Instituto de Fisiología Vegetal

(INFIVE) UNLP-CONICET

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales

Universidad Nacional de La Plata

TRABAJO FINAL DE CARRERA

INGENIERÍA AGRONÓMICA

EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÓXIDO NÍTRICO EN PLANTAS EXPUESTAS A RESTRICCIÓN DE FOSFATO

Alumno: Mateos, Rocío Soledad
Legajo: 26566/6
DNI: 35.408.321
Correo electrónico: romateos6@gmail.com
Teléfono: (02355-15506633)

Alumno: Marinacci, Gonzalo
Legajo: 26307/8
DNI: 34.547.736
Correo electrónico: marinacci225@hotmail.com
Teléfono: (02345-15433936)

Fecha de entrega: **21/10/16**

INDICE

Introducción 4
Hipótesis 7
Objetivo general 8
Objetivos particulares 8
Materiales y métodos: 8
Material vegetal y tratamientos 8
Peso fresco 9
Contenido total de fósforo en los tejidos 10
Indicadores de senescencia: 11
-Evaluación de la capacidad fotosintética 11
-Contenido de pigmentos fotosintéticos 11
Indicadores de eficiencia en la utilización de P 11
Análisis estadístico 12
Resultados 13
Discusión 24
Conclusión 28
Bibliografía 29

Resumen

La disponibilidad de fósforo (P) para los cultivos es una problemática que afecta los suelos a nivel mundial. La baja disponibilidad de P para ser utilizado por las plantas, conlleva a la necesidad del uso de fertilizantes en grandes cantidades, los que por fenómenos de escorrentía suelen contaminar cursos de agua. Por otra parte, la disponibilidad de roca madre para la obtención del P utilizado como fertilizante constituye un recurso finito, estos aspectos hacen que resulte de interés plantear como estrategia el estudio de los factores que puedan optimizar la absorción y uso de P por las plantas.

El óxido nítrico (NO) es una molécula bioactiva sintetizada por las plantas que participa en numerosos procesos fisiológicos y de estrés.

En este trabajo se evaluó el efecto de la presencia de un dador de NO (S-nitrosoglutatión) sobre determinados parámetros fisiológicos y morfológicos de plantas de soja creciendo en cultivos hidropónicos en condiciones control y de restricción de P. En las plantas creciendo con restricción de P, el NO no afectó significativamente los parámetros de crecimiento, del mismo modo no se vio afectada la concentración de P en raíz ni en las primeras hojas (hojas más viejas), comparado con las plantas que crecieron en ausencia del dador de NO. Se observó un efecto de retraso del proceso de senescencia por parte del NO, evaluado a través del contenido de clorofila en las hojas más viejas. En las condiciones experimentales planteadas no se observaron diferencias significativas en la eficiencia de uso ni en la eficiencia de utilización de P debidas a la presencia de NO.

Título: EFECTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ÓXIDO NÍTRICO EN PLANTAS EXPUESTAS A RESTRICCIÓN DE FOSFATO

Área: Fisiología Vegetal.

Modalidad: Trabajo de Investigación

Introducción

En los últimos años se reconoció al óxido nítrico (NO) como una molécula con importante participación en numerosos procesos de la fisiología vegetal, que van desde la germinación hasta la senescencia (Lamattina y col., 2003; Simontacchi y col., 2015). El NO es sintetizado por las plantas por mecanismos que aún no están totalmente dilucidados, mientras que los niveles de esta molécula en los tejidos actúan como reguladores del crecimiento y median la acción de las hormonas vegetales (Simontacchi y col., 2013; Gupta y col., 2011).

En la bibliografía consultada se describe claramente la participación del NO en la respuesta de las plantas a bajo suminstro de P. En trabajos llevados a cabo utilizando lupino blanco (*Lupinus albus*) expuestos a condiciones de deficiencia de P, se observó la formación de raíces profusamente ramificadas (denominadas raíces proteoides) y la liberación hacia la rizosfera de ácidos orgánicos de bajo peso molecular y protones (Lambers y col., 2011; Niu y col., 2013). Estas modificaciones favorecen el aprovechamiento del *stock* de P no disponible del suelo. Se ha demostrado una acumulación de NO en los ápices de raíces primarias y laterales en lupino blanco expuestas a deficiencia de P, correlacionada con los cambios de la morfología de raíz y el

aumento de la exudación de citrato (Wang y col., 2010). La sola adición de dadores de NO como nitroprusiato de sodio (SNP) y S-nitrosoglutatión (GSNO) también condujo a la formación de raíces proteoides en Lupino blanco, característicamente observadas como respuesta al déficit de P (Meng y col, 2012).

El NO participa en el control de la homeostasis de metales de transición, en particular hierro, ya que se observó que la exposición a NO revierte los síntomas de clorosis en plantas expuestas a deficiencia de hierro y además afecta los mecanismos de absorción (Graziano y col., 2002; Graziano y Lamattina 2007). Se demostró además que tiene un papel en la modulación de la captura de Zn, en plantas expuestas a cantidades excesivas de este elemento (Xu y col., 2010), así como bajo condiciones de restricción de Zn (Buet y col., 2014). La adición del dador GSNO como una fuente de NO en plantas de trigo privadas de Zn, provocó la aparición acelerada de síntomas de senescencia en hojas que fue acompañado por una disminución de la asignación de Zn a brotes (Buet y col., 2014). En cuanto al potasio, se observó que la suplementación de NO exógeno aumenta el contenido de K^+ bajo condiciones de exposición a altas concentraciones de sal en la planta halófila *Kandelia obovata,* y que este aumento se correlaciona con cambios en el transporte de iones (un aumento de los transcriptos de canales de K, AKT1) (Chen y col., 2013).

Existe información referida a que el NO participa en las respuestas de las plantas a cambios en las condiciones ambientales, como por ejemplo cierre de estomas inducido por ABA frente a condiciones de stress hídrico (Neill y col., 2002), desarrollo de raíces laterales modulada por IAA (Pagnussat y col., 2002) y síntesis de antocianinas inducidas por UV-B (Hao y col., 2009).

Las auxinas son fitohormonas que a muy bajas concentraciones estimulan la elongación de raíces y ramificación de raíces laterales. Se demostró que la organogénesis es promovida por el NO mediando las respuestas a auxinas en *Cucumis*

*sativus (*Pagnussat y col., 2002*)* y en *Solanum lycopersicum* (Correa- Aragunde y col., 2004). El efecto estimulante del NO en la elongación de la raíz se observó en maíz (Gouvea 1997). Dos dadores de NO, SNP y S -nitroso, N–acetil-penicilamina (SNAP), aplicados en el hipocotilo (raíces primarias eliminadas) del pepino (*Cucumis sativus*) fueron capaces de imitar el efecto de la auxina IAA en la inducción de la formación de raíces adventicias (Pagnussat y col., 2002). Un aspecto puesto de manifiesto en el curso de las investigaciones referidas al rol del NO durante la deficiencia de hierro es que la profusa ramificación de las raíces observada en plantas de tomate en condiciones de déficit es acompañada por un aumento de los niveles endógenos de auxinas y NO (Terrile y col., 2012).

La senescencia en las especies monocárpicas tiene gran importancia en la removilización de nutrientes desde las hojas hacia los granos, y es influenciada tanto por factores externos como internos. Entre los factores que pueden acelerar la senescencia se encuentran las deficiencias nutricionales. Durante la senescencia se degradan las clorofilas, disminuye la capacidad para realizar fotosíntesis y se degradan las proteínas y ácidos nucleicos. La degradación de ácidos nucleicos, principalmente el ARN ribosómico, constituye una fuente importante de C, N y P (Bariola y col., 1999).

