

**Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
Universidad Nacional de La Plata**



Trabajo Final de Carrera

**PARTICIPACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA MODIFICACIÓN DE LA
ARQUITECTURA RADICAL DE PLANTAS DE TRIGO EXPUESTAS A DEFICIENCIA
DE FÓSFORO**

Alumna: Julieta Kolac

Legajo: 26716/2

DNI: 36.694.272

Correo electrónico: julieta_k_22@hotmail.com

Teléfono: 0221-5922296

Directora: Dra. Agustina Buet

Codirectora: Dra. Andrea V. Galatro

Fecha de entrega: 26/02/2020

Índice de Contenidos

Resumen	3
1. Introducción	
1.1 Importancia del fósforo para las plantas.....	4
1.2 El P en el suelo.....	4
1.3 Situación general de los suelos productivos en la Región Pampeana Argentina.....	6
1.4 Uso de fertilizantes fosforados y microorganismos.....	6
1.5 Deficiencia de P y cambios en la arquitectura de la raíz.....	7
1.6 El óxido nítrico (NO) como molécula de respuesta al estrés nutricional.....	8
1.7 Hipótesis y objetivos del plan de trabajo a realizar.....	10
1.7.1 Hipótesis.....	10
1.7.2 Objetivo General.....	10
1.7.3 Objetivos Específicos.....	10
2. Métodos y técnicas empleados	
2.1 Material vegetal, cultivo y tratamientos.....	10
2.1.1 Material vegetal, germinación y condiciones de la cámara de cultivo.....	10
2.1.2 Solución nutritiva.....	11
2.1.3 Tratamientos.....	12
2.1.4 Síntesis del dador de NO.....	13
2.2 Determinaciones.....	13
2.2.1 Determinación de la tasa de crecimiento.....	13
2.2.2 Determinación del peso de fresco de raíz y vástago.....	14
2.2.3 Evaluación de cambios en la arquitectura de la raíz.....	14
2.2.4 Determinación de la concentración de P en raíz y vástago.....	15
2.2.5 Análisis estadístico.....	15
3. Resultados	
3.1 Caracterización del desarrollo de las plantas en condiciones de restricción parcial y total de P.....	16
3.2 Efecto de la exposición a NO exógeno sobre el crecimiento en plantas de trigo sometidas a deficiencia de P.....	20
3.3 Análisis de la arquitectura de la raíz en plantas deficientes en P: efecto del agregado de NO exógeno.....	22
4. Discusión	26
5. Conclusiones	30
6. Bibliografía	31

Resumen

El fósforo (P) es un elemento mineral esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas superiores y su deficiencia afecta marcadamente la productividad de los cultivos. La adición de fertilizantes fosforados es una práctica común basada en el uso de rocas minerales, lo cual impone una fuerte dependencia de un recurso finito con potenciales efectos negativos sobre el ambiente. El objetivo principal de este trabajo es evaluar si el óxido nítrico (NO) afecta las modificaciones en la arquitectura radical desencadenadas como consecuencia de la deficiencia de P en plantas de trigo. Los resultados obtenidos permitieron observar que las plantas restringidas en P asignaron más biomasa a las raíces respecto a las plantas cultivadas con niveles suficientes de P, y mostraron un sistema radical más ramificado. Bajo las condiciones experimentales utilizadas, en los tiempos ensayados hasta el momento, el NO tendió a contrarrestar los efectos de la restricción de P en la arquitectura del sistema radical, lo cual podría estar relacionado con el cambio en la distribución de P entre las raíces y la parte aérea. Resta evaluar si este efecto puede deberse a cambios en la distribución de P disponible que permitan mejorar a tiempos cortos los efectos de la deficiencia de este nutriente.

1. Introducción

1.1 Importancia del fósforo para las plantas

En las plantas superiores está bien establecido que existen 17 elementos minerales esenciales, y el fósforo es uno de ellos. Junto con el nitrógeno, potasio, azufre, calcio y magnesio, forma parte del grupo de los macronutrientes ya que su presencia en los tejidos está siempre por encima de $30 \mu\text{mol g}^{-1}$ de peso seco (0,1% m/m en base seca) (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

En las plantas, el fósforo se encuentra como fosfato (PO_4^{3-}), ya sea en forma libre o formando parte de compuestos orgánicos, principalmente como éster fosfórico con grupos hidroxilos, o formando enlaces anhídridos ricos en energía, como es el caso del ATP o del ADP. Desempeña, por tanto, un papel clave en la fotosíntesis, en la respiración y en todo el metabolismo energético (Fernández, 2007). Asimismo, tiene un papel importante en muchas moléculas y estructuras celulares, como los ácidos nucleicos y los fosfolípidos, los cuales son fundamentales en las membranas; y participa en numerosas reacciones de intercambio, actuando como transductor de energía química, y también en procesos de señalización celular (Epstein y Bloom, 2005). Una parte importante del P en la planta se encuentra en forma iónica libre: el 75 % en las vacuolas y el 25 % restante en la matriz y las organelas citoplasmáticas, en equilibrio con los ciclos metabólicos (Azcón-Bieto y Talón, 2008).

Las plantas, adquieren el P fundamentalmente en forma de iones ortofosfato de la solución del suelo en la cual se encuentra en bajas concentraciones, preferentemente como H_2PO_4^- en suelos con un pH inferior a 7 y como anión divalente HPO_4^{2-} en suelos alcalinos (Vance y col., 2003). Entre los nutrientes esenciales, el P a menudo limita la productividad de la planta debido a su baja movilidad en el suelo (Holford, 1997).

1.2 El P en el suelo

En la figura 1, se visualiza el ciclo del P en el suelo, el cual es un sistema dinámico y complejo que involucra la acumulación del elemento en la biomasa microbiana, materia orgánica y formas inorgánicas. La presencia de P en los diferentes tipos de rocas fosfatadas del suelo tales como apatita, fluorapatita, vivianita, etc., constituye aproximadamente el 0,12 % de la corteza terrestre (Brady y Weil, 1999). Estas rocas sufren un proceso de desintegración debido a fenómenos físicos (intemperie, erosión o desplazamientos geológicos) o químicos (reacciones internas y externas de los

compuestos que se hallan en las rocas), que va liberando su contenido de P, que se integra a los nutrientes del suelo. Sin embargo, estos aportes naturales de P al suelo son mínimos, por tal motivo la principal fuente de este nutriente para los cultivos es aportada a través de fertilizantes.

Una fracción pequeña del P del suelo se encuentra en forma soluble, que está en equilibrio con la fracción lábil que comprende el P orgánico fácilmente mineralizable y P débilmente adsorbido a las arcillas coloidales. La mayor parte está en formas insolubles o fijadas, principalmente como minerales primarios fosfatados, humus, fosfatos insolubles de calcio, hierro y aluminio, y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados (Picone y Zamuner, 2002).

Los residuos de plantas, animales y microorganismos, que liberan compuestos como ácidos nucleicos, fosfolípidos y ésteres, constituyen la principal fuente de P orgánico, que representa entre un 30 y un 60% del P total. La mineralización de éstos, retornándolos a HPO_4^{2-} y H_2PO_4^- (Pi), permite el reciclaje del elemento para que regrese a la biota (Rincón y Gutiérrez, 2012). El P es utilizado por organismos autótrofos y heterótrofos, incluidos los descomponedores, en la cadena trófica, para ser devueltos por estos últimos. La disponibilidad de estos iones está fuertemente influenciada por el pH del suelo y por la adición de fertilizantes (Barančíková y col., 2007).

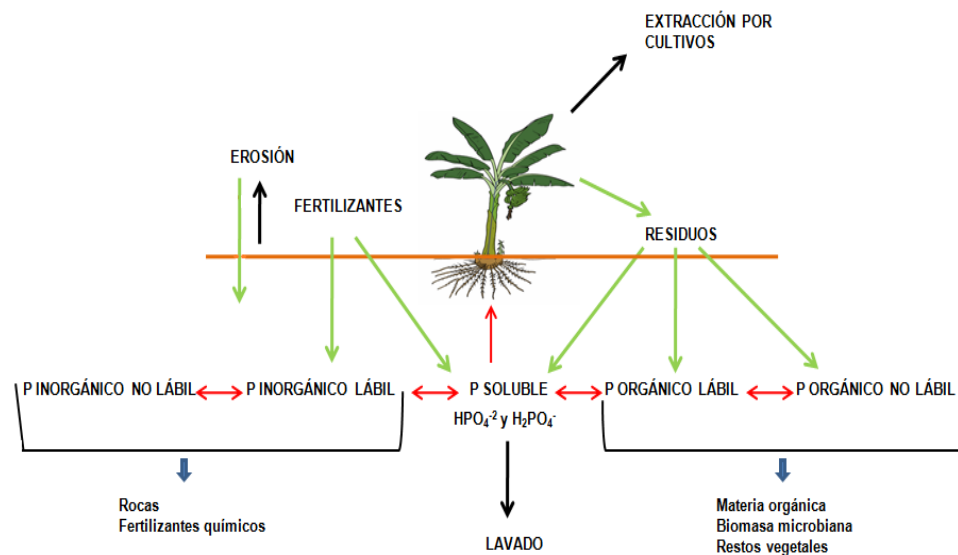


Figura 1. Ciclo del P en el suelo: las flechas de color verde (■) indican las entradas de P, las flechas de color negro (■) hacen referencia a las pérdidas de P del sistema, mientras que las flechas rojas (■) indican las transformaciones que atraviesa el P en el ciclo (modificado de Conti, 2000).

1.3 Situación general de los suelos productivos de la Región Pampeana de Argentina

La agricultura en la Argentina se ha intensificado en los últimos años incrementándose la producción de los principales granos (soja, maíz, trigo y girasol) de 34 a 143 millones de toneladas entre 1990 y 2019 (Casas, 2006; INTA, 2019). Este aumento produjo paralelamente un deterioro en la calidad del recurso suelo, considerado estratégico por ser de naturaleza no renovable. El proceso de degradación del recurso está asociado con la intensidad de las labranzas, la explotación de suelos con capacidades de uso no agrícolas, la duración de los ciclos agrícolas, la tendencia al monocultivo y la no reposición de nutrientes, entre otros factores (Andrade y col., 2017; Cruzate y Casas, 2012), y se pone de manifiesto en la pérdida de propiedades físicas, químicas y biológicas.

La continua remoción de P por parte de los cultivos y la escasa reposición (García, 2001) han resultado en una disminución del P disponible. Este balance negativo de nutrientes sumado a la disminución del porcentaje de materia orgánica y acidificación de los suelos, entre otros factores, conduce a que los suelos se vayan empobreciendo progresivamente (Cruzate y Casas, 2012; Álvarez y col, 2009) y vean reducida su fertilidad pudiendo afectar seriamente la producción (rendimiento y biomasa no cosechada) (García y Berardo, 2005; Grasso y González Sanjuan, 2018).

