



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

División de Estudios de Posgrado

FACULTAD DE BIOLOGÍA



**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

ÁREA TEMÁTICA: FISIOLOGÍA Y GENÉTICA VEGETAL

**EFFECTOS DEL CROMO (VI) SOBRE LA EXPRESIÓN GLOBAL DE
GENES EN**

***Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh**

T E S I S

QUE PRESENTA

BIOL. FÁTIMA HERNÁNDEZ MADRIGAL

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

DIRECTORES DE TESIS:

Dr. Miguel Martínez Trujillo

Dr. José López Bucio

MORELIA, MICHOACÁN, AGOSTO 2011

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de **Genética y Microbiología** de la Facultad de Biología y de **Biología del Desarrollo Vegetal** del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del **Dr. Miguel Martínez Trujillo** y del **Dr. José López Bucio**, contando con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

DEDICATORIA

A Gabriel con todo mi amor y cariño...

AGRADECIMIENTOS

A Gabriel: por ser el motorcito de mi vida... Gracias por tu comprensión al restarte tiempo a mi lado, que aunque ahora eres pequeño algún día lo entenderás... ¡Va por los Tres!

A mi esposo: Jesús Rafael Cortés Marín por tu invaluable apoyo, por estar conmigo no solo en mis momentos de alegría, sino también alimentándome en mis dificultades. Gracias por estar ahí y cuidar de lo que más quiero.

A mis padres: Saúl Hernández y María de Lourdes Madrigal por la oportunidad de estar aquí y por darme las herramientas necesarias para seguir en este camino...Gracias.

A mis hermanos: Dulce por tu apoyo, Alejandro por tus buenos ánimos, Francisco y Saúl, a mis sobrinos Denisse y Ángel...Gracias por ser las ramas de mi árbol.

Al Dr. Miguel Martínez Trujillo: Por confiar en mí al permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por compartir conmigo su sabiduría. Por su tiempo, su gran comprensión y su gran apoyo y siempre mostrar su lado humano...Muchas gracias.

Al Dr. José López Bucio: Por sus conocimientos compartidos, por su entusiasmo, por su gran apoyo y tiempo, por estar siempre al pendiente en la realización de este trabajo...Muchas gracias.

Al Dr. Carlos Cervantes Vega: Por sus conocimientos compartidos que me ayudaron a despejar muchas de mis dudas, así como por su tiempo y dedicación en la revisión de mi trabajo...Gracias.

Al M.C. Randy Ortiz Castro: Por su tiempo y su gran ayuda en el transcurso y revisión de mi trabajo...Gracias.

Al Dr. Lenin Sánchez Calderón y al Dr. Victoriano Ramírez: Por el tiempo en la revisión y comentarios a mi trabajo. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio: a los que están y a los que ya partieron a nuevos rumbos, por hacerme del tiempo de trabajo un momento ameno. De una manera especial a Tere, Carlos, Domingo, Claudia, Güero y a las Maestras: **Ángeles** y **Gloria**, por su amena compañía y asesoría en el laboratorio. Gracias por tu ayuda en la elaboración de mi tesis, Ángeles. Así como también a mis compañeros del otro Lab. Javier, Ramón, Enrique, León y Edith, y al ya Doctor **Alfonso Méndez** por su gran ayuda y asesoría en mi trabajo...Gracias.

A mis amigas: Karlita, Liz y Mariana por compartir conmigo lo bueno y lo malo. De una manera muy especial a mi amiga y colaboradora: **Lizette Chávez Meza**, por su apoyo en material bibliográfico, así como los ánimos brindados...Gracias.

A Dios: por permitirme estar aquí y ser mi refugio y fuerza en los momentos difíciles...Gracias.

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre el cromo	1
1.2 La química del cromo	1
1.3. Efectos biológicos del cromo	2
1.4. Transporte y acumulación del cromo en microorganismos	3
1.5. Transporte y acumulación del cromo en las plantas	4
1.6. Respuestas fisiológicas de las plantas al cromo	4
1.7. Efectos del cromo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas	5
1.8. Efectos del cromo en el metabolismo de nutrientes minerales	6
1.9. Resistencia de las plantas al cromo	7
1.10. Efectos del cromo en Arabidopsis	7
1.11. <i>Arabidopsis thaliana</i> (L) Heynh	8
1.12. Crecimiento y desarrollo post-embrionario de las plantas	8
1.13. Reguladores del crecimiento vegetal	9
1.13.1. Auxinas	10
1.13.2. Citocininas	10
1.13.3. Giberelinas	11