Es conocido, desde hace ya más de 150 años, que el fósforo (P) es un nutriente esencial requerido para el crecimiento y normal desarrollo de las plantas, donde forma parte de moléculas tales como ADN, ARN y fosfolípidos de membranas (Marschner 1995). Por otro lado, participa en numerosas reacciones de intercambio, actuando como transductor de energía química, así como en procesos de señalización celular (Epstein y Bloom, 2005). La disponibilidad de HPO_4^{2-} en la solución del suelo que baña las raíces suele ser baja por lo que se estima que entre el 40 y el 60 % del rendimiento de los cultivos se encuentra condicionado por este nutriente (Uexküll y Mutert, 1995).

Han sido observadas diversas respuestas fisiológicas a la baja disponibilidad externa de P, algunas de las cuales varían en gran medida entre especies. Así, mientras que el bajo suministro de P conduce a una reducción de la elongación de las raíces en *Arabidopsis* y otras plantas (Jiang y col., 2007), en trigo se ha observado un incremento del peso seco de la raíz (Wang y col., 2013). En ambos grupos de plantas existe una clara tendencia a la acumulación diferencial de biomasa en la raíz, con respecto al vástago, así como a la proliferación de raíces laterales (Jiang y col., 2007). Por otro lado, se ha observado que cuando las raíces, acorde a su crecimiento exploratorio, encuentran zonas de abundante disponibilidad de P, ocurre un crecimiento localizado (Chiou y Lin, 2011). En tanto, diferencias en la utilización de P podrían estar reflejando diferencias, entre distintas especies o variedades, en la removilización de este nutriente desde las hojas viejas hacia las jóvenes, en la recuperación de P desde el ARN debido a la actividad de ribonucleasas o cambios en el patrón de senescencia (Bariola y col. 1999).

En el presente proyecto nos planteamos evaluar la senescencia en hojas de soja inducida por la deficiencia de fosfato en relación a la disponibilidad de NO, así como el efecto del agregado de NO sobre el desempeño de plantas de soja creciendo en condiciones contrastantes de disponibilidad de P. Los efectos se evaluaron analizando parámetros de crecimiento, índices de eficiencia de uso del nutriente y capacidad fotosintética.

Hipótesis

Se propone que el NO afecta o modula procesos de crecimiento y senescencia de las plantas, tanto en condiciones adecuadas como limitantes de nutrientes. Los efectos del óxido nítrico sobre el crecimiento se ven reflejados en modificaciones en la eficiencia en el uso de P.

Objetivo general

El objetivo central de este plan de trabajo es estudiar el efecto del óxido nítrico (NO) sobre la eficiencia en el uso y adquisición de fósforo (P) en soja (*Glycine max*) a través del análisis del crecimiento vegetativo, la concentración y distribución de P, así como indicadores de la capacidad fotosintética.

Objetivos particulares

1- Analizar el efecto del NO sobre la redistribución de fósforo en plantas de soja.

2- Analizar el efecto del NO sobre la senescencia en hojas de soja.

3- Analizar el efecto del NO sobre los indicadores de eficiencia en el uso de fósforo en plantas de soja.

Materiales y métodos

Material vegetal y tratamientos

Las semillas de soja (*Glycine max*, DM 4800) fueron esterilizadas por lavado con solución de hipoclorito de sodio al 10% durante 5 min, y germinadas en oscuridad y humedad durante 48 h a 28°C. Posteriormente fueron transferidas a recipientes plásticos de 0,8 L de capacidad, conteniendo solución nutritiva con la siguiente composición: $Ca(NO_3)_2$ 1 mM, $MgSO_4$ 0,5 mM, NaCl 0,15 mM, KCl 1mM, FeEDTA 50 μM, $CaCl_2$ 50 μM, H_3BO_3 25 μM, $ZnSO_4$ 2 μM, $MnSO_4$ 2 μM, $CuSO_4$ 0.5 μM, ácido molíbdico 0,5 μM, MES 2,5 mM, y H_3PO_4 0,5 500 μM. El pH se ajustó a 6,0 mediante la adición de $Ca(OH)_2$.

Las soluciones fueron aireadas continuamente, renovadas día por medio y la densidad de plantas fue de una por recipiente. Los cultivos se mantuvieron en una cámara de cultivo ubicada en el INFIVE con temperatura de 24±2^{o}C y fotoperíodo de 14 h, la radiación fotosintéticamente activa fue de 300 μmoles fotones m^{-2} s^{-1} provista por un banco de luces Philips de 40W.

Luego de 1 semana (tiempo 0 del tratamiento) las plantas fueron divididas en forma aleatoria en grupos que recibieron los siguientes tratamientos:

1- Solución nutritiva completa (500 μM H_3PO_4; +P, grupo control).

2- Solución nutritiva sin el agregado de P (-P). En el caso de las soluciones sin el agregado de ácido fosfórico se compensó la cantidad de Ca^{2+} requerida para llevar el pH a 6,0 mediante el agregado de $CaCl_2$.

3- Agregado del dador de NO (S-nitrosoglutatión; GSNO) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes (50 μM y 100 μM).

La solución madre de GSNO (70 mM) fue sintetizada químicamente a partir de la mezcla de volúmenes iguales de glutatión (GSH) 140 mM, preparado en buffer fosfato de potasio 100 mM pH 7,4, y $NaNO_2$140 mM, preparado en HCl 0,1 N. Las soluciones de trabajo fueron preparadas a partir de la solución madre descripta más arriba. El dador de NO se agregó con cada cambio de solución nutritiva (3 veces por semana).

Se realizó una cosecha inicial (todas plantas control de una semana de crecimiento) para evaluar parámetros iniciales.

Los tratamientos se mantuvieron durante tres semanas, al finalizar los mismos las plantas tuvieron 4 semanas en total de crecimiento y fueron cosechadas.

Peso fresco

El peso fresco se determinó pesando el material vegetal inmediatamente después de ser cosechado y lavado en agua bi-destilada. A partir de esta medición se evaluó la acumulación de biomasa en raíz y parte aérea.

Contenido total de fósforo en los tejidos

Las muestras obtenidas para la determinación del peso fresco se incineraron a temperatura de 540^{o}C en mufla hasta obtención de cenizas. Se procedió con el agregado de solución de ácido nítrico diluído 1:7 en agua destilada. Posteriormente se determinó el contenido de P en el digesto según la técnica de fosfo-molibdo-vanadato descripta por Kitson y Mellon, (1944), para lo cual se prepararon dos soluciones.

Solución A: Se disolvieron 1,25 g de NH_4VO_3 en agua hirviendo. Una vez enfriado a temperatura ambiente se adicionan 10 ml de HNO_3y se llevó a volumen final de 500 ml con H_2O destilada.

Solución B: Consiste en una solución de $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ al 5% en H_2O destilada.

Curva de calibración: Se prepararon las distintas soluciones de fosfato que conforman la curva de referencia (0, 10, 20, 30,40, 50 y 60 ppm). Se adicionan 3,5 ml de HNO_3 al 50% y el volumen necesario de KH_2PO_4 (100 ppm) para obtener cada una de las concentraciones. Finalmente se lleva cada preparación a un volumen de 50 ml mediante el agregado de H_2O destilada.

Procedimiento: Se adicionaron los reactivos: 250 µl de muestra, 100 µl de la solución A, 100 µl de la solución B y finalmente 550 µl de H_2O bidestilada. La medición de la absorbancia de las muestras se realizó con un espectrofotómetro a λ= 460 nm. El contenido de P en las muestras de obtuvo por interpolación de la curva de calibración, la concentración de P se obtuvo expresando el resultado en relación al peso del material vegetal.

Indicadores de senescencia:

- *Evaluación de la capacidad fotosintética*

Se evaluó a través de la medición de la fluorescencia de clorofila de las hojas utilizando un equipo de fluorescencia modulada (FMS2, Hansatech Instruments, UK). En presencia de iluminación constante el rendimiento cuántico del fotosistema II (Φ_{PSII}) fue obtenido a partir de la relación entre fluorescencia variable (F_v') y máxima (F_m') en hojas adaptadas a la luz (Maxwell y Johnson, 2000).

