficient to adequate) varied from 0.22 to 0.18 $\mu\text{mole NADH mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$ for a shoot P of 0.14 to 0.19%, respectively. In a broad range of P concentrations in nutrient solutions (with P added to obtain shoot P ranging from deficient to near toxicity), the enzyme activity and citrate release were reduced to almost undetectable levels when shoot P was increased to 0.7 and 0.5%, respectively. The results indicate that *in vitro* PEPCase activity does not significantly change with the range of shoot P from deficient to adequate, and suggest that the mechanism associated with citrate excretion might be impaired at P concentrations lower than those required to inhibit PEPCase activity

Key words: *Lupinus albus*, phosphorus, citrate, phosphoenolpyruvate carboxylase.

INTRODUCCIÓN

El lupino blanco (*Lupinus albus* L.) es una leguminosa adaptada a suelos ácidos, que ha mostrado un adecuado comportamiento en suelos limitantes en fósforo (P) disponible (Gardner y

Boundy, 1983). Este comportamiento se atribuye a la capacidad de la planta para exudar citrato a través de sus raíces proteoideas (Marschner *et al.*, 1987), cuya presencia y abundancia se correlaciona con la concentración de P en el medio de crecimiento (Gardner *et al.*, 1982). En el suelo, este ácido orgánico favorece la desorción de fosfato retenido en las fracciones lábiles (Gardner *et al.*, 1983) y no lábiles (Braun y Helmke, 1995), dejándolo disponible para su absorción por la planta.

De acuerdo a estudios realizados en *L. albus*, la exudación de citrato puede representar entre el

¹Recepción de originales: 8 de abril de 1999.

²Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación Carillanca, Casilla 58-D, Temuco, Chile. E-mail: epenaloz@carillanca.inia.cl

³Universidad de Concepción, Depto. Biología Celular y Molecular, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

⁴Universidad de Concepción, Depto. Botánica, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

12 y 26% del peso seco de la planta (Gardner *et al.*, 1983 ; Dinkelaker *et al.*, 1989), contrastante con el 0,5% exudado por *Medicago sativa* (Lipton *et al.*, 1987), especie que no produce raíces proteoideas. Sobre la base del rol esencial que cumplirían los ácidos orgánicos en la respuesta de *L. albus* al P, Johnson *et al.* (1994) postularon la existencia de alteraciones en el metabolismo del carbono (C) de raíces proteoideas, que permitirían explicar la significativa cantidad de ácidos exudados por la planta. Sus resultados demostraron que en plantas sometidas a deficiencias de P en el medio de crecimiento, una alta proporción del C exudado provenía de la fijación no fotosintética, y que esta fijación de C se asoció con un aumento en la actividad de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (EC 4.1.1.31) (PEPCasa).

No obstante observarse variaciones en la actividad de la PEPCasa en respuesta a P, los tratamientos utilizados para asociar esta enzima con el metabolismo de los ácidos orgánicos sólo han considerado niveles de deficiencia y suficiencia de P (Johnson *et al.*, 1994, 1996a,b). En tratamientos suficientes en P, la actividad PEPCasa de raíces proteoideas se redujo 23% respecto de los tratamientos deficientes en P, en tanto que las diferencias no fueron significativas al comparar raíces normales (Johnson *et al.*, 1996b). En estos estudios, la concentración de P utilizada prácticamente inhibió la exudación de ácidos orgánicos, lo que sugiere que los mecanismos moleculares asociados con la exudación y/o la formación y función de las raíces proteoideas serían más sensibles a la presencia de P que la actividad PEPCasa.

Con el propósito de demostrar esta hipótesis, en la presente investigación se estudió la relación entre la actividad PEPCasa de raíces y la exudación de ácidos orgánicos en un amplio rango de concentraciones de P externo, utilizando el contenido de P total en la biomasa aérea como indicador del estrés inducido por deficiencias de P en *L. albus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en los invernaderos del Centro Regional de Investigación Carillanca, del Instituto de Investigaciones Agropecuarias, con *L. albus* cv. Victoria Baer, cultivado en suelo y en solución nutritiva. Se utilizaron concentraciones de P externo suficientes para obtener rangos de P en la biomasa aérea fluctuantes entre deficiente y adecuado para *L. albus* cultivado en suelo, así como entre deficiente y cercano a toxicidad para *L. albus* cultivado en solución nutritiva, de acuerdo a los estándares nutricionales definidos para esta especie por Snowball y Robson (1986).

