



Instituto de Fisiología Vegetal
(INFIVE) UNLP-CONICET

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Universidad Nacional de La Plata

TRABAJO FINAL DE CARRERA INGENIERÍA AGRONÓMICA

Deficiencia de fósforo y generación de especies activas del oxígeno en plantas de soja

Área: Fisiología Vegetal.

Modalidad: Trabajo de Investigación en Dúo

Fecha de entrega: 15/11/2017

Alumno: Natanael Ponce

Nº de Legajo: 26138/8

DNI: 34.589.630

Dirección de correo electrónico: natanael.ponce@hotmail.com

Teléfono: (0236) 15 4552711

Alumno: Ignacio Martínez Ruffinatti

Nº de Legajo: 26367/1

DNI: 34.125.976

Dirección de correo electrónico: ignacio654@hotmail.com

Teléfono: (02392) 15522189

Nombre del Director: Andrea Galatro.

Nombre del Co-Director: Marcela Simontacchi.

Resumen

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el normal crecimiento de las plantas, sin embargo, la disponibilidad en la solución del suelo que baña las raíces suele ser baja afectando la agricultura. La adición de fertilizantes fosforados es una práctica común basada en el uso de rocas minerales de fosfato (recurso finito), con potenciales efectos negativos sobre el ambiente. En este contexto, el estudio de los mecanismos de aclimatación de cultivos de interés agropecuario a condiciones de restricción de P es un tema de actual interés.

Las plantas han evolucionado para disminuir los efectos negativos de la deficiencia de nutrientes desarrollando estrategias que abarcan diferentes niveles de organización y la puesta en marcha de mecanismos bioquímicos que involucran entre otros procesos, la señalización celular. Las especies activas del oxígeno (ROS) participan en numerosos procesos de señalización fundamentales para la percepción y aclimatación a cambios en la disponibilidad de nutrientes, entre ellos el P. En este trabajo de tesis se caracterizaron aspectos fisiológicos y bioquímicos en plantas de soja, durante las primeras 48 horas de deficiencia de P. Se estimó la distribución de P en los tejidos, se evaluaron parámetros fotosintéticos y la distribución de biomasa, entre otros aspectos de la fisiología de la planta. Se emplearon técnicas de microscopía de epifluorescencia y confocal para la detección *in situ* de ROS en raíces y hojas, pudiendo evidenciar la presencia de estas especies en los tejidos aún cuando no se evidenciaron alteraciones en la fotosíntesis o signos de daño a tejidos. Estos resultados preliminares abren la puerta a futuros estudios reforzando la idea del papel fisiológico y de señalización que pueden tener estas especies para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas y la respuesta a situaciones de estrés abiótico, en particular la deficiencia de nutrientes minerales como el P.

Índice

	Pág.
Introducción	4
Hipótesis	5
Objetivo general y objetivos particulares	5
Materiales y Métodos	7
<i>Material vegetal y tratamientos</i>	7
<i>Peso fresco</i>	8
<i>Determinación del contenido relativo de agua (CRA)</i>	8
<i>Contenido de fósforo en los tejidos</i>	8
<i>Medición de parámetros fotosintéticos</i>	9
<i>Evaluación de la conductancia, densidad e índice estomático</i>	9
<i>Evaluación del crecimiento foliar</i>	9
<i>Detección de ROS</i>	10
<i>Determinación de la salida de electrolitos</i>	11
<i>Análisis estadístico</i>	11
Resultados	12
1. <i>Caracterización bioquímica y fisiológica de las plantas durante las primeras 48 horas de restricción de P</i>	12
2. <i>Evaluación de la generación de ROS durante las primeras horas de privación de P en plantas de soja.</i>	16
3. <i>Evaluación del daño a tejidos (mediciones de salida de electrolitos de raíces y hojas).</i>	21
Discusión	22
Conclusión	25
Bibliografía	26

Deficiencia de fósforo y generación de especies activas del oxígeno en plantas de soja

INTRODUCCIÓN

Dentro de los nutrientes esenciales, el fósforo (P) constituye un macronutriente necesario para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que forma parte de moléculas tales como ADN, ARN y fosfolípidos de membranas, además de participar en numerosas reacciones de intercambio de energía, así como también en procesos de señalización celular (Epstein y Bloom, 2005).

El P posee un ciclo sedimentario sin fase atmosférica y su disponibilidad en la solución del suelo que baña las raíces suele ser baja, siendo un limitante crítico para el rendimiento de los cultivos (Lambers y col., 2011). Las rocas madres de las cuales se extraen los fosfatos constituyen un recurso finito y limitado. En nuestro país el deterioro de las reservas de P del suelo, resultante de muchos años de producción sin adecuada fertilización, plantea un problema para los cultivos (Castro y Melgar, 2005). Además, la adición de fertilizantes fosforados, basada en el uso de las rocas minerales de fosfato, impone una fuerte dependencia de un recurso finito con efectos negativos potenciales sobre el ambiente (Ashley y col., 2011; Baker y col., 2015), ya que una parte del fosfato agregado en exceso al suelo es fácilmente conducido por cursos de agua, provocando eutroficación y daño ambiental (Gilbert, 2009).

La agricultura se ve cada vez más afectada por los suelos desprovistos de cantidades adecuadas de P. El estudio de los mecanismos por los cuales las plantas sobreviven bajo condiciones de restricción de P y los factores que pueden influenciarlos es importante a la hora de diseñar estrategias que permitan el desarrollo y la selección de líneas que puedan aclimatarse a condiciones adversas en cultivos de interés agropecuario.

Las plantas han evolucionado para disminuir los efectos negativos de la deficiencia de distintos elementos en el suelo (Hernandez y Munné-Bosch, 2015). Así, han desarrollado distintos mecanismos para evitar los posibles efectos nocivos de vivir en condiciones de baja disponibilidad del fósforo en el suelo. Estos mecanismos abarcan diferentes niveles de organización, como por ejemplo la alteración de la morfología y la fisiología de la raíz en algunas especies, estableciendo asociaciones micorrícicas de forma de incrementar la capacidad de adquisición de P (Pang y col., 2015), y la puesta en marcha de diferentes mecanismos bioquímicos que involucran entre otros procesos, la señalización celular. En este sentido, las denominadas especies activas del oxígeno y del nitrógeno (ROS y RNS) participan en numerosos

procesos de señalización fundamentales para la percepción y aclimatación a cambios en la disponibilidad de nutrientes, a través de modificaciones sobre biomoléculas, la interacción con hormonas y cambios en el estado de óxido-reducción (Simontacchi y col., 2015). Las ROS (por sus siglas en inglés “*reactive oxygen species*”) incluyen radicales libres del O₂ tales como el anión superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) y el radical hidroxilo (HO \cdot), así como moléculas no radicales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y el oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) (Halliwell, 2006). Estas especies se forman naturalmente como subproductos del metabolismo y tienen un importante papel en la señalización celular. Sin embargo, bajo condiciones de estrés ambiental sus niveles pueden incrementarse causando un desbalance, que puede llevar a condiciones de estrés oxidativo. Este desbalance se produce a causa de una excesiva producción de ROS en relación a la disponibilidad de antioxidantes (Halliwell, 2006), lo cual puede conducir a daño celular.

Ha sido evidenciado en plantas de *Arabidopsis* que las raíces responden a la deficiencia de nutrientes incrementando la concentración de ROS en regiones específicas. Las ROS pueden actuar en señalización y además ser parte de una respuesta general de estrés (Shin y col., 2005). Además, la deficiencia severa de P puede causar alteraciones en el aparato fotosintético, causando estrés fotooxidativo, caracterizado por una producción incrementada de ROS en los cloroplastos, y suele activar respuestas a distintos niveles involucrando procesos de señalización en raíz y vástago para prevenir el daño oxidativo (Hernandez y Munné-Bosch, 2015).

Hasta el momento, existe poca información en relación con la deficiencia de P y la señalización por ROS en la generación de respuestas de aclimatación que involucren cultivos de interés agropecuario como la soja.

Hipótesis

La hipótesis general de trabajo es que las especies activas del oxígeno (ROS) participan en los eventos tempranos que suceden a la restricción de P en las plantas.

Objetivo general

El objetivo general de este proyecto es evaluar aspectos fisiológicos y bioquímicos durante las primeras horas de deficiencia de P, en particular en relación con la generación de especies activas del oxígeno (ROS), en plantas de soja.