- *Contenido de pigmentos fotosintéticos*

Para la cuantificación de pigmentos las hojas se trituraron en mortero utilizando N_{liq}, el polvo obtenido se pesó (50 a 100 mg) y se realizó la extracción empleando acetona al 80% e incubando durante 4h a 4°C en oscuridad. Posteriormente, para separar los restos de tejido de la solución con los pigmentos, se centrifugo la mezcla durante 5 minutos a 8000 rpm. El contenido de clorofila *a*, clorofila *b* y de carotenos totales en la fase orgánica fue determinado espectrofotométricamente midiendo la absorbancia de las muestras a λ=663 nm, λ=647 nm y λ=470 nm (Lichtenthaler, 1987), y expresado en base al peso fresco.

$$[\text{Clorofila a}] = (12{,}25\ A_{663\ nm} - 2{,}79\ A_{647\ nm}) \cdot \frac{0{,}005 \cdot 1000}{PF\ (mg)}$$

$$[\text{Clorofila b}] = (21{,}50\ A_{647\ nm} - 5{,}10\ A_{663\ nm}) \cdot \frac{0{,}005 \cdot 1000}{PF\ (mg)}$$

$$[\text{Clorofila total}] = (19{,}75\ A_{647\ nm} + 7{,}90\ A_{663\ nm}) \cdot \frac{0{,}005 \cdot 1000}{PF\ (mg)}$$

$$[\text{Carotenos}] = (1000.\ Abs_{\ 470\ nm} - 1{,}82\ mg\ a\ /ml - 85{,}0\ mg\ b/ml) / 198.$$

Indicadores de eficiencia en la utilización de P

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

$$Eficiencia\ del\ uso = \frac{PF_f}{Q_f}$$

$$Eficiencia\ de\ la\ utilización = \frac{PF_f}{C_f}$$

En las cuales, PFf corresponde al peso fresco final; Qf, al contenido final del nutriente; Cf, a la concentración del nutriente (es el contenido dividido la masa del tejido).

Análisis estadístico

Se realizaron tres experimentos independientes con un número de muestras de 4 para cada grupo. En todos los casos el análisis estadístico de los datos se efectuó a través de ANOVA de doble entrada, las comparaciones post-hoc se hicieron a través del test de Tukey (nivel de significancia α=0.05).

Resultados

Para realizar una caracterización general de las respuestas de las plantas a los distintos tratamientos, realizamos mediciones a fin de conocer la acumulación de biomasa en cada uno de ellos. Se realizó la determinación del peso fresco del vástago de todas las plantas cultivadas. Al finalizar las cuatro semanas de crecimiento en los tratamientos bajo restricción de P se observó una disminución estadísticamente significativa con respecto al tratamiento control (Fig.1). En cambio, cuando se determinó el peso fresco de las raíces, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con un peso para el control de 8 ± 1 g de raíz/planta (Fig. 2).

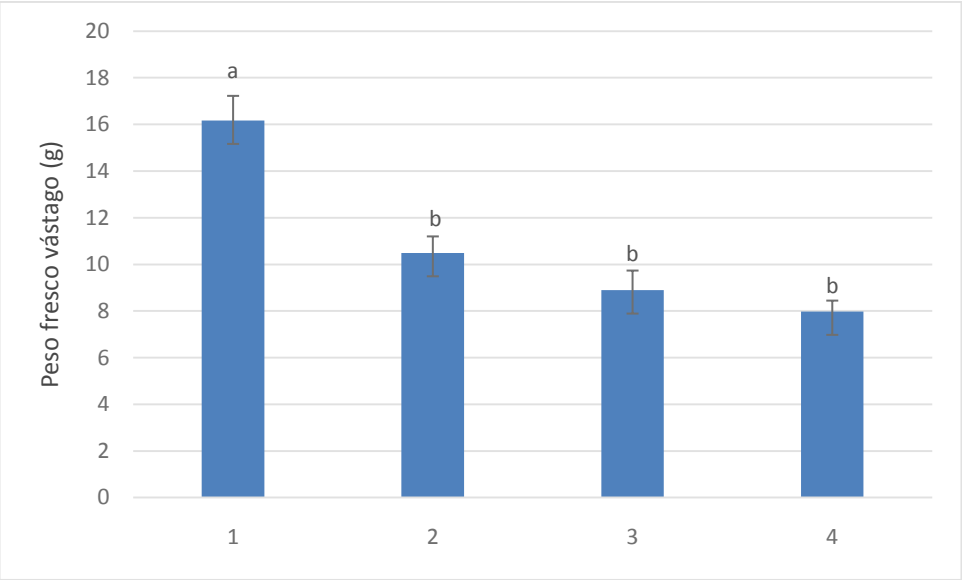

Figura n°1. Peso fresco del vástago en plantas de 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P) (1)** y sin el agregado de P **(-P) (2)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *µM* **(-P + 50 *µM* GNSO**) **(3)** y 100 *µM* ***(*-P + 100 *µM* GNSO) (4)**. El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

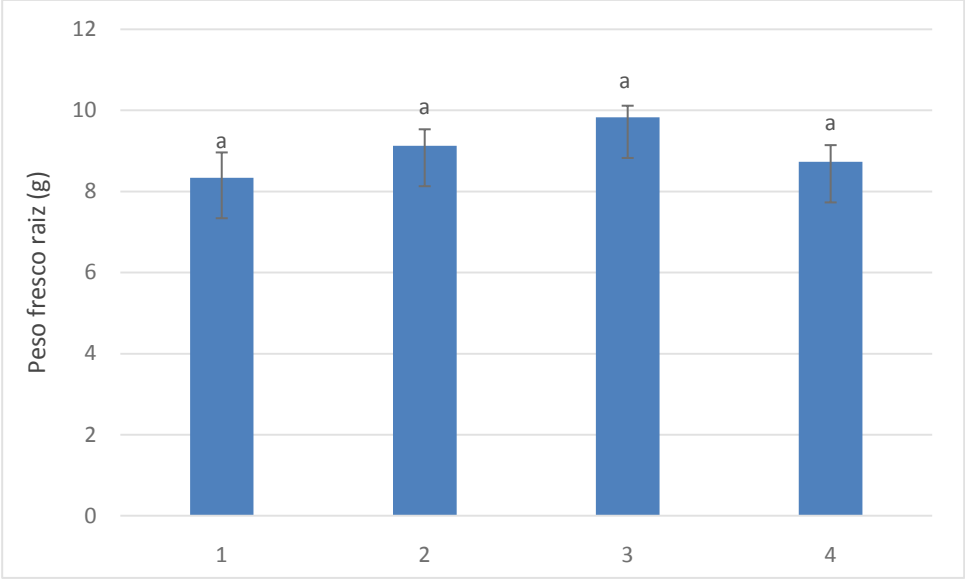

Figura n°2. Peso fresco de la raíz en plantas de 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P) (1)** y sin el agregado de P (**-P) (2)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *µM* **(-P + 50 *µM* GNSO**) **(3)** y 100 *µM* ***(*-P + 100 *µM* GNSO) (4)**. El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

En cuanto a la longitud de la raíz se observó una tendencia, aunque no resultó estadísticamente significativa, de las plantas con restricción de P a presentar una mayor longitud. De la misma forma se observó una tendencia por parte de las plantas restringidas en P a presentar vástagos de menor longitud. Como se observa en las Figuras 3 y 4, ante la deficiencia de nutrientes, las plantas suelen favorecer el crecimiento de la raíz sobre el vástago lo que permite explorar un área mayor del suelo, lo cual conduce a un cambio entre la distribución de biomasa entre la parte aérea y raíz.