Crecimiento de plantas en suelo

Se utilizó un suelo Andisol de 3 mg kg⁻¹ de P, 12 mg kg⁻¹ de N, 205 mg kg⁻¹ de K, suma de bases de 16,1 meq 100 g suelo⁻¹, capacidad de intercambio catiónico efectiva de 16,5 meq 100 g suelo⁻¹, 0,4% saturación de aluminio, pH (H₂O) de 5,60, y 12% de materia orgánica. La semilla se esterilizó en 80% etanol por 1 min y en 5% NaOCl por 2 min, seguido de 3 lavados con agua destilada. Se sembraron 8 semillas en maceteros de 3,5 kg de suelo, raleando a 2 plantas por macetero posterior a la emergencia. En este ensayo se incorporó *Triticum aestivum* cv. Renaico como testigo de respuesta a P, con el propósito de demostrar la capacidad de adaptación del *L. albus* a suelos muy bajos en P disponible. Los tratamientos consistieron en cinco dosis de P (0; 0,02; 0,04; 0,08 y 0,16 g P kg⁻¹ suelo aplicados como KH₂PO₄), con cuatro repeticiones. Se utilizó una dosis basal de 0,02 g de K kg⁻¹ suelo (aplicado como KCl), y de 0,04 g de N kg⁻¹ suelo (aplicado como NaNO₃). La cosecha se realizó 45 días después de la emergencia (52 días entre siembra y cosecha), evaluándose el peso seco de la biomasa aérea (70 °C x 48 h), el contenido de P total en la biomasa aérea, y la actividad PEPCasa de raíces.

Crecimiento de plantas en solución nutritiva

Se utilizó una solución nutritiva compuesta de 1,0 mM NH_4NO_3 ; 3,0 mM KNO_3 ; 2,0 mM CaCl_2 ; 1,0 mM MgSO_4 ; 12,5 μM H_3BO_3 ; 1,6 μM ZnSO_4 ; 2,0 μM MnSO_4 ; 0,4 μM CuSO_4 ; 0,035 μM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_2$ y 25,0 μM FeEDTA . La solución nutritiva se renovó cada 7 días, ajustándose diariamente el pH a 5,8 y la concentración de P en solución cada 3 días. Los tratamientos de P correspondieron a 0; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,4 mM P en un ensayo de respuesta a P externo, y de 0 y 0,1 mM P en un ensayo de cinética de exudación de ácidos orgánicos. En ambos ensayos, la semilla se esterilizó superficialmente con etanol y NaOCl , y se sembró entre toalla absorbente saturada con agua destilada. Transcurridos 4 días a 22 °C, las plántulas se trasladaron en envases de plástico de 4,5 L de capacidad (cinco plántulas por tratamiento, con tres repeticiones), sostenidas en una plataforma de poliestireno perforada, y mantenidas con aireación permanente. La cosecha se realizó 40 días después del trasplante en el ensayo de respuesta a P externo, y a los 10, 20, 30 y 40 días después del trasplante en el ensayo de cinética de exudación de ácidos. Dependiendo del propósito del ensayo, las mediciones correspondieron a actividad PEPCasa de raíces, exudación de ácidos orgánicos, y contenido de P en la biomasa aérea.

Cuantificación de la actividad PEPCasa

Estudios preliminares permitieron observar la supresión de raíces proteoideas en plantas mantenidas por 40 días en solución nutritiva, con concentraciones de P externo por sobre 0,05 mM. Consecuentemente, la actividad de la enzima PEPCasa se evaluó sólo en raíces normales (no proteoideas), lo que permitió comparar tejidos similares de plantas mantenidas en suelo y en solución nutritiva. La enzima se extrajo a partir de 1,0 g de ápices radicales (0 a 2 cm), macerando el tejido en nitrógeno líquido, y homogeneizándolo con 1,5 mL de tampón de extracción (0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 0,01 M

MgCl_2 ; 0,01 M DTT; 2% PVP y 10% glicerol). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 g por 10 min, utilizando el sobrenadante para la determinación de actividad enzimática y de proteínas totales. La actividad PEPCasa se cuantificó espectrofotométricamente en una reacción acoplada a la enzima malato dehidrogenasa, observando la desaparición del NADH a longitud de onda de 340 nm. La mezcla de reacción se compuso de 0,1 M Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl_2 ; 1×10^4 U L^{-1} de malato dehidrogenasa; 10 mM NaHCO_3 ; 30 mL de extracto y 0,5 mM NADH, en un volumen total de 1,5 mL. La reacción se inició con la adición de 3 mM fosfoenolpiruvato, después de 2 min de agregado el NADH. Las proteínas se precipitaron con ácido tricloroacético y se cuantificaron por el método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albúmina de suero de bovino como estándar.

Extracción y cuantificación de ácidos orgánicos exudados

La exudación de ácidos orgánicos se realizó sólo en plantas mantenidas en solución nutritiva. Previo a la extracción de exudados, las raíces se desinfectaron con una solución compuesta por 0,025 mg mL^{-1} tetraciclina y 0,05 mg mL^{-1} rifampicina por 2 h con el propósito de prevenir contaminación bacteriana (Graham *et al.*, 1981). Las plantas se lavaron con agua estéril y se transfirieron a un matraz de 500 mL conteniendo 0,5 mM CaCl_2 , mantenido con aireación permanente mediante aire filtrado. Transcurrido un período de exudación de 4 h a 25 °C, los exudados radicales se concentraron por liofilización, cuantificándose citrato y malato por métodos enzimáticos. Para la cuantificación de citrato, 2 mL del extracto se incubaron con 1 mL de tampón (0,51 M glicilglicina pH 7,8; 0,6 mM Zn^{2+}), 0,19 mM NADH y una solución compuesta por $3,8 \times 10^3$ U L^{-1} de malato dehidrogenasa y $8,8 \times 10^3$ U L^{-1} de lactato dehidrogenasa. Una vez estabilizadas las lecturas espectrofotométricas (340 nm), la reacción se inició con la adición de $2,7 \times 10^2$ U L^{-1} de citrato liasa, registrándose los cambios de absorbancia debido a la oxidación

