



Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

**TRABAJO FINAL DE CARRERA**  
**“PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA**  
**EFICIENCIA DEL USO DE FÓSFORO EN PLANTAS DE TRIGO”**

**Alumno:** Gustavo Hernán Recatume Aquino

**Legajo:** 24508/6

**Directora:** Dra. Agustina Buet

**Co-directora:** Dra. Marcela Simontacchi

Fecha de entrega: 17/08/2016

## Tabla de contenidos

<b>Resumen</b> .....	3
<b>1. Introducción</b> .....	4
1.1. El fósforo y su rol como nutriente .....	4
1.2. El fósforo en el suelo.....	4
1.3. Fósforo en suelo y disponibilidad para las plantas .....	5
1.4. El óxido nítrico (NO) y sus funciones en las plantas.....	7
1.5. Hipótesis .....	9
1.5.1. Objetivo general .....	10
1.5.2. Objetivos particulares.....	10
<b>2. Materiales y métodos</b>	
2.1. Material vegetal y tratamientos.....	11
2.1.1. Germinación.....	11
2.1.2. Condiciones de la cámara de cultivo .....	12
2.1.3. Solución nutritiva .....	13
2.1.4. Tratamientos .....	13
2.1.5. Síntesis del dador de NO, S-nitrosoglutatión (GSNO) .....	15
2.2. Determinación del número de hojas y macollo .....	16
2.3. Cosecha.....	16
2.4. Evaluación de cambios en la arquitectura de la raíz.....	17
2.5. Determinación de la concentración de P en órganos .....	17
2.6. Evaluación de la eficiencia del uso de P.....	18
2.7. Análisis estadístico.....	19
<b>3. Resultados</b>	
3.1. Efecto de la aplicación de NO sobre el crecimiento en plantas de trigo con deficiencia de P.....	20
3.2. Análisis de la arquitectura de la raíz en plantas deficientes en P: efecto del NO exógeno .....	22
3.3. Efecto de la aplicación NO sobre la concentración de P en raíz y vástago de plantas de trigo con restricción de P .....	24
3.4. Acumulación porcentual de P en vástago, hoja 1, hoja 2 y hoja 5 .....	25
3.5. Índices de eficiencia en el uso del P y productividad acumulada.....	27
<b>4. Discusión</b> .....	29
<b>5. Conclusiones</b> .....	32
<b>6. Referencias bibliográficas</b> .....	33

## Resumen

El fósforo (P) es un macronutriente y su deficiencia afecta marcadamente la productividad de los cultivos. El uso de fertilizantes conteniendo P, además de su costo, impacta negativamente sobre el medio ambiente. Actualmente se busca conocer en detalle los procesos que regulan la absorción, distribución y eficiencia de uso de este nutriente a fin de optimizar su aplicación. Por otra parte, las especies activas del oxígeno y del nitrógeno participan en la percepción por parte de las plantas de cambios en el entorno, incluyendo alteraciones en la disponibilidad de nutrientes minerales. El objetivo de este trabajo fue analizar el papel del óxido nítrico (NO) en aspectos relacionados a la utilización de P por plantas de trigo. Los resultados obtenidos indican que el NO afecta el crecimiento de las plantas en etapas tempranas de deficiencia de P, así como la arquitectura de la raíz. La partición de P entre vástago y raíz, y la redistribución entre hojas también resultó afectada por la presencia de NO en el medio de cultivo de las plantas. En todos los casos el NO disminuyó los indicadores de eficiencia de uso de P y productividad acumulada en las condiciones experimentales ensayadas. Es probable que en situaciones de reducción de la disponibilidad de P se pongan en marcha otros mecanismos a los observados en este trabajo, realizado en condiciones de restricción total de P.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. El fósforo y su rol como nutriente

El fósforo (P) es uno de los 17 elementos esenciales en la nutrición de las plantas. Éste, junto con el nitrógeno, potasio, azufre, calcio y magnesio forman parte del grupo de los seis elementos considerados macronutrientes, denominados así a causa de su mayor concentración en los tejidos y de la alta demanda por parte de la planta para su crecimiento y desarrollo. (Azcón-Bieto, 2000, cap. 6)

La productividad de los cultivos resulta particularmente afectada por la disponibilidad de fósforo (P) a nivel mundial. Una estrategia para contrarrestar las pérdidas en el rendimiento radica en tratar de mejorar la productividad por unidad de P adquirido por las plantas (eficiencia en el uso de P). Aún plantas con bajo contenido de P, pueden modificar la distribución de este elemento entre sus órganos, permitiendo un crecimiento máximo y una distribución de biomasa de manera de mantener el rendimiento de las partes cosechables (Azcón-Bieto., 2000, cap. 6).

El ión fosfato es la forma disponible de P para las plantas, y se absorbe preferentemente como  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  en suelos con un pH inferior a 7 y como anión divalente  $\text{HPO}_4^{2-}$ , en suelos básicos, con pH por encima de 7. A diferencia de lo que sucede con nitrógeno y azufre, el P no se encuentra en forma reducida en las plantas, sino que permanece como fosfato ya sea en forma libre o como compuestos orgánicos, principalmente como éster fosfórico con grupos hidroxilos, o formando enlaces anhídridos de alta energía, como es el caso del ATP o del ADP. Desempeña por lo tanto un papel clave en la fotosíntesis, la respiración y en todo el metabolismo energético. También forma parte de macromoléculas y estructuras celulares, como es el caso de los enlaces diésteres presentes en los ácidos nucleicos y en los fosfolípidos, los cuales son fundamentales en la estructura de las membranas biológicas (Azcón-Bieto., 2000, cap. 6).

Una fracción importante del fosfato en la planta se encuentra en forma iónica libre (Pi), la cual se encuentra principalmente en las vacuolas (75 %) y en el

citósol. Las formas esterificadas de P están constituidas principalmente por los ácidos nucleicos, fosfolípidos, metabolitos fosforilados de bajo peso molecular y proteínas fosforiladas (Veneklaas y col., 2012).

El fosfato se redistribuye fácilmente en la mayoría de las plantas de un órgano a otro, acumulándose en las hojas jóvenes, flores y semillas en desarrollo; en consecuencia los síntomas de deficiencia se presentan primero en hojas adultas. Los síntomas de deficiencia de P en plantas incluyen la reducción del crecimiento y aparición de coloración verde oscuro. En algunas especies es evidente la formación de antocianinas, otorgándoles a las hojas una coloración púrpura. Ante una situación de deficiencia, el reemplazo de fosfolípidos por sulfolípidos y galactolípidos, así como la reducción del RNA ribosomal constituyen mecanismos que permiten un mejor uso del P (Tachibana, 1987). El P es removilizado desde las hojas senescentes hacia los tejidos en desarrollo y hacia las semillas, en coincidencia con la activación de numerosos genes (Robinson y col., 2012). La madurez se ve retardada en comparación con las plantas que presentan deficiencias de P aunque en muchas especies, es la relación de P y N la que regula la maduración: el exceso de N la retarda y la abundancia de P la acelera (Azcón-Bieto, 2000, cap. 6)

## 1.2. El fósforo en el suelo

El contenido de P total en el suelo es relativamente bajo. En suelos minerales de áreas templadas, la concentración oscila alrededor de un promedio de 0,05% (500 ppm). En nuestro país se han registrados valores variables del contenido de este elemento. Morras (1996) consignó cifras de entre 120-1200 ppm para suelos de la región pampeana. En general las grandes variaciones del contenido de P total se deben a la variabilidad de las rocas parentales, al desarrollo de los suelos y a otras condiciones edafológicas y ecológicas.

La mayor parte del P en las rocas está como apatita, siendo ésta un componente minoritario. La meteorización de la apatita es muy lenta y es considerada prácticamente un resistato (Ollier & Brown, 1975). La literatura cita tasas de mineralización inferiores a 1 kg/ha/año (Gardner, 1990, Walker & Syers 1976).

También el contenido de P total parece estar ligado al contenido de materia orgánica del suelo. En suelos de América Central se comprobó que a un aumento en la materia orgánica le corresponde un incremento de P orgánico y este hecho deriva en un aumento del P total. Para interpretar esto se debe tener en cuenta que en estos suelos la relación P orgánico/P total es elevada (Gardner, 1990; Walker & Syers 1976).

### 1.3. Fósforo en suelo y disponibilidad para las plantas

La principal forma en que el P llega a la raíces de las plantas es por difusión (movimiento por gradientes de concentración) y en menor proporción por flujo masal e interceptación radical. Los factores que afectan la disponibilidad del P en el suelo son el contenido de P total en el material original del suelo, contenido de materia orgánica, tipo y cantidad de arcilla, temperatura, pH, contenido de agua en el suelo (Conti, 2000) (Fig. 1.1).