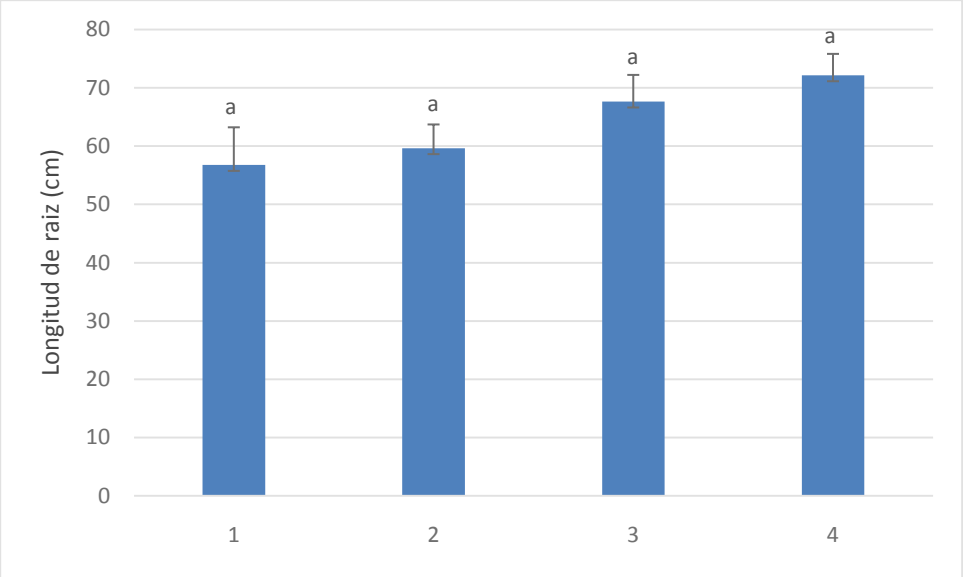

Figura n°3. Longitud de raíz en plantas de 4 semanas de crecimiento
Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P) (1)** y sin el agregado de P **(-P) (2)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *µM* **(-P + 50 *µM* GNSO**) **(3)** y 100 *µM* ***(*-P + 100 *µM* GNSO) (4)**. El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

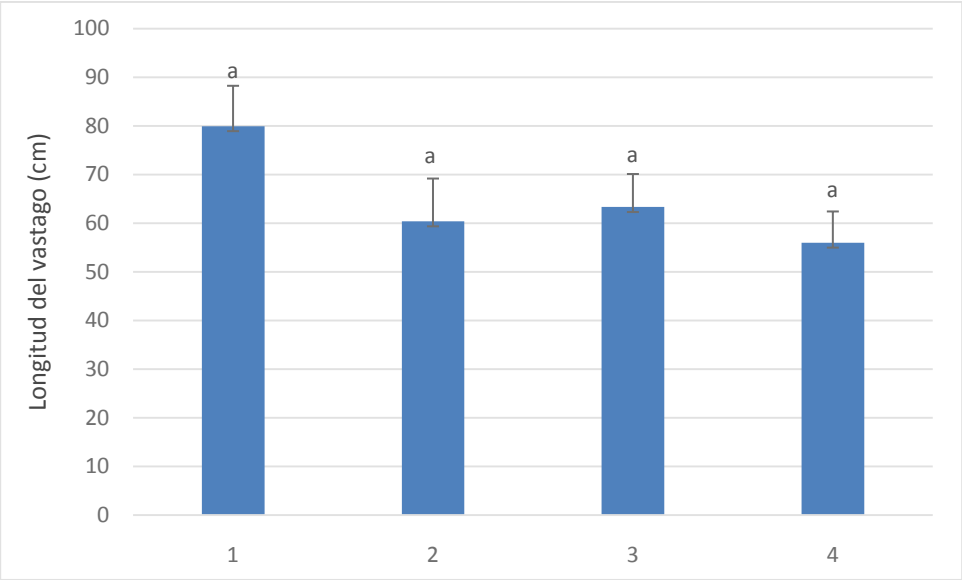

Figura n°4. Longitud de vástago en plantas de 4 semanas de crecimiento
Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P) (1)** y sin el agregado de P **(-P) (2)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *µM* **(-P + 50 *µM* GNSO) (3)** y 100 *µM* **(-P + 100 *µM* GNSO) (4)**. El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05)

A las cuatro semanas se analizó el contenido de fósforo en los tejidos de las plantas. Como se puede observar en las tablas 1 y 2, las plantas de soja cultivadas en solución completa tienen una concentración de fósforo superior al resto de los tratamientos. La diferencia del grupo control, con respecto a las desprovistas de P se debe a las diferencias en el suministro de fósforo durante todo el experimento. Los tratamientos con restricción de P no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre sí explicadas por el efecto de la adición de NO.

Tabla nº 1. Concentración de fósforo en hoja 1 y primera hoja trifoliada, en plantas de 4 semanas de crecimiento.

Tratamiento	**[P] en H1**	**[P] en trifoliada**
	(µmol/g PF)	**(µmol/g PF)**
Control	114 ± 9 a	91 ± 9 a
-P	2,6 ± 0,9 b	4,3 ± 0,2 b
- P + 50 µM GSNO	4 ± 1 b	5 ± 1b

- P + 100 µM GSNO	4 ± 1 b	5 ± 1 b

Tabla nº 2. Concentración de fósforo en raíz y vástago, en plantas de 4 semanas de crecimiento.

Tratamiento	**[P] en raíz**	**[P] en vástago**
	(µmol/g PF)	**(µmol/g PF)**
Control	32,5 ± 2[a]	17,0 ± 0,8[a]
-**P**	2,1 ± 0,5[b]	0,31 ± 0,04[b]
- P + 50 µM GSNO	2,3 ± 0,5[b]	0,36 ± 0,04[b]
- P + 100 µM GSNO	2,1 ± 0,4[b]	0,44 ± 0,04[b]

Los datos corresponden a la media obtenida ± el error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P<0,05$).

En cuanto a los indicadores de senescencia se determinó el contenido de pigmentos fotosintéticos.

En la hoja 1 se puede observar que se mantuvo el nivel de clorofila total en valores cercanos a los valores control (15± 2 mg/ g PF) en plantas expuestas a restricción de fósforo simultáneamente con la aplicación de un dador de NO, mientras que las plantas con restricción de P presentaron valores significativamente menores. En la Fig. 5 se observa como el agregado de GSNO previene la reducción en los niveles de clorofila en la hoja 1. En la Tabla 3 se detallan los distintos tipos de clorofila evaluados.

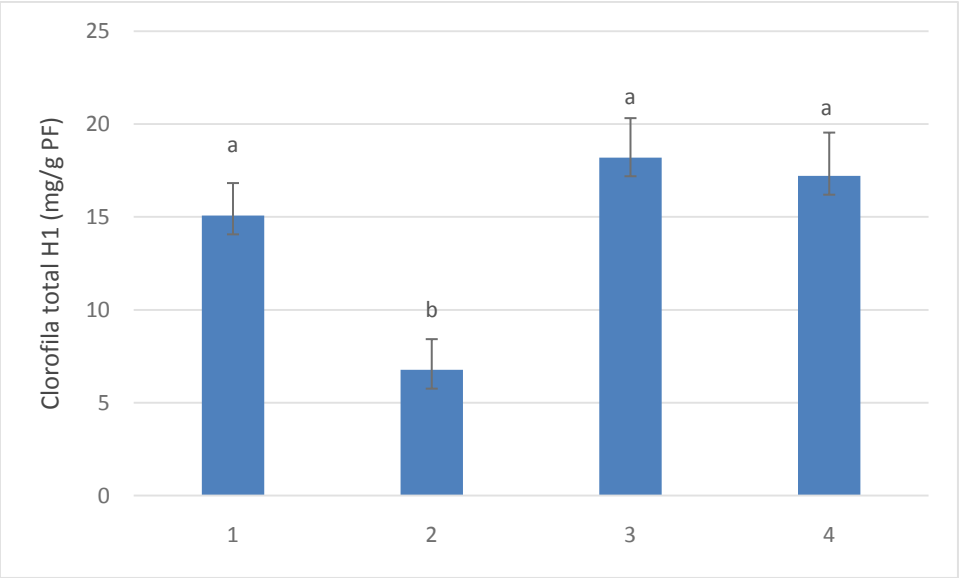

Figura n°5. Clorofila total en la primera hoja unifoliada en plantas de 4 semanas de crecimiento. Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P) (1)** y sin el agregado de P **(-P) (2)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *µM* **(-P + 50 *µM* GNSO) (3)** y 100 *µM* **(-P + 100 *µM* GNSO) (4)**. El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

Tabla 3. Clorofilas a y b en la primera hoja unifoliada.