del NADH, los que son directamente proporcionales a la concentración de ácido cítrico en la muestra (Boehringer, 1984). Para la determinación de malato, 2 mL del extracto se incubaron con 1 mL de solución tampón (0,6 M glicilglicina, 0,1 M glutamato, pH 10,0), 3,46 mM NAD, y $1,5 \times 10^3 \text{ U L}^{-1}$ de glutamato oxaloacetato transaminasa. Una vez estabilizadas las lecturas espectrofotométricas, la reacción se inició con la adición de $2,2 \times 10^4 \text{ U L}^{-1}$ de malato dehidrogenasa, registrándose los cambios de absorbancia debidos a la reducción del NAD, los que son directamente proporcionales a la concentración de malato en la muestra (Boehringer, 1984).

Análisis estadístico

Se utilizó la desviación estándar para la discriminación de promedios en las determinaciones de P total, actividad enzimática y exudación de ácidos orgánicos. Cuando procedió, las diferencias entre tratamientos se determinaron mediante análisis de varianza, ordenando los tratamientos factorialmente en un diseño completamente al azar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentración de P externo y actividad PEPCasa

El comportamiento del *L. albus* en respuesta a incrementos en la concentración de P, graficado en la Figura 1, permitió confirmar la capacidad de la especie para establecerse y crecer en suelos bajos en P disponible observada por otros autores (Gardner y Boundy, 1983), y demostrar que esta capacidad puede manifestarse incluso en suelos con 3 mg kg^{-1} de P inicial. En este ensayo, la cuantificación del P total en la biomasa aérea indicó que éste fluctuó entre 0,14 y 0,19%, concentraciones que se ubican dentro del rango de P definido como deficiente (0,13%) y adecuado (0,22%) en *L. albus* (Snowball y Robson, 1986). Para estos rangos de P en la biomasa aérea, la actividad específica de la PEPCasa de ápices radicales correspondió a

0,22 y 0,18 $\mu\text{moles NADH mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$, en ausencia de P, y en presencia de 0,16 g P kg^{-1} suelo, respectivamente (Figura 2).

Aun cuando significativas, las variaciones en la actividad de la enzima no mostraron una tendencia que permitiera asociarla con el P externo sugiriendo que, de existir tal relación, ésta debiera encontrarse dentro de un rango más amplio de concentraciones. Una mejor aproximación hacia el estudio de esta relación se obtuvo en ensayos en solución nutritiva, donde las concentraciones de P externo se hicieron variar entre 0 y 0,4 mM. En este tipo de ensayos, la concentración de P total en la biomasa aérea fluctuó entre 0,13 y 1,55% (Figura 3a), lo que permitió cuantificar la actividad enzimática en raíces de plantas mantenidas dentro del rango de concentraciones de P definidas como deficientes, y cercanas a toxicidad en *L. albus* (Snowball y Robson, 1986). En estas condiciones, la máxima actividad de la PEPCasa ocurrió en ausencia de P externo (0,13% de P en la biomasa aérea), y prácticamente se inhibió con una concentración de P externo de 0,1 mM (0,7% de P en la biomasa aérea) (Figura 3b). La magnitud de la respuesta es consistente con la variación en actividad de la enzima observada en raíces normales de plantas mantenidas en suelo (Figura 2), y sugieren que su contribución a la fijación autotrófica de C para la síntesis de ácidos orgánicos no sería alterada significativamente por la concentración de P, dentro de los rangos de P en la biomasa aérea definidos como deficientes (0,13%) y adecuados (0,22%) en *L. albus*.

Si bien no fue posible cuantificar la actividad PEPCasa de raíces proteoideas debido a que éstas no se desarrollaron en todos los tratamientos de P evaluados, lo observado en ápices radicales es consistente con la actividad PEPCasa de raíces proteoideas informada por Johnson *et al.* (1996b) en plantas entre 10 y 23 días después de la emergencia, para concentraciones de P entre 0 y 0,05 mM. Desde un punto de vista funcional, por lo tanto, estos resultados sugieren que la enzima PEPCasa sería modulada de