- **P total:** a mayor riqueza de P en el material original, dependiendo de las condiciones de meteorización de la región (precipitaciones y temperatura), mayor será la disponibilidad de este nutriente en el suelo
- **Materia Orgánica:** la descomposición y mineralización de la materia orgánica, determina la liberación de importantes cantidades de P disponible, por lo que la cantidad de materia orgánica del suelo debe ser preservada como reservorio del mismo.
- **Arcilla:** el tipo y cantidad de arcilla que contenga el suelo hace que tenga mayor facilidad para adsorber fosfatos. Cuanto mayor sea el contenido de arcillas y óxidos menor será la disponibilidad de P para las plantas.
- **Temperatura:** a mayor temperatura mayor disponibilidad de P, dado por el aumento de la energía en las reacciones.
- **Agua:** participa aumentando su solubilidad y absorción, este hecho es más notorio en suelos deficientes de P que en suelos bien provistos
- **pH:** el pH del suelo determina la proporción de fosfatos mono y di-ácidos en la solución del suelo, y además determina la cantidad de P fijado con hierro, calcio y aluminio. La máxima disponibilidad de P se encuentra entre pH 6 y 7.



de -160.453 toneladas, es decir que se aporta un 64 % de la cantidad de P extraído, existiendo un 36% de déficit que es subsidiado por el suelo (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1:** Balance de nutrientes para Argentina en la campaña agrícola 2010/11 (tomado de Cruzate y Casas, 2012).

	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>S</b>	<b>Total</b>
	-----tn.-----					
Extraído	2 091 572	441 348	1 021 921	154 462	222 664	3 931 967
Fertilizado	820 233	280 895	61 028	82 727	114 946	1 359 829
Balance	-1 271 339	-160 453	-960 893	-71 735	-107 718	-2 572 138
<b>%Aportado</b>	<b>39</b>	<b>64</b>	<b>6</b>	<b>54</b>	<b>52</b>	<b>35</b>

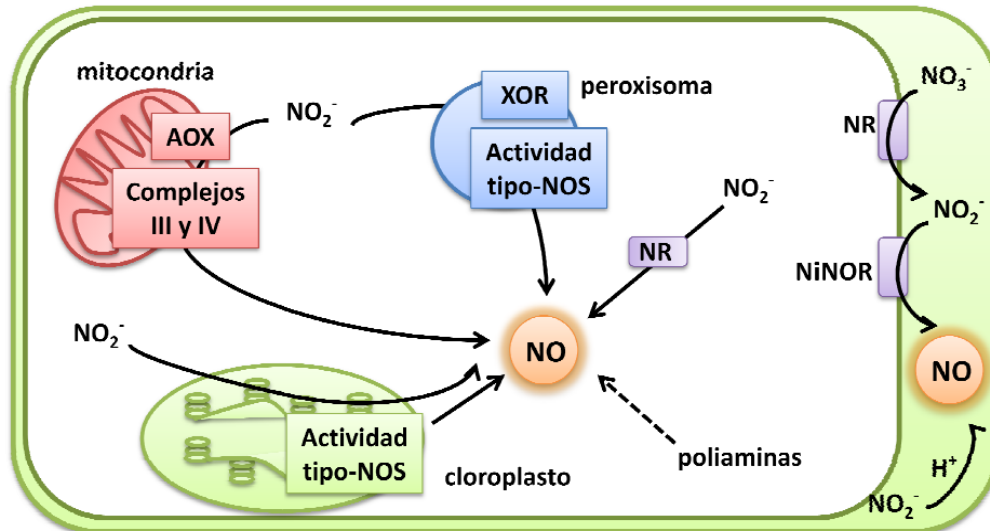
#### 1.4. El óxido nítrico (NO) y sus funciones en las plantas

El NO es una molécula diatómica gaseosa que participa en la señalización de numerosos procesos fisiológicos y fisiopatológicos en los seres vivos. Posee un electrón desapareado en su estructura y presenta tres estados con diferentes actividades químicas, pero todos ellos con actividad biológica: radical sin carga eléctrica ( $\text{NO}^\cdot$ ), anión nitrosilo ( $\text{NO}^-$ ) y catión ( $\text{NO}^+$ ) (Buet y col., 2014).

Desde los años 70 se reconoce la emisión de NO por las plantas (Klepper; 1979), pero recién en 1998, se descubrió que el NO cumple funciones en la resistencia a patógenos y como mensajero en la transducción de señales en plantas superiores (Delledonne y col.; 1998, Durner y col.; 1998).

En plantas superiores, se han descripto múltiples vías de biosíntesis, detalladas en la figura 1.2. Así mismo las plantas se encuentran expuestas al NO proveniente de procesos de nitrificación y denitrificación que ocurren en el suelo y también al NO proveniente de la atmósfera (Davidson y Kinglerlee, 1997; Paul y col., 1993).

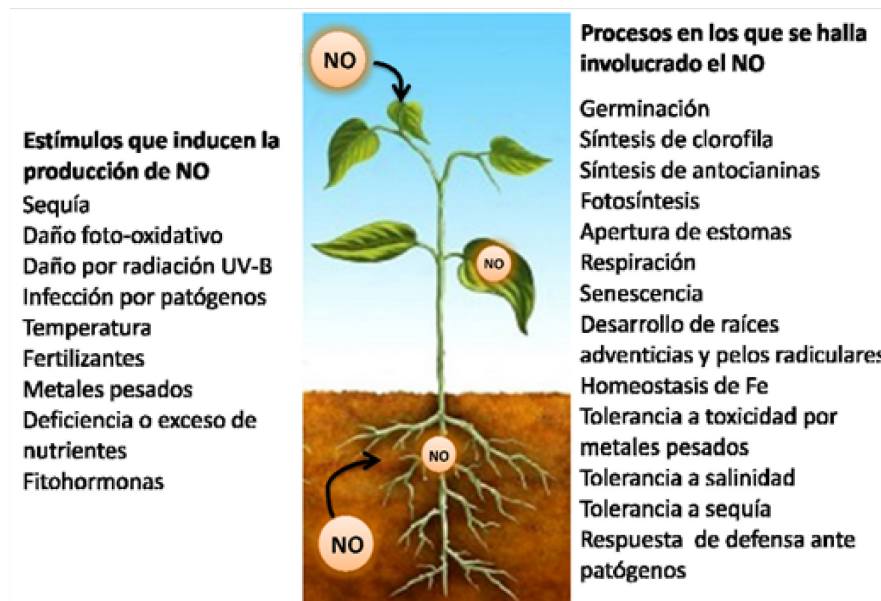




**Figura 1.2. Vías de síntesis de NO en plantas**

Se muestran las distintas vías propuestas de la biosíntesis de NO en células vegetales. La enzima NiNOR (nitrato oxidasa-reductasa), es específica de raíz. AOX: oxidasa alternativa, NOS: óxido nítrico sintasa, NR: nitrato reductasa, XOR: xantina oxidasa.

El NO cumple diversas funciones en las plantas, tanto en procesos fisiológicos como en respuestas frente a situaciones de estrés. El NO ha sido descrito como una molécula que por un lado retarda o revierte los procesos de senescencia en plantas (Jasid y col., 2009), y por otra parte actúa como un efector clave en numerosos procesos mediados por hormonas (Simontacchi y col., 2013). En la figura 1.3, se resumen los estímulos que inducen un aumento de la concentración de NO en tejidos y los procesos fisiológicos y fitopatológicos en los que participa. Los efectos dependerán del lugar donde se produzca el NO y la concentración que se alcance en el mismo.



**Figura 1.3. Funciones del NO en plantas**

*Se muestran los distintos agentes que desencadenan un aumento de NO en distintos tejidos vegetales y los procesos en los que se halla involucrado el NO.*

Graziano y col. (2002) mostraron por primera vez la relación entre la exposición a dadores de NO y la reversión de síntomas de clorosis en plantas de maíz expuestas a deficiencia de Fe. También, se ha descrito su participación en la toxicidad de distintos metales pesados en plantas, en particular cadmio (Groppa y col., 2008). Recientemente, se ha evidenciado que la exposición a NO tiene un efecto modulador sobre las tasas de absorción y translocación a vástago de zinc (Buet y col., 2014). Por esta razón, resulta interesante analizar el efecto que ejerce la suplementación exógena de NO sobre el crecimiento de las plantas, la distribución de biomasa y la redistribución de P en condiciones de restricción del nutriente.

Pagnussat y col (2003), trabajando con raíces de pepino demostraron que el NO participa en la vía de transducción de las raíces actuando como estímulo de la actividad de la enzima guanilato ciclasa (GC), llevando al desarrollo de raíces adventicias.

## 1.5. Hipótesis

La hipótesis general de trabajo propone que la exposición a NO exógeno afectará la producción de biomasa y la distribución de P entre los distintos órganos de las plantas, redundando en cambios en la eficiencia del uso de P en plantas de trigo sometidas a condiciones limitantes de este nutriente.