Objetivos particulares

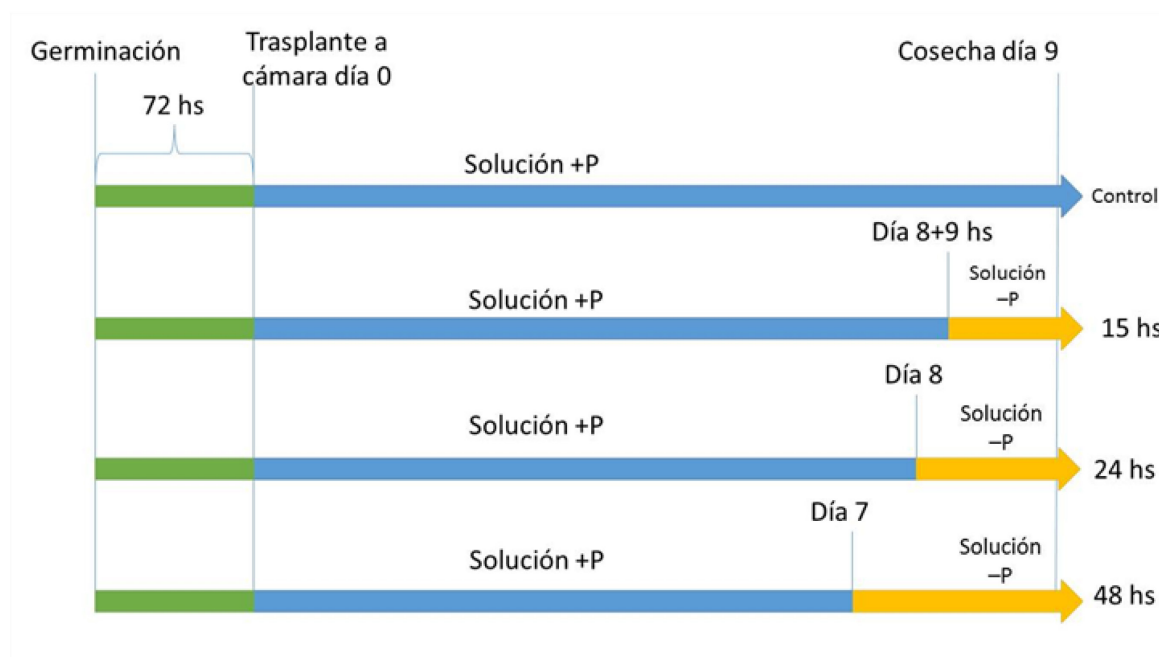
- 1- Caracterización bioquímica y fisiológica de las plantas durante las primeras 48 horas de restricción de P (crecimiento, contenido y concentración de P, parámetros fotosintéticos, contenido hídrico, densidad estomática)

- 2- Evaluación de la generación de ROS durante las primeras horas de privación de P en plantas de soja (evidenciado por la generación de H_2O_2 y $\bullet\text{O}_2^-$).
- 3- 3. Evaluación del daño a tejidos (mediciones de salida de electrolitos de raíces y hojas).

Materiales y Métodos

Material vegetal y tratamientos

Las semillas de soja (*Glycine max*, Williams 82) se esterilizaron mediante lavado con solución de hipoclorito de sodio 10% durante 5 minutos, y se germinaron en oscuridad durante 72 h a 28°C. Posteriormente se transfirieron a recipientes plásticos de 0,8 L de capacidad (una planta por recipiente), conteniendo solución nutritiva con la siguiente composición: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1mM; KCl 1 mM; MgSO_4 0,5 mM; H_3PO_4 0,5 mM; CaCl_2 50 μM ; FeNaEDTA 50 μM ; H_3BO_3 25 μM ; MnSO_4 2 μM ; CuSO_4 0,5 μM ; Na_2MoO_4 0,5 μM ; ZnSO_4 2 μM ; ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES) 2,5 mM, pH 5,9-6,0 ajustado con $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Las plantas crecieron en cámara de cultivo (Percival Intellus Control System) con una irradiancia de 180 μmol fotones $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$, bajo un fotoperíodo de 16 h, con una humedad relativa de 80% y una temperatura de 28/22°C (día/noche). Las soluciones fueron aireadas continuamente y renovadas acorde al crecimiento de las plantas con el fin de evitar el agotamiento de los nutrientes. Luego de 7 días de cultivo, se realizaron los tratamientos de restricción de P transfiriendo las plantas a una solución de igual composición pero sin agregado de P durante 15, 24 y 48 h. Dado que la cantidad necesaria de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ para llevar a pH entre la solución +P y la -P resultó distinta, el faltante de Ca^{2+} en la solución -P se corrigió con el agregado de CaCl_2 . A los 9 días se realizó la cosecha de las plantas (Esquema 1).



Esquema 1: Tratamientos de deficiencia.



Imagen 1: Cámara de cultivo (Percival Intellus Control System)

Peso fresco y peso seco

Al momento de cosecha las hojas y raíces se pesaron en una balanza Electrónica Analítica de alta precisión obteniendo el peso fresco (Pf). Luego, las muestras se colocaron en estufa a 80°C hasta peso constante (Ps).

Determinación del contenido relativo de agua (CRA)

Luego de estimar el peso fresco (Pf), las hojas se llevaron a máxima turgencia sumergiéndolas en agua a 4°C durante 12 a 24 h (hasta peso constante) y se tomó nota del peso alcanzado (Pt). Luego las muestras se colocaron en estufa a 80°C hasta peso constante (Ps) y el CRA se calculó según la siguiente fórmula (Flexas y col., 2006):

$$\text{CRA (\%)} = \frac{(\text{Pf} - \text{Ps})}{(\text{Pt} - \text{Ps})} \times 100$$

Contenido de fósforo en los tejidos

A fin de conocer la distribución del P dentro de la planta, se evaluó la concentración de P en cada hoja y en la raíz mediante el método colorimétrico de fosfo-molibdo-vanadato (Kitson y Mellon, 1944). Las muestras (raíces, hojas y resto de vástago obtenidas al día 9, luego de 0, 15, 24 o 48 h de deficiencia de P) se

incineraron a 500°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. Para ello se preparó una curva de calibración con soluciones de concentraciones comprendidas en el rango 0-60 ppm de PO_4^{3-} utilizando KH_2PO_4 como patrón. Luego se llevo a cabo la reacción colorimétrica con NH_4VO_3 0,25% en medio ácido y $(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot\text{H}_2\text{O}$ al 5%. La medición de la absorbancia se realizo con un espectrofotómetro a una longitud de onda de 460 nm.

Medición de parámetros fotosintéticos

Se estimaron los valores de clorofila mediante una técnica no destructiva empleando el medidor portable de clorofila SPAD 502 (Minolta®, Konica Minolta Sensing, Inc.) y el rendimiento cuántico intrínseco del fotosistema II (ΦFSII) con el medidor de fluorescencia modulada de clorofila (Fluorescence Modulated System 2, FMS2, Hansatech Instruments, UK). Las medidas se realizaron 3 horas luego de la iniciación del fotoperíodo al momento de cosecha (día 9, luego de 0, 15, 24 o 48 h de deficiencia de P) realizando 2 mediciones por cada hoja verdadera.

Evaluación de la conductancia, densidad e índice estomático

La conductancia estomática se evaluó al momento de cosecha (día 9) mediante el empleo de un porómetro Decagon sc-1, en la cara abaxial. Para la evaluación de la densidad e índice estomático se realizaron cortes de las hojas post cosecha y se sumergieron en una solución de hidrato de cloral al 5%, luego se tiñeron con safranina. Las improntas se fotografiaron y se realizó el conteo de células epidérmicas y células oclusivas mediante el uso del programa Image J.

Evaluación del crecimiento foliar

Se realizaron medidas del área foliar en las hojas unifoliadas durante las primeras 24 h de tratamiento en plantas controles y restringidas en P. Para ello se tomaron fotografías de las hojas como se muestra en la imagen 2. Luego las áreas foliares se calcularon utilizando el programa Image J.



Imagen 2: Método utilizado para evaluar el crecimiento foliar.

Detección de ROS

La detección de ROS en hojas y raíces se realizó empleando 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA) y nitrobluetetrazolium (NBT) de acuerdo a Buet y col. (2014). Para la observación de la fluorescencia derivada de la oxidación de la DCFH (diclorofluoresceína –desacetilada-) se empleó un microscopio de epifluorescencia (Olympus, modelo BX51) y un microscopio confocal (Leica, modelo SP5).