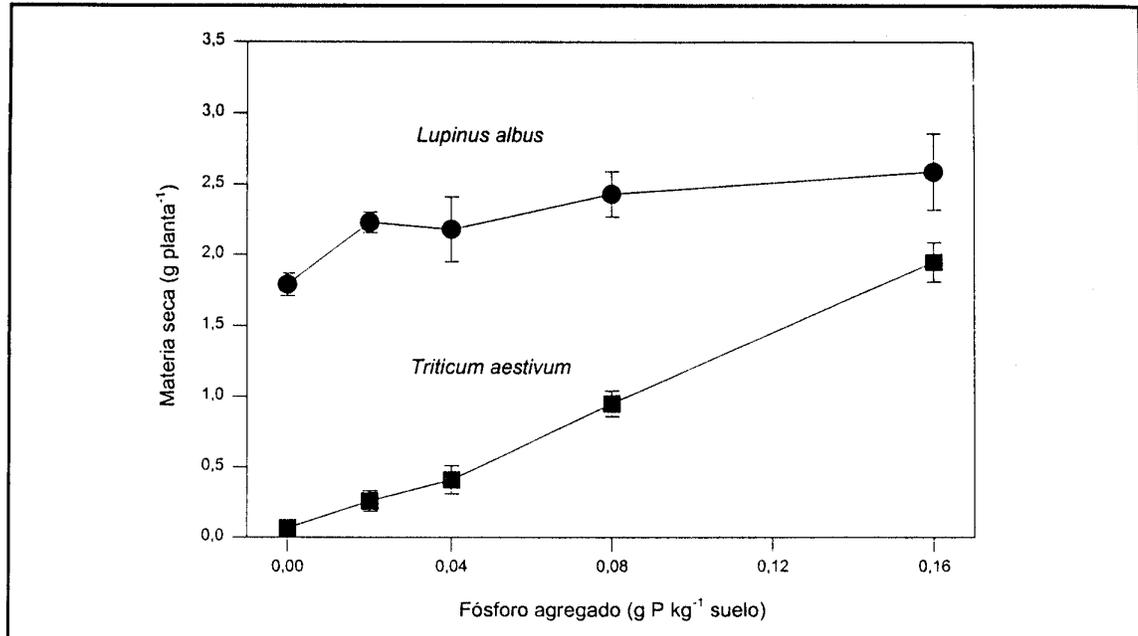


Figura 1. Efecto de la fertilización con fósforo sobre la producción de materia seca por planta en *L. albus* cv. Victoria y *T. aestivum* cv. Renaico, 45 días después de la emergencia. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Figure 1. The effect of P fertilization on the production of plant dry matter of *L. albus* cv. Victoria and *T. aestivum* cv. Renaico, 45 days after emergence. Vertical bars represent the standard deviation.

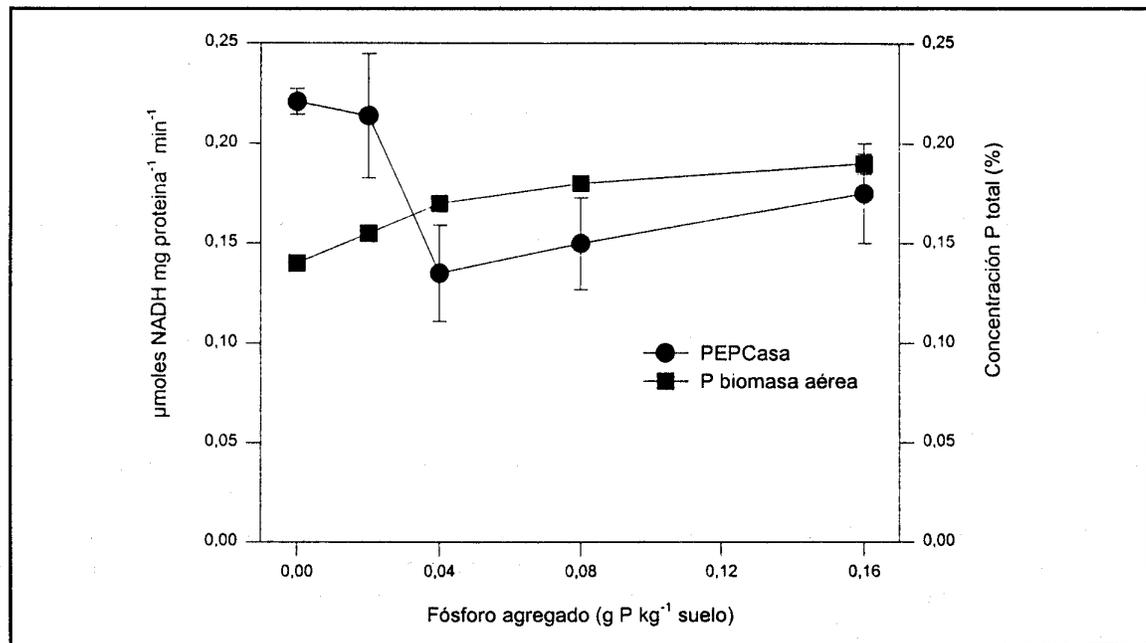


Figura 2. Actividad específica de la enzima PEPCasa y concentración de P total en la biomasa aérea de *L. albus*, en respuesta a la aplicación de P al suelo. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Figure 2. Specific activity of PEPCase and total P concentration in the shoot as affected by different soil P treatments in *L. albus*. Vertical bars represent the standard deviation.