Según estudios realizados por Vázquez (2002) y Richardson (2001), las fuentes de ganancia de P del suelo son muy reducidas, ya que los aportes por la vía de la meteorización, por la vía atmosférica, por la lixiviación y por sedimentaciones a partir de procesos erosivos son mínimos y muy fluctuantes. Esta situación provoca que el P disponible en el suelo sea insuficiente para las plantas, y esta deficiencia, en el caso de los cultivos, sólo se pueda paliar con la aplicación de fertilizantes fosforados.

1.4 Uso de fertilizantes fosforados y microorganismos

La adición de fertilizantes fosforados es una práctica común basada en el uso de las rocas minerales de P, lo cual impone una fuerte dependencia de un recurso finito con potenciales efectos negativos sobre el ambiente (Ashley y col., 2011), ya que una parte

del P agregado en exceso al suelo es fácilmente conducida por cursos de agua, provocando eutrofización y daño ambiental (Gilbert, 2009). La materia prima que se usa para la fabricación de fertilizantes fosforados es la apatita, un producto de la minería. Las minas de P existentes podrán explotarse entre 60 a 130 años más, indicando que la producción de este nutriente declinará en cantidad con el consecuente aumento de los costos (García Cartagena, 2012).

Sumado a esto, si bien la fertilización fosforada ha tenido una evolución histórica favorable, en relación a la reposición del elemento, no es suficiente para restablecer la fertilidad natural de los suelos. Entonces, dado que la mayoría de los suelos del mundo son deficientes en P disponible para las plantas y que los fertilizantes fosforados representan un costo significativo para la producción agrícola a nivel mundial, uno de los desafíos actuales que enfrenta el sector agropecuario es garantizar la nutrición adecuada de los cultivos para mantener el rendimiento, mediante un uso sustentable y adecuado de los fertilizantes y también a través del uso de microorganismos (Vázquez, 2002).

En este sentido, es importante mencionar que casi todas las especies de plantas superiores forman simbiosis con hongos del suelo y la adquisición de nutrientes está mediada en gran medida por esta asociación (Behie y Bidochka, 2014). Debido a ello es que existe un fuerte interés en utilizar microorganismos del suelo, incluidos los hongos micorrízicos arbusculares (MA), como inoculantes para movilizar el P de fuentes escasamente disponibles en el suelo hacia las raíces de las plantas, y también para que ayuden a aumentar la efectividad agronómica de los fertilizantes (Richardson, 2001).

1.5 Deficiencia de P y cambios en la arquitectura de la raíz

La capacidad de las plantas para acceder al P bajo condiciones limitantes de este nutriente depende de importantes rasgos de aclimatación como la excreción de ácidos orgánicos, la acidificación de la rizósfera y una mayor capacidad para explorar diferentes zonas del suelo (Schachtman y col., 1998; López Bucio y col., 2000). En este sentido, se ha observado una modificación en la arquitectura de la raíz en diversas especies, con el objetivo aparente de aumentar la superficie de absorción (Bates y Lynch, 1996; López-Bucio y col., 2002).

Ha sido descrito que la baja disponibilidad de P promueve el desarrollo de un sistema radical altamente ramificado, caracterizado por la formación de raíces laterales y pelos radicales en plantas de *Arabidopsis thaliana* (López-Bucio, 2002; Pérez-Torres y col., 2008; Sánchez-Calderón y col., 2005; Williamson y col., 2001). Chevalier y

colaboradores (2003) estudiaron el efecto de la baja disponibilidad de P sobre el sistema radical en sesenta y tres ecotipos de *Arabidopsis* y encontraron que en la mitad de los mismos prevalecía una reducción en el crecimiento de la raíz primaria. En contraste, un 25% de los ecotipos no respondieron y en el restante 25% se presentó una elongación de la raíz primaria. Por lo tanto, se puede decir que el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de deficiencia de P muestra variaciones entre especies y genotipos, y también depende de la duración y magnitud de la deficiencia.

Otras especies nativas y cultivadas que fueron expuestas a deficiencia de P, como por ejemplo *Brassica nigra* (Carswell y col., 1996), arroz (*Oryza sativa*) (Shimizu y col., 2004), poroto común (*Phaseolus vulgaris*) (Borch y col., 1999), lupino blanco (*Lupinus albus*) (Johnson y col., 1996) y tomate (*Solanum lycopersicum*) (Kim y col., 2008), presentaron tanto una reducción en el crecimiento de la raíz primaria como una mayor ramificación del sistema radical, resultado de un aumento en el número y longitud de raíces laterales y una mayor densidad de pelos radicales. La ramificación de la raíz es un factor determinante de su arquitectura, cuyo desarrollo provoca una considerable contribución a la configuración espacial del sistema radical en el suelo y determina sustancialmente la capacidad de una planta para asegurar el anclaje y la absorción de agua y nutrientes (Malamy, 2005). Ma y colaboradores (2001), así como también López- Bucio y colaboradores (2003) cultivaron plantas de *Arabidopsis* en medios asépticos con distintas concentraciones de P y llegaron a la conclusión que la densidad de los pelos radicales fue altamente regulada por la disponibilidad de P, aumentando significativamente en raíces expuestas a baja disponibilidad del nutriente. Además, en lupino blanco (Johnson y col., 1996), se observó la formación de raíces proteoides, que son densos conglomerados de raíces laterales cortas y densamente espaciadas que mejoran la absorción de nutrientes, posiblemente modificando químicamente el ambiente del suelo para incrementar la solubilización de los mismos.

1.6 El óxido nítrico (NO) como molécula de respuesta al estrés nutricional

Las plantas se enfrentan frecuentemente a condiciones de estrés abiótico tales como baja disponibilidad de nutrientes, salinidad, sequía, radiación ultravioleta y temperaturas extremas, que pueden influir en los procesos de desarrollo y conducir a la restricción del crecimiento. La capacidad de las plantas para responder y sobrevivir bajo condiciones de estrés ambiental implica eventos de detección y señalización donde el NO se convierte en un componente crítico que media las acciones hormonales, interactuando

con especies reactivas del oxígeno (ROS), modificando la expresión génica y la actividad de proteínas (Simontacchi y col., 2015).

Se ha propuesto un rol para el NO como regulador de la morfología de la raíz siendo capaz de modificar la arquitectura de la misma, promoviendo el crecimiento de raíces laterales y el desarrollo de pelos radicales, e inhibiendo la elongación de la raíz primaria (Lombardo y col., 2006; Correa-Aragunde y col., 2004). También está involucrado en respuestas gravitrópicas y en las diferentes etapas de la interacción simbiótica leguminosa-rizobio (Hu y Zhang, 2005). Desempeña un papel central en la formación de raíces adventicias en pepino (*Cucumis sativus*) (Pagnussat y col., 2003, 2004), raíces de la corona en arroz (Xiong y col., 2009) e iniciación de raíces laterales en tomate y maíz (*Zea mays*) (Correa-Aragunde y col., 2004; Creus y col., 2005; Zandonadi y col., 2010). Además, se ha evidenciado que el NO está involucrado en la respuesta fisiológica de la raíz a la deficiencia de hierro (Fe) en tomate (Graziano y Lamattina, 2007).

Wang y colaboradores (2010) describieron por primera vez una relación entre la producción de NO y la deficiencia de P en raíces de lupino blanco. La deficiencia de P produjo un incremento en la producción de NO en los ápices de las raíces primarias y laterales, y el tratamiento con un dador de NO aumentó el número de raíces laterales. Además, otras respuestas, como la exudación de citrato por diferentes segmentos de la raíz, se correlacionaron con los niveles de NO. Meng y colaboradores (2012) investigaron un posible papel del NO sobre el número y longitud de raíces proteoides en plantas de lupino blanco cultivadas en distintas condiciones de deficiencia y suficiencia de Fe y P, llegando a la conclusión que las plantas que fueron cultivadas en condiciones de deficiencia de P presentaron mayor formación de raíces proteoides (y de mayor longitud) con respecto a las plantas que crecieron en condiciones de suficiencia de P, independientemente del nivel de Fe. Al agregar NO (mediante la aplicación de un dador) el número de raíces proteoides aumentó significativamente en todos los niveles de P y Fe ensayados.

Más recientemente, se ha informado un aumento de los niveles de NO en raíces de *Arabidopsis thaliana* cultivadas sin P en el medio (Royo y col., 2015). Además ha sido descrito que la exposición al NO exógeno influencia ciertas respuestas típicas a la deficiencia de P en plantas de maíz, tales como la acidificación del medio y el aumento de la actividad de las fosfatasas ácidas, entre otras (Ramos Artuso y col., 2018). En este contexto, resulta interesante explorar si el NO puede también participar en respuestas de

aclimatación a la deficiencia de P, en particular sobre la arquitectura radical, en otras especies como el trigo. El conocimiento de los mecanismos involucrados y la regulación de las respuestas desencadenadas brindarán herramientas que permitirán a largo plazo el mejoramiento de los cultivos y la selección de líneas con mayor eficiencia de uso de P, llevando en último término a un menor requerimiento y la optimización de la aplicación de fertilizantes.

1.7- Hipótesis y objetivos del plan de trabajo a realizar

1.7.1- Hipótesis

El plan de trabajo se basa en la hipótesis general que *el NO interviene en las respuestas de aclimatación de las plantas de trigo a la deficiencia de P en el medio, modificando la arquitectura de las raíces en pos de aumentar la superficie radical y favorecer su captura.*

1.7.2- Objetivo general

El objetivo principal de este trabajo es evaluar si el NO afecta las modificaciones en la arquitectura radical desencadenadas como consecuencia de la deficiencia de P en plantas de trigo.

1.7.3- Objetivos específicos

- 1- Caracterizar los cambios morfológicos y bioquímicos en plantas de trigo cultivadas en condiciones de deficiencia de P.
- 2- Analizar el papel del NO en la modificación de la arquitectura de raíces de plantas sometidas a restricción de P.

2. Métodos y técnicas empleados

2.1. Material vegetal, cultivo y tratamientos

2.1.1- Material vegetal, germinación y condiciones de la cámara de cultivo

Los experimentos se llevaron a cabo con plantas de trigo (*Triticum aestivum*) del cultivar Maringa propagadas por el grupo de trabajo. En primer lugar, las semillas se desinfectaron por inmersión en solución de hipoclorito de sodio comercial al 5% v/v

durante 3 minutos. Se enjuagaron con agua destilada y se incubaron en bandejas cerradas, sobre algodón y papel de filtro humedecidos, durante 48 horas en heladera, a 4-5 °C, a fin de sincronizar la germinación. Una vez sincronizadas, las semillas se pusieron a germinar en las macetas de 0,7 L, en hidroponia, con solución de Hoagland modificada (Buet y col., 2014), pH 5,9-6,0 ajustado con $\text{Ca}(\text{OH})_2$ con aireación continua, en un cuarto de cultivo a una temperatura de 22°C y fotoperíodo largo (16 horas de luz/8 horas de oscuridad) (Figura 2., A y B).