Se realizaron cortes de hojas y raíces en plantas controles y deficientes de P que fueron incubadas en buffer MES 50 mM pH= 7 en presencia y ausencia (auto-fluorescencia) de DCFH-DA 50 μ M. Se ensayaron diferentes tiempos a fin poner a punto el ensayo. Luego se realizaron lavados con el mismo buffer y se observaron los preparados en los microscopios.

Para detectar la presencia de $\cdot\text{O}_2^-$ en los tejidos, se incubaron las hojas en presencia de una solución de NBT al 0.05 % preparada en buffer MES 50 mM (pH= 7). Se realizaron cortes del hipocotilo inmediatamente por debajo de los cotiledones y se sumergieron en la solución de NBT descrita anteriormente. Se incubaron durante dos horas en cámara (Percival Intellus Control System) en las condiciones de iluminación descritas anteriormente. Cumplido el tiempo las hojas se decoloraron con etanol 96 % y observamos directamente la coloración azul (azul de formazán) resultante de la reducción del NBT por el $\cdot\text{O}_2^-$. Para efectuar la observación de esta especie en raíces realizamos un corte de 2 cm en la parte apical de raíz principal. Los cortes provenientes de raíces controles y deficientes en P fueron incubadas en una solución de NBT 0.005 % en buffer MES 50 mM (PH= 7) en oscuridad durante 2 h. Luego se observó la presencia de coloración azul y se tomaron fotografías.

Determinación de la salida de electrolitos

Se tomaron hojas y raíces al momento de cosecha de plantas controles y deficientes en P. Los tejidos se pesaron, se lavaron en agua bidestilada y se sumergieron en tubos conteniendo agua calidad mili Q. Luego se tomo el valor de la conductividad inicial (Li, conductancia inicial). Luego de 3h, se registraron nuevamente los valores (conductancia a 3h, Lf) y se colocaron los tubos en agua a 100°C durante 10 min. Luego de este tratamiento las muestras se llevaron a temperatura ambiente para determinar nuevamente la conductividad (Lmax, conductividad máxima obtenida). Se calculó el porcentaje de salida de electrolitos de los tejidos mediante la siguiente ecuación (Jasid y col., 2009):

$$\text{Salida de Electrolitos} = ((L_f - L_i) / (L_{\text{max}} * P_f)) * 100$$

Siendo Pf el peso fresco de los tejidos

Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa Statistica7 mediante "one-way" ANOVA. Se utilizó el post-hoc test de Tukey para determinar las diferencias significativas entre tratamientos. Se realizaron tres experimentos independientes con al menos 4 réplicas por experimento.

Los datos se expresaron como la media \pm SE (error estándar) de tres experimentos independientes, a menos que se indique específicamente en la figura.

Resultados:

1. Caracterización bioquímica y fisiológica de las plantas durante las primeras 48 horas de restricción de P

Evaluación del crecimiento de las plantas, contenido de fósforo y parámetros fotosintéticos

Las semillas de soja (*Glycine max*, Williams 82) fueron germinadas como se describió en Materiales y Métodos y crecieron en cámara durante 7 días. Luego fueron expuestas a tratamientos de restricción de P transfiriendo las mismas a una solución de igual composición pero sin agregado de P (Materiales y Métodos, Esquema 1). Cabe mencionar que a la fecha de cosecha, todas las plantas tenían la misma edad (9 días).

Al momento de cosecha, las plantas contaban con dos hojas verdaderas bien desarrolladas junto a sus respectivos cotiledones y no se encontraron diferencias morfológicas significativas en la raíz y las hojas como consecuencia de los tratamientos de restricción de este nutriente (Tabla 1).

Tabla 1: Peso fresco de raíz, tallo y sus relaciones.

Tiempo (h)	Peso fresco de la raíz (g)	Peso fresco de tallo (g)	Peso fresco total (g)	Relación raíz/vástago
0	1,2 ± 0,1a	2,4 ± 0,2a	3,6 ± 0,3a	2,1 ± 0,1a
15	1,0 ± 0,1a	2,2 ± 0,2a	3,2 ± 0,3a	2,3 ± 0,2a
24	1,20 ± 0,08a	2,7 ± 0,1a	3,9 ± 0,2a	2,30 ± 0,07a
48	1,3 ± 0,1a	2,7 ± 0,2a	4,0 ± 0,3a	2,2 ± 0,2a

Peso fresco de los tejidos en función del tiempo de restricción de P. Los datos son expresados como la media ± SE de tres experimentos independientes. Anova "One-way", Tuckey post-hoc test, n=4.

Al determinar la concentración de P en los órganos de las plantas, se evidenció que a medida que aumentan las horas de restricción, el contenido de P disminuye como se observa en la Figura 1. A partir de las 15h comienza a evidenciarse una caída del contenido de P con respecto al control en hojas, tornándose significativo en raíces a partir de las 24h, mientras que en el vástago completo no se encuentran diferencias significativas hasta las 48h de deficiencia. Estos resultados indican que mediante algún mecanismo la planta estaría movilizandando el contenido de P desde las primeras hojas completamente expandidas hacia el resto del vástago.

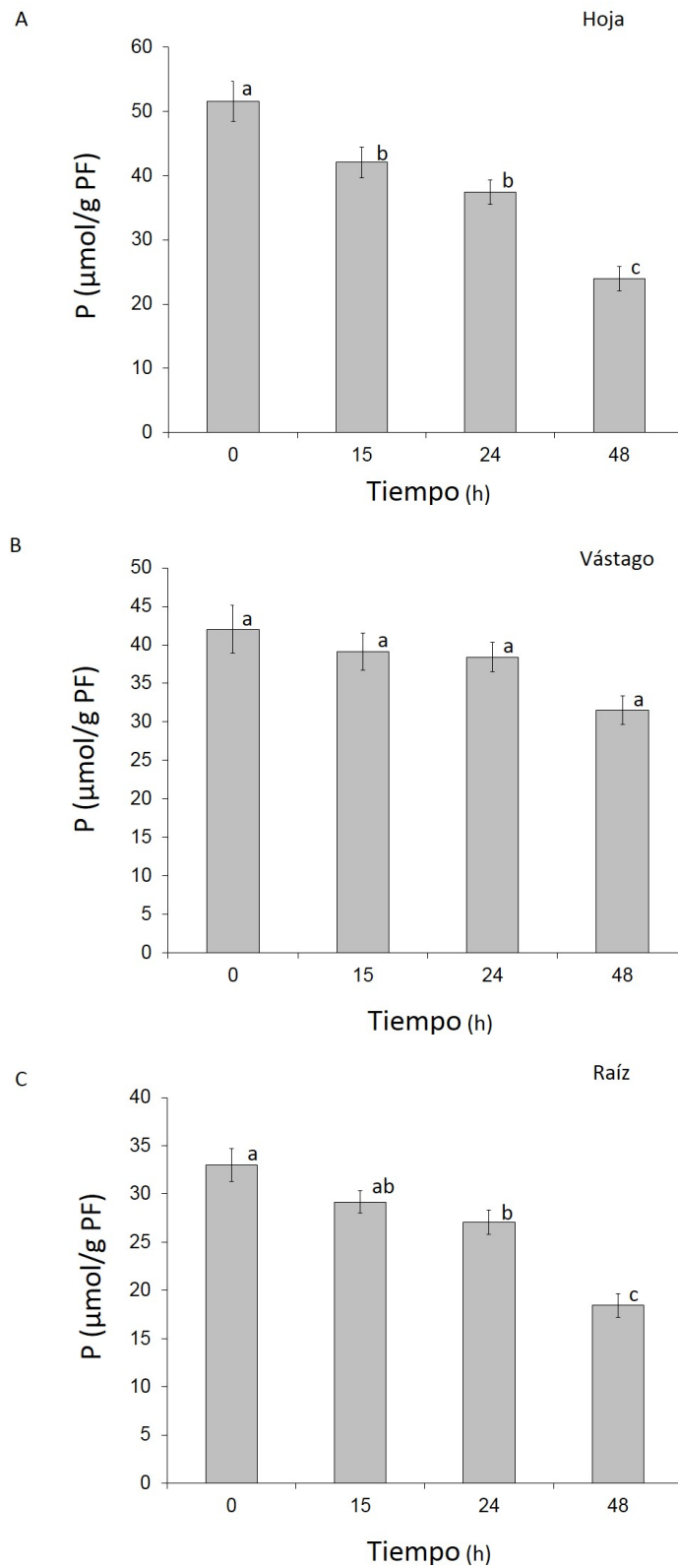


Figura 1: Concentración de P en tejidos en función del tiempo de restricción. Los datos son expresados como la media \pm SE de tres experimentos independientes, n= 4. Letras diferentes indican diferencias significativas dentro del mismo tejido. Anova One-way, Tukey post-hoc test, p< 0,05 (Statistica 7.0; StatSoft, Inc.)