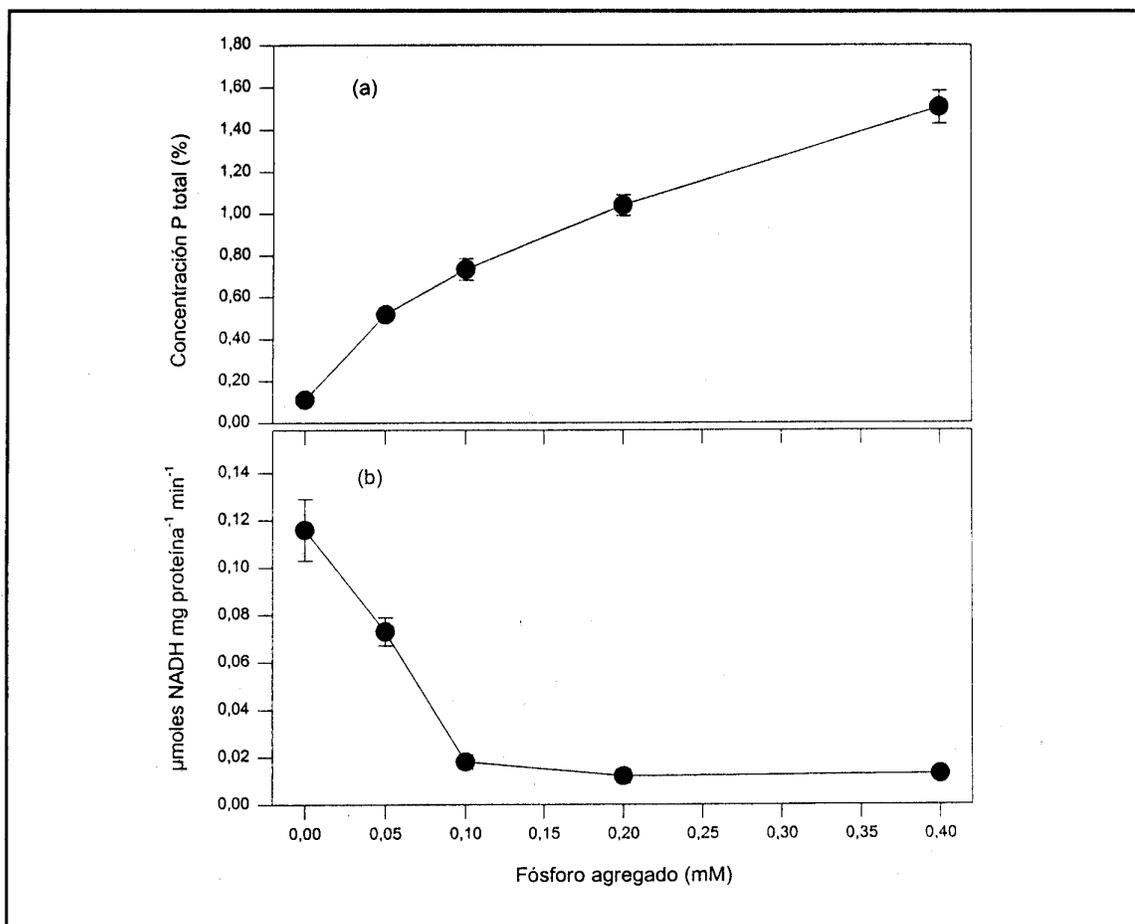


Figura 3. Concentración de P total en la biomasa aérea (a) y actividad específica de la enzima PEPCasa (b) en *L. albus* mantenido en diferentes concentraciones de P en solución nutritiva. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Figure 3. Total P concentration in the shoot (a) and specific activity of PEPCase (b) in *L. albus* maintained at different P concentrations in nutrient solution. Vertical bars represent the standard deviation.

manera similar por P, tanto en ápices radicales como en raíces proteoideas de *L. albus*.

Concentración de P externo y exudación de citrato

La exudación radical de citrato representa una de las principales estrategias adaptativas utilizadas por el *L. albus* para acceder al P retenido en el suelo. Aun cuando las evidencias señalan que la exudación se reduce a niveles basales en plantas regadas con una solución nutritiva conteniendo 0,5 mM de P (Johnson *et al.*, 1996b),

se desconoce el contenido de P foliar equivalente a esta concentración, así como la concentración mínima requerida para inhibir el proceso. Cuando se evaluó la exudación de citrato en respuesta a concentraciones de P externo fluctuantes entre 0 y 0,4 mM, se observó que la máxima exudación de citrato ocurrió en ausencia de P externo, y prácticamente se inhibió al incrementar la concentración de P externo desde 0 a 0,05 mM (Figura 4). Esta concentración de P externo se correspondió con un contenido de P total en la biomasa aérea de 0,55%, indicando que la exudación de citrato sería inhibida con concentra-

ciones de P externo inferiores a 0,05 mM en solución nutritiva, o en plantas con un contenido de P total en la biomasa aérea menores a 0,55%. Si bien no se dispone de observaciones entre 0 y 0,05 mM de P externo que permitan precisar esta concentración, el examen visual del sistema radical al término de la experiencia evidenció la ausencia de raíces proteoideas en concentraciones de P de 0,05 mM, antecedente que permitiría asociar el citrato exudado con la presencia de raíces proteoideas, de reconocida función en la excreción de citrato.