### 1.5.1. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo final es analizar el rol del NO como modulador de las respuestas de las plantas de trigo frente a la limitación de P en el medio de cultivo y su influencia sobre el uso de P por parte de las mismas.

### 1.5.2. Objetivos particulares

- 1- Análisis del efecto de la exposición a NO sobre la producción de biomasa y la eficiencia del uso de P en plantas de trigo bajo condiciones limitantes de P.**
- 2- Análisis de la participación del NO en las modificaciones en la arquitectura de la raíz frente a la restricción de P.**
- 3- Análisis de la removilización de P en hojas durante el curso de la limitación de este nutriente en presencia y ausencia de NO exógeno.**

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Material vegetal y tratamientos

En los experimentos de este trabajo final, se utilizaron plantas de trigo (*Triticum aestivum*) cv. Maringa. Las semillas fueron desinfectadas por inmersión en una solución de lavandina comercial al 5% durante 3 minutos. Durante la inmersión, fueron agitadas y aireadas con una pipeta Pasteur. Luego las semillas fueron enjuagadas 4 veces con abundante agua destilada.

#### 2.1.1. Germinación

Se realizó la estimación del número de semillas a partir de la relación del peso de 100 semillas de trigo cv. Maringa, considerando un 30% de sobre siembra, por lo que se utilizaron 5 g de semillas por experimento. Con el fin de proporcionar las condiciones adecuadas para su germinación, las semillas fueron distribuidas a una distancia aproximada de 3 cm entre sí sobre una capa de algodón y papel de filtro, en una bandeja plástica de 30 x 20 cm, en la cual se colocaron hasta 40 semillas. Previamente, el algodón y papel de filtro fueron embebidos con agua destilada. La capa de algodón cumplió la función de retener el agua necesaria para la germinación y el papel de filtro impidió que las raíces se adhieran al algodón evitando romperlas en su posterior pasaje a macetas. Las bandejas fueron tapadas y colocadas en cámara de germinación a una temperatura de 26 °C durante 48 horas (Foto 2.1.).



**Foto 2.1.** Bandeja donde germinaron las semillas.

El pasaje a macetas se realizó el día 2 del experimento cuando las plántulas desarrollaron raíces seminales de un tamaño acorde para ser enhebradas en las canastillas de las macetas, siempre con el resguardo de no dañar las raíces y que éstas entren en contacto con la solución nutritiva contenida en la maceta. Como maceta utilizamos recipientes plásticos con forma de vaso de 700 cm<sup>3</sup>, las mismas contaban con tapa donde uniformemente se insertaron 5 canastillas por maceta (Foto 2.2.).



**Foto 2.2.** Plántulas en maceta con canastillas.

### 2.1.2. Condiciones de la cámara de cultivo

Las plantas se cultivaron utilizando una cámara (*Percival Intellus Control System, Percival Scientific Inc., USA*), en la cual se fijaron condiciones de fotoperíodo de 16:8 h de luz:oscuridad, con una irradiancia de 180  $\mu\text{moles de fotones m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , a la altura de la tapa de las macetas, y una temperatura de 22°C. Aunque la cámara no posee controlador de humedad ambiente, se reguló mediante la colocación de un recipiente conteniendo agua dentro de la cámara (Foto 2.3.).



**Foto 2.3.** Cámara de cultivo con plantas de trigo.

**2.1.3.** Solución nutritiva

Para el cultivo de la plantas en hidroponia, utilizamos solución nutritiva de Hoagland modificada completa, cuya composición se detalla en la tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Composición de la solución de Hoagland modificada.

<b>Nutrientes</b>	<b>Concentración final en Solución Hoagland modificada</b>
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 mM
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	50 µM
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,25 mM
FeNaEDTA	50 µM
KCl	1mM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	25 µM
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	2 µM
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,5 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,5 µM
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 µM

La solución se adicionó con MES 2,5 mM con el fin de amortiguar cambios en el pH. Una vez preparada, la solución se llevó a pH 6 con el agregado de Ca(OH)<sub>2</sub>.

**2.1.4.** Tratamientos

El cultivo se desarrolló hasta el día 12 en solución nutritiva completa de Hoagland modificada realizando 3 cambios por semana de la solución nutritiva. Esto se realizó para asegurarnos una provisión óptima de nutrientes y evitar posibles interacciones por limitación de ciertos nutrientes. Los cambios se realizaron luego de dos horas de comenzado el fotoperíodo. La solución nutritiva fue aireada continuamente por medio de tubos conectados a aireadores.

A partir del día 12, se impuso la restricción de P a un grupo de plantas. Con este fin, se omitió el agregado de  $H_3PO_4$  a la solución nutritiva, este tratamiento lo denominamos -P. Dado que el pH inicial difirió entre la solución +P (solución nutritiva completa) y -P, y en ambas soluciones el pH se llevó a 6 con el agregado de  $Ca(OH)_2$ , se suplió el faltante de  $Ca^{2+}$  en la solución -P con el agregado de  $CaCl_2$ . La solución sin el agregado de  $H_3PO_4$  se preparó siempre antes y en recipientes separados de la solución completa, para evitar así la contaminación con P de esta solución.

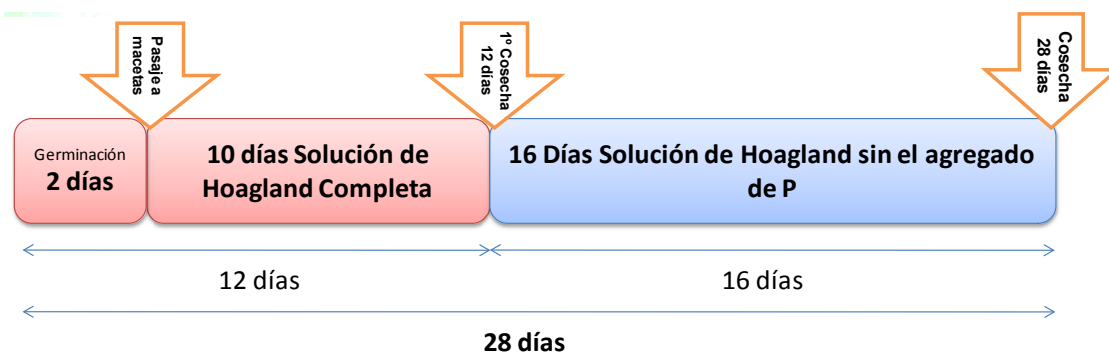
Un grupo de plantas restringidas en P fue cultivado en presencia del dador de NO, S-nitrosoglutatión (GSNO). Este grupo se denominó -P +GSNO. Para tal fin, se utilizó una solución de GSNO agregada directamente en la solución nutritiva de las macetas en una concentración final de  $100 \mu M$  en cada cambio de solución. La solución madre de GSNO fue preparada inmediatamente antes de su agregado (como se describe a continuación en el ítem 2.2.). Estos tratamientos se impusieron durante 16 días hasta la cosecha final.

En resumen, los experimentos se diseñaron como se muestra en el siguiente esquema:

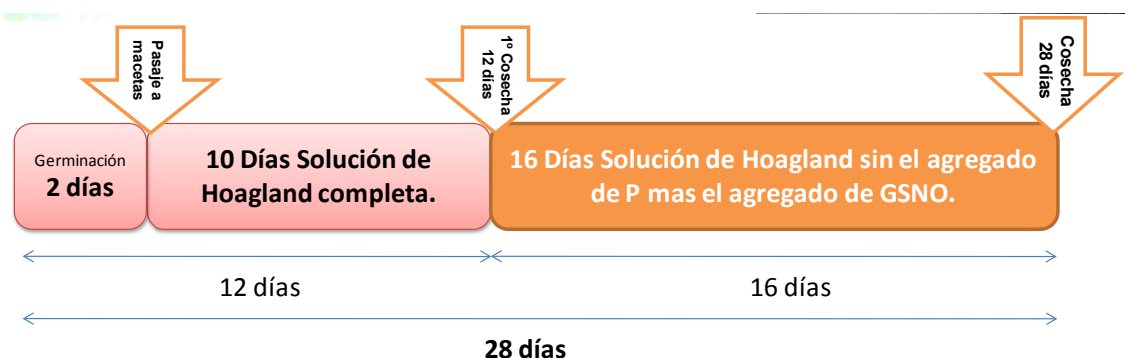
**Tratamiento +P:** Plantas cultivadas hasta el día 28 en solución nutritiva completa de Hoagland modificada.



**Tratamiento –P:** Plantas cultivadas hasta el día 12 en solución nutritiva completa y 16 días (desde el día 12, hasta el día 28), en solución nutritiva sin el agregado de fosfato.



**Tratamiento -P +GSNO:** Plantas de 12 días cultivadas en solución nutritiva completa y 16 días (desde el día 12, hasta el día 28) en solución nutritiva sin el agregado de fosfato, más el agregado de solución de S-nitrosoglutatión (GSNO) en una concentración final de 100µM.