1.13.4. Etileno	12
1.13.5. Acido abscísico	13
1.14. Morfogénesis de la raíz	14
1.15. Morfogénesis de la hoja	16
1.16. Nutrición vegetal	17
1.17. Transporte de macronutrientes	18
1.17.1. Nitrógeno	20
1.17.2. Fósforo	20
1.17.3. Azufre	21
1.17.4. Regulación de la expresión de los transportadores de iones	22
1.18. Disponibilidad de nutrientes minerales y respuestas adaptativas	22
1.19. Control de la expresión génica	24
1.20. Microarreglos de DNA	25
1.21. El genoma de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L) Heynh	26
1.22. Estudios de expresión global de genes	27
1.22.1. Respuesta a nutrientes	27
1.22.2. Respuesta a metales pesados	28
II. JUSTIFICACIÓN	30
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS	31
4.1. Objetivo general	31
4.2. Objetivos particulares	31

V. MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1. Material biológico y condiciones de crecimiento	32
5.2. Cuantificación de biomasa y análisis estadísticos	33
5.3. Análisis histoquímico de la actividad de GUS	33
5.4. Microscopía	33
5.5. Aislamiento de RNA, marcaje, hibridación y procesamiento de imágenes	34
5.6. Diseño experimental y plataforma del microarreglo	34
5.7. Normalización y análisis de datos	34
5.8. Clasificación funcional de los genes diferenciales	35
VI. RESULTADOS	36
6.1. Efectos del cromo sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de <i>Arabidopsis</i>	36
6.2. Efecto del cromo sobre la expresión de <i>CyCB1::uidA</i>	37
6.3. Efecto de los nutrientes en la respuesta de la raíz al cromo	37
6.4. Efecto del cromo en la expresión de los transportadores de fosfato AtPT1 y AtPT2	39
6.5. Expresión global de genes en respuesta al cromo en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh	42
6.6. Genes implicados en la homeostasis del hierro	45
6.7. Regulación hormonal en <i>Arabidopsis</i> en respuesta al cromo	45
6.8. Genes implicados en la respuesta a estrés biótico y abiótico	47
VII. DISCUSIÓN	48
VIII. RESUMEN DE RESULTADOS	55
IX. CONCLUSIÓN	56

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	8
Figura 2. Estructura de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i>	15
Figura 3. El origen de las hojas en el meristemo apical del tallo	19
Figura 4. Efecto del cromato sobre el crecimiento de <i>Arabidopsis</i>	36
Figura 5. Efecto del Cr en la expresión del marcador de la división celular <i>CyCB1::uidA</i>	37
Figura 6. Efecto de los nutrientes en la restauración del crecimiento de la raíz primaria afectado por el cromo	38
Figura 7. Efecto del cromato y dicromato de potasio en la expresión de <i>AtPT1::uidA</i>	39
Figura. 8 Expresión de <i>AtPT2::uidA</i> en medios con cromato y dicromato	40
Figura 9. Efecto del cromato en la expresión de <i>AtPT2::uidA</i> en medios suplementados con fosfato o sulfato	41
Figura 10. Efecto del cromo en la expresión global de genes	42
Figura 11. Clasificación funcional de los genes con expresión regulada diferencialmente en 20 μ M de cromato de potasio	43
Figura 12. Clasificación funcional de los genes con expresión regulada diferencialmente en 140 μ M de cromato de potasio	44

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Principales genes inducidos y reprimidos por el cromato	46
--	----