Tratamiento	Clorofila a (mg/g PF)	Clorofila b (mg/g PF)
Control	11 ± 1[a]	3,9 ± 0,5[a]
-P	5 ± 1[b]	1,8 ± 0,4[b]
- P + 50 µM GSNO	13 ± 2[a]	4,7 ± 0,5[a]
- P + 100 µM GSNO	13 ± 2[a]	4,5 ± 0,5[a]

Los datos corresponden a la media obtenida ± el error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

El mantenimiento de los niveles de clorofila similares a los observados a las plantas +P en las –P cultivadas en presencia del dador de NO, se corresponden con un mantenimiento similar del rendimiento cuántico del fotosistema II para la H1 (Fig. 6).

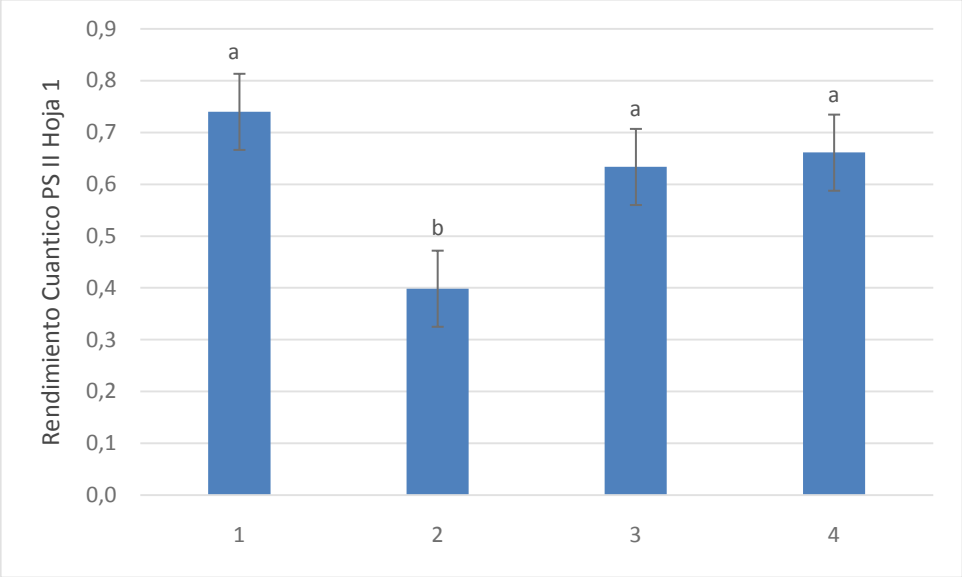

Figura n°6. Rendimiento Cuántico II en la primera hoja unifoliada en plantas de 4 semanas de crecimiento.
Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P) (1)** y sin el agregado de P **(-P) (2)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *µM* **(-P + 50 *µM* GNSO**) **(3)** y 100 *µM* **(-P + 100 *µM* GNSO) (4)**. El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).
Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

En cuanto a la 1er hoja trifoliada, se observó un incremento de la concentración de clorofila cuando las plantas fueron mantenidas en presencia de GSNO por sobre los valores observados tanto en plantas control como restringido en P (Tabla 3). Se observó una disminución del rendimiento cuántico en todas las plantas creciendo con restricción de P, independientemente de la adición de GSNO (Tabla 4).

Tabla 4. Clorofila y rendimiento cuántico en la primera hoja trifoliada en plantas de 4 semanas de crecimiento.

Tratamiento	Clorofila total (mg/g PF)	Rendimiento cuántico
Control	16,6 ± 0,8 [a]	0,717 ± 0,03 [a]
-P	13 ± 2 [a]	0,487 ± 0,07 [b]
- P + 50 µM GSNO	23,3 ± 0,9 [b]	0,494 ± 0,03 [b]
- P + 100 µM GSNO	25 ± 1 [b]	0,516 ± 0,02 [b]

Los datos corresponden a la media obtenida ± el error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey ($P<0,05$).

Se realizaron ensayos tendientes a evaluar el efecto del dador de NO sobre las plantas que recibieron nutrición completa. La fluorescencia de clorofila, indicador del funcionamiento del fotosistema II, no presentó modificaciones significativas para la hoja 1 (Fig. 7). Sin embargo, para la primera hoja trifoliada se observó un incremento para las plantas creciendo en solución nutritiva completa en función de la concentración de GSNO (Fig. 8).

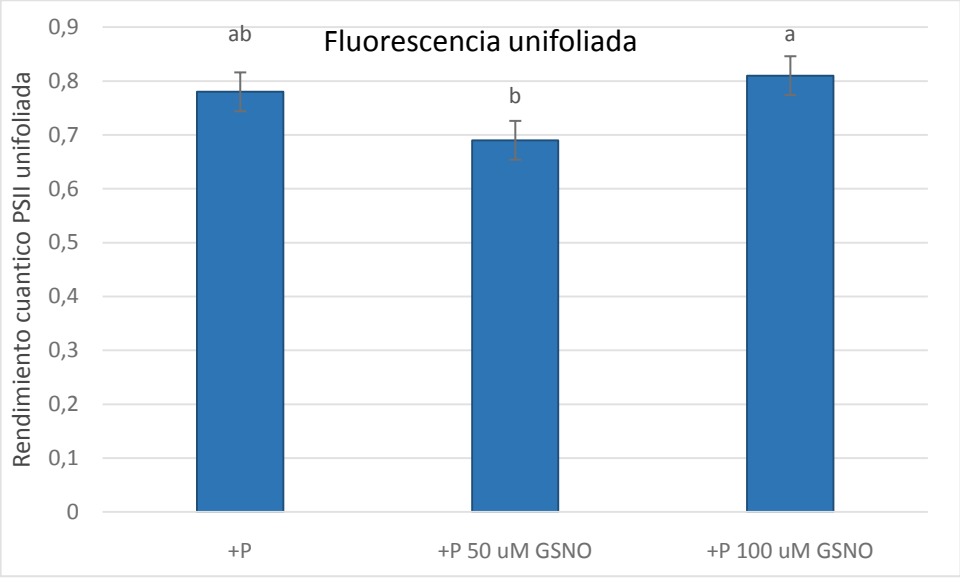

Figura n° 7. Fluorescencia en la hoja unifoliada en plantas de 4 semanas de crecimiento.