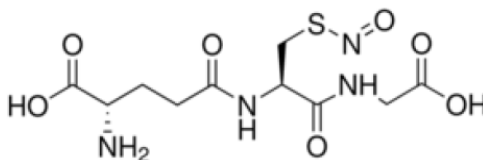
Se utilizaron 5 macetas por grupo (25 plantas en total) para cada tratamiento. Antes de iniciar los tratamientos se descartaron las plántulas que no presentaban un tamaño homogéneo.

### 2.1.5. Síntesis del dador de NO, S-nitrosoglutatión (GSNO)

El dador de NO, GSNO (Figura 2.1.), fue sintetizado a partir de la reacción de volúmenes iguales de NaNO<sub>2</sub> 140 mM en HCl 0,1 N y glutatión (GSH) 140 mM. Para preparar estas soluciones pesamos 24 mg de NaNO<sub>2</sub> y llevamos a volumen de 2,5 ml utilizando HCl 0,1 N. Luego pesamos 108 mg de GSH y llevamos a 2,5 ml de volumen con agua. Mediante la mezcla de estas dos soluciones se obtiene



una solución de GSNO de color rojo de concentración 70 mM. Ésta fue utilizada inmediatamente agregándola en una concentración final de 100  $\mu$ M en la solución nutritiva de las macetas.



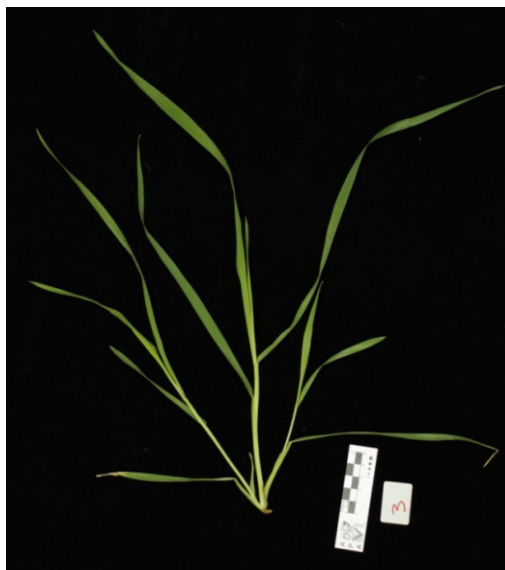
**Figura 2.1.** Estructura química del GSNO.

## 2.2. Determinación del número de hojas y macollos

Durante el transcurso del experimento, se tomó nota de la aparición de hojas y macollos en las plantas de trigo. En las cosechas, se registró además, el número de hoja más joven completamente expandida para cada planta, siendo la hoja número 1, la primera en emerger.

## 2.3. Cosecha

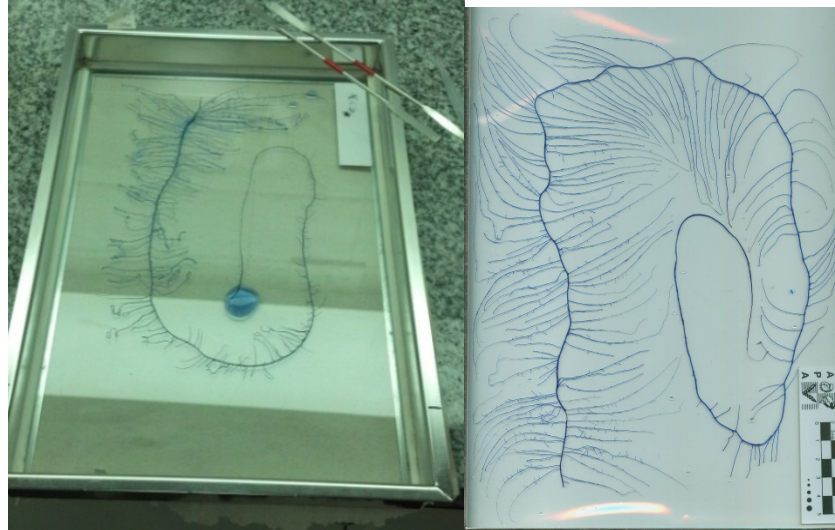
Las plantas se cosecharon a los 12 y 28 días de crecimiento luego de dos horas de comenzado el fotoperíodo. Las raíces se lavaron con solución sin el agregado de P, se secaron, se separaron del vástago e inmediatamente se tomó el peso fresco. Se tomó también el peso fresco del vástago y de cada una de las hojas. Posteriormente, se colocaron a secar en estufa a fin de evaluar peso seco y contenido de P. Con estas medidas, se analizó la acumulación de biomasa en raíz y vástago y la partición entre los mismos (relación vástago: raíz) (Foto 2.3.).



**Foto 2.3.** Planta cosechada a los 28 días con dos macollos expandidos.

#### **2.4.** Evaluación de cambios en la arquitectura de la raíz

En el momento de la cosecha, se midió también la longitud de la raíz seminal más larga, luego fueron inmersas en una solución fijadora Formaldehído:Etanol:Ácido Acético (FAA). Ésta se preparó a partir de 900 ml de alcohol etílico al 50%, 50 ml de ácido acético glacial y 50 ml de formaldehído. Posteriormente, se procedió a la tinción de los tejidos por inmersión en solución de azul de Evans 0,2% (p/v) durante 4 h. Luego, las raíces se lavaron con agua destilada y se ubicaron en una placa de vidrio para su escaneado, separando manualmente las raíces laterales. Las imágenes fueron analizadas con el programa informático ImageJ con el objetivo de evaluar la distribución de biomasa entre los distintos tipos de raíces (Foto 2.4.).



**Foto 2.4.** Extendido de raíces para escaneado, imagen ya escaneada para procesar en ImageJ

## 2.5. Determinación de la concentración de P en órganos

Las muestras obtenidas para la determinación del peso seco se incineraron a 560°C en mufla hasta la obtención de cenizas. Las cenizas se disolvieron con ácido nítrico y posteriormente se procedió a la determinación del contenido de P según la técnica espectrofotométrica de fosfo-molibdo-vanadato (Kitson y Mellon, 1944). Se preparó una curva de calibración con soluciones de concentraciones comprendidas en el rango 0-60 ppm de  $\text{PO}_4^{3-}$ , utilizando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como patrón. Luego se llevó a cabo la reacción colorimétrica con  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  0,25% en medio ácido y  $(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  al 5%. La medición de la absorbancia se realizó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 460 nm.

Para calcular el porcentaje de acumulación de P en vástago y las diferentes hojas se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$\%AV = \frac{Q_{P \text{ vástago}}}{Q_{P \text{ total}}} \quad \%AH_n = \frac{Q_{P \text{ Hn}}}{Q_{P \text{ vástago}}}$$

Donde %AV corresponde al porcentaje de acumulación de P en vástago,  $Q_{P \text{ vástago}}$  al contenido de P en vástago,  $Q_{P \text{ total}}$  al contenido de P en planta entera, %AH<sub>n</sub> corresponde al porcentaje de acumulación de P en la hoja n y  $Q_{P \text{ Hn}}$  al contenido de P en la hoja n.

## 2.6. Evaluación de la eficiencia del uso de P

Con el fin de estimar la influencia del NO sobre la eficiencia del uso de P por parte de las plantas de trigo, se calcularon cuatro indicadores de eficiencia del uso de nutrientes, señalados como los más adecuados (Moriconi y Santa-María, 2013). Las fórmulas utilizadas para el cálculo son las siguientes:

$$\text{Eficiencia del uso} = \frac{PF_f}{Q_f} \qquad \text{Eficiencia de la utilización} = \frac{PF_f}{C_f}$$

$$\text{Productividad del nutriente} = \frac{PF_f - PF_i}{\Delta t \cdot Q_f}$$

$$\text{Productividad acumulada del nutriente} = \frac{(\ln PF_f - \ln PF_i)}{\Delta t \cdot C_f}$$

En las cuales,  $PF_f$  y  $PF_i$  corresponden al peso fresco final e inicial, respectivamente;  $Q_f$ , al contenido final del nutriente;  $C_f$ , a la concentración del nutriente y  $\Delta t$ , al período de tiempo entre el inicio y el final del tratamiento. Los índices se obtuvieron para plantas en estado vegetativo.