RESUMEN

El incremento de las concentraciones de cromo (Cr) en el ambiente debido a actividades antropogénicas lo ha convertido en un serio contaminante ambiental. El Cr(VI) es la forma más tóxica del Cr, debido a la generación de radicales libres durante su reducción a Cr(III) en las células. Se sabe que el Cr se transporta a través de la membrana por un mecanismo activo que involucra acarreadores de aniones esenciales en bacterias y hongos, pero se carece de información concluyente sobre los procesos de captación, movilización y acumulación que ocurren en las plantas. Debido a que el Cr es un elemento no esencial, hasta la fecha son pocos los estudios que se han realizado para elucidar las redes de señalización que participan en las respuestas adaptativas al estrés por Cr. En este trabajo se analizaron los cambios en la expresión global de genes de *Arabidopsis thaliana* ante dos concentraciones de cromato de potasio ($K_2CrO_4^{2-}$), 20 y 140 μM que, con base en los efectos fisiológicos mostrados sobre el desarrollo de la raíz, fueron definidas como estimulante e inhibitoria para el crecimiento, respectivamente. Los tratamientos con cromato (CrO_4^{2-}) modificaron la expresión de 761 genes, de los aproximadamente 25, 000 genes que constituyen el genoma de *Arabidopsis*. La respuesta transcripcional en cada una de las concentraciones del oxianion fue específica, lo cual correspondió con el fenotipo de las plantas in vitro. Una de las categorías funcionales mejor representada para ambos tratamientos fue la de genes que codifican factores de transcripción. Además, la expresión de varios genes implicados en la señalización por auxinas y citocininas y en la homeostasis de hierro (Fe), se modificó en concentraciones inhibitorias. También se analizó la interacción de CrO_4^{2-} con algunos nutrientes, encontrándose que el fosfato (PO_4^{3-}) y el sulfato (SO_4^{2-}), disminuyen la toxicidad del Cr sobre el crecimiento de la raíz primaria. Aunado a lo anterior, el análisis de la expresión del transportador de fosfato de alta afinidad *AtPT2* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, sugiere que el CrO_4^{2-} puede interferir con la translocación de PO_4^{3-} , SO_4^{2-} y Fe, o afectar su metabolismo.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades sobre el cromo

El cromo (Cr) fue identificado por primera vez en 1797 por el químico francés Vauquelin, quién lo aisló de la crocoita, un mineral también llamado “plomo rojo siberiano”. Su nombre proviene del griego *chroma*, que significa color y le fue dado por los muchos colores de sus compuestos (Shupack, 1991). El Cr generalmente no se halla en estado libre en la naturaleza, se encuentra en forma combinada, principalmente como el mineral cromita (FeCr_2O_4), que se utiliza para fines comerciales.

El Cr es el séptimo elemento de mayor abundancia en la tierra y el vigésimo primero en las rocas de la corteza. La abundancia del Cr en la corteza terrestre varía en un rango de 100 a 300 $\mu\text{g/g}$ y el suelo puede contener entre 5 y 3000 $\mu\text{g/g}$ (Skeffington et al., 1976). El Cr se encuentra en rocas, suelo y emisiones volcánicas (McGrath y Smith, 1990).

Los usos del Cr y sus compuestos en la industria son muy diversos, del 60 al 70% se utiliza en aleaciones, incluyendo al acero inoxidable y el 15% es utilizado en procesos químicos industriales, principalmente en el curtido de pieles, en pigmentos y galvanoplastia. Estas aplicaciones incrementan su concentración en el ambiente, por lo que se ha convertido en un contaminante importante del aire, suelo y agua (Armienta-Hernández y Rodríguez-Castillo, 1995).

1.2. La química del cromo

El Cr es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica. Su química no es sólo rica en la variedad de colores de sus compuestos, sino también en la variedad de estados de oxidación, los cuales van de -2 a +6. Las formas más estables y abundantes del Cr son la trivalente Cr(III) y la hexavalente Cr(VI), los otros estados de valencia son inestables y de vida corta en los sistemas biológicos (Shupack, 1991).

El Cr(VI) está asociado al oxígeno, para formar los oxianiones hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (Shanker et al., 2005). En presencia de materia orgánica el Cr(VI) es reducido a Cr(III); esta transformación es más rápida

en suelos ácidos (McGrath y Smith, 1990). Por otro lado, el Cr(III) es termodinámicamente muy estable, se encuentra formando óxidos, hidróxidos o sulfatos y se le ha encontrado asociado a materia orgánica en suelos y ambientes acuáticos (Shanker et al., 2004). Se sabe que el Cr(III) es importante para la dieta humana, pero en plantas no hay evidencia sustancial que indique un papel fundamental en el metabolismo (Zayed y Terry, 2003).

El Cr, en contraste a otros metales tóxicos como el cadmio, mercurio, plomo y aluminio, ha recibido poca atención como agente contaminante. Una de las razones es por la complejidad de las interacciones con los sistemas biológicos y su dificultad para estudiarlos (Shanker et al., 2009). En el citoplasma, la toxicidad del Cr está principalmente relacionada con los procesos de reducción del Cr(VI) a Cr(III), por acción tanto enzimática como no enzimática, pasando por estados inestables intermedios de Cr(V) y Cr(IV), en el cual se forman radicales libres (Cervantes y Campos-García, 2007).