El citrato exudado mostró una tendencia similar a lo observado en la actividad de la PEPCasa en respuesta a incrementos en la concentración de P externo (Figura 3b). Comparado con las variaciones en actividad de la enzima, sin embargo, la exudación de citrato prácticamente se inhibió en plantas mantenidas en 0,05 mM de P externo (Figura 4), concentración que provocó sólo el 38% de reducción en la actividad de la enzima

(Figura 3b). Estos resultados permiten indicar que la exudación de citrato en *L. Albus*, estaría regulada por un mecanismo más sensible a la presencia de P externo o interno, que aquel asociado con la regulación de la PEPCasa de raíces.

Cinética de exudación de ácidos orgánicos

Ensayos dirigidos a determinar la cinética de exudación de ácidos orgánicos durante los primeros 40 días después del trasplante permitieron observar que, en ausencia de P, la exudación comenzó a ser detectable a partir de los 10 días, y aumentó significativamente sobre los 20 días después del trasplante, período que coincidió con la aparición de raíces proteoideas en la planta. Al término de esta experiencia, plantas mantenidas en ausencia de P exudaron 10 veces más citrato que aquellas mantenidas con 0,1 mM de P (Figura 5), tendencia consistente con lo observado por Johnson *et al.* (1996a), y que confirma la importancia de las raíces proteoideas

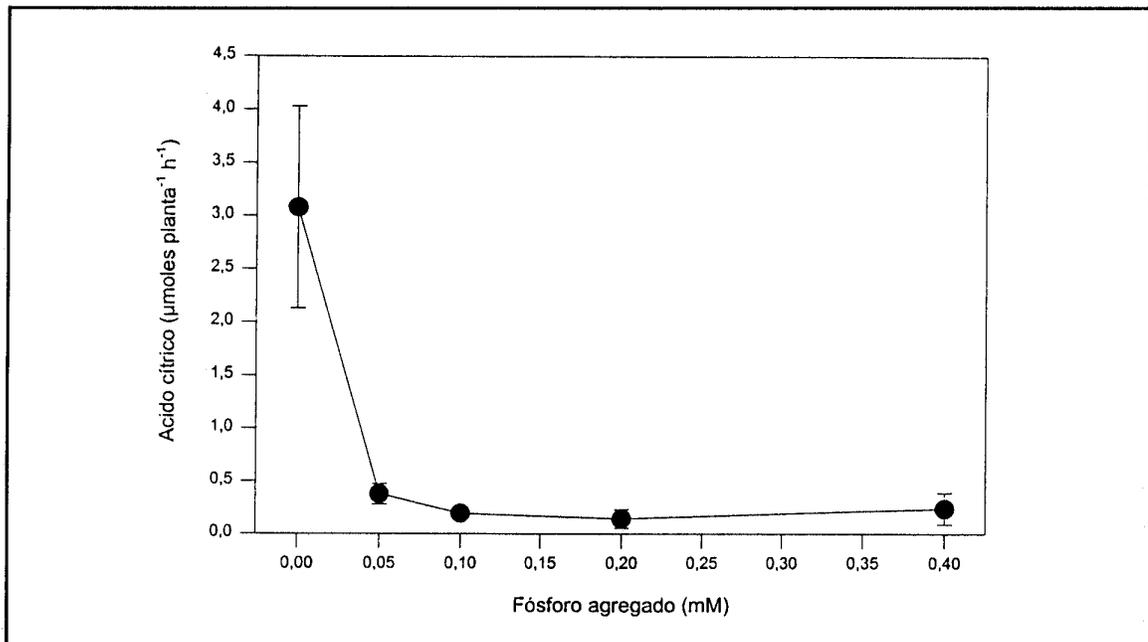


Figura 4. Exudación de citrato (expresado como ácido cítrico) por raíces de *L. albus* mantenido en diferentes concentraciones de P en solución nutritiva durante 40 días. Las barras verticales representan la desviación estándar.

Figure 4. Citrate (expressed as citric acid) exuded from the roots of *L. albus* maintained at different P concentrations in nutrient solution for 40 days. Vertical bars represent the standard deviation.

como estructuras especializadas en la exudación de citrato en la rizósfera. Sin embargo, la cinética de la exudación de citrato mostró una tendencia similar a la acumulación de biomasa radical a través del tiempo (datos no presentados), sugiriendo la posibilidad que otros tejidos de la raíz, como los ápices radicales, puedan estar también contribuyendo a la exudación.