## 2.7. Análisis estadístico

Se realizaron 3 experimentos independientes completamente aleatorizados, cada uno con 5 replicados por cada tratamiento. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa Statistica7 mediante ANOVA one-way. Se utilizó el test de Tukey post-hoc con  $P < 0,05$  para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

### 3. RESULTADOS

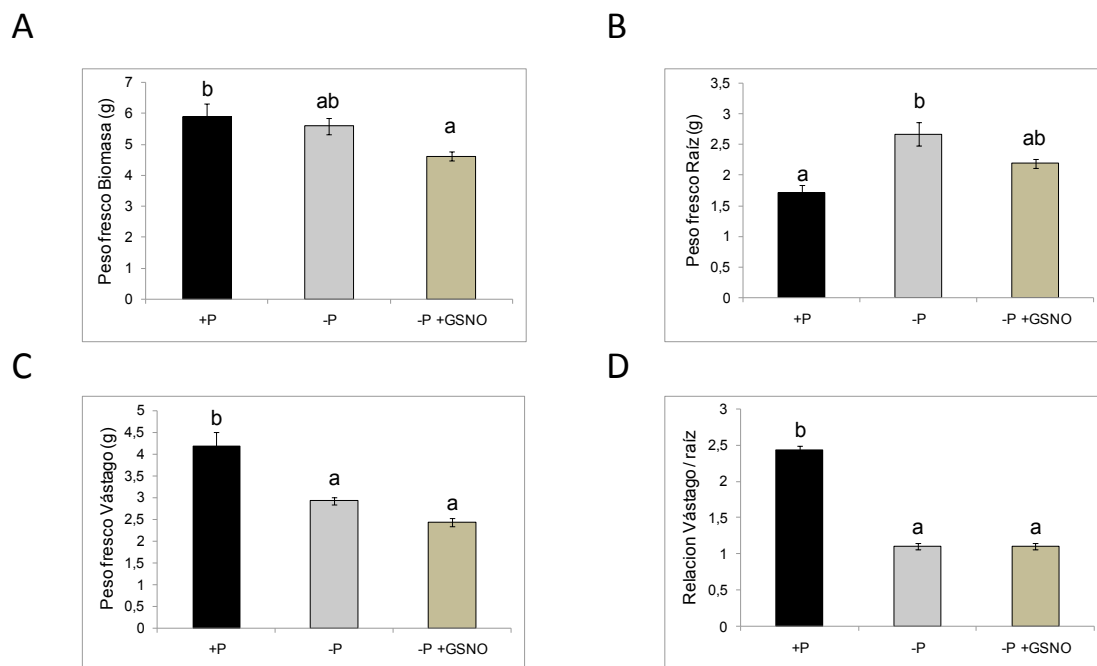
#### 3.1. Efecto de la aplicación de NO sobre el crecimiento en plantas de trigo con deficiencia de P

Con el objetivo de conocer el efecto de la exposición a NO en plantas de trigo deficientes en P, se analizó la acumulación de biomasa en plantas cultivadas con solución nutritiva completa (+P), con solución deficiente en P (-P) y en presencia del dador de NO en la solución nutritiva (-P+GSNO), de tal modo que la única fuente de P es aquella derivada de la absorción por las plantas durante los primeros 12 días de cultivo en solución completa de Hoagland. Se calculó, además, el cociente entre la biomasa de vástago y la de raíz, denominada relación vástago:raíz como un estimador de la partición de biomasa entre ambos órganos.

El análisis de la biomasa total (Fig. 3.1., panel A) indicó que no hay diferencias significativas entre las plantas +P y -P, en los tiempos empleados en este estudio, sin embargo el agregado de GSNO a la solución nutritiva causó una disminución significativa de la biomasa en las plantas restringidas en P.

En cuanto al peso fresco de la raíz, se observaron diferencias significativas, la restricción de P condujo a un aumento significativo de peso con respecto a las plantas creciendo en solución completa. Mientras que la exposición simultánea al dador de NO en plantas restringidas en P, previno el incremento en el peso de las raíces (Fig. 3.1., panel B). En vástago, se observó una reducción del peso fresco tanto en las plantas -P, como en las plantas expuestas a GSNO (-P+GSNO) (Fig. 3.1., panel C).

Como resultado del análisis de la relación vástago:raíz (Fig. 3.1. panel D), se observó una menor relación vástago:raíz en las plantas cultivadas en condiciones de restricción de P respecto de las plantas control, siendo en éstas últimas cercana a 2,5 mientras que tomó valores cercanos a 1 en plantas restringidas en P. El agregado de GSNO en la solución nutritiva no modificó esta relación respecto de las plantas -P.



**Fig. 3.1. Efecto de la aplicación de NO exógeno en plantas de trigo con deficiencia de P.**

Las plantas de trigo fueron cultivadas en condiciones adecuadas (■), y restringidas (□) en P. Un grupo de plantas restringidas en P se expuso a GSNO (-P+GSNO) (■). Los resultados se indican como la media  $\pm$  ES. Las diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,005$ .

La restricción de P resultó en un número menor de hojas totales, y un número menor de hojas en el vástago principal, como así también la disminución del número de macollos por planta. El agregado de NO exógeno en plantas restringidas en P, muestra una tendencia a disminuir aun más el número de hojas aunque esta diferencia no es significativa. Lo mismo ocurre con el número de hojas en el vástago principal y el número de macollos por planta (Tabla 3.1).

**Tabla 3.1. Número de hojas y macollos en plantas de trigo sometidas a restricción de P y expuestas a NO**

Tratamiento	Número total de hojas	Número de hojas en el vástago principal	Número de macollos por planta
+P	10 $\pm$ 0,4a	6 $\pm$ 0a	1,6 $\pm$ 0,2a
-P	6,2 $\pm$ 0,3b	5,1 $\pm$ 0,1b	0,5 $\pm$ 0,1b
-P +GSNO	5,4 $\pm$ 0,2b	5 $\pm$ 0b	0,2 $\pm$ 0,1b

Las plantas de trigo fueron cultivadas en condiciones adecuadas (+P), y restringidas (-P) en P. Un grupo de plantas restringidas en P se expuso a GSNO

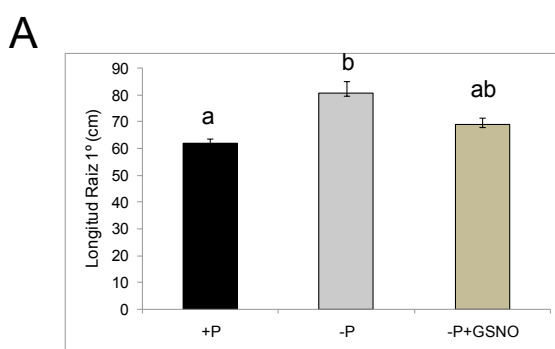
(-P+GSNO). Los resultados se indican como la media  $\pm$  ES. Las diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,005$ .

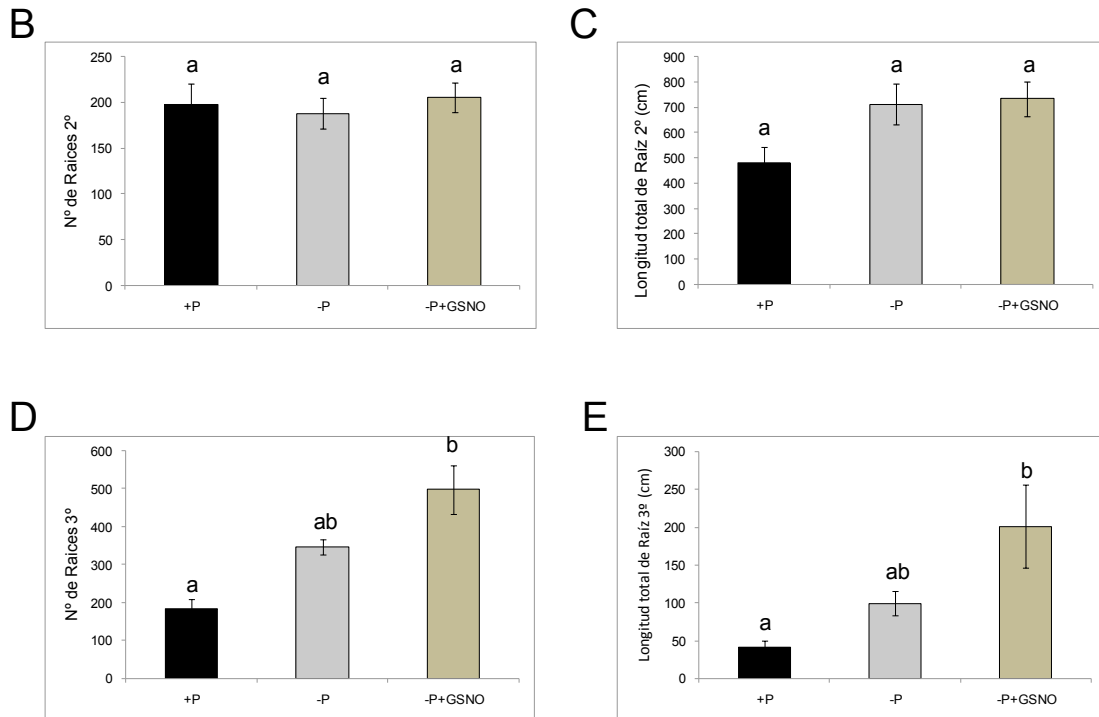
### 3.2. Análisis de la arquitectura de la raíz en plantas deficientes en P: efecto del NO exógeno

Al realizar la medición de raíces primarias observamos un incremento estadísticamente significativo en la longitud de las raíces de plantas -P con respecto a plantas +P (Fig. 3.2. panel A). Mientras que en las plantas -P+GSNO, no fue observado, indicando que el NO exógeno impidió esta mayor elongación.