1.3. Efectos biológicos del cromo

Los efectos biológicos del Cr dependen de su estado de oxidación y localización celular. El Cr(VI) es considerado la forma más tóxica, mientras que el Cr(III) es relativamente inocuo debido a su insolubilidad y subsecuente incapacidad para cruzar las membranas celulares (Katz y Salem, 1993).

La reducción del Cr(VI) a Cr(III) se ha descrito en muchos sistemas biológicos, involucrando la formación intermedia de Cr(V) (Kawanishi et al., 1986). Los complejos de Cr(V) se producen a partir de Cr(VI) por la reducción de agentes fisiológicos tales como NAD(P)H, FADH₂, varias pentosas y glutatión (Shi et al., 1990). Estos compuestos reaccionan con H₂O₂ generando cantidades significativas de radicales OH[·], sin generación asociada a O₂. Los radicales OH[·] pueden producir alteraciones en el DNA, siendo el daño oxidativo el responsable de los efectos genotóxicos causados por el Cr(VI) (Shi y Dalal, 1990). Por otro lado, el Cr(III) puede ejercer efectos tóxicos adicionales por su capacidad para unirse a grupos fosfato en el DNA (formando aductos Cr-DNA), a grupos carboxilo y sulfhidrilo en proteínas y

por competencia con el transporte de hierro (Fe) (Cervantes y Campos-García, 2007).

1.4. Transporte y acumulación del cromo en microorganismos

Estudios previos acerca de las interacciones de microorganismos y plantas con el Cr han proporcionado información sobre su transporte y acumulación en los organismos. Se ha reportado que el CrO_4^{2-} se transporta activamente a través de las membranas celulares, tanto de procariontes como de eucariontes, probablemente dentro de las células el Cr(VI) es reducido a Cr(III) (Cervantes y Campos-García, 2007).

Mediante estudios con *Salmonella typhimurium*, así como con *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Alcaligenes eutrophus*, se ha demostrado que el transporte de CrO_4^{2-} ocurre a través del sistema de transporte de sulfato (SO_4^{2-}) y que la captación del CrO_4^{2-} se da por transporte activo en la membrana. La analogía estructural de estos oxianiones determina que el CrO_4^{2-} sea un inhibidor competitivo en el transporte de SO_4^{2-} en todas las especies de bacterias donde ha sido analizado (Cervantes et al., 2001; Cervantes y Campos-García, 2007). En cuanto a los hongos, se ha generado una mutante de *Neurospora crassa* resistente a CrO_4^{2-} , la cual mostró que existe un antagonismo entre la captación de SO_4^{2-} y CrO_4^{2-} (Cervantes et al., 2001).

En bacterias, se han encontrado mecanismos de resistencia a CrO_4^{2-} en los cuales participan genes plasmídicos y del cromosoma (Cervantes et al., 2001). Los sistemas de resistencia bacterianos están usualmente relacionados a estrategias como la reducción del Cr(VI) por enzimas específicas e inespecíficas, reparación de daños en el DNA, actividades de detoxificación y procesos asociados al metabolismo del hierro (Fe) o del azufre (S). Por otro lado, algunos genes plasmídicos codifican proteínas de transporte que median el flujo de iones CrO_4^{2-} desde el citoplasma al exterior de la célula (Cervantes et al., 2001).

1.5. Transporte y acumulación del cromo en las plantas

Una de las primeras interacciones del Cr con la planta ocurre durante el proceso de internalización por la raíz. El Cr es un elemento tóxico no esencial, por lo que aparentemente no existe especificidad para su captación. La acumulación del Cr ha sido bien documentada para varios cultivos, en plántulas de cebada se observó que la captación de Cr(VI) ocurre con gasto de energía y no así la captación de Cr(III) (Skeffington et al., 1976). En este mismo cultivo se encontró una acumulación mayor de Cr(III) que de Cr(VI) (Ramachandran et al., 1980).

En los vegetales, el Cr se transporta desde la raíz hasta la parte aérea a través del xilema, acumulándose principalmente en las raíces y en cantidades menores en el follaje y órganos reproductivos. En el frijol, el 98% de Cr absorbido se localizó en la raíz, mientras que solo el 0.1% se encontró en las semillas (Huffman y Allaway, 1973). En las células, el Cr se concentra principalmente en la pared celular y en las vacuolas (Liu y Kottke, 2003). La alta acumulación del Cr en las raíces podría deberse a que el Cr es inmovilizado en los sitios mencionados, haciéndose menos tóxico.