Se estimaron parámetros fotosintéticos durante la restricción de P. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Durante las primeras horas de restricción de P no se observaron cambios significativos en ninguno de los dos parámetros evaluados.

Tabla 2: Eficiencia cuántica del fotosistema II (Φ_{PSII}) y contenido de clorofila

Tiempo (h)	Clorofila (unidades SPAD)	(Φ_{FSII})
0	30 ± 1a	0,707 ± 0,007a
15	28,4 ± 0,8a	0,70 ± 0,01a
24	30 ± 1a	0,73 ± 0,01a
48	30,4 ± 0,6a	0,72 ± 0,02a

Los datos son expresados como la media ± SE de tres experimentos independientes. Anova "One-way", Tuckey post-hoc test, n=4.

Evaluación de la conductancia estomática, densidad estomática e índice estomático.

La conductancia estomática se evaluó en la cara abaxial del primer par de hojas totalmente desarrolladas. Los resultados se muestran en la Figura 2. Se puede evidenciar un aumento en la conductancia estomática de las hojas luego de 24 horas de restricción de P.

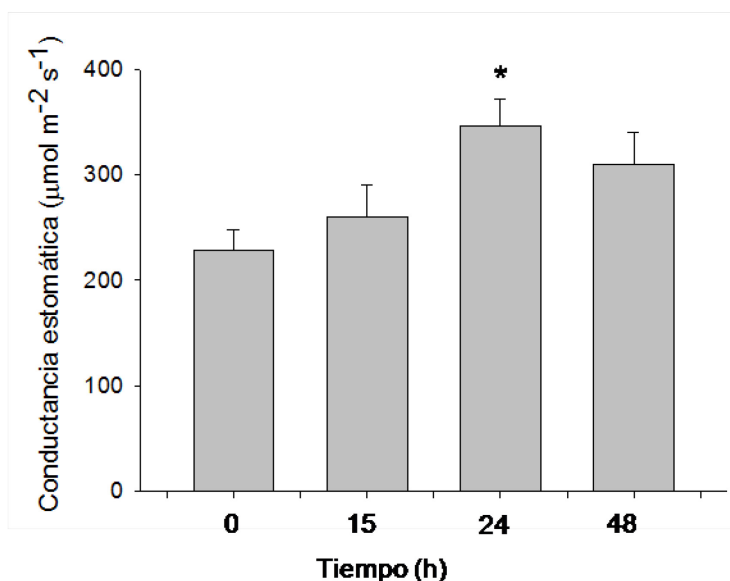


Figura 2: Conductancia estomática del primer par de hojas durante las primeras horas de restricción de P. *Significativamente distinto del valor control (solución completa, 0h de restricción). Los datos son expresados como la media ± SE de tres experimentos independientes, n=4. Anova One-way, Tukey post-hoc test, p< 0,05 (Statística 7.0; StatSoft, Inc.).

Debido al aumento de la conductancia estomática evidenciado a las 24 h, resultó interesante evaluar la densidad estomática (número de estomas por unidad de superficie foliar) y el índice estomático (relación entre número de estomas y el total de células de la epidermis) de las hojas unifoliadas bajo las mismas condiciones

experimentales. Para ello las mismas se procesaron según se describió en materiales y métodos. Las improntas se fotografiaron y se realizó el conteo celular y de estomas mediante el uso del programa Image J. Para determinar estos parámetros se analizaron cortes de hojas provenientes de 5 plantas independientes por tratamiento, y se analizaron 5 campos de cada corte (Imagen 3). Los resultados indicados en la tabla 3 permiten evidenciar que no hubo cambios significativos en el índice estomático como consecuencia de los tratamientos. En relación con la densidad estomática sí se observaron cambios significativos, con un aumento de este parámetro a las 24 h.

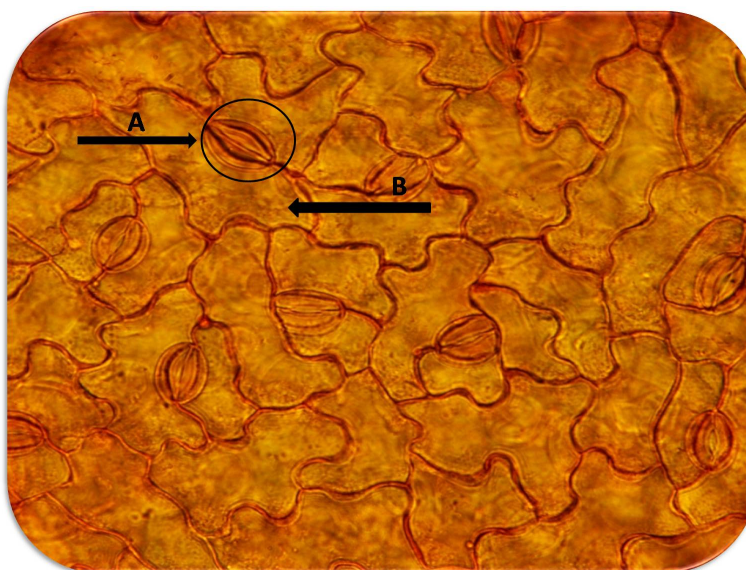


Imagen 3: Análisis del número de estomas y células. La flecha A muestra un estoma que fue contabilizado empleando el programa ImajeJ. La flecha B señala una célula epidérmica.

Tabla 3: Índice estomático y densidad estomática

Tiempo (h)	Índice estomático	Densidad estomática (estomas mm ⁻²)
0	19,6 ± 0,2 a	192 ± 5a
24	21,2 ± 0,6a	254 ± 20 b
48	20,1 ± 0,5a	233 ± 9a,b

Índice estomático (relación entre número de estomas y el total de células) y densidad estomática (número de estomas por unidad de superficie foliar). Los datos son expresados como la media ± SE de un experimento n=5.

Para evidenciar si los cambios en la densidad estomática pueden estar relacionados con un crecimiento diferencial de las hojas como consecuencia de los tratamientos, se evaluó el área foliar realizando un seguimiento del crecimiento de las hojas durante las primeras 24 h. Se calculó el cambio en el área foliar estimando la

diferencia del área foliar determinada a las 24 h y a las 0 h (comienzo del tratamiento). Se evidenció un aumento significativo en el crecimiento de las hojas unifoliadas para las plantas controles ($20 \pm 1 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$) en relación con las plantas restringidas en P ($14 \pm 1 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$).

Por otra parte también se evaluó el contenido relativo de agua en condiciones controles y luego de 24 h de deficiencia. No se observaron diferencias significativas en este parámetro ($88 \pm 1 \%$ para hojas controles y $86 \pm 1 \%$ para hojas sometidas 24 h a deficiencia de P).

2. Evaluación de la generación de ROS durante las primeras horas de privación de P en plantas de soja.

Estimación del contenido de H_2O_2 empleando DCFDA

Se utilizó 2,7-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), quien si bien permite estimar el contenido de H_2O_2 proporciona también un ensayo integral para varias ROS (por sus siglas en inglés “*reactive oxygen species*”). La DCFH-DA tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática y tras ser desacetilada por esterasas en el citoplasma, se oxida por su interacción con ROS resultando un producto altamente fluorescente (Tyburski y col., 2009).

Antes de evaluar el contenido de H_2O_2 en las plantas sometidas a deficiencia de P, se realizó la puesta a punto de la técnica empleando plantas controles. Para ello se realizaron ensayos con distintas concentraciones de DCFH-DA utilizando el primer par de hojas y cortes de raíces (zona cercana al ápice). Los cortes se realizaron con bisturí y se colocaron en tubos tipo *ependorf* conteniendo la solución buffer con DCFH-DA en concentraciones de 50 ó 25 μM . Se realizaron controles (auto-fluorescencia) repitiendo el procedimiento pero sumergiendo los cortes en solución buffer sin DCFH-DA. Las muestras se incubaron en oscuridad y luego de 15 min se realizaron los lavados en el mismo buffer y se observaron al microscopio (Figura 3).