Las cantidades de malato exudado por raíces de lupino mantenidas en ausencia de P representaron el 75, 64, 13 y 4% del citrato exudado, a los 10, 20, 30 y 40 días después del trasplante, y no difirieron significativamente de plantas mantenidas en presencia de P. Estos resultados contrastan con los informados por Johnson *et al.* (1996b), quienes detectaron la presencia de malato y succinato como contribuyentes adicionales a la exudación. Independiente de estas discrepancias, la función del malato en la desorción de P retenido en la fracción inorgánica del suelo parece ser cuestionable, sobre la base de los

resultados informados por Jones y Darrah (1994) en una amplia gama de suelos, en tanto que el succinato (no cuantificado en este estudio) no cumpliría ningún rol como agente de desorción de P (Struthers y Sieling, 1959).

Evaluaciones preliminares sobre la distribución del P total en tejidos foliares y radicales de plantas mantenidas en ausencia de P indican que el contenido de P foliar comienza a reducirse por bajo la concentración estimada como adecuada, a partir de los 10 días después del trasplante, y alcanza niveles de deficiencia a los 30 días, en ambos tejidos. Si bien esta tendencia es consistente con la aparición de raíces proteoideas, y con la detección de exudados (Figura 5), las concentraciones de P representan un promedio de diferentes tejidos, entre los que se incluyen aquellos asociados con la exudación de ácidos orgánicos, como las raíces proteoideas, y probablemente los ápices radicales. Consecuentemente, una mejor aproximación para explicar

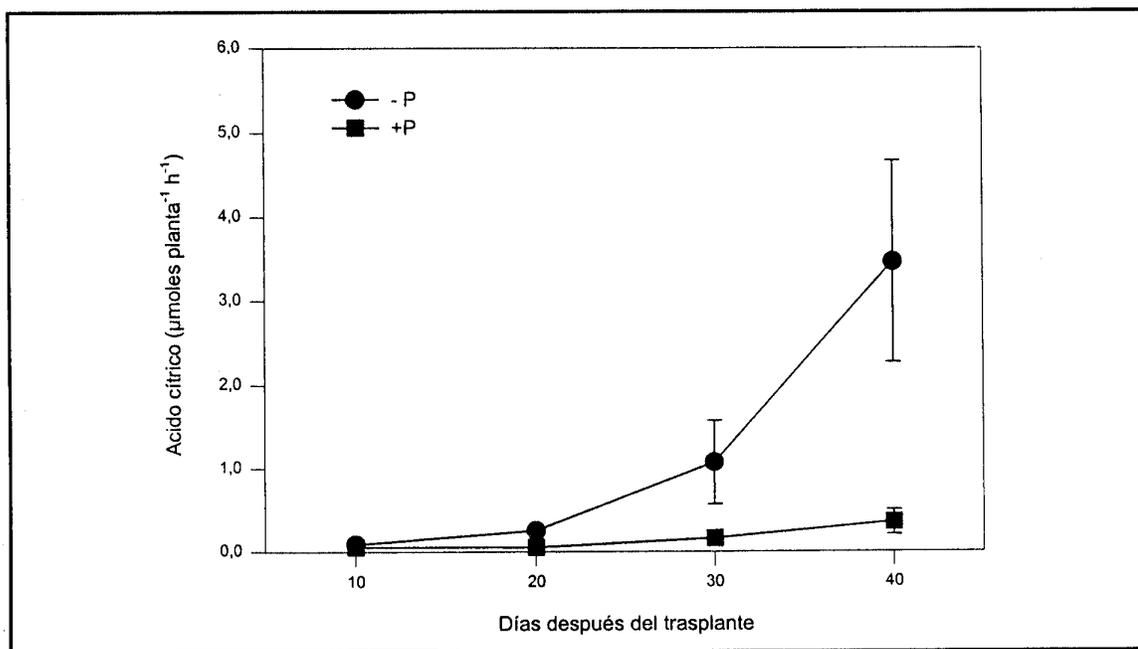


Figura 5. Exudación de citrato (expresado como ácido cítrico) por raíces de *L. albus* mantenido en solución nutritiva en ausencia de P (-P), y en presencia de 0,10 mM P (+P). Las barras verticales representan la desviación estándar.
 Figure 5. Citrate (expressed as citric acid) exuded from the roots of *L. albus* maintained in nutrient solutions without P (-P) and with 0.10 mM P (+P). Vertical bars represent the standard deviation.

el rol directo o indirecto del P en el metabolismo de plantas sometidas a deficiencias de P debiera obtenerse mediante estudios que permitan cuantificar su compartimentalización en la raíz, y asociarlo con los cambios que ocurran en la exudación de citrato, o en la actividad de la enzima PEPCasa.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados de esta investigación, los cambios de mayor magnitud observados en respuesta a variaciones en la concentración de P externo ocurrieron entre 0 y 0,05 mM

en la exudación de citrato, y entre 0 y 0,1 mM en la actividad específica de la enzima PEPCasa de raíces. Las determinaciones de actividad *in vitro* indican que la PEPCasa no sería significativamente modulada por el P interno al menos dentro del rango de P total definido como deficiente a adecuado. Dentro de este rango, sin embargo, el P externo o interno desempeñaría un rol importante en la regulación del mecanismo de exudación de citrato ya sea alterando procesos moleculares asociados, o la producción de raíces proteoideas, especializadas en la síntesis y excreción de ácidos orgánicos.