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *µM* y 100 *µM*. El experimento se realizó una vez (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

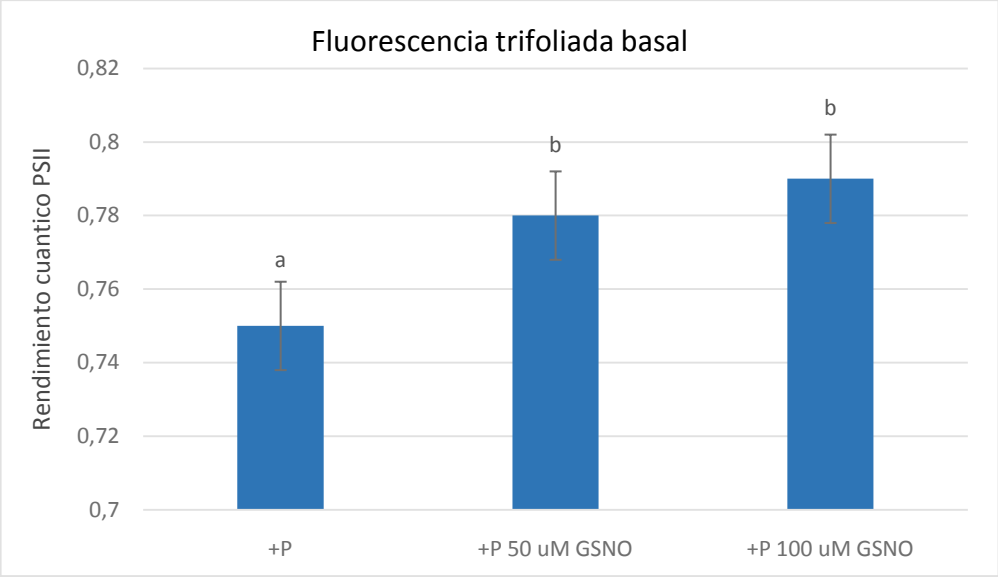

Figura n° 8. Fluorescencia en primera hoja trifoliada en plantas de 4 semanas de crecimiento. Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *µM* y 100 *µM*. El experimento se realizó una vez (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

Se evaluó la transpiración, observándose un incremento significativo para la hoja correspondiente a plantas expuestas al dador de NO (Fig. 10).

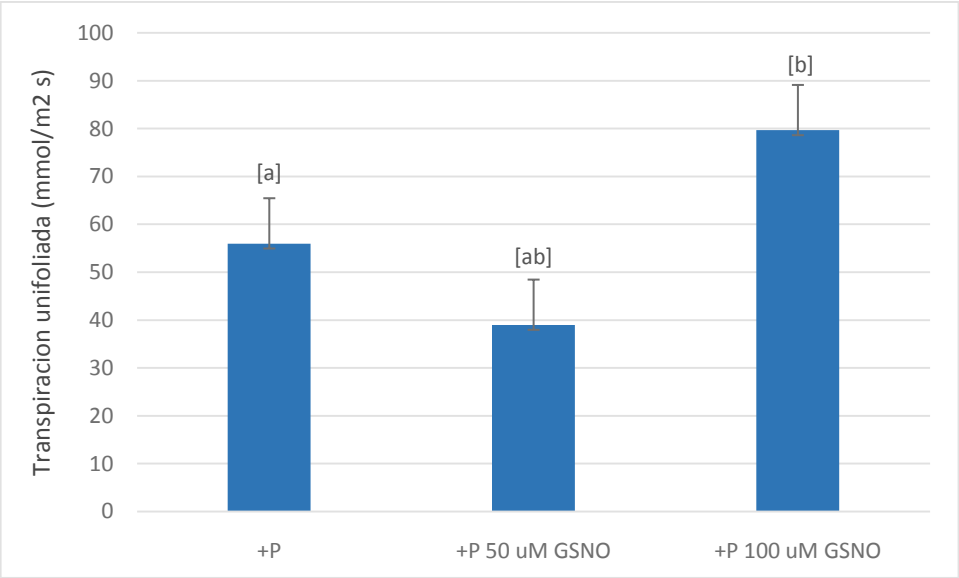

Figura n°9. Transpiración en la hoja unifoliada en plantas de 4 semanas de crecimiento

Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *μM* y 100 *μM*. El experimento se realizó una vez (con un número de cuatro plantas por tratamiento).

Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponden al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

Con el fin de estimar la influencia del NO sobre la eficiencia del uso de P por parte de las plantas de soja, se realizó el cálculo de dos indicadores: eficiencia de uso (EU) y eficiencia de la utilización de los nutrientes (EUN).

Se observó en nuestro caso que los tratamientos con privación de fósforo presentan los valores más altos de eficiencia de uso de fósforo (EUP) (Tabla 5). A su vez no se observaron diferencias significativas para aquellos tratamientos que tienen aporte de GSNO.

Con respecto a la eficiencia de la utilización (EU), existe diferencia significativa para los tratamientos con restriccion de dicho elemento y aquellos que tienen el aporte de P. Por otra parte, en los tratamientos de restricción de P, el tratamiento –P con el agregado de 100 uM GSNO es el que presenta mayor EU, sin embargo esta diferencia no llega a ser estadísticamente significativa (Tabla 5) . Para las plantas creciendo en

condiciones de buena disponibilidad de nutrientes, ninguno de los índices refleja mejoras estadísticamente significativas en la eficiencia debidas a la presencia del dador de NO.

Tratamiento	EUP	EU
+P	0,28 ± 0,01[a]	4,6 ± 3 [a]
+P 50 uM GSNO	0,49 ± 0,07[a]	7,7 ± 3 [a b]
+P 100 uM GSNO	0,9 ± 0,4[ab]	9,7 ± 3 [a b]
-P	2,9 ± 0,2[c]	27,3 ± 3 [c]
-P 50 uM GSNO	2,6 ± 0,3[bc]	21,6 ± 3 [b c]
-P 100 uM GSNO	1,9 ± 0,9[abc]	34,5 ± 3 [c]

Tabla 5. Eficiencia de uso y eficiencia de utilización de fósforo en plantas de 4 semanas de crecimiento. Las plantas se cultivaron en solución nutritiva completa **(+P)** y sin el agregado de P (**-P)** y con la presencia del dador de NO (S-nitrosoglutatión) en la solución nutritiva en dos concentraciones diferentes 50 *µM* y 100 *µM*. El experimento se repitió 3 veces (con un número de cuatro plantas por tratamiento).
Los datos corresponden a la media obtenida y las barras de error corresponde al error estándar. Las diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, evaluado mediante el test de Tukey (P<0,05).

Discusión

Las plantas, a lo largo de su evolución, han desarrollado diversos mecanismos que les permiten aclimatarse a la deficiencia de P. Podemos decir que algunas de las primeras respuestas bioquímicas y moleculares a la privación de P son la disminución de la concentración de P libre en los tejidos y el aumento del transporte de alta afinidad de P conjuntamente con la expresión de transportadores de P localizados en la epidermis radical (Cogliatti y Clarkson, 1983).

Resultados recientes muestran que las respuestas a la privación de P implican una *respuesta localizada*, la que está caracterizada principalmente por la modificación de la arquitectura de las raíces y, una *respuesta sistémica*, caracterizada por el mantenimiento de la homeostasis de P dentro de la planta (Thibaud et al., 2010; Péret et al., 2011).

Las raíces de las plantas presentan una elevada plasticidad ante los cambios en la composición del medio iónico que las baña. Se ha observado así que plantas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a deficiencia de P modifican la arquitectura de sus raíces mediante una rápida disminución de la tasa de crecimiento de la raíz principal y a través de un incremento de la tasa de elongación de las raíces laterales (Williamson et al., 2001; Al-Ghazi, 2003; Nacry et al., 2005; Péret et al., 2011). Se cree que esta respuesta maximiza la intercepción del nutriente cuando este tiende a acumularse en las porciones superiores del suelo (Abel, 2011). La disponibilidad localizada de P modula la actividad meristemática de las raíces. Existe evidencia de que la disponibilidad externa de P es la que modula la respuesta de crecimiento de las raíces en Arabidopsis y no el nivel interno de este elemento (Thibaud et al., 2010).