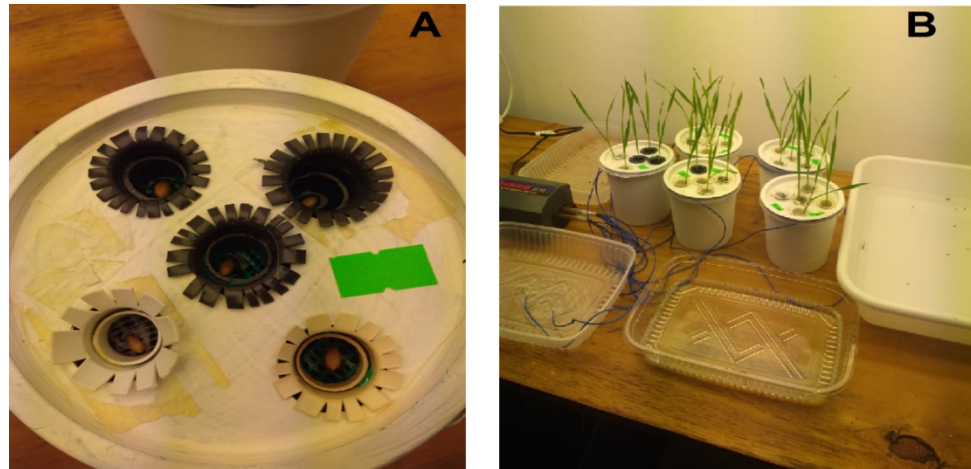


Figura 2. A. Semillas en maceta al inicio del experimento. B. Plántulas en el cuarto de cultivo.

2.1.2- Solución nutritiva

En la Tabla 1, se muestra la composición de la solución nutritiva Hoagland modificada, con las concentraciones de cada nutriente. Como regulador de pH, se utilizó el ácido 2-N-morfolino-etanosulfónico (MES), agregado en concentración 2,5 mM. La solución se renovó completamente según el crecimiento y absorción de las plantas para asegurar una óptima provisión de nutrientes.

Tabla 2: Composición de la solución nutritiva.

Nutriente	Concentración final (mM)
H ₃ PO ₄	0,5
Ca(NO ₃) ₂	1
KCl	1
MgSO ₄	0,5
Nutriente	Concentración final (µM)
CaCl ₂	50
FeNaEDTA	50
H ₃ BO ₃	25
MnSO ₄	2
CuSO ₄	0,5
Na ₂ MoO ₄	0,5
ZnSO ₄	2

2.1.3- Tratamientos

Se realizaron una serie de experimentos preliminares a fin de caracterizar y evidenciar el tiempo en el que las plantas comienzan a percibir la deficiencia de P y desarrollan respuestas asociadas al crecimiento. Con este fin, las plantas de trigo se cultivaron 7 días con solución nutritiva completa (P 500 µM) y luego se dividieron en tres grupos que crecieron con diferentes niveles de P (H₃PO₄) en la solución nutritiva: 0, 50 y 500 µM. Las plantas fueron sometidas a los distintos tratamientos durante 16 días (Figura 3).

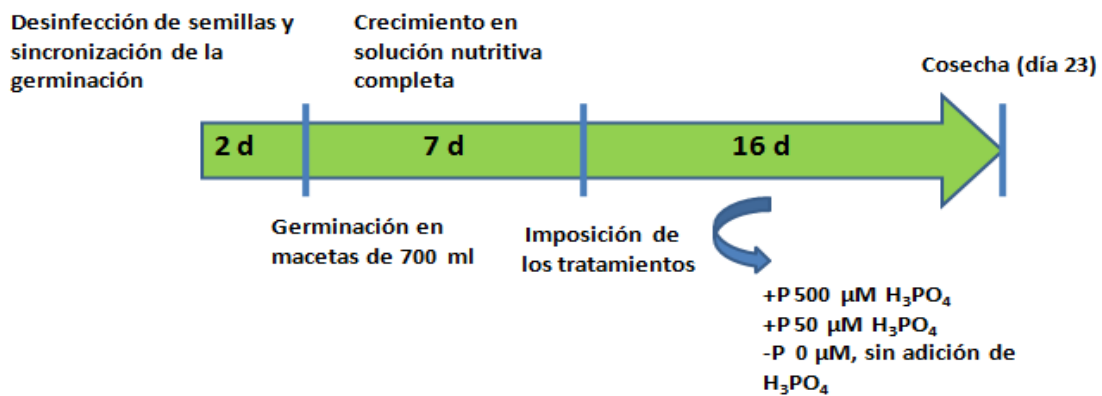


Figura 3. Diseño del esquema experimental con diferentes niveles de P: 0, 50 y 500 µM.

En la preparación de la solución nutritiva para el nivel 0 µM se omitió el agregado de H₃PO₄. Dado que la cantidad necesaria de Ca(OH)₂ para llevar a pH difiere según la concentración de H₃PO₄, se suplió el faltante de Ca²⁺ con el agregado de CaCl₂.

De acuerdo a los resultados obtenidos, para evaluar el efecto del NO sobre la arquitectura radical durante la deficiencia de P, se utilizó S-nitrosoglutatión (GSNO), una

sustancia capaz de liberar NO en el medio. Las plantas fueron sometidas a los distintos tratamientos durante 9 días (Figura 4).

1- **+P**: un grupo de plantas se cultivó con solución nutritiva Hoagland modificada completa durante todo el experimento (P 500 μ M).

2- **-P**: luego de 7 días de cultivo, un grupo de plantas se transfirió a macetas con solución nutritiva Hoagland modificada sin H_3PO_4 .

3- **-P+GSNO**: luego de 7 días de cultivo, un grupo de plantas se transfirió a macetas con solución nutritiva Hoagland modificada sin H_3PO_4 , en presencia del dador de NO, GSNO, que fue adicionado en la solución nutritiva en una concentración final de 100 μ M, en cada cambio de solución.

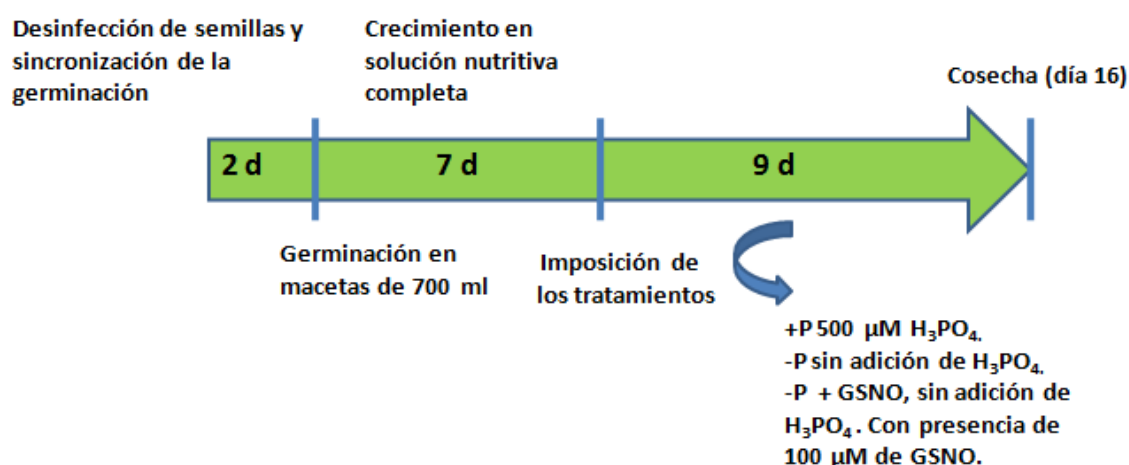


Figura 4. Diseño del esquema experimental utilizando el dador de NO (GSNO).

2.1.4- Síntesis del dador de NO

El dador de NO, GSNO, fue sintetizado a partir de la reacción de volúmenes iguales de $NaNO_2$ 140 mM en HCl 0,1 N y glutatión (GSH) 140 mM. Mediante la mezcla de estas dos soluciones se obtiene una solución de GSNO (de color rojo) de concentración 70 mM. Ésta fue utilizada inmediatamente agregándola en una concentración final de 100 μ M en la solución nutritiva de las macetas.

2.2 Determinaciones

2.2.1- Determinación de la tasa de crecimiento

Se registró el número de hojas y macollos y se midieron la penúltima y la última hoja del vástago principal, tres veces por semana para obtener la tasa de crecimiento. El número de hojas corregido para cada día se obtuvo a partir del siguiente cálculo:

$$\text{Número de hojas corregido} = N - 1 + \frac{\text{longitud de la hoja más joven}}{\text{longitud de la segunda hoja más joven}}$$

Donde N es el número de hojas registrado cada día. El valor de la tasa de crecimiento se obtuvo a partir de la pendiente del gráfico de número de hojas corregido en función del tiempo.

2.2.2- Determinación del peso fresco de la raíz y del vástago

Al momento de la cosecha, al final de los distintos tratamientos, las hojas y raíces se pesaron en una balanza electrónica analítica de alta precisión obteniendo el peso fresco (PF).

2.2.3- Evaluación de cambios en la arquitectura de la raíz

En el momento de la cosecha, se midió la longitud de la raíz primaria más larga de cada planta, se separó y se sumergió en la solución fijadora formaldehído:etanol:ácido acético (FAA). Posteriormente, se procedió a la tinción de la misma por inmersión en Azul de Evans 0,2%. Se lavaron con agua destilada y se ubicaron en una placa de vidrio para su escaneo (Figura 5). Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa ImageJ para determinar el número y la longitud de los distintos tipos de raíces (raíces primarias, laterales de primer orden y laterales de segundo orden).

Además, se realizó un análisis del número de raíces laterales de primer y de segundo orden pertenecientes a distintos rangos de longitud, para las plantas sometidas a los tres tratamientos ensayados (+P, -P y -P +GSNO). Los rangos elegidos para evaluar el desarrollo de las raíces laterales de primer orden fueron 0-10, 10-50, 50-75 y mayores a 75 mm, mientras que para las raíces laterales de segundo orden, éstos fueron de 0-3, 3-5, 5-7,5 y mayores a 7,5 mm.

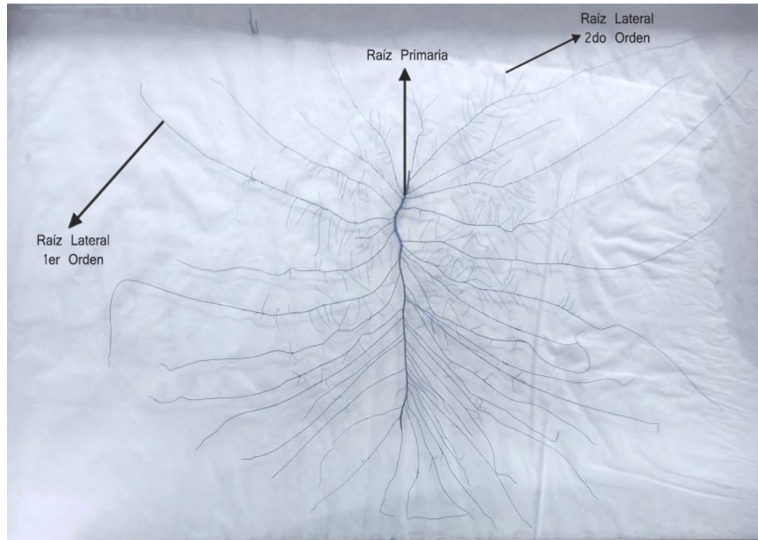


Figura 5. Arquitectura de las raíces de plantas de trigo cultivadas en hidroponía en la bandeja de vidrio previo a su escaneo.