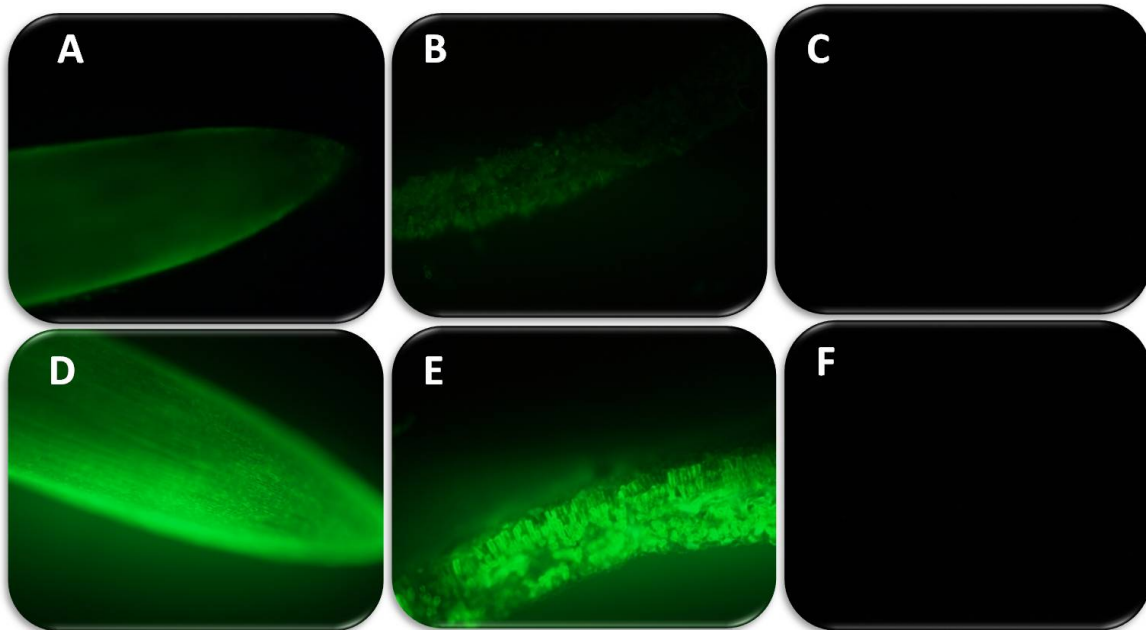


Figura 3: Ensayo de las condiciones adecuadas para la detección de H_2O_2 empleando microscopía de epifluorescencia. Secciones de tejidos fueron incubadas en presencia de DCFH-DA 25 (A, B) y 50 μM (D, E) durante 15 min a T ambiente, en raíces (A, D) y hojas (B, E) de soja. Los paneles C y F muestran controles de autofluorescencia de raíz y hoja respectivamente. La fluorescencia verde corresponde al producto de oxidación de la DCFH (ya desacetilada) luego de la interacción con H_2O_2 y otras ROS ($\lambda_{exc}=488$ nm, $\lambda_{em}=525$ nm, verde).

Según se puede evidenciar en la Figura 3, los valores de autofluorescencia fueron muy bajos, de modo que no interfirieron con el ensayo. De acuerdo a los resultados obtenidos se eligió la concentración 25 μM , debido a la ausencia de saturación de la señal, lo cual permitiría evidenciar, si las hubiera, diferencias entre tratamientos.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de trabajo se realizó la incubación de los cortes provenientes de muestras controles y sometidas a restricción de P a fin de evaluar el efecto de la restricción de este nutriente sobre la generación de ROS. Se incubaron los cortes de tejidos en las condiciones descritas anteriormente en presencia del fluoróforo (25 μM). Se realizaron en cada determinación y para cada tratamiento controles de autofluorescencia. Transcurrido el tiempo, los cortes se colocaron en los portaobjetos y fueron observados en el microscopio de epifluorescencia, se fotografiaron y se realizó una cuantificación relativa de la fluorescencia empleando el programa Image J. La fluorescencia pudo evidenciarse en los ápices de todas las raíces, sin cambios significativos entre tratamientos. En las hojas se evidenció una tendencia, aunque no significativa a un incremento de la fluorescencia a las 48h de restricción de P (Tabla 4).

Tabla 4: Estimación del contenido de H₂O₂ en las hojas empleando DCFH-DA.

Tiempo (h)	Fluorescencia (UA)
0	7 ± 1a
15	8 ± 1a
24	6,4 ± 0,7a
48	9 ± 2a

Las imágenes se integraron empleando Image J. Anova One-way, Tukey post-hoc test, $p < 0,05$ (Statistica 7.0; StatSoft, Inc.). Los datos son expresados como la media \pm SE de un experimento $n=3$, con resultados similares en dos experimentos independientes. UA indica unidades arbitrarias.

Las muestras también se observaron empleando microscopio de fluorescencia confocal a fin localizar la fluorescencia observada (Figura 4). Se evidenció fluorescencia en el citoplasma y en los cloroplastos, debido a la co-localización de la fluorescencia roja (correspondiente a la clorofila) y la fluorescencia verde (correspondiente a la DCF). La integración de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal, fluorescencia verde, mostró el mismo perfil con una tendencia a incrementarse hasta las 48h ($1,8 \pm 0,4$; $3,0 \pm 0,4$ y $3,4 \pm 0,4$, para control, 24 y 48h de deficiencia respectivamente).

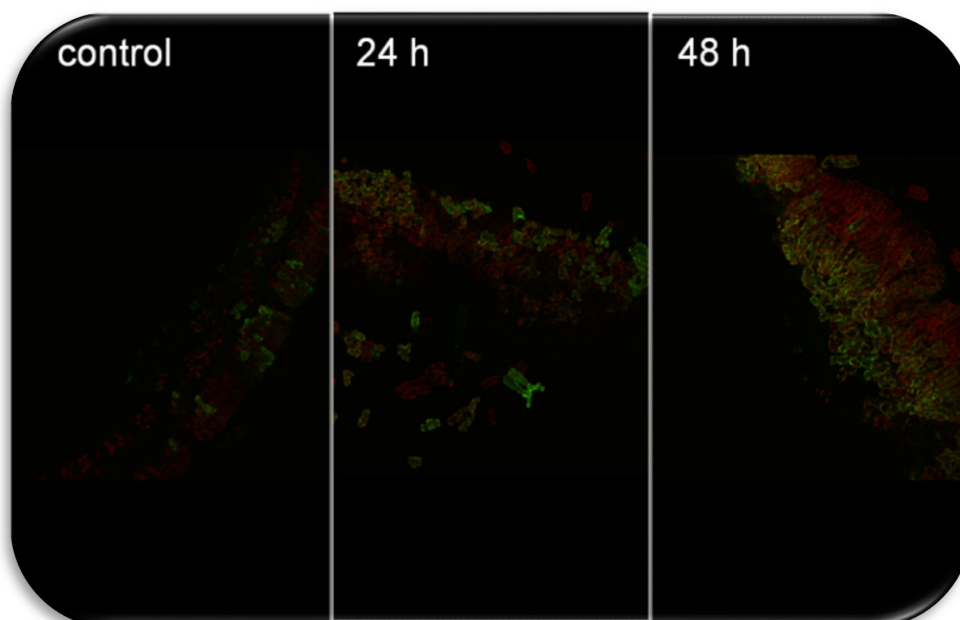


Figura 4: Detección de H₂O₂ empleando microscopía confocal. Secciones de hojas fueron incubadas en presencia de DCFH-DA 25 μ M durante 15 min a T ambiente. La fluorescencia verde corresponde al producto de oxidación de la DCFH ($\lambda_{exc}=488$ nm, $\lambda_{em}= 525$ nm, verde) superpuesta a la autofluorescencia de clorofila ($\lambda_{exc}=488$ nm, $\lambda_{em}= 670-730$ nm, roja).

Detección de $\cdot\text{O}_2^-$ empleando nitrobluetetrazolium (NBT)

La detección de $\cdot\text{O}_2^-$ en los tejidos de las plantas puede realizarse empleando NBT, como fue descrito por Mellers y col. (2002), quienes localizaron estos radicales en raíces. La evidencia de esta reacción está dada por la acción del NBT cuando participa como oxidante, donde en su estado reducido se lo conoce como formazán y es un compuesto insoluble en agua de color azul muy intenso, prácticamente negro. La coloración azul en los tejidos permite estimar la presencia de esta especie reactiva.

A continuación, de modo ilustrativo se presentan fotografías de las metodologías empleadas para realizar las incubaciones en hojas y raíces (Figura 5). Se trabajó con plantas controles y deficientes en P (15, 24 y 48 horas).