En el análisis del número de raíces secundarias mediante su tinción y escaneo, utilizando el programa ImageJ, no se observan diferencias estadísticamente significativas para los tres tratamientos (Fig. 3.2. panel B). En cambio en el análisis de la suma total de la longitud de raíces secundarias se observa que las plantas del tratamiento -P y -P+GSNO muestran una mayor longitud total de raíz con respecto a las plantas +P, sin embargo estas diferencias no son estadísticamente significativas (Fig. 3.2. panel C).

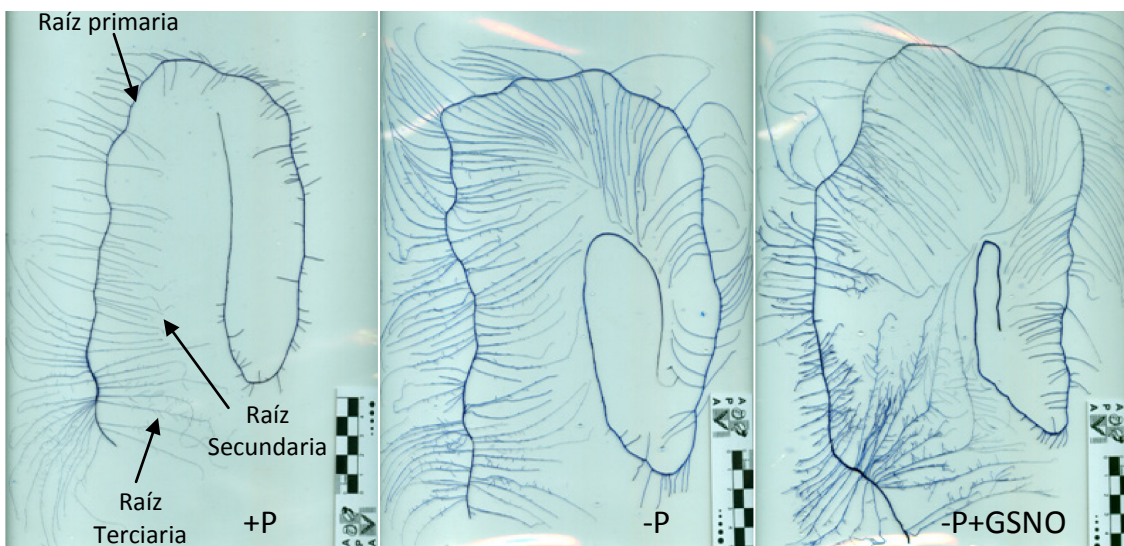
En cuanto al análisis de las raíces terciarias, encontramos que las plantas del tratamiento -P+GSNO, presentan una cantidad mayor de raíces, estadísticamente significativo si lo comparamos con el tratamiento +P. En tanto que en las plantas -P no se observan estas diferencias (Fig. 3.2. panel D). Además, las plantas -P +GSNO presentaron una mayor longitud total (sumatoria de las longitudes de todas las raíces) de las raíces terciarias respecto a las plantas de los tratamientos +P y -P (Fig. 3.2. panel E).





**Fig.3.2. Análisis de la arquitectura de raíz en plantas deficientes de P bajo el efecto del NO exógeno.**

Las plantas de trigo fueron cultivadas en condiciones adecuadas (■), y restringidas (□) de P. Un grupo de plantas restringidas en P se expuso a GSNO (-P+GSNO) (■). Los resultados se indican como la media ± ES. Las diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,005$ .



**Fig.3.3. Imágenes escaneadas de la arquitectura de raíz en plantas deficientes de P bajo el efecto del NO exógeno.**

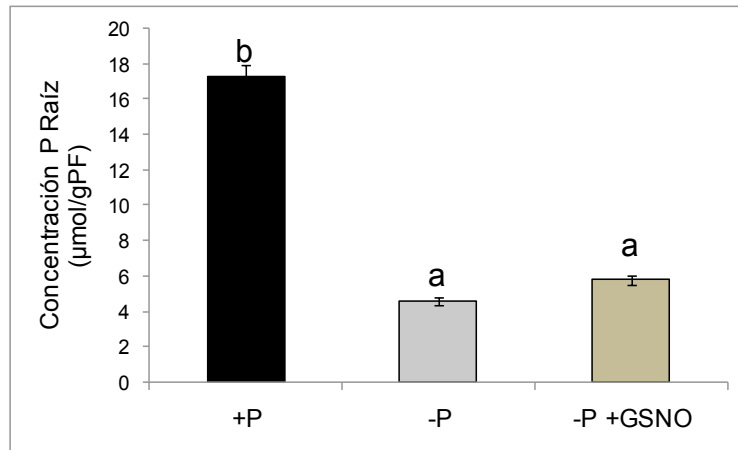
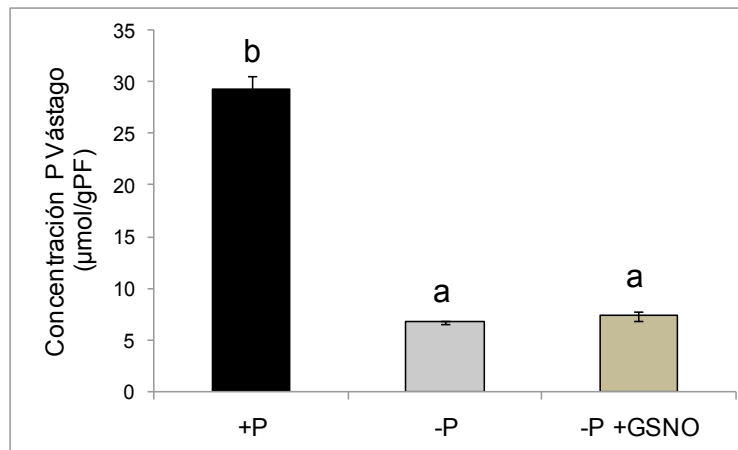


### 3.3. Efecto de la aplicación NO sobre la concentración de P en raíz y vástago de plantas de trigo con restricción de P

En base a la determinación de la concentración de P en raíz y vástago, se observó que las plantas de los tratamientos -P y -P+GSNO mostraron valores menores de concentración de P en raíz, con respecto a las plantas +P, resultando algo esperado puesto que ambos grupos permanecieron 16 días con disponibilidad de P contrastantes (Fig.3.3. panel A).

En cuanto a la concentración de P en vástago ocurre algo muy similar a lo que ocurre en la raíz, las plantas que crecieron sin restricción de P (tratamiento +P), presentaron la mayor concentración de P, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En cambio en las plantas que crecieron con restricción de P (tratamientos -P y -P+GSNO), la concentración de P en vástago es levemente mayor en el tratamiento en el que se expuso a las plantas al NO exógeno (-P+GSNO), aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En las plantas con disponibilidad adecuada de P, la concentración de este nutriente en vástago ( $29 \pm 1 \mu\text{mol/gPF}$ ) resultó mayor que la concentración hallada en raíz ( $17,2 \pm 0,7 \mu\text{mol/gPF}$ ). Mientras que en las plantas que crecieron con restricción de P, si bien persistió esta diferencia en la concentración de P entre el vástago y la raíz, la diferencia fue menor. La concentración de P en vástago de las plantas -P fue un 47% mayor que en raíz, en tanto que en plantas expuestas a NO esta diferencia fue de un 27%.