2.2.4- Determinación de la concentración de P en raíz y vástago

Para la determinación de la concentración de P en los tejidos vegetales se utilizó el método colorimétrico de fosfo-molibdo-vanadato (Kitson y Mellon, 1944). El material vegetal seco se incineró en forma gradual en mufla (hasta 500 °C) hasta la obtención de cenizas que se resuspendieron en 200 µl de ácido nítrico y 1200 µl de agua MilliQ y se trasvasaron a tubos Eppendorf hasta su medida. Se preparó una curva de calibración con soluciones de concentraciones entre 0 y 60 ppm de P utilizando KH_2PO_4 como patrón. Luego se llevó a cabo la reacción a partir del agregado de NH_4VO_3 0,25% y $(\text{NH}_4)_7\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 5%, y 40 µl de muestra midiendo la absorbancia a 460 nm utilizando el lector de placas ClarioStar®.

2.2.5- Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres experimentos independientes, cada uno con un mínimo de tres replicados por cada tratamiento. Los resultados fueron analizados estadísticamente con el programa Statistica7 mediante “one-way” ANOVA. Se utilizó el test post-hoc de Tukey para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

3. Resultados

3.1. Caracterización del desarrollo de las plantas en condiciones de restricción parcial y total de P

Con el objetivo de caracterizar el efecto de la restricción de P sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, se ensayaron tres niveles diferentes de P en el medio de cultivo (H_3PO_4): 0, 50 y 500 μM . Durante el ensayo, se registró el número de hojas, tres veces por semana, para el cálculo de la tasa de crecimiento. En el momento de la cosecha final (luego de 16 días de tratamiento), se determinó además el peso fresco de la raíz, del vástago y de la planta entera, la relación vástago/raíz y la longitud de la raíz primaria más larga.

Luego de 16 días de restricción total de P, las plantas no mostraron cambios significativos en el peso fresco de la raíz respecto de las plantas cultivadas en solución nutritiva completa mientras que las plantas cultivadas con restricción parcial de P (50 μM) mostraron una biomasa radical mayor (Figura 6. A). El peso fresco del vástago (Figura 6. B) resultó tres veces menor en las plantas cultivadas con 0 μM de P (restricción total) comparado con el grupo control. En tanto que las plantas cultivadas con P 50 μM no mostraron diferencias significativas en el peso de la parte aérea respecto de las plantas cultivadas con P 500 μM .

El análisis de la biomasa total de las plantas (Figura 6. C) indicó que existe una reducción significativa en el peso fresco de las plantas cultivadas con restricción total de P respecto de las plantas que crecieron en soluciones nutritivas con agregado de P (50 o 500 μM).

Como resultado del análisis de la relación vástago:raíz (Figura 6. D), se encontraron diferencias significativas entre los tres tratamientos luego de los 16 días, observándose una menor relación vástago:raíz a medida que disminuye la concentración de P en la solución nutritiva. La relación vástago:raíz fue 2,4 veces menor en las plantas cultivadas en condiciones de restricción total de P (sin agregado de H_3PO_4) en relación a las plantas cultivadas con suministro óptimo de P (500 μM). Mientras que en las plantas cultivadas bajo restricción parcial de P (50 μM) fue 1,4 veces menor respecto de la obtenida para las plantas del grupo control (500 μM).

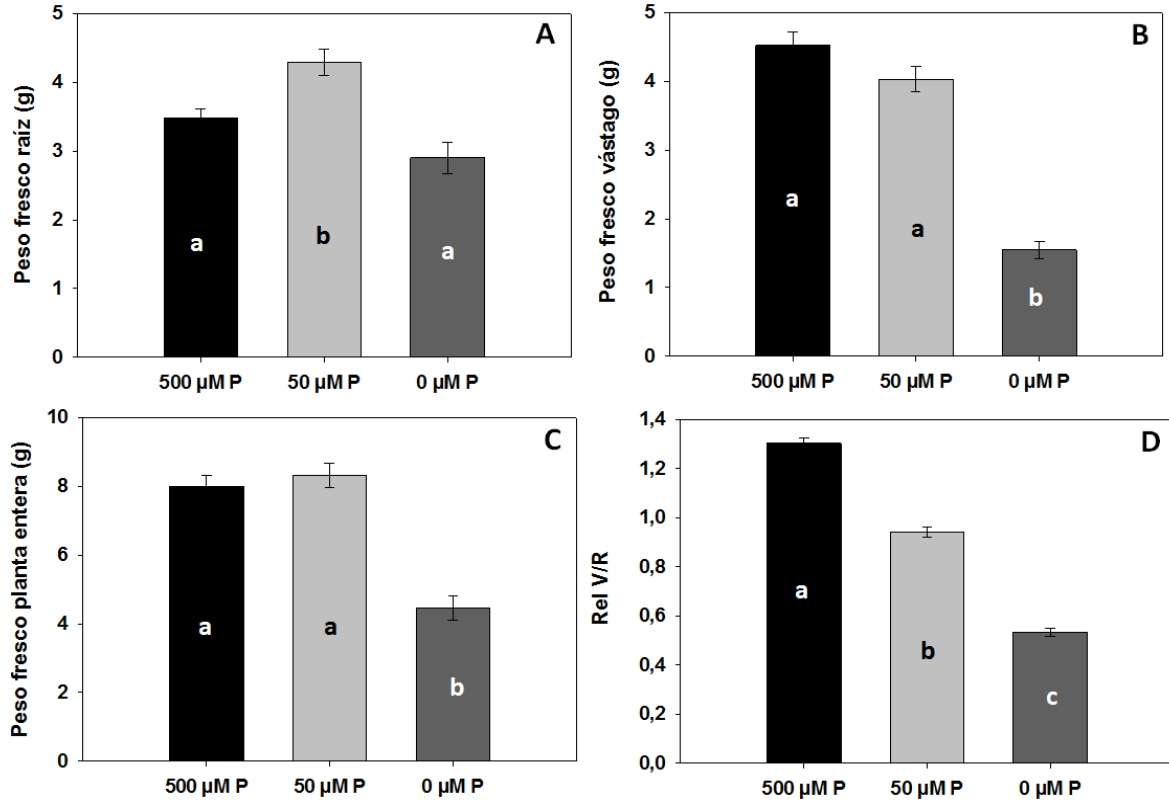


Figura 6. Efecto de distintos niveles de P sobre el crecimiento de plantas de trigo. Un grupo de plantas fue cultivado con 500 µM de P (■), otro con 50 µM de P (▒) y el tercero en restricción total, 0 µM de P (■) durante 16 días. Los resultados se indican como la media ± ES. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, test de Tukey Post hoc ($p < 0,05$).

En relación con la longitud de la raíz primaria más larga, se observaron diferencias significativas en el grupo de plantas que crecieron en condiciones de deficiencia completa y parcial de P (0 y 50 µM, respectivamente), siendo superior con respecto a las plantas cultivadas con un nivel de 500 µM de P (solución completa) (Figura 7)

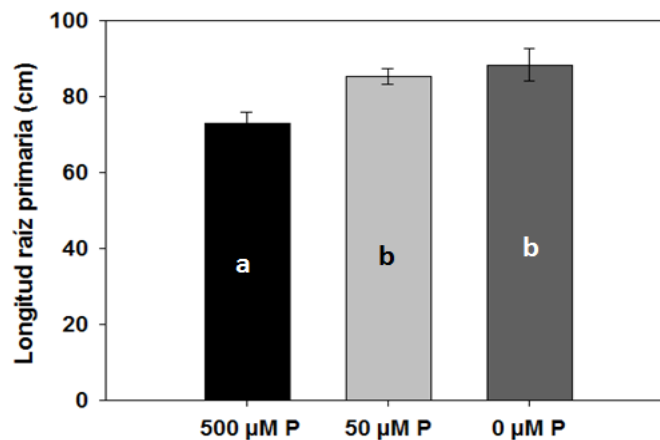


Figura 7. Efecto del tratamiento con distintos niveles de P sobre la longitud de la raíz primaria más larga en plantas de trigo. Un grupo de plantas fue cultivado con 500 μM de P (■), otro con 50 μM de P (▒) y el tercero en restricción total, 0 μM de P (■) durante 16 días. Los resultados se indican como la media \pm ES. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, test de Tukey Post hoc ($p < 0,05$).

Se graficó el número de hojas corregido en función del tiempo y a partir de las pendientes correspondientes, se determinó la tasa de crecimiento para cada uno de los niveles de P ensayados, 500, 50 y 0 μM (Figura 8. A, B y C, respectivamente). Se puede destacar que la tasa de crecimiento en las plantas cultivadas en condiciones de restricción total de P (0 μM) a medida que transcurrió el ensayo resultó menor respecto de las plantas cultivadas con solución nutritiva con agregado de H_3PO_4 (50 y 500 μM), observándose una restricción del crecimiento hacia el final de experimento. Las plantas cultivadas en condiciones de restricción parcial, fueron capaces de mantener una tasa de crecimiento cercana al grupo control.

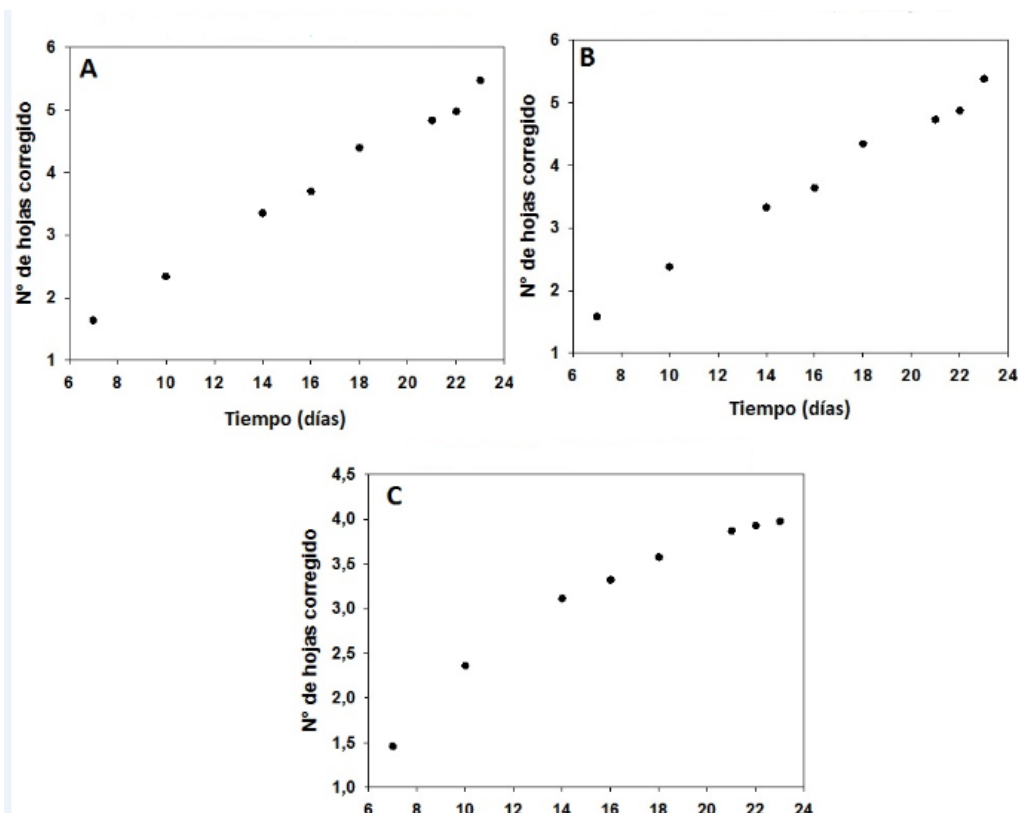


Figura 8. Aumento del número de hojas corregido en función del tiempo durante 16 días de tratamiento para los tres niveles de P ensayados: 500, 50 y 0 μM (paneles A, B y C, respectivamente).