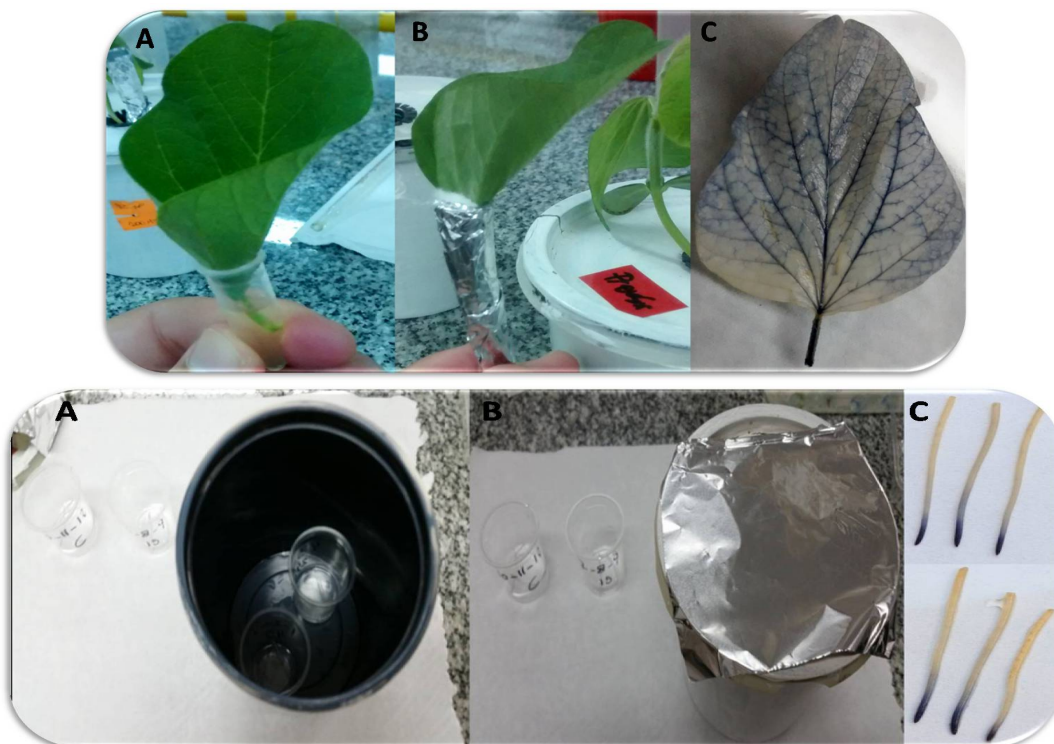


Figura 5: Tratamiento con NBT en hojas (panel superior) y raíces (panel inferior). Ensayo de las condiciones adecuadas de detección del contenido de O_2^- . Las hojas se incubaron con NBT al 0.05 % preparado en buffer MES 50mM pH 7. Se muestra el procedimiento de incubación de las hojas (A y B) y una hoja decolorada con etanol 96 % que permite la visualización de azul de formazán resultante de la reducción del NBT por el $\cdot\text{O}_2^-$ (C). Los ápices de las raíces se incubaron con NBT al 0.005 % preparado en buffer MES 50mM pH=7. Se muestra el procedimiento de incubación de las raíces (A y B) y la observación directa de azul de formazán resultante de la reducción del NBT por el $\cdot\text{O}_2^-$ (C).

La Figura 6, resume los resultados obtenidos empleando las hojas y raíces de las plantas sometidas a condiciones de suficiencia y hasta 48 h de restricción completa de P. Si bien en general todas las hojas se tiñen en presencia del NBT y los resultados son variables se pudo evidenciar que las hojas controles presentaron menor coloración en promedio.



control 15 24 48

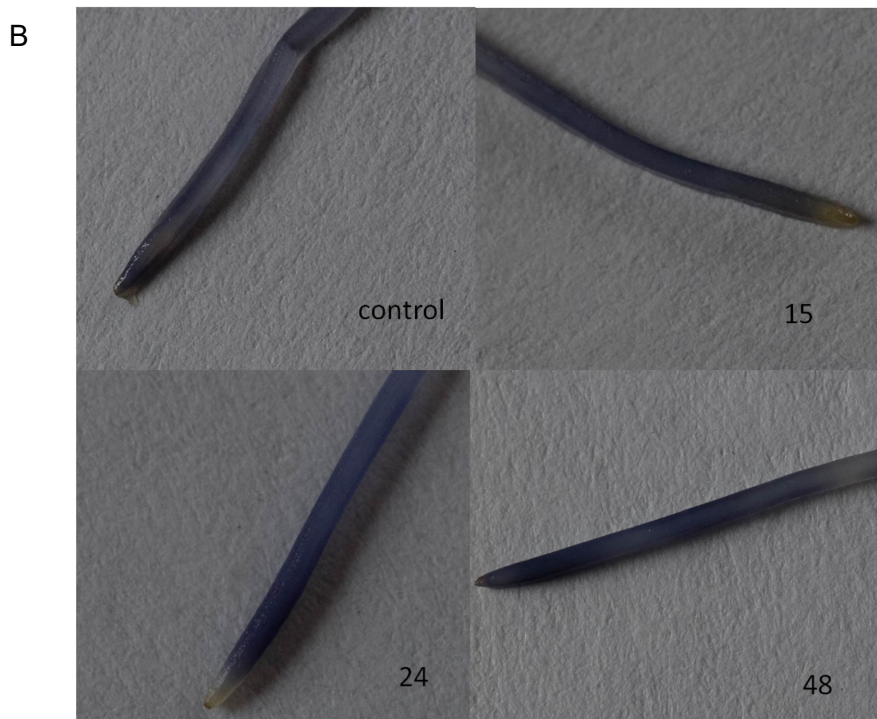


Figura 6: Evaluación de la generación de $\bullet\text{O}_2^-$. **Panel A:** fotos representativas de los resultados obtenidos con hojas provenientes de plantas sometidas a 0, 15, 24 y 48 h de deficiencia de P. **Paneles B y C:** fotos representativas de los resultados obtenidos con las raíces principales (B) y laterales (C) provenientes de plantas sometidas a 0, 15, 24 y 48 h de deficiencia de P). Se analizaron 6 plantas distintas (tres experimentos independientes).

En condiciones de deficiencia todas las hojas se colorearon en mayor o menor proporción, con una tendencia que resultó ser más intensa entre las 15 y 24 h. Sin embargo debido a la gran variabilidad y la dificultad para obtener resultados cuantitativos al emplear esta técnica, estas tendencias observadas deberán ser confirmadas empleando un mayor número de plantas y en combinación con otras técnicas bioquímicas. En relación con las raíces, si bien todas las raíces se colorearon luego de la incubación con el colorante y no parecen observarse diferencias cuantitativas, las fotos muestran posibles cambios en la distribución, incluso que pueden ser diferentes entre las raíces principales y laterales, que deberán ser evaluados en mayor profundidad realizando cortes y observación al microscopio.

3. Evaluación del daño a tejidos (mediciones de salida de electrolitos de raíces y hojas).

Se calculó el porcentaje de salida de electrolitos de los tejidos a partir de las mediciones de conductividad de la solución donde se colocaron las raíces y hojas (Tabla5):

Tabla 5: Estimación de la salida de electrolitos

Tiempo de deficiencia (h)	Salida de electrolitos (%)	
	Raíces	Hojas
0	11 ± 2 a	1,9 ± 0,4a
15	9,6 ± 0,7a	2,0 ± 0,7a
24	9 ± 1a	1,9 ± 0,3a
48	9 ± 2a	2 ± 1a

Valores porcentuales (%) de liberación de electrolitos medidos en los distintos tratamientos. Los datos son expresados como la media ± SE de tres experimentos independientes. Anova One-way, Tukey post-hoc test, $p < 0,05$ (Statistica 7.0; Stat Soft, Inc.).

Con los resultados obtenidos se determinó que la liberación de electrolitos no presentó diferencias significativas entre los tratamientos, indicando integridad en la membrana plasmática, esto permitió establecer que las primeras horas de deficiencia de P no causaron daños relevantes en la integridad de las células.