En nuestros experimentos llevados a cabo en un modelo de cultivo hidropónico se observó la característica restricción del crecimiento de la parte aérea de las plantas de soja, mientras que las raíces no presentaron, ni en longitud ni en peso fresco,

modificaciones de su crecimiento cuando se mantuvieron por tres semanas en una solución carente de P. Estos resultados concuerdan con la reducción del crecimiento del vástago observada en restricción de P en otros trabajos (Mollier y Pellerin, 1999; Tewari y col., 2004). Además, se ha observado que el área foliar se reduce significativamente con la falta de fósforo en *Phaseolus vulgaris* (Olivera y col., 2004). Este efecto podría estar parcialmente regulado por la vía de giberelinas-proteínas DELLA (Harberd y col., 2009; Tewari y col., 2004). La limitación de P induciría la acumulación de proteínas DELLA como consecuencia de la reducción de los niveles de giberelinas activas. Hasta el momento estas hipótesis no han sido analizadas en soja.

Estas respuestas se deben a que, ante la deficiencia de nutrientes, las plantas suelen favorecer el crecimiento de la raíz sobre el vástago lo que permite explorar un área mayor del suelo, lo cual conduce a un cambio entre la distribución de biomasa entre la parte aérea y raíz al menos durante los primeros estadios de deficiencia.

Las condiciones de cultivo utilizadas para llevar a cabo los experimentos de este trabajo distan 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 soja 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.

Cuando se determinaron los niveles de P en muestras frescas cosechadas luego de cuatro semanas de crecimiento se observaron diferencias significativas del grupo control, con respecto a las desprovistas del nutriente. Sin embargo, los tratamientos con restricción de P no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre sí explicadas por el efecto de la adición de NO. Teniendo en cuenta que el número total de hojas en las

plantas al momento de la cosecha fue de 21 y 16 en promedio para las plantas control y deficientes en P, respectivamente, y que el P es removilizado desde las hojas viejas a las nuevas, es esperable que las diferencias mas marcadas se presenten al analizar hojas diferentes de las incluidas en este ensayo.

El retraso de la senescencia observado por el agregado de GSNO en plantas en condiciones de déficit de P, no parece ser explicado por una modificación de la dinámica del P, ya que en las hojas de las plantas tratadas con GSNO que presentan niveles más elevados de clorofila y rendimiento cuántico, los niveles de P no resultaron incrementados como consecuencia del tratamiento con GSNO. Trabajos previos coinciden en adjudicar al NO un efecto anti senescente (Jasid y col., 2009; Liu y col. 2013; Procházková y Wilhelmová, 2011), probablemente relacionado con modificaciones del estado redox.

Con el objetivo de evaluar la integridad del aparato fotosintético y la capacidad fotosintética, se determinó rendimiento cuántico del fotosistema II en la hoja 1 (unifoliada) y en la primera hoja trifoliada. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el rendimiento cuántico del fotosistema II en la hoja 1 entre las plantas cultivadas con provisión adecuada y limitada de P (con un valor promedio 0,73 para las plantas control), la exposición a NO de las plantas privadas de P provocó un incremento del rendimiento cuántico del fotosistema II con valores similares a las plantas control. En la hoja trifoliada se observaron diferencias significativas entre el tratamiento control (con un valor de 0,71) y los tratamientos con restricción de P.

Una posibilidad es que la caída en la eficiencia del fotosistema II, evaluada a través de la medición de fluorescencia de clorofila, en las hojas bajo condiciones sub-óptimas de P, este relacionada con la velocidad de recuperación de Ribulosa 1,5-bifosfato (RuBP) (Pleniscar 1994).

A partir de numerosas investigaciones, se le ha asignado un rol antioxidante al NO en plantas sometidas a diferentes tipos de estrés y en diversos procesos fisiológicos. Por

ejemplo, se ha demostrado un efecto protector del NO sobre la clorofila puesto que se observó una reducción de la perdida de clorofila, debida a la exposición a un dador de NO, en hojas de poroto (*Phaseolus vulgaris*) irradiadas con luz ultravioleta (Shi y col., 2005). En este caso, el NO o los productos del dador de NO, podrían estar actuando como antioxidantes protegiendo los cloroplastos contra el daño foto-oxidativo desencadenando por la radiación de la luz ultravioleta (Foyer y col., 1994).

En el caso de nuestra tesis, se pudo evidenciar el efecto protector del NO al conservar los pigmentos fotosintéticos. El agregado de GSNO previno la reducción en los niveles de clorofila en la hoja 1 provocados por la restricción de P.

La capacidad fotosintética, determinada a través del rendimiento cuántico del fotosistema II, exhibió una caída drástica en la hoja 1 a causa de la deficiencia de P y recuperó los valores de las plantas control para las plantas que fueron expuestas al dador de NO, sugiriendo una protección del NO sobre el aparato fotosintético (Galatro y col., 2013). En cambio, en las hojas trifoliadas la disminución en el rendimiento cuántico del fotosistema II no se recuperó debido a la presencia de NO. Este efecto protector del NO sobre el aparato fotosintético se observó también en las plantas control expuestas al dador de NO (Figs. 7 y 8).

Luego de tres semanas de exposición al dador de NO, las plantas control exhibieron un incremento en la conductancia estomática (Fig. 9). Estos cambios, que en el presente trabajo de tesis solo fueron evaluados en las plantas creciendo con suficiencia de P, pueden estar reflejando alteraciones en la densidad estomática o en el grado de apertura de los estomas. En este sentido se ha descripto que el NO actúa modulando el cierre estomático en conjunto con la hormona ABA (Neill y col., 2002).

En el caso de nuestra tesis, los resultados encontrados para la EU y EUP advierten que cuando la concentración interna de P es baja, las plantas responden

maximizando la producción de biomasa por unidad de P utilizado, tal cual lo indica la literatura citada. Siguiendo con esta tendencia nuestros resultados señalan que las plantas con privación de fosforo presentan los valores más altos de EUP.

En cuanto a la eficiencia de la utilización se evidenció de la misma forma que para el caso anterior un aumentando en aquellos tratamientos con restricción de P. Como conclusión, no se observaron diferencias significativas para aquellos tratamientos que tienen aporte de GSNO en las muestras independientemente de la disponibilidad de P.

Como conclusión general de este trabajo de tesis se pudo demostrar que el agregado de NO en forma exógena tiene influencia en las respuestas fisiológicas a la baja disponibilidad externa de fósforo, mostrando efectos positivos en los parámetros evaluados como la prevención de la senescencia inducida por la deficiencia de P en las hojas más antiguas, mantenimiento de la clorofila y funcionalidad del PSII. Contrariamente, el agregado de GSNO no mostro efectos positivos o de cambio sobre eficiencia de utilización del P.

Conclusión

El agregado de NO en la solución de cultivo de plantas de soja retrasó la senescencia inducida por la deficiencia de P en las hojas más viejas. Un efecto protector sobre la clorofila por parte del NO se observó asimismo para plantas creciendo con nutrición completa. En las condiciones experimentales planteadas no se observaron diferencias significativas en la eficiencia de uso ni en la eficiencia de utilización de P debidas a la presencia de NO.

Es importante tener en cuenta que en este diseño experimental utilizamos restricción completa de P, es probable que en situaciones de reducción de la disponibilidad de P se pongan en marcha otros mecanismos a los observados en este trabajo.

Bibliografía

Abel S. (2011) Phosphate sensing in root development. Curr Opin Plant Biol 14: 303–309.

Al-Ghazi Y, Muller B, Pinloche S, Tranbarger TJ, Nacry P, Rossignol M, Tardieu F, Doumas P (2003) Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signaling. *Plant Cell Environ* **26:** 1053–1066

Bariola P., MacIntosh G.C., Green P.J. (1999) Regulation of S-Like ribonuclease levels in Arabidopsis.Antisense iInhibition of RNS1 or RNS2 elevates anthocyanin accumulation. Plant Physiol. 119:331-342.