El análisis de los gráficos obtenidos previamente mostró que ya a 9 días de tratamiento (16 días de cultivo) (Figura 9), comienzan a evidenciarse diferencias significativas en la tasa de crecimiento en las plantas creciendo en condiciones de restricción total de P, siendo un 13 % menor con respecto a las plantas cultivadas con niveles de P de 50 y 500 μM .

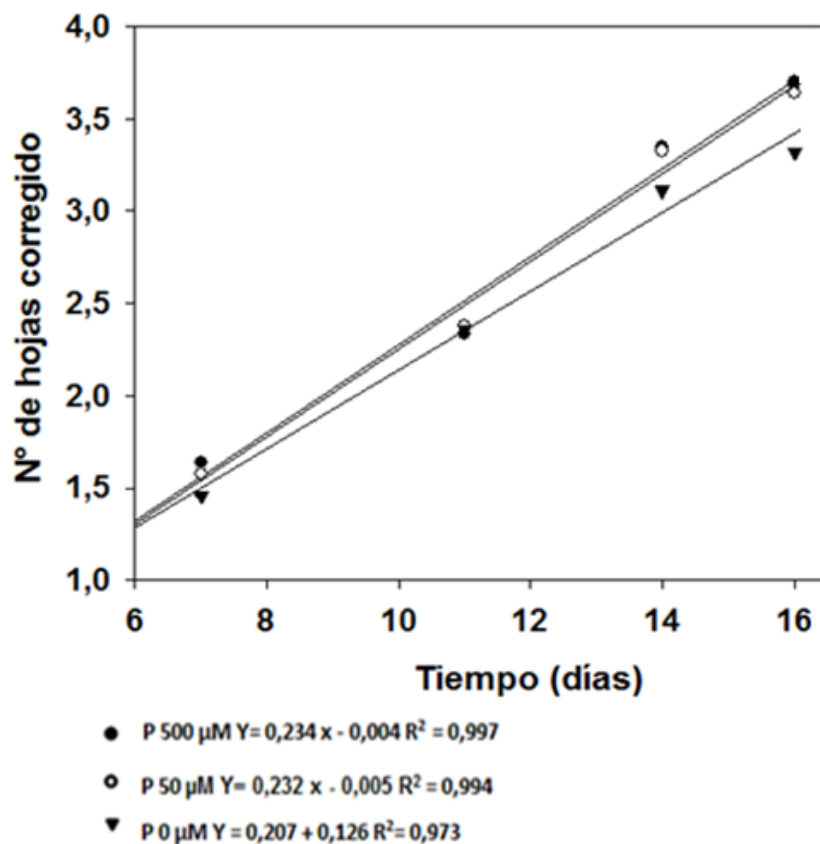


Figura 9. Variación del número de hojas corregido en función del tiempo durante 9 días de tratamiento para los tres niveles ensayados: 500, 50 y 0 μM .

Luego de 16 días de tratamiento, el grado de crecimiento de las raíces dificulta su análisis con la metodología planteada. Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados, se eligieron 9 días de restricción total de P como el tiempo de cosecha y tratamiento para caracterizar tempranamente las respuestas de las raíces frente a la restricción de P y los efectos de la exposición a NO, evaluando el peso fresco de la raíz, del vástago y de la planta entera, como así también la arquitectura de las raíces y la distribución de P tanto en vástago como en raíz, cuando el crecimiento de las plantas aún no se encuentra drásticamente afectado.

3.2 Efecto de la exposición a NO exógeno sobre el crecimiento en plantas de trigo sometidas a deficiencia de P

Para evaluar el efecto de la exposición a NO sobre el crecimiento en plantas de trigo sometidas a condiciones de restricción completa de P durante 9 días, se analizó el peso fresco de la raíz y del vástago y de la planta entera en grupos de plantas cultivadas en solución nutritiva completa (+P), en solución deficiente en P (-P) y en solución deficiente en P en presencia del dador de NO (-P+GSNO). Se calculó, además, el cociente entre la biomasa de vástago y la de raíz (relación vástago: raíz), como un estimador de la partición de biomasa entre ambos órganos. También se determinó la concentración de P en raíces y vástago, y su acumulación en vástago.

Luego de 9 días de tratamiento, el peso fresco de la raíz de las plantas cultivadas en condiciones de restricción de P en presencia de GSNO fue menor que el peso fresco de la raíz de las plantas del grupo control (Figura 10. A). Se observó una reducción del peso fresco del vástago de las plantas cultivadas en condiciones de restricción de P, tanto en ausencia como en presencia de GSNO, siendo más marcada en este último grupo (Figura 10. B). De manera similar, el análisis de la biomasa total indicó que hubo una reducción del 25% en el peso fresco de las plantas restringidas en P en ausencia del dador de NO y del 37% en las plantas expuestas a NO, en comparación con las plantas cultivadas en condiciones de suficiencia de P (+P) (Figura 10. C).

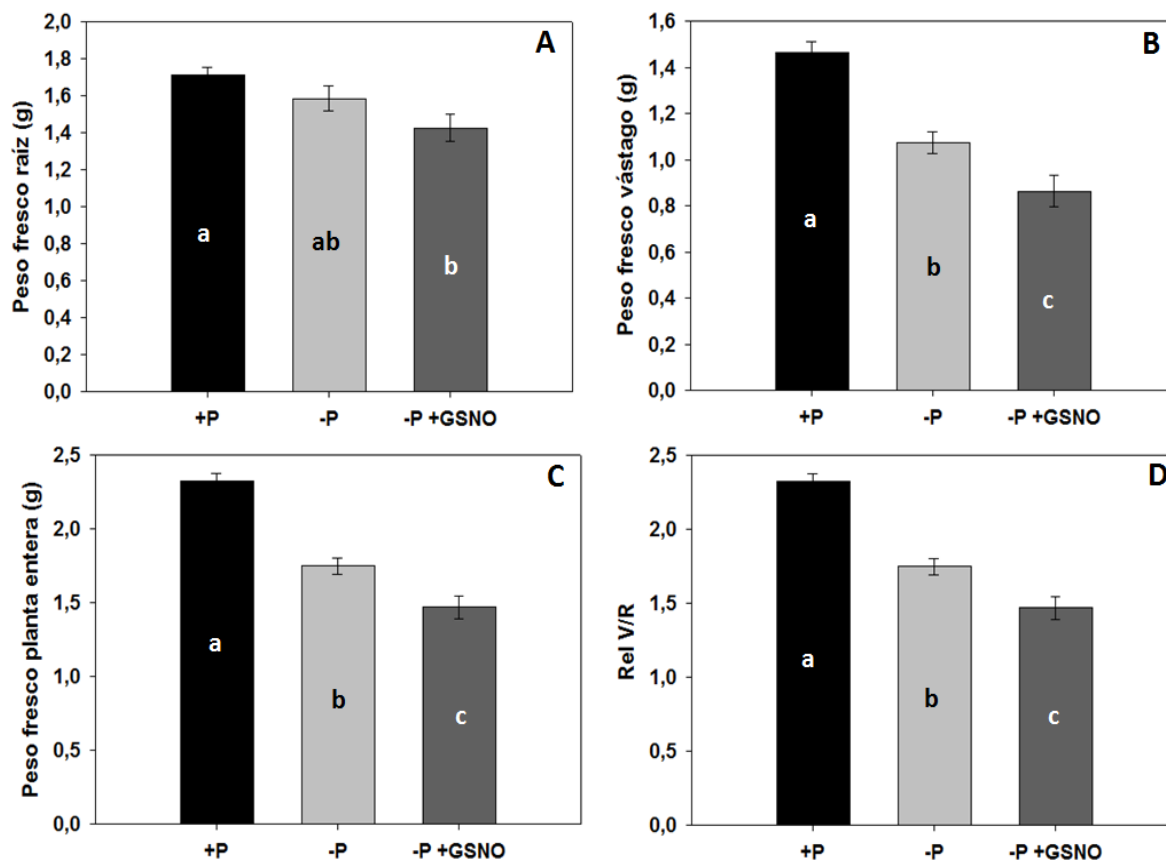


Figura 10. Efecto de la aplicación de NO exógeno sobre el crecimiento de plantas de trigo en condiciones de deficiencia de P. Un grupo de plantas fue cultivado con solución completa de P (■), otro con restricción completa de P (□) y el tercero en restricción total de P en presencia del dador de NO (▒) durante 9 días. Los resultados se indican como la media ± ES. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, test de Tukey Post hoc ($p < 0,05$).

Por otra parte, se observó una menor relación vástago:raíz en las plantas cultivadas en condiciones de restricción de P, que resultó más marcada en las plantas expuestas al dador de NO (Figura 10. D).

Se determinó la concentración de P en raíz y vástago de acuerdo a la metodología descrita en materiales y métodos. Las plantas deficientes en P, independientemente de la exposición a GSNO, mostraron una menor concentración de P tanto en las raíces y los vástagos respecto de las plantas cultivadas con solución nutritiva completa (Figura 11. A). Curiosamente, el NO exógeno condujo a un menor porcentaje de acumulación de P en la parte aérea (Figura 11. B).