Discusión:

La baja disponibilidad de P es uno de los principales factores que limitan la producción de los cultivos en la mayor parte del planeta (Lynch y Deikman, 1998). Se han evidenciado diversas respuestas fisiológicas a la baja disponibilidad externa de P, algunas de las cuales varían en gran medida entre especies. Una de las respuestas típicas a un bajo nivel de P en el medio son los cambios en la arquitectura y la producción de biomasa radical (Henry y col., 2010). Sin embargo, durante las condiciones experimentales desarrolladas en este trabajo no se observaron cambios en la biomasa total ni en la distribución de biomasa durante las primeras 48 h de restricción de P en el medio de cultivo, lo cual podría ser atribuido al corto período de deficiencia. Las plantas tienden a movilizar al menos el 50% del P de las hojas senescentes, siendo el P redistribuido una fuente importante para el crecimiento especialmente en situaciones en que la disponibilidad es baja (Veneklass y col., 2012). En nuestro estudio, se evidenció que a medida que aumentan las horas de restricción, el contenido de P disminuye en raíces y hojas con cambios significativos a las 24 h. Considerando el vástago en su totalidad no se encuentran diferencias significativas hasta las 48h de deficiencia, indicando que la planta estaría movilizando el contenido de P desde las primeras hojas hacia las hojas trifoliadas en formación. Esto permitiría mantener concentraciones de P más altas en las hojas jóvenes trifoliadas para sostener el crecimiento.

La productividad depende de la fotosíntesis, que depende a su vez de compuestos que contienen P (Veneklass y col., 2012). Sin embargo, a pesar de la disminución en el contenido de P, no se observaron cambios significativos en la eficiencia cuántica del fotosistema II, ni en el contenido de clorofila estimado con el SPAD. Esto puede deberse a que la disminución de P en las hojas a estos tiempos cortos de restricción todavía no ha alcanzado un nivel crítico como para afectar estos procesos. Por otra parte, cambios en la conductancia estomática comenzaron a observarse luego de 24 h de restricción de P. En este sentido Clark y col (2011), evidenciaron que los nucleótidos extracelulares regulan la apertura y cierre de los estomas, donde la disminución de ATP promueve la apertura de los mismos. Por lo tanto, podría postularse que una disminución de ATP, como consecuencia de la disminución de P, puede estar ocasionando señales tempranas que activan mecanismos compensatorios tendientes a mantener la fotosíntesis. Sin embargo, el aumento en la densidad estomática observado en las plantas restringidas en P durante las primeras 24 h, puede deberse a una disminución en el incremento del área foliar en comparación con las plantas controles, como consecuencia de una restricción del crecimiento. Además, ha sido evidenciado que las especies reactivas del oxígeno (ROS) participan en procesos

de señalización en las células oclusivas. En particular el H_2O_2 tiene un rol clave en el cierre de los estomas inducido por el ácido abscísico (ABA) (revisado por Singh y col., 2017). Por lo tanto resultaría de interés en un futuro analizar la presencia de estas especies en las células oclusivas en las condiciones experimentales ensayadas en este estudio.

Las ROS han sido tradicionalmente consideradas como productos tóxicos del metabolismo aeróbico, cuyos niveles deben ser rigurosamente controlados para evitar el daño oxidativo. Existen distintas fuentes potenciales de producción de ROS en las células de las plantas, algunas de ellas vinculadas al metabolismo normal como la fotosíntesis y la respiración, y otras fuentes potenciadas en la respuesta frente al estrés abiótico, por ejemplo en los peroxisomas durante la foto-respiración (Mittler, 2002). Sin embargo, las plantas también producen ROS activamente como moléculas de señalización para controlar procesos como la muerte celular programada, y la defensa contra patógenos a través de otras fuentes finamente reguladas (NADPH oxidasas, aminooxidasas, y peroxidasas unidas a la pared celular) (Mittler, 2002). Así, la vida es un balance entre la generación de estas especies activas y los antioxidantes necesarios para mantenerlas en niveles adecuados para cumplir sus funciones biológicas evitando el daño (Halliwell, 2006). Las ROS participan en procesos de señalización fundamentales para la percepción y aclimatación a cambios en la disponibilidad de nutrientes (Simontacchi y col., 2015). Así, las plantas de *Arabidopsis* responden a la deficiencia de nutrientes incrementando la concentración de ROS en determinadas regiones de la raíz durante las primeras horas de deficiencia (entre 6 y 30 h). Estas ROS pueden actuar como señal o incluso ser parte de una respuesta general de estrés (Shin y col., 2005). En este trabajo de tesis, en relación con la detección de ROS empleando DCFH y NBT, no se observaron diferencias de coloración entre tratamientos en los ápices de las raíces, hasta las 48 h de deficiencia de P. Sin embargo, Tyburski y col. (2009) estudiaron el patrón de generación de ROS en raíces de *Arabidopsis* en medios de cultivos suplementados con concentraciones contrastantes de P y encontraron que la disponibilidad de P afectó la distribución de ROS en los ápices de las raíces primarias a tiempos más prolongados de deficiencia de este nutriente (10 días), provocando una disminución de ROS en la zona de elongación y una acumulación en la parte proximal del meristema apical de la raíz. Shin y col. (2005), en plantas de *Arabidopsis* expuestas a deficiencia de P hasta 30 h, evidenciaron que las ROS se acumularon más en el tejido cortical que en la epidermis cuando las raíces fueron privadas de P. La deficiencia de otros nutrientes como el N y el K, llevaron a una acumulación de estas especies en una región discreta de la raíz, justo detrás de la zona de elongación. Por lo tanto, puede ocurrir que los niveles de ROS totales no cambien, pero si la distribución de los mismos

en las raíces, o que la ventana temporal para evidenciar los cambios debido a una generación diferencial de estas especies deba ser ampliada. Sería interesante además realizar cortes longitudinales y evidenciarlos mediante microscopía óptica para descartar diferencias en la distribución, como fueron informadas por Tyburski y col (2009). En el caso del empleo de DCFH pueden realizarse cortes transversales y longitudinales y visualizarlos empleando microscopía confocal a fin de evaluar la distribución de las especies con mayor precisión.

La presencia de ROS también pudo ser estimada en hojas. Si bien la integración de las señales obtenidas luego de la incubación de las hojas con DCFH-DA no evidenció diferencias significativas entre los tratamientos, sí se observó una tendencia que indicaría que estas especies pueden incrementarse a partir de las 48h. Un panorama similar resultó cuando se empleó NBT en las incubaciones. Los resultados parecen indicar que los niveles de estas especies podrían incrementarse a partir de las 48h de deficiencia, lo cual plantea la necesidad de estudiar los cambios a tiempos posteriores a 48h. En este sentido (Shin y Schachtman, 2004) describieron que las ROS aumentaron en hojas de plantas de maíz y *Arabidopsis* entre las 6 y 30 h de privación de K, sugiriendo un rol para estas especies en la señalización frente a la deficiencia de este nutriente. Además evidenciaron que la producción de ROS en las raíces es una respuesta temprana que modula la expresión de genes y cambios fisiológicos relacionados con la captación de este nutriente (Shin y Schachtman, 2004). Existen evidencias moleculares en relación a las respuestas de las plantas frente a la deficiencia de nutrientes, que sugieren que existen caminos de transducción de señales en común (Wang y col., 2002). Por lo tanto es probable que estas especies también cumplan un rol en señalización frente a la deficiencia de otros nutrientes como el P.

La presencia de especies activas del oxígeno tanto en plantas controles como expuestas a deficiencia de P parece indicar un rol específico durante el crecimiento, como ha sido descrito por otros autores (Lizkay y col 2004; Foreman y col., 2003; Shin y col., 2005). En este sentido no se evidenció daño en los tejidos al evaluar la salida de electrolitos, indicando que los niveles de estas especies deben estar finamente regulados para evitar daño. Sería interesante evaluar más específicamente el daño oxidativo empleando técnicas como la detección de proteínas oxidadas o el daño a membranas mediante peroxidación de lípidos (Jasid y col., 2006).