**A****B**

**Fig. 3.3. Efecto de la aplicación NO exógeno sobre la concentración de P en raíz y vástago de plantas de trigo con restricción de P.**

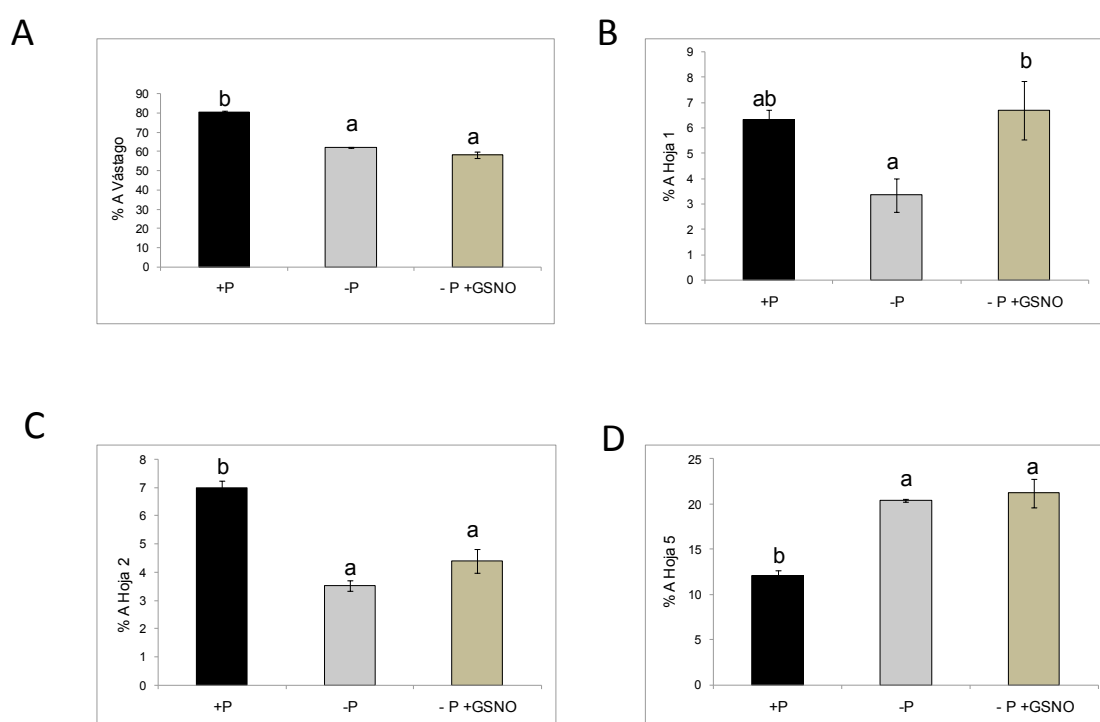
Las plantas de trigo fueron cultivadas en condiciones adecuadas (■), y restringidas (□) de P. A un grupo de plantas restringidas en P, se les agregó el dador de NO (-P+GSNO) (■). Los resultados se indican como la media  $\pm$  ES. Las diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,005$ .

### 3.4. Acumulación porcentual de P en vástago, hoja 1, hoja 2 y hoja 5

En base a los datos obtenidos para la concentración de P en vástago y en raíz, se obtuvieron los porcentajes de acumulación de P en vástago total y en las distintas hojas, omitiendo los macollos primarios uno y dos cuando los hubiera.

El grupo de plantas expuesto a restricción de P presentó un porcentaje de acumulación de P en el vástago menor en comparación a las plantas expuestas a solución nutritiva completa (Fig. 3.4. panel A). Se observó una tendencia a disminuir aún más este porcentaje en presencia del dador de NO, sin embargo esta diferencia no resultó estadísticamente significativa.

En cuanto a la removilización del nutriente P, que es algo que esperamos demostrar en estos resultados, se observó como para el caso de la Hoja N°1 (la más vieja), la acumulación porcentual de P bajó considerablemente (Fig. 3.4. panel B), esto nos está dando una idea de la removilización que ocurre del nutriente hacia partes de la planta en crecimiento. Esta removilización no ocurrió en las plantas deficientes en P expuestas a NO exógeno, en las cuales la acumulación porcentual no solo no ha bajado, si no que aumentó levemente respecto a la acumulación porcentual de las plantas sin restricción del nutriente P. Esto es algo que también observamos al analizar el porcentaje de acumulación de P en la Hoja N°2 (Fig. 3.4 panel C).



**Fig. 3.4. Acumulación porcentual de P en vástago, hoja 1, hoja 2 y hoja 5.** Las plantas de trigo fueron cultivadas en condiciones adecuadas (■), y restringidas (□) de P. A un grupo de plantas restringidas en P, se les agregó S-nitrosoglutatión (-P+GSNO) (■). Los resultados se indican como la media  $\pm$  ES. Las diferentes letras indican diferencias significativas  $p < 0,005$ .

Cuando analizamos los resultados obtenidos en la hoja N° 5, (la más nueva), vemos que para el caso de las plantas del tratamiento -P, aumentó el porcentaje de acumulación, lo que nos evidencia que gran parte del P disponible se acumuló en esta hoja (Fig. 3.4. panel D). Esto también ocurre con las plantas expuestas a NO exógeno.

### 3.5. Índices de eficiencia en el uso del P y productividad acumulada

Se calculó la eficiencia de uso del P por parte de las planta de trigo a través de cuatro indicadores de eficiencia de uso del nutriente, las mediciones y cálculos se realizaron sobre el peso fresco (PF) para planta entera.

Para el caso de la eficiencia de uso [mg de PF/ mol de P], observamos que la máxima eficiencia se logra en la condición -P, en esta condición (restricción de P) la presencia del dador de NO disminuyó significativamente la eficiencia del uso de P (Tabla 3.2.).

En cuanto a la eficiencia de utilización ocurre algo similar a la eficiencia de uso dado que el tratamiento -P es el que presentó mayor eficiencia de utilización estadísticamente significativa, seguido por el tratamiento expuesto a NO, siendo el tratamiento +P el menos eficiente en cuanto a la utilización del nutriente P.

Respecto a la productividad del nutriente [PF por día en función del nutriente P], observamos que para el tratamiento -P se dio la mayor de los tres tratamientos, siendo estadísticamente significativa la disminución en el tratamiento expuesto a NO exógeno. En el tratamiento +P se observa la menor productividad.

En el cálculo de la productividad acumulada, este índice fue mayor para el caso -P, con una disminución estadísticamente significativa para el tratamiento expuesto a NO exógeno. Siendo el tratamiento +P el que presentó menor productividad acumulada en función del nutriente P.

El cálculo de estos cuatro indicadores de eficiencia nos permitió observar cómo, en términos generales, la menor eficiencia se manifiesta en el tratamiento +P y la mayor en el tratamiento -P, observándose claramente que la exposición a NO exógeno tiende a disminuir los indicadores de eficiencia.

**Tabla 3.2. Índices de eficiencia en el uso del P y productividad acumulada.**

Tratamiento	Eficiencia del uso (mg mol <sup>-1</sup> )	Eficiencia de utilización (g <sup>2</sup> μmol <sup>-1</sup> )	Productividad del nutriente (mg día <sup>-1</sup> μmol <sup>-1</sup> )	Productividad acumulada (mg <sup>2</sup> día <sup>-1</sup> μmol <sup>-1</sup> )
+P	39 ± 2a	0,23 ± 0,02a	2,1 ± 0,1a	5 ± 1a
-P	175 ± 5b	0,99 ± 0,07b	9,3 ± 0,3b	21 ± 1b
-P +GSNO	153 ± 8c	0,71 ± 0,05c	7,8 ± 0,4c	16 ± 1c

Las plantas de trigo fueron cultivadas en condiciones adecuadas (+P), y restringidas (-P) de P. A un grupo de plantas restringidas en P, se les agregó el dador de NO (-P+GSNO). Los resultados se indican como la media ± ES. Las diferentes letras indican diferencias significativas p<0,005.

## 4. DISCUSIÓN

En este trabajo se utilizaron plantas de trigo y se analizó el efecto de la restricción de P y del agregado de NO durante el desarrollo vegetativo, en su primer mes de crecimiento.

Las condiciones de cultivo utilizadas para llevar a cabo los experimentos de este trabajo están muy alejadas de aquellas que ocurren en la realidad del cultivo. Sin embargo, estas condiciones se eligieron con el fin de optimizar el crecimiento de las plantas de trigo y, de alguna forma, favorecer el establecimiento de la deficiencia de P, incrementando las diferencias entre los tratamientos. Esta estrategia es válida en el inicio de la investigación de los efectos del NO sobre la respuesta de las plantas a la limitación de este nutriente. En etapas más avanzadas, se deberán modificar las condiciones de cultivo de las plantas para tener una visión más aproximada a la realidad de los cultivos a campo.

Los cambios en el peso fresco del vástago y en la relación vástago:raíz en condiciones de deficiencia de P fueron los esperados. La restricción de P también afectó el crecimiento del vástago que se ve reflejado en un menor número de hojas y macollos. Estos resultados coinciden con la bibliografía consultada (Azcón-Bieto., 2000, cap. 6).

Sin embargo la observación de una mayor longitud de las raíces en deficiencia de P es un resultado que se contrapone con lo descrito para plantas de *Arabidopsis thaliana* creciendo en las mismas condiciones (Sánchez-Calderón et al, 2005). En cereales como el maíz se ha observado un aumento de la longitud de la raíz en los primeros días luego de la imposición de la limitación de P y posteriormente un estancamiento del crecimiento. Estos resultados sugieren que las plantas monocotiledóneas presentan una respuesta ante la restricción de P distinta a las dicotiledóneas. La restricción de P altera la arquitectura de la raíz, incluyendo su ramificación, la elongación, la longitud de los pelos radiculares y la formación de raíces laterales (Buet y col., 2014).

El NO parece ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tanto de vástago como de raíz, se puede plantear la hipótesis de que se produzcan interacciones entre el NO y hormonas, o entre NO y proteínas DELLA (que actúan

como inhibitorias del crecimiento), como fuera propuesto por Lozano-Juste y León (2011).