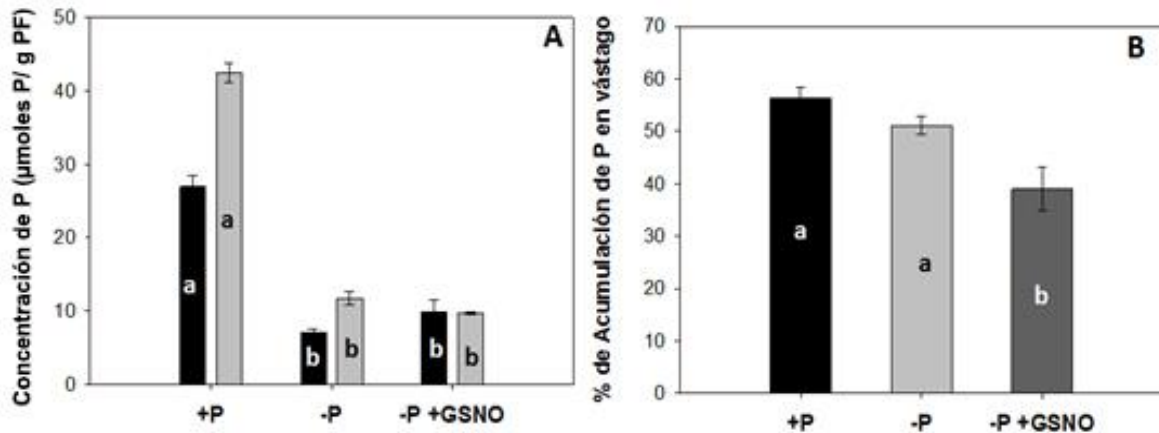


Figura 11. Concentración de P en raíces (■) y vástago (■) (panel A) y porcentaje de acumulación de P en vástago (panel B). Los resultados se indican como la media \pm ES. Las letras distintas indican diferencias significativas, ANOVA, test de Tukey Post hoc ($p < 0,05$).

3.3 Análisis de la arquitectura de la raíz en plantas deficientes en P: efecto del agregado de NO exógeno

Luego de 9 días de tratamiento, las plantas sometidas a restricción total de P mostraron una raíz primaria más larga en comparación con las plantas suficientes en P, en tanto que el tratamiento con GSNO parece inhibir este alargamiento (Figura 12). Las plantas cultivadas en condiciones de restricción de P, expuestas al dador de NO, no mostraron diferencias significativas en la longitud de la raíz primaria más larga respecto de las plantas control.

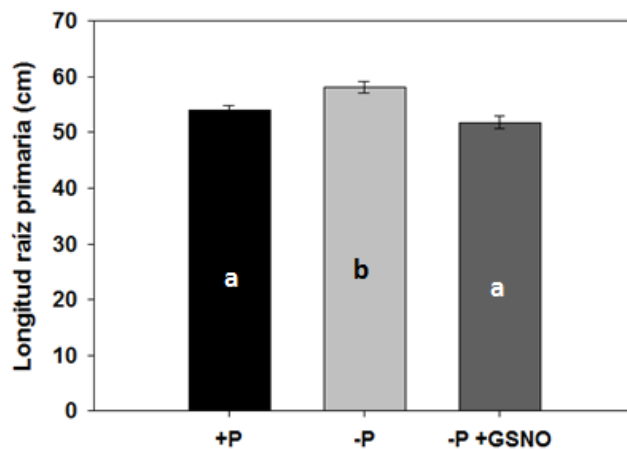


Figura 12. Efecto de la aplicación de NO exógeno sobre la longitud de la raíz primaria más larga de plantas de trigo en condiciones de deficiencia de P. Un grupo de plantas fue cultivada con solución completa de P (■), otro con restricción completa de P (■) y el tercero en restricción total de P en presencia del dador de NO (■) durante 9 días. Los resultados se indican como la media \pm ES. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, test de Tukey Post hoc ($p < 0,05$).

Al analizar el desarrollo de las raíces laterales, se observó que las plantas cultivadas en condiciones de restricción completa de P no presentaron una modificación en el número total de raíces laterales de primer orden (Figura 13. A, barras negras), pero la longitud total de las mismas (resultante de la sumatoria de las longitudes de cada raíz lateral de primer orden) muestra una tendencia a aumentar (aunque no significativa) (Figura 13. B, barras negras). Tanto el número como la longitud total de las raíces laterales de primer orden en las plantas expuestas a NO exógeno en condiciones de deficiencia de P resultaron similares a los valores obtenidos en las plantas control.

Las plantas que crecieron en condiciones de deficiencia de P presentaron un mayor número de raíces laterales de segundo orden en relación a las plantas control y a las plantas cultivadas en deficiencia de P expuestas al dador de NO, sugiriendo que el tratamiento con GSNO contrarresta el efecto de la privación de P sobre el desarrollo de estas raíces (Figura 14. A, barras grises). En cuanto a la longitud total de las raíces laterales de segundo orden (resultante de la sumatoria de las longitudes de cada raíz lateral de segundo orden), se observó que las plantas cultivadas en solución deficiente en P presentaron una mayor longitud total, comparado con las plantas del grupo control. La exposición al NO exógeno parecería bloquear el efecto de la privación de P sobre la longitud total de las raíces laterales de segundo orden, ya que no se encontraron diferencias significativas entre las plantas cultivadas en condiciones de restricción de P expuestas al dador de NO y las plantas que crecieron en solución completa de P (Figura 14. B, barras grises).

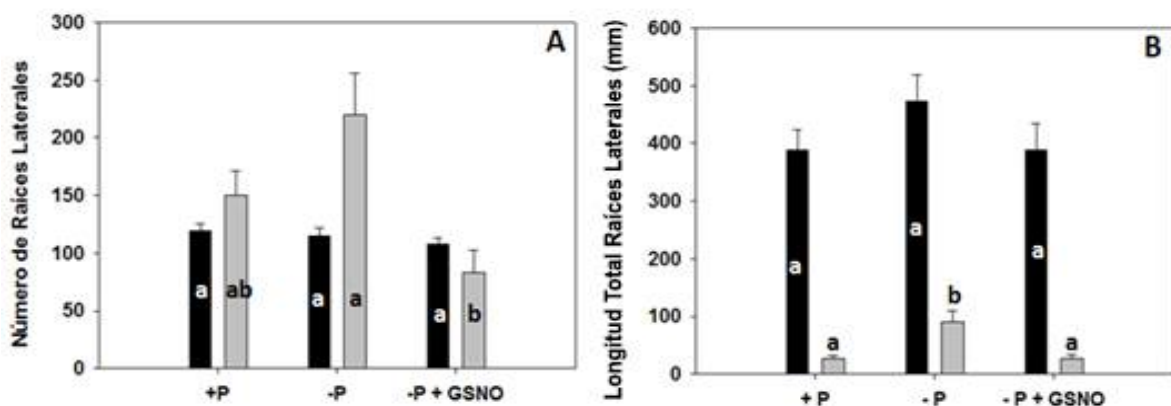


Figura 14. Efecto de la aplicación de NO exógeno sobre el número y la longitud total de raíces laterales de plantas de trigo en condiciones de deficiencia de P. Las barras de color negro (■) hacen referencia a las raíces laterales de primer orden, mientras que las barras de color gris (■) representan a las raíces laterales de segundo orden. Los resultados se

indican como la media \pm ES. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, test de Tukey Post hoc ($p < 0,05$).

Con el fin de profundizar el estudio de las raíces laterales, se realizó un análisis del número de raíces laterales, según rangos de longitud (Figura 15. A y B). En relación con las raíces laterales de primer orden (Figura 15. A), no se encontraron diferencias significativas en los rangos de 0-10 mm y mayores a 75 mm. Sin embargo, las plantas cultivadas en restricción total de P presentaron un menor número de raíces laterales entre 10-50 mm, independientemente de la exposición al dador de NO, con respecto al grupo control. En tanto que el número de raíces laterales en el rango 50-75 mm fue mayor en las plantas cultivadas en solución restringida en P comparado con las plantas que crecieron en solución completa, mientras que el grupo de plantas cultivadas en deficiencia completa de P expuestas al dador de NO se posicionó en un nivel intermedio y no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto del grupo control.

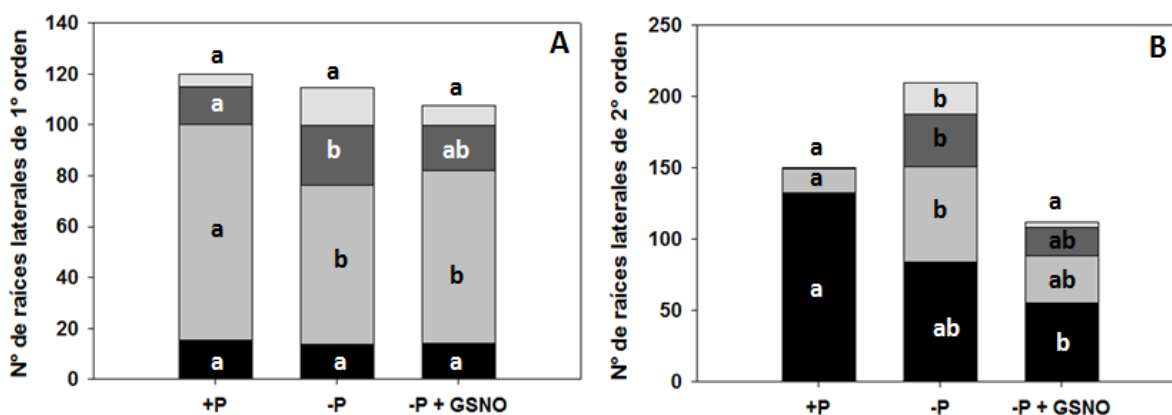


Figura 15. Número de raíces laterales de primer orden y de segundo orden de cada rango de longitudes (A y B, respectivamente). A: número de raíces laterales de primer orden de longitud comprendida 0-10 mm (■); 10-50 mm (▒); 50-75 mm (■); mayor a 75 mm (□). B: número de raíces laterales de segundo orden de longitud comprendida 0-3 mm (■); 3-5 mm (▒); 5-7,5 mm (■); mayor a 7,5 mm (□). Los resultados se indican como la media \pm ES. Las letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, test de Tukey Post hoc ($p < 0,05$).

En la Figura 15. B, se muestra el número de raíces laterales de segundo orden según su rango de longitud. Las plantas cultivadas en condiciones de deficiencia de P presentaron un mayor número de raíces en los rangos de mayor longitud (de 3-5; 5-7,5 y mayores a 7,5 mm), mientras que el rango de 0-3 mm muestra una tendencia a disminuir, comparado con el grupo de plantas cultivadas con solución nutritiva completa. El tratamiento con GSNO mostró una tendencia a contrarrestar nuevamente los efectos de la

deficiencia de P sobre el crecimiento de las raíces laterales de segundo orden en los rangos 3-5; 5-7,5 y mayor a 7,5 mm, excepto en el rango más bajo (0-3 mm).

Las plantas privadas de P mostraron cambios fundamentalmente en el desarrollo de raíces laterales de segundo orden, las cuales resultaron de mayor longitud respecto de las plantas cultivadas con solución nutritiva completa. La exposición a NO exógeno parecería suprimir parcialmente estos efectos de la restricción de P sobre la arquitectura radical (Figura 16).