Es importante mencionar que, la detección de la producción *in situ* de ROS presenta dificultades. Entre ellas podemos mencionar las bajas concentraciones en estado estacionario, la vida media corta y los eficientes y redundantes sistemas de atrapamiento, lo cual requiere el empleo de una técnica sensible, y que pueda competir eficientemente con los antioxidantes por la sustancia en cuestión. Por otra parte deben

tener un acceso adecuado al medio intracelular para reflejar estas condiciones. Finalmente las reactividades cruzadas de las distintas especies activas con los sistemas de detección pueden llevar a una identificación y cuantificación equivocada de las mismas (Tarpey y col., 2004). La oxidación de DCFH a DCF dependiente de H_2O_2 se produce lentamente, si es que se produce, en ausencia de Fe^{2+} . Además esta oxidación es potenciada en presencia de sustancias conteniendo el grupo hemo, como por ejemplo peroxidasas, en ausencia o presencia de H_2O_2 . Además el H_2O_2 no necesariamente permanece dentro de la célula, puede re-acumularse en el espacio extracelular estando disponible para reaccionar con otros oxidantes. Otras sustancias son capaces de inducir la formación de DCF, en ausencia de H_2O_2 , como el peroxinitrito y HClO, y peróxidos lipídicos en presencia de compuestos conteniendo hemo (Tarpey y col., 2004). Es interesante entonces complementar la detección con otras metodologías que permitan confirmar los resultados obtenidos. Es importante también realizar controles para incrementar la especificidad de la detección de la especie en cuestión. Por ejemplo, se pueden realizar incubaciones previas utilizando antioxidantes, como ser el empleo del galato de propilo previo a la incubación con NBT (Tyburski y col., 2009). En este sentido sería interesante también estudiar la actividad de las enzimas antioxidantes encargadas de detoxificar las especies activas evaluadas. En este caso la actividad de las enzimas catalasa (CAT) y ascorbatoperoxidasa (APX) (encargadas de detoxificar el H_2O_2), y superóxidodismutasa (SOD) (que cataliza la dismutación del anión superóxido). Ha sido descrito que la actividad de estas enzimas resultó incrementada como consecuencia de la deficiencia de P en hojas de plantas de maíz, a tiempos más prolongados de deficiencia (Tewari y col., 2004).

Si bien es probable que el tiempo de restricción sea demasiado corto como para evidenciar cambios significativos en muchos de los parámetros estudiados, en algunos casos se observaron tendencias (debido a la dispersión que presentan los métodos de detección de estas especies) que deben ser confirmadas y complementadas con otras metodologías que puedan aportar información adicional, como se describió anteriormente. Sin embargo el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar aspectos fisiológicos y bioquímicos durante las primeras horas de deficiencia de P a fin de evidenciar cambios tempranos. Por lo tanto la detección de estas especies a tiempos cortos de deficiencia, con indicios de cambios en la cantidad o en la distribución de las mismas, podría indicar algún rol en procesos de señalización celular que sería interesante explorar en un futuro.

Conclusión

Los resultados indican que se cumplieron los objetivos planteados en el

presente proyecto ya que pudieron caracterizarse algunos aspectos fisiológicos y bioquímicos durante las primeras horas de deficiencia de P en plantas de soja, como la concentración y distribución del P en los distintos tejidos y la puesta en marcha de posibles mecanismos compensatorios. A pesar de las dificultades que plantea la detección de las especies activas *in situ* en los tejidos discutidas anteriormente, se lograron poner a punto dos técnicas para la detección de ROS en raíces y hojas de soja empleando técnicas de microscopía de epifluorescencia y confocal, pudiendo detectar la presencia de estas especies en condiciones de suficiencia y deficiencia de P, sin evidenciar alteraciones en la fotosíntesis o signos de daño a tejidos. Estos resultados preliminares obtenidos abren la puerta a futuros estudios en este sistema experimental, reforzando la idea del papel fisiológico y de señalización que pueden tener estas especies para el normal crecimiento y desarrollo de las plantas y la respuesta a situaciones de estrés abiótico, en particular la deficiencia de nutrientes minerales.

Bibliografía

Ashley K, Cordell D, Mavinic D. (2011) A brief history of phosphorus: from the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. *Chemosphere*, 84: 737-746.

Baker A, Ceasar SA, Palmer AJ, Paterson JB, Qi W, Muench SP, Baldwin SA. (2015) Replace, reuse, recycle: improving the sustainable use of phosphorus by plants. *Journal of Experimental Botany*, 66:3523-3540.

Buet A, Moriconi JI, Santa-María GE, Simontacchi M. (2014) An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83:337-345.

Castro LN, Melgar R. (2005) Rocas Fosfóricas en Minerales para la Agricultura en Latinoamérica. Nielson y Sarudiansky eds., Buenos Aires, Cap. 3:37-253.

Clark G, Fraley D, Steinebrunner I, Cervantes A, Onyirimba J, Liu A, Torres J, Tang W, Kim J, RouxSJ. (2011). Extracellular nucleotides and apyrases regulate stomatal aperture in Arabidopsis. *Plant physiology*, 156:1740-1753.

Epstein E, Bloom A. (2005) Mineral nutrition of plants: principles and perspectives, 2nd ed. Sinauer Assoc. Inc., Sunderland.

Flexas J, Ribas-Carbó M, Bota J, Galmés J, Henkle M, Martínez-Cañellas S, Medrano H. (2006). Decreased Rubisco activity during water stress is not induced by decreased relative water content but related to conditions of low stomatal conductance and chloroplast CO₂ concentration. *New Phytologist*, 172:73-82.

Foreman J, Demidchik V, Bothwell JH, Mylona P. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422: 442.

Gilbert N. (2009) The disappearing nutrient: phosphate-based fertilizers have helped spur agricultural gains in the past century, but the world may soon run out of them. *Nature*, 461:716-719.

Halliwell B. (2006) Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life Plant Physiology, 141:312-322.

Henry, A., N.F. Chaves, P.J.A. Kleinman y J.P. Lynch (2010). Will nutrient-efficient genotypes mine the soil? Effects of genetic differences in root architecture in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) on soil phosphorus depletion in a low-input agroecosystem in Central America. Field Crops Research, 115: 67-78.

Hernández I, Munné-Bosch S. (2015) Linking phosphorus availability with photo-oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany, 66 :2889-2900.

Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S (2006) Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. Plant Physiology, 142:1246-1255.

Jasid S, Galatro A, Villordo JJ, Puntarulo S, Simontacchi M (2009). Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. Plant science, 176: 662-668.

Kitson RE, Mellon MG. (1944) Colorimetric Determination of Phosphorus as Molybdivanadophosphoric Acid. Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition, 16:379-383.

Lambers H, Finnegan P, Laliberté E. (2011) Phosphorus nutrition of *Proteaceae* in severely phosphorus-impooverished soils: are there lessons to be learned for future crops? Plant Physiology, 156:1058-1066.

Liszakay A, van der Zalm E, Schopfer P. (2004). Production of Reactive Oxygen Intermediates (O_2^- , H_2O_2 , and OH) by Maize Roots and Their Role in Wall Loosening and Elongation Growth. Plant Physiology, 136: 3114-3123.

Lynch JP, Deikman J. (1998). Phosphorus in plant biology: regulatory roles in molecular, cellular, organismic, and ecosystem processes. Current Topics in Plant Physiology. American Society of Plant Physiologists, Vol. 19. Rockville, MD, USA.

Mellers DG, Foulds IV, Higgins VJ, Heath MC. (2002) H_2O_2 plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. The Plant Journal, 29: 257-268.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in plant science, 7:405-410.

Pang J, Yang J, Lambers H, Tibbett M, Siddique KHM, Ryan MH. (2015) Physiological and morphological adaptations of herbaceous perennial legumes allow differential access to sources of varying soluble phosphate. Physiologia Plantarum, 154:511-525.

Shin R, Berg RH, Schachtman DP (2005) Reactive Oxygen Species and Root Hairs in Arabidopsis Root Response to Nitrogen, Phosphorus and Potassium Deficiency. Plant Cell Physiology, 46:1350-1357.

Shin R, Schachtman DP (2004). Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101:8827-8832.

Singh R, Parihar P, Singh S, Mishra RK, Singh VP, Prasad SM (2017). Reactive oxygen species signaling and stomatal movement: Current updates and future perspectives.

RedoxBiology, 11:213-218.

Simontacchi M, Galatro A, Ramos-Artuso F, Santa-María GE. (2015) Plant Survival in a Changing Environment: The Role of Nitric Oxide in Plant Responses to Abiotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 6:977.

Tarpey MM, Wink, DA, Grisham MB. (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: in vitro and in vivo considerations. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286:R431-R444.

Tewari RK, Kumar P, Tewari N, Srivastava S, Sharma PN. (2004). Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses-influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant science*, 166:687-694.

Tyburski J, Dunajska K, Tretyn A. (2009) Reactive oxygen species localization in roots of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown under phosphate deficiency. *Plant Growth Regulation*, 59:27-36.

Veneklaas EJ, Lambers H, Bragg J, Finnegan PM, Lovelock CE, Plaxton WC, Price CA, Scheible W-R, Shane MW, White PJ, Raven JA. (2012) Opportunities for improving phosphorus-use efficiency in crop plants. *New Phytologist*, 195:306-320.

Wang YH, Garvin DF, Kochian LV. (2002) Rapid induction of regulatory and transporter genes in response to phosphorus, potassium and iron deficiencies in tomato roots. Evidence for cross talk and root/rhizospheremediated signals. *Plant Physiol.* 130: 1361-1370.