Buet A., Moriconi JI., Santa-María G.E., Simontacchi M. (2014) Exposure to nitric oxide increases the nitrosyl-iron complexes content in sorghum embryonic axes. Plant Physiology and Biochemistry (2014) 83: 337-345.

Chen, J., Xiong, D.-Y., Wang, W.-H., Hu, W.-J., Simon, M., Xiao, Q., Chen, J., Liu, T.W., Liu, X., Zheng, H.-L. (2013). Nitric oxide mediates root K+/Na+ balance in a mangrove plant, Kandeliaobovata, by enhancing the expression of AKT1-type K+ channel and Na+/H+ antiporter under high salinity. PloS One, 8, e71543. doi: 10.1371/journal.pone.0071543.

Chiou T.J., Lin S.I. (2011) Signaling network in sensing phosphate availability in plants. Ann Rev Plant Biol 62:185–206.

Cogliatti, D. H. and Clarkson, D. T. (1983), Physiological changes in, and phosphate uptake by potato plants during development of, and recovery from phosphate deficiency. Physiologia Plantarum, 58: 287–294.

Correa-Aragunde, N., Graziano, M. and Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. Planta 218, 900–905.

Epstein E., Bloom A.J. (2005) Mineral Nutrition of Plants.Second Edition.SinauerAssoc, Inc Publishers.

Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J (1994) Photooxidante stress in plants.PhysiologiaPlantarum92 : 696-717.

Galatro A., Guiamet J.J., Puntarulo S., Simontacchi M. (2013) Chloroplast functionality has a positive effect on nitric oxide level in soybean cotyledons.Plant Physiology and Biochemistry 66: 26-33.

Gouvêa, J.F. Souza, A.C.N. Magalhães, I.S. Martins. (1997)NO releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. C.M.C.P Plant Growth Regulation 21: 183-187.

Graziano M., Beligni, M V., Lamattina, L (2002) Nitric oxide improves internal iron availability in plants. Plant Physiol. 4: 1852-1859.

Graziano M., Lamattina L (2007) Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. The Plant Journal 52:949-960.

Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T., (2011) On the origins of nitric oxide.Trends Plant Sci. 16: 160-168.

Hao G., Du X., Zhao F., Shi R., Wang J.(2009)Role of nitric oxide in UV-B-induced activation of PAL and stimulation of flavonoid biosynthesis in Ginkgo biloba callus.Plant Cell Tiss Organ Cult. 2: 175-185.

Harberd N.P., Belfield E., Yasumura Y. (2009) The angiosperm gibberellin-GID1-DELLA growth regulatory mechanism: how an "inhibitor of an inhibitor" enables flexible response to fluctuating environments.Plant Cell 21: 1328-1339.

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.

Jiang C., Gao X., Liao L, Harberd N.P, Fu X. (2007) Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the Gibberellin-DELLA signaling pathway in Arabidopsis. Plant Physiology 145: 1460-1470.

Kitson RE., Mellon MG., (1944) Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. Industrial & Engineering Chemistry Analytical Edition 6: 379-383.

Lamattina L., García Mata C.,Graziano M., Pagnussat G. (2003)Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. Annual review of Plant Biology 54: 109-136.

Lambers, H., Finnegan, P. M., Laliberté, E., Pearse, S. J., Ryan, M. H., Shane, M. W., Veneklaas, E. J. (2011) Update on phosphorus nutrition in Proteaceae. Phosphorus nutrition of proteaceae in severely phosphorus-impoverished soils: are there lessons to be learned for future crops? Plant Physiology 156, 1058–66.

Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes Methods in Enzymology 148: 350-382.

Liu F., Guo F.-Q. (2013) Nitric oxide deficiency accelerates chlorophyll breakdown and stability loss of thylakoid membranes during dark-induced leaf senescence in Arabidopsis. PLoS ONE 8:e56345.

Marschner, M. (1995).Mineral Nutrition of Higher Plants, 2nd edn, Academic Press Limited, London, UK.

Maxwell K., Johnson N. (2000). Chlorophyll fluorescence.Journal of Experimental Botany. 51: 659-668.

Meng, Z. Bin, Chen, L. Q., Suo, D., Li, G. X., Tang, C. X., Zheng, S. J. (2012). Nitric oxide is the shared signalling molecule in phosphorus- and iron-deficiency- induced formation of cluster roots in white lupin (*Lupinusalbus*). Annals of Botany 109, 1055–64.

Mollier A., Pellierin S. (1999).Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. Journal of Experimental Botany 50:487-497.

Moriconi, J. I. y Santa-María, G. E. (2013). A theoretical framework to study potassium utilization efficiency in response to withdrawal of potassium. Journal of Experimental Botany 64, 4289–99.

Nacry P, Canivenc G, Muller B, Azmi A, Van Onckelen H, Rossignol M, Doumas P (2005) A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in Arabidopsis. *Plant Physiol* **138:**2061–2074.

Neill S.J., Desikan R., Clarke A., Hancock J.T. (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisicacid signaling in stomatalguard cells. Plant Physiol. 128:13–16.

Niu, Y. F., Chai, R. S., Jin, G. L., Wang, H., Tang, C. X., and Zhang, Y. S. (2013). Responses of root architecture development to low phosphorus availability: a review. Annals of Botany 112, 391–408.

Olivera, M., N. Tejera, C. Iribarne, A. Ocaña y C. Lluch (2004).Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (Phaseolus vulgaris): Effect of phosphorus. Physiologia Plantarum 121: 498–505.

Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L.(2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. Plant Physiol. 129:954-956.

Péret B., Clément, Nussaume M., Desnos T. (2011) Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. Trends in plant science, 16: 442-450

Pleniscar, M., Kadstori, R., Petrovic, N. (1994) Photosynthesis and chlorophyll fluorescence in sunflower *(Heliantus annuus L.)* leaves as affected by phosphorus nutrition. J. Exp. Bot., v45, p. 919-924.

Procházková D., Wilhelmová N. (2011) Nitric Oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence.Nitric Oxide 24: 61-65.

Shi S., Wang G., Wang Y., Zhang L. (2005) Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. Nitric Oxide 13:1-9.

Simontacchi M., Galatro A., Ramos Artuso F., Santa María G. E.(2015) Plant survival in a changing environment: nitric oxide as a cue to cope with abiotic stress. *Frontiers in Plant Science,* Vol 6, art. 977

Simontacchi M., Garcia-Mata C., Bartoli C.G., Santa-Maria G.E., Lamattina L.(2013) Nitric oxide as a key component in hormone-regulated processes. Plant Cell Reports, 32 (6): 853-866.

Terrill, París R, Calderón-Villalobos LI, Iglesias MJ, Lamattina L, Estelle M, Casalongué CA (2012) Nitric oxide influences auxin signaling through S-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 auxin receptor.

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

Thibaud MC, Arrighi JF, Bayle V, Chiarenza S, Creff A, Bustos R, Paz Ares J,Poirier Y, (2010) Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in Arabidopsis. Plant J **64**: 775–789.

Uexküll H.R.,Mutert E.W. (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils.Plant and Soil 171: 1–15.

Wang B.L. Sun J., Mao J. y col. (2013) A phosphate starvation response regulator Ta-PHR1 is involved in phosphate signalling and increases grain yield in wheat. Annals of Botany 111: 1139–1153.

Wang B.L., Tang X.Y., Cheng L.Y., Zhang A.Z, Zhang W.H., Zhang F.S, Liu J.Q., Cao Y., Alla D.L., Vance C.P., Shen J.B. (2010) Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in whit lupin. New Phytologist 187:1112-1123.

Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH, Leyser HMO (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol* **126:**875–882.

Xu J., Yin H., Li Y., Liu X. (2010). Nitric oxide is associated with long-term Zinc tolerance in *Solanumnigrum*. Plant Physiology 154:1319-1334.