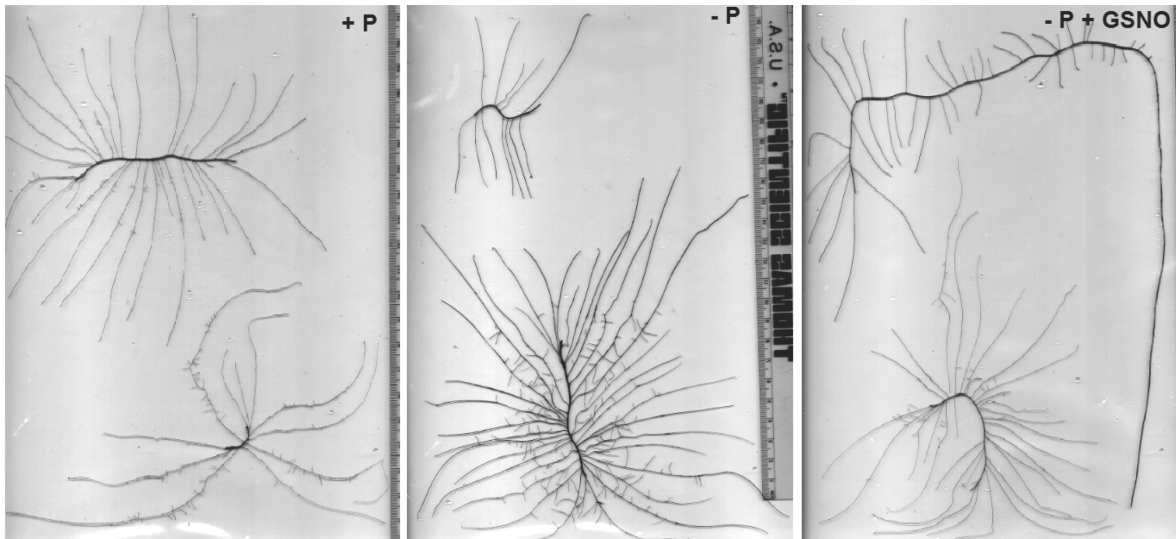


Figura 16. Raíces de plantas de trigo sometidas a los distintos tratamientos.

4. Discusión

En los experimentos desarrollados en este trabajo final de carrera se generaron y caracterizaron condiciones de restricción de P en plantas de trigo (*Triticum aestivum* cv Maringa), y se analizó el efecto de la adición de un dador de NO sobre la arquitectura de las raíces de las plantas cultivadas en condiciones de restricción total de P. Los ensayos se realizaron en cámara de cultivo e hidroponia, ya que este sistema nos permitió controlar variables como la concentración de P y facilitó el análisis posterior de las raíces de las plantas.

En los ensayos llevados a cabo inicialmente para caracterizar el crecimiento y las condiciones de deficiencia de P, se observó que en las plantas sometidas a restricción total de P (0 μ M), la tasa de crecimiento fue cada vez menor, observándose un crecimiento casi nulo hacia el final del experimento (16 días de restricción) (Figura 8). Este efecto concuerda con lo informado por Mollier y Pellerin (1999), empleando plantas de maíz bajo condiciones de cultivo similares a las ensayadas en este trabajo (midieron el número de hojas expandidas y el área foliar cada tres días hasta la cosecha en el día 16 de restricción). Cogliatti y Clarkson (1983), también analizaron la tasa de crecimiento de plantas de papa (*Solanum tuberosum* cv. Desiree) cultivadas bajo restricción de P y encontraron que la misma se inhibió significativamente a los 5 días de deficiencia respecto de las plantas control. La reducción del crecimiento en las plantas cultivadas con restricción total de P podría deberse a una mayor movilización de carbohidratos hacia la raíz en detrimento de los vástagos (Anuradha y Narayanan, 1991).

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 especies (Jiang y col., 2007), en trigo se ha observado un incremento de la longitud de la raíz primaria más larga (Recatume, 2016) y 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).

Las plantas cultivadas en restricción de P durante los tiempos ensayados en este trabajo, presentaron una menor relación vástago: raíz. Esto significa que asignaron más biomasa a las raíces respecto de las plantas cultivadas con niveles suficientes de P

(Figuras 6 y 10) lo cual permite sugerir que la planta distribuye el nutriente residual a favor del crecimiento y desarrollo de la raíz respecto del vástago, en pos de aumentar la superficie radical y favorecer su captura. Estos resultados coinciden con lo señalado por Olivera y colaboradores (2004) que estudiaron el efecto de la deficiencia de P sobre el crecimiento en *Phaseolus vulgaris*. Estos autores plantearon que ante condiciones de restricción de P se inhibe la expansión de las células de los vástagos, reduciendo significativamente el área foliar debido a una menor movilización de carbohidratos hacia estos tejidos. Además, Harberd y colaboradores (2009) sugirieron que este efecto podría estar parcialmente regulado por la vía de giberelinas-proteínas DELLA. La deficiencia de P induciría la acumulación de proteínas DELLA como consecuencia de la reducción de los niveles de giberelinas activas con la consecuente restricción del crecimiento.

Para avanzar en torno al análisis de los efectos del NO exógeno sobre la arquitectura de la raíz en plantas de trigo deficientes en P, y de acuerdo a los resultados obtenidos en una primera etapa de caracterización de la restricción, se eligió como tiempo óptimo de cosecha 9 días (16 días de crecimiento), ya que en este tiempo se encontraron diferencias significativas en las tasas de crecimiento entre las plantas controles (+P) y deficientes (-P) y el sistema radical presentaba un desarrollo adecuado para su análisis (Figura 9).

De acuerdo a lo descrito previamente en Materiales y métodos, se trabajó con plantas controles, plantas creciendo en condiciones de restricción total de P y plantas restringidas en P en presencia de GSNO, un dador de NO. Bajo las condiciones experimentales descritas en este trabajo, la concentración de P en el vástago y las raíces de las plantas restringidas en P se redujo como consecuencia de la falta de incorporación de P desde la solución nutritiva (Figura 11). El agregado de NO exógeno no produjo cambios significativos en el contenido de P respecto de las plantas deficientes en P. Estos resultados coinciden con lo observado por Ramos Artuso y colaboradores (2018) en plantas de maíz cultivadas condiciones de suficiencia y deficiencia de P, en presencia o ausencia de GSNO 100 μ M durante 21 días. Sin embargo, cabe mencionar que la exposición a NO exógeno condujo a un menor porcentaje de acumulación de P en la parte aérea (con una tendencia a aumentar el contenido de P en la raíz). Estos resultados podrían indicar cambios en la distribución de P dentro de la planta. En este sentido, ha sido descrito que el NO mejoró algunos síntomas de la deficiencia de Fe, como la

clorosis, en plantas de maíz, sin cambios en el contenido total de Fe, debido a variaciones en la disponibilidad interna del nutriente (Graziano y col., 2002).

La aplicación de NO exógeno en plantas restringidas en P acentuó aún más la disminución del peso fresco del vástago, de la raíz y la relación vástago: raíz (Figura 10), lo cual podría indicar un efecto inhibitorio del NO en el crecimiento de estos órganos. Tales resultados concuerdan con lo hallado por Ramos Artuso y col. (2018) quienes evidenciaron una caída (aunque no estadísticamente significativa), de la acumulación de biomasa tanto en raíz como en vástago de plantas en condición de déficit de P tratadas con GSNO.

En especies que no desarrollan raíces proteoides, la reorganización de la arquitectura del sistema radical bajo deficiencia nutricional generalmente incluye el desarrollo de raíces laterales y la inhibición de la extensión de la raíz primaria con la participación de auxinas (Reed y col., 1998). En este trabajo experimental, las plantas sometidas a restricción total de P mostraron una raíz primaria más larga en comparación con las plantas suficientes en P, en tanto que el tratamiento con GSNO pareció inhibir este alargamiento. El efecto del NO sobre la raíz primaria se describió en plantas de tomate en condiciones de suficiencia nutricional, donde el tratamiento con otro dador de NO (nitroprusiato de sodio, SNP) también redujo la longitud de la raíz primaria (Correa-Aragunde y col., 2004). En plantas de *Arabidopsis*, se observó un efecto inhibitorio del tratamiento con NO exógeno (SNP) tanto en plantas controles (suficiencia de P) como con privación de P (Wu y col., 2014). En este trabajo los autores confirmaron que el NO contrarresta el efecto estimulador de las giberelinas sobre el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de restricción de P. El NO estabiliza las proteínas DELLA (reguladoras negativas de la señalización por giberelinas), interactuando en forma antagónica para regular el crecimiento de la raíz primaria en condiciones de suficiencia y deficiencia de P.

En condiciones de restricción total de P, las plantas de trigo mostraron un sistema radical más voluminoso en comparación con las plantas suficientes en P con un mayor número y longitud de raíces laterales de segundo orden. La exposición a NO generado exógenamente parecería bloquear el efecto de la privación de P sobre el desarrollo de las raíces laterales de segundo orden. Ha sido descrito que el NO forma parte de los eventos moleculares involucrados en el desarrollo de raíces adventicias inducido por auxinas en plantas de pepino (Pagnussat y col., 2002). En plantas de tomate, la aplicación

de un dador de NO (SNP) indujo la elongación y emergencia de raíces laterales en forma dependiente de la dosis, operando en un camino de transducción de señales mediado por auxinas (Correa Aragunde y col., 2004). Sin embargo el efecto del NO y la interacción con auxinas sobre el desarrollo de raíces laterales en condiciones de deficiencia de P aún no ha sido documentado. El empleo de otros dadores y atrapadores de NO y la medición de los niveles de NO en cada sistema, permitirán confirmar el efecto de esta especie química en la morfología de la raíz, bajo condiciones de escasez de P y ahondar en los mecanismos involucrados.

5. Conclusiones

En este trabajo se analizó el efecto del NO sobre la arquitectura radical de plantas de trigo sometidas a restricción de P, lo cual implicó el trabajo con un dador de NO (GSNO) a fin de evaluar modificaciones en tales respuestas. Bajo las condiciones experimentales analizadas aquí, y en los tiempos ensayados hasta el momento, el GSNO tendió a contrarrestar los efectos de la restricción de P en la arquitectura del sistema radicular, en forma distinta a los efectos observados en otras especies en cuanto al desarrollo de raíces laterales, refutando la hipótesis planteada inicialmente. Sin embargo esto podría, al menos en parte, estar relacionado con un cambio en la distribución de P entre las raíces y la parte aérea, a tiempos cortos de restricción. En este sentido, se propone realizar experimentos adicionales para comprender el papel del NO en la distribución del P interno a estos tiempos de tratamiento (y evaluar otras formas de P - como P inorgánico, P orgánico soluble en ácido, P proteico, P lipídico y P presente en ácidos nucleicos- y enzimas involucradas en la redistribución del P interno).

Se cumplieron favorablemente los objetivos planteados en este trabajo final de carrera ya que se caracterizaron cambios morfológicos y bioquímicos en plantas de trigo cultivadas en condiciones de deficiencia de P y se analizó el papel del NO en la modificación de la arquitectura radical desencadenada como consecuencia de la deficiencia. Futuros experimentos permitirán confirmar su participación y profundizar en los mecanismos involucrados.