El Cr(VI) y Cr(III) cruzan la endodermis vía simplasto; el Cr(VI) en el citoplasma puede reducirse a Cr(III), el cual es retenido en las células del córtex, con lo que disminuyen las concentraciones de Cr(VI) en otros tejidos. Esto podría explicar en parte la baja toxicidad del Cr(III) (Cervantes et al., 2001). Aunado a lo anterior, se demostró que el transporte de Cr(VI) en la célula es más alto que su tasa de reducción a Cr(III), consecuentemente, las células vegetales tienen que responder activando mecanismos de destoxificación (Kaszycki et al., 2005).

1.6. Respuestas fisiológicas de las plantas al cromo

El impacto de la contaminación por Cr en la fisiología de las plantas depende de la especiación del metal, la cual es responsable de su movilización y su subsecuente entrada, así como del efecto celular subsiguiente (Shanker 2005). Los compuestos de Cr son altamente tóxicos y su concentración en el ambiente puede ser perjudicial para la productividad vegetal (Davies et al., 2002).

El Cr(VI) inhibe la germinación (Ortiz-Castro et al., 2006, 2007), o causa necrosis y/o clorosis de las hojas, reducción del crecimiento de la raíz y en la producción de biomasa durante el desarrollo post-embionario (Sharma et al., 1995). Estos efectos se explican por el daño oxidativo a las membranas celulares (Vázquez et al., 1987), reducción en la producción de clorofila (Sharma et al., 2003), disminución del contenido de proteínas e inhibición de la actividad de la nitrato reductasa (Vajpayee, 2000). También afecta directamente el material genético provocando alteraciones cromosómicas (Zou et al., 2006).

1.7. Efectos del cromo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas

Son varios los procesos biológicos que se ven afectados por el Cr(VI) en las plantas, incluyendo cambios en los patrones de crecimiento y desarrollo de la raíz y del follaje. La disminución en el crecimiento de la raíz causada por metales pesados ha sido bien documentada en árboles y plantas cultivadas (Shanker et al., 2005). Prasad et al. (2001) reportaron que el orden de toxicidad de los metales sobre los primordios de la raíz en *Salix viminalis* es $\text{Cd} > \text{Cr} > \text{Pb}$, además la longitud de la raíz fue más afectada por el Cr que por cualquier otro de los metales antes mencionados. Este efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz por Cr(VI) se ha reportado también en plantas de *Amaranthus viridis* L. en concentraciones mayores a 100 μM de dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (Zou et al., 2006). Asimismo, se reportó una disminución en la biomasa de la raíz y del follaje en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. trasplantadas a un medio nutritivo suplementado con 200 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (Ortiz-Castro et al., 2007). Barceló et al. (1986) sugirieron que la disminución del crecimiento de la raíz debida a la toxicidad del Cr puede ocurrir por una inhibición en la mitosis y por una alteración en el alargamiento de las células, causando un colapso del sistema radical y una subsiguiente incapacidad para la absorción de agua y nutrientes del medio. En estudios con plántulas de *A. viridis*, se analizaron los efectos del Cr sobre la división celular, encontrándose daños en la estructura y organización cromosomal (Zou et al., 2006). En estos estudios, las plántulas fueron sometidas a distintos tratamientos con Cr(VI) (10 μM a 1000 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$), con efectos dependientes de la concentración, reafirmando la idea de que la

disminución en el crecimiento de la raíz ocurre como resultado de la inhibición en la división y elongación celular.

El Cr(VI) tiene un efecto inhibitor del crecimiento de la raíz en altas concentraciones y a tiempos prolongados de exposición, sin embargo, también presenta un efecto estimulador en concentraciones relativamente bajas (10 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) en plantas de *A. viridis* (Zou et al., 2006). Este efecto estimulador del crecimiento se ha confirmado en plantas de *Arabidopsis* trasplantadas a medios con 100 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (Ortiz-Castro et al., 2005).

El Cr(VI) tiene efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo de las hojas. Los efectos visibles incluyen un retraso en el crecimiento, clorosis, reducción en la fotosíntesis y la presencia de un color rojo parduzco con pequeñas áreas necróticas (Zayed et al., 2003). El número de hojas se redujo en un 50% en plantas de trigo tratadas con 0.50 mM de Cr(VI) (Sharma y Sharma, 1993). Tripathi et al