El NO ha sido descrito como un regulador de la morfología de la raíz ya que es capaz de modificar la arquitectura de la misma, promoviendo el crecimiento de raíces laterales y el desarrollo de pelos radicales e inhibiendo la elongación de la raíz primaria (Buet y col., 2014). En este caso resulta interesante la observación de un mayor número de raíces terciarias. Esto podría deberse a la estimulación del desarrollo de raíces por el NO exógeno. Según Pagnussat y col. (2004), las auxinas llevan a un aumento de los niveles de NO en raíces de pepino, entonces el NO estimula la actividad de la enzima guanilato ciclasa (GC), resultando en un aumento de cGMP y cuando este aumenta se activa una MAP kinasa la cual estimula el desarrollo de raíces adventicias.

El aumento del número de raíces laterales podría tener implicancias en plantas expuestas a una situación más realista, donde la concentración de P no disminuye drásticamente como en nuestro diseño experimental. Una planta con mayor densidad de raíces en un suelo que contiene trazas o bajas concentraciones de nutriente se vería favorecida en la capacidad de exploración y por lo tanto de captación de P. Aunque el NO impide una elongación de la raíz primaria, esto no afectaría tanto la posible captación de P, puesto que el NO favorece el desarrollo de las raíces en horizontes del suelo más superficiales.

La presencia de NO afectó la removilización de P en hojas. En situaciones de restricción de un nutriente móvil este se desplaza desde los órganos más viejos hacia los tejidos en formación. En este caso observamos que el NO actúa modificando este transporte. Esto puede deberse a una alteración en las relaciones fuente-destino probablemente debido a modificaciones hormonales (Freschi., 2013), adicionalmente se debe considerar que el NO ejerce efectos antisenescentes, lo que también influye en la removilización de nutrientes (Jasid y col., 2009). La presencia de NO no tuvo un resultado positivo en tanto mejora de los índices de eficiencia de uso del nutriente, sin embargo hay que tener en cuenta que las plantas expuestas a NO se encontraban en ausencia de P en la solución nutritiva por lo que desconocemos cual será el comportamiento expuestas a soluciones diluídas de P.

En cultivos a campo, los niveles críticos de fósforo extractable para trigo se ubican de entre 15 y 20 ppm para la región pampeana. La fertilización se basa en la estrategia de manejo adoptada por cada productor: de reposición y construcción de los niveles de P Bray (García y Berardo., 2005) o aplicación de una dosis suficiente para alcanzar un determinado rendimiento (respuesta) según análisis de suelo. Un objetivo importante en la agricultura actual es intentar mejorar la eficiencia de adquisición y utilización de los nutrientes esenciales, reduciendo así los costos y efectos colaterales de la aplicación desmedida de fertilizantes. Es entonces que nos queda como tarea ver de qué manera la aplicación de NO exógeno puede aportar a hacer más eficiente el uso del P, en la producción de granos de trigo, en determinadas circunstancias de crecimiento del cultivo.



## 5. CONCLUSIONES

Luego de haber realizado los experimentos y mediciones que me permitieron observar distintos parámetros de desempeño de crecimiento de plantas de trigo bajo la influencia de NO exógeno puedo concluir que:

El crecimiento de las plantas bajo la influencia de NO exógeno, tuvo alteraciones significativas respecto a las plantas que crecieron con restricción de P solamente, esto se ve más evidenciado en los cambios de la arquitectura de la raíz, ya que se observa un mayor número y longitud de raíces terciarias en las plantas NO.

La removilización de P en hojas, se ve alterada bajo la influencia de NO exógeno. Hay una tendencia a removilizar los nutrientes desde hojas viejas a hojas jóvenes en crecimiento en situaciones de deficiencia de nutrientes esenciales como el P, esto no ocurre con la misma intensidad en plantas de trigo - P expuestas a NO exógeno.

En cuanto a la eficiencia del uso de P, no se observó un aumento debido a la exposición a NO pero tenemos que considerar que crecieron en una restricción intensa de P. Quedaría por determinar el comportamiento de este índice en situaciones de deficiencia parcial del nutriente P.

Lo expuesto anteriormente nos conduce a aceptar la hipótesis propuesta para este trabajo final de carrera, con la salvedad de que quedará seguir estudiando como varían los índices de eficiencia en diferentes situaciones de deficiencia de P, ya que no fueron los esperados en este trabajo.

### Comentarios Finales

La importancia del P como nutriente para la obtención de rendimientos esperados en los principales cultivos, hace que en muchas oportunidades se realice un uso ineficiente y desmedido de la fertilización mineral. Es por esto que buscar alternativas de reposición y utilización más eficiente del P por parte de la planta, resulta un gran aporte a mejorar no solo la productividad sino también la sustentabilidad de los sistemas de producción granarios en la Argentina.

## 6. Referencias bibliográficas

- Azcón-Bieto M.T. (2000) Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw–Hill/ Interamericana de España, S A U. Primera edición.
- Buet A., Moriconi J.I., Santa-María G.E., Simontacchi M. (2014) An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83:337-345.
- Conti M. (2000) Principios de Edafología con énfasis en suelos Argentinos. Editorial Facultad de Agronomía. Segunda edición.
- Cruzate G.A. y Casas R.R. (2012) Extracción y balance de nutrientes en los suelos agrícolas de la Argentina. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica* 6:7-14.
- Davidson E., Kinglerlee W. (1997) A global inventory of nitric oxide emissions from soils. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 48:37-50.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:10328- 10333.
- Freschi, L. (2013). Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in plant science*, 4, 398.
- García, F. O., & Berardo, A. (2005). Trigo. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. Editorial INTA. Buenos Aires, 233-253.
- Gardner L.R. 1990. The role of rock weathering in the phosphorus budget of terrestrial watersheds. *Biogeochemistry* 11: 97-110.
- Graziano M., Beligni M.V., Lamattina L. (2002) Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiology* 130:1852-1859.
- Groppa M.D., Rosales E.P., Iannone M.F., Benavides M.P. (2008) Nitric oxide, polyamines and Cd induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* 69:2609-2615.
- Jasid S., Galatro A., Villordo J.J., Puntarulo S., Simontacchi M. (2009) Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. *Plant Science* 176:662- 668.
- Kitson R.E., Mellon M.G. (1944) Colorimetric Determination of Phosphorus as Molybdivanadophosphoric Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition* 16:379-383.
- Klepper L. (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment* (1967) 13:537-542.
- Lozano-Juste J., Leon J. (2011) Nitric Oxide Regulates DELLA Content and PIF Expression to Promote Photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant Physiology* 156:1410-1423.
- Moriconi J.I., Santa-Maria G.E. (2013) A theoretical framework to study potassium utilization efficiency in response to withdrawal of potassium. *Journal of Experimental Botany* 64:4289-4299.

- Morras H. 1996. Influencias litológicas y climáticas en los contenidos de fósforo en los suelos pampeanos. Actas XIII Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo. Comisión 2. Trabajo 41 (CD) Aguas de Lindota, Brasil, 4-8 agosto.
- Ollier, C. D. & Brown, M. C (1975). Geology and scenery of Canberra. *Australian Geographer*, 13(2), 97-103.
- Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lamattina L. (2003). Nitric Oxide and Cyclic GMP Are Messengers in the Indole Acetic Acid-Induced Adventitious Rooting Process. *Plant Physiology* 132:1241-1248.
- Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lombardo M.C., L. Lamattina (2004). Nitric Oxide Mediates the Indole Acetic Acid Induction Activation of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Involved in Adventitious Root Development. *Plant Physiology* 135:279-286.
- Paul J.W., Beauchamp E.G., Zhang X. (1993) Nitrous and nitric oxide emissions during nitrification and denitrification from manure-amended soil in the laboratory. *Canadian Journal of Soil Science* 73:539-553.
- Robinson W.D., Carson I., Ying S., Ellis K., Plaxton W.C. (2012) Eliminating the purple acid phosphatase AtPAP26 in *Arabidopsis thaliana* delays leaf senescence and impairs phosphorus remobilization. *New Phytologist* 196:1024-1029.
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J. G., & Herrera-Estrella, L. (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 46(1), 174-184.
- Simontacchi M., García-Mata C., Bartoli C., Santa-María G., Lamattina L. (2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. *Plant Cell Reports* 32:853-866.
- Tachibana S. (1987) Effect of root temperature on the concentration of various forms of phosphorus in cucumber and figleaf gourd plants. *Boletín de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Mie* 74:1-8.
- Veneklaas E.J., Lambers H., Bragg J., Finnegan P.M., Lovelock C.E., Plaxton W.C., Price C.A., Scheible W.-R., Shane M.W., White P.J., Raven J.A. (2012) Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phytologist* 195:306-320
- Walker T.W., Syers J.K. 1976. The fate of phosphorus during pedogenesis. *Geoderma* 15: 1-19.