6. Bibliografía

- Álvarez, C., Duggan, M., Chamorro, E., D'ambrosio D., Taboada, M. (2009).** Descompactación de suelos franco limosos en siembra directa: efectos sobre las propiedades edáficas y los cultivos. *Ciencia del suelo*, 27(2).
- Andrade, F., Taboada, M., Lema, D., Maceira, N., Echeverría, H., Posse, G., Prieto, D., Sánchez, E., Ducasse, D., Bogliani, M., Gamundi, J., Trumper, E., Frana, J., Perotti, E., Fava, F., Mastrángelo, M. (2017).** Los desafíos de la agricultura argentina; compilado por Fernando H. Andrade. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Ediciones INTA.
- Anuradha, M., Narayanan, A. (1991).** Promotion of root elongation by phosphorus deficiency. *Plant and soil*, 136(2), 273-275.
- Ashley, K., Cordell, D., Mavinic, D. (2011).** A brief history of phosphorus: from the philosopher's stone to nutrient recovery and reuse. *Chemosphere*, 84(6), 737-746.
- Azcón-Bieto, J., Talón, M. (2008).** Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw-Hill/ Interamericana de España, S A U. Segunda edición.
- Bates, T., Lynch, J. (1996).** Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ* 19, 529-538.
- Barančíková, G., Liptaj, T., Prónayová, N. (2007).** Phosphorus fractions in arable and mountain soils and their humic acids. *Soil and water research*, 2(4), 141-148.
- Behie, S., Bidochka, J. (2014).** Nutrient transfer in plant-fungal symbioses. *Trends in plant science*, 19(11), 734-740.
- Borch, K., Bouma, T., Lynch, J., Brown, K. (1999).** Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment*, 22, 425-431.
- Brady, N., Weil, R. (1999).** The Nature and Properties of Soils. 12th Edition. Prentice Hall, Inc. New Jersey.
- Buet, A., Moriconi, J., Santa-María, G., Simontacchi, M. (2014).** An exogenous source of nitric oxide modulates zinc nutritional status in wheat plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 83:337-345.
- Carswell, C., Grant, B., Theodorou, M., Harris, J., Niere, J., Plaxton, W. (1996).** The fungicide phosphonate disrupts the phosphate-starvation response in *Brassica nigra* seedlings. *Plant Physiology* 110, 105-110.
- Casas, R. (2006).** Preservar la calidad y salud de los suelos: una oportunidad para la Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Tomo LX, Buenos Aires, Argentina.
- Chevalier, F., Pata, M., Nacry, P., Doumas, P., Rossignol, M. (2003).** Effects of phosphate availability on the root system architecture: large-scale analysis of the natural variation between *Arabidopsis* accessions. *Plant, Cell and Environment* 26, 1839-1850.
- Cogliatti, D., Clarkson, D. (1983).** Physiological Changes in, and Phosphate Uptake by Potato Plants during Development of, and Recovery from Phosphate Deficiency. *Physiologia Plantarum* 58 (3): 287-94.
- Conti, M. (2000).** Principios de Edafología. Editorial Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires, 2da edición.

- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Lamattina, L. (2004).** Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218, 900-905.
- Creus, C., Graziano, M., Casanovas, E., Pereyra, M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2005).** Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta*, 221(2), 297-303.
- Cruzate, G., Casas, R. (2012).** Extracción y balance de nutrientes en los suelos agrícolas de la Argentina. *Informaciones Agronómicas de Hispanoamérica*, 6, 7-14.
- Epstein, E., Bloom, A. (2005).** Mineral nutrition of plants: principles and perspectives, 2nd ed Sinauer Assoc. Inc., Sunderland.
- Fernández, M. (2007).** Fósforo: amigo o enemigo. *ICIDCA. Sobre los derivados de la Caña de Azúcar*, 41(2), 51-57.
- García, F. (2001).** Balance de fósforo en los suelos de la región pampeana. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* 9:1-3.
- García, F., Berardo, A. (2005).** Trigo. Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. Editorial INTA. Buenos Aires, 233-253.
- García Cartagena, C. (2012).** El ciclo del fósforo. Disponible en: <https://acento.com.do/2012/opinion/205292-el-ciclo-del-fosforo/> Último acceso: octubre 2018.
- Gilbert, N. (2009).** Phosphate: the disappearing nutrient. *Nature* 461, 716-718
- Grasso, A., González Sanjuan, M. (2018).** Fertilizantes en Argentina-Análisis del Consumo. FertilizarAsociación Civil – Argentina.
- Graziano, M., Beligni, M., Lamattina, L. (2002).** Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiology*, 130(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(5), 949-960.
- Harberd, N., 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. *The Plant Cell*, 21(5), 1328-1339.
- Holford, I. (1997).** Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Research*, 35(2), 227-240.
- Hu, Y., Zhang, Q. (2005).** Potential cytoplasmic inheritance in *Wisteria sinensis* and *Robinia pseudoacacia* (Leguminosae). *Plant and cell physiology*, 46 (7), 1029-1035.
- INTA (2019).** Mapa Nacional de Cultivos, Campaña 2018/2019. Colección 1 (Versión 1), publicación N° 1.
- Jiang, C., Gao, X., Liao, L., Harberd, N., Fu, X. (2007).** Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 145(4), 1460-1470.
- Johnson, J., Vance, C., Allan, L. (1996).** Phosphorus deficiency in *Lupinus albus* (altered lateral root development and enhanced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase). *Plant Physiology* 112: 31–41.
- Kim, J., Lynch, J., Brown, M. (2008).** Ethylene insensitivity impedes a subset of responses to phosphorus deficiency in tomato and petunia. *Plant, Cell and Environment* 31, 1744–1755.

- Kitson, R., Mellon, M. (1944).** Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. *Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition* 16, 379-383.
- Lombardo, C., Graziano, M., Polacco, J., Lamattina, L. (2006).** Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signaling and Behavior* 1, 28-33.
- López-Bucio, J., Martínez de la Vega, O., Guevara-García, A., Herrera-Estrella, L. (2000).** Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotechnology* 18, 450–453.
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M., Simpson, J., Herrera-Estrella, L. (2002).** Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant physiology* 129, 244-256.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L. (2003).** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in plant biology* 6, 280-287.
- Ma, J., Goto, S., Tamai, K., Ichii, M. (2001).** Role of root hairs and lateral roots in silicon uptake by rice. *Plant Physiology* 127, 1773-1780.
- Malamy, J. (2005).** Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, cell & environment*, 28(1), 67-77.
- Meng, Z., Chen, Q., Suo, D., Li, G., Tang, C. (2012).** Nitric Oxide Is the Shared Signalling Molecule in Phosphorus- and Iron-Deficiency-Induced Formation of Cluster Roots in White Lupin (*Lupinus albus*). *Annals of Botany* 109 (6): 1055–64.
- Mollier, A., Pellerin, S. (1999).** Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *Journal of Experimental Botany*, 50(333), 487-497.
- Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocana, A., Lluch, C. (2004).** Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): effect of phosphorus. *Physiologia Plantarum*, 121(3), 498-505.
- Pagnussat, G., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2002).** Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129, 954–956.
- Pagnussat, G., Lanteri, M., Lamattina, L. (2003).** Nitric Oxide and Cyclic GMP Are Messengers in the Indole Acetic Acid-Induced Adventitious Rooting Process. *Plant Physiology* 132 (3): 1241–48.
- Pagnussat, G., Lanteri, M., Lombardo, M., Lamattina, L. (2004).** Nitric Oxide Mediates the Indole Acetic Acid Induction Activation of a Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade Involved in Adventitious Root Development. *Plant Physiology* 135 (1): 279–286.
- Pérez-Torres, C., López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M., Herrera-Estrella, L. (2008).** Phosphate availability alters lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *The Plant Cell* 20, 3258-3272.
- Picone, L., Zamuner, E. (2002).** Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones agronómicas del cono sur*, 16, 11-15.
- Ramos-Artuso, F., Galatro, A., Buet, A., Santa-María, G., Simontacchi, M. (2018).** Key acclimation responses to phosphorus deficiency in maize plants are influenced by exogenous nitric oxide. *Journal of Plant Physiology* 222, 51-58.

- Recatume, G. (2016).** Participación del óxido nítrico en la eficiencia del uso de fósforo en plantas de trigo. Disponible en: <http://sedici.unlp.edu.ar/discover?query=recatume&submit=> (Último acceso: noviembre de 2019).
- Reed, R., Brady, S., Muday, G. (1998).** Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 118, 1369 LP – 1378. doi:10.1104/pp.118.4.1369.
- Richardson, A. (2001).** Prospects for using soil microorganisms to improve the acquisition of phosphorus by plants. *Aust. J. Plant Physiol.* (28): p. 897-906.
- Rincón L., Gutiérrez F, (2012)** Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista colombiana de biotecnología* 14, 285-295.
- Royo, B., Moran, J., Ratcliffe, R., Gupta, K. (2015).** Nitric oxide induces the alternative oxidase pathway in Arabidopsis seedlings deprived of inorganic phosphate. *Journal of Experimental Botany* 66, 6273–6280.
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J., Herrera-Estrella, L. (2005).** Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of Arabidopsis thaliana. *Plant and Cell Physiology*, 46(1), 174-184.
- Shimizu, A., Yanagihara, S., Kawasaki, S., Iekashi, H. (2004).** Phosphorus deficiency-induced root elongation and its QTL in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 109, 1361-1368.
- Schachtman, D., Reid, R., Ayling, S. (1998).** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant physiology* 116, 447-453.
- Simontacchi, M., Galatro, A., Ramos-Artuso, F., Santa-María, G. (2015).** Plant survival in a changing environment: the role of nitric oxide in plant responses to abiotic stress. *Abiotic Stress Signaling in Plants: Functional Genomic Intervention, Frontiers in Plant Science, section Plant Physiology* 6,1-19.
- Vance, C., Uhde-Stone, C., Allan, D. (2003).** Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New phytologist*, 157, 423-447
- Vázquez, M. (2002).** Balance y Fertilidad Fosforada en Suelos Productivos de la Región Pampeana. *Informaciones Agronómicas del Cono Sur* N° 16.
- Wang, B., Tang, X., Cheng, L., Zhang, A., Zhang, W., Zhang, F., Liu, J., Cao, Y., Allan, D., Vance, C., Shen, J. (2013).** Nitric oxide is involved in phosphorus deficiency-induced cluster-root development and citrate exudation in white lupin. *New Phytologist* 187, 1112-1123.
- Williamson, L., Ribrioux, S., Fitter, A., Leyser, H. (2001).** Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant physiology* 126, 875-882.
- Wu, A., Gong, L., Chen, X., Wang, J. (2014).** Interactions between nitric oxide, gibberellic acid, and phosphorus regulate primary root growth in Arabidopsis. *Biol. Plant.* 58 (2), 335–40.
- Xiong, J., An, L., Lu, H., Zhu, C. (2009).** Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. *Planta*, 230(4), 755-765.
- Zandonadi, D., Santos, M., Dobbss, L., Olivares, F., Canellas, L., Binzel, M., Okorokova-Façanha, A., Façanha, A. (2010).** Nitric Oxide Mediates Humic Acids-Induced Root Development and Plasma Membrane H⁺-ATPase Activation. *Planta* 231 (5): 1025–36.