RESUMEN

Se ha propuesto que una de las funciones de la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPCasa) de raíces de lupino blanco (*Lupinus albus*) consiste en proveer del carbono requerido para soportar la significativa cantidad de citrato que es exudado por plantas sometidas a deficiencias de P. Con el propósito de demostrar que la excreción de citrato es un evento más sensible a la concentración de P que la PEPCasa, se cuantificó la actividad de la enzima en lupino blanco mantenido en suelo, así como su actividad y exudación de citrato en plantas mantenidas en solución nutritiva. La actividad PEPCasa de plantas mantenidas en suelo (con P agregado para obtener concentraciones de P en la biomasa aérea fluctuante entre deficiente y adecuado) varió entre 0,22 y 0,18 $\mu\text{moles NADH mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$, para concentraciones de P en la biomasa aérea de 0,14 y 0,19%, respectivamente. En un rango más amplio de concentraciones de

P en solución nutritiva (con P agregado para obtener concentraciones de P en la biomasa aérea entre deficiente y cercano a toxicidad), la actividad de la enzima y la exudación de citrato se redujeron a niveles casi no detectables, cuando las concentraciones de P en la biomasa aérea se elevaron a 0,7 y 0,5%, respectivamente. Estos resultados indican que la actividad PEPCasa *in vitro* no se alteró significativamente en plantas mantenidas con concentraciones de P en la biomasa aérea entre deficiente a adecuado, y sugieren que el mecanismo asociado con la excreción de citrato sería inhibido por concentraciones de P inferiores a aquellas requeridas para inhibir la actividad de la enzima PEPCasa.

Palabras claves: *Lupinus albus*, fósforo, citrato, fosfoenolpiruvato carboxilasa.

LITERATURA CITADA

BOEHRINGER. 1984. Boehringer Mannheim GmbH. Methods of Enzymatic Food Analysis Using Single Reagents. Mannheim, W. Germany, 79 p.

BRAUM, S. M. AND HELMKE, P. A. 1995. White lupin utilizes soil phosphorus that is unavailable to soybean. *Plant and Soil* 176: 95-100.

- DINKELAKER, B.; RÖMHELD, V. AND MARSCHNER, H. 1989. Citric acid excretion and precipitation of calcium citrate in the rhizosphere of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant Cell Environ.* 12: 285-292.
- GARDNER W. K.; PARBERY, D. G. AND BARBER, D. A. 1982. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. II. The effect of varying phosphorus supply and soil type on some characteristics of the soil/root interface. *Plant and Soil* 68: 33-41.
- GARDNER, W. K.; BARBER, D. A. AND PARBERY, D. G. 1983. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. III. The probable mechanism by which phosphorus movement in the soil/root interface is enhanced. *Plant and Soil* 70: 107-124.
- GARDNER, W. K. AND BOUNDY, K. 1983. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. IV. The effect of interplanting wheat and white lupin on the growth and mineral composition of the two species. *Plant and Soil* 70: 391-402.
- GRAHAM, J. H.; LEONARD, R. T. AND MENGE, J. A. 1981. Membrane-mediated decrease in root exudate of *Cicer arietinum* L. *Plant Physiol.* 68: 548-552.
- JOHNSON, J. F.; ALLAN, D. L. AND VANCE, C. P. 1994. Phosphorus stress-induced proteoid roots shows altered metabolism in *Lupinus albus*. *Plant Physiol.* 104: 657-665.
- JOHNSON, J. F.; ALLAN, D. L.; VANCE, C. P. AND WEIBLEN, G. 1996a. Root carbon dioxide fixation by phosphorus-deficient *Lupinus albus*. Contribution to organic acid exudation by proteoid roots. *Plant Physiol.* 112: 19-30.
- JOHNSON, J. F.; VANCE, C. P. AND ALLAN, D. L. 1996b. Phosphorus deficiency in *Lupinus albus*. Altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Physiol.* 112: 31-41.
- JONES, D. L. AND DARRAH, P. R. 1994. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant and Soil* 166: 247-257.
- LIPTON, D. S.; BLANCHAR, R. W. AND BLEVINS, D. G. 1987. Citrate, malate and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiol.* 85: 315-317.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. AND RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V. AND ÇAKMAK, I. 1987. Root-induced changes of nutrient availability in the rhizosphere. *J. Plant Nutr.* 10(9-16): 1175-1184.
- SNOWBALL, K. AND ROBSON, A. D. 1986. Symptoms of Nutrient Deficiencies: Lupins. *Netherlands, Western Australia. University of Western Australia.* 83 p.
- STRUTHERS, P. H. AND SIELING, D. H. 1959. Effects of organic anions on phosphate precipitation by iron and aluminum as influenced by pH. *Soil Sci.* 69: 205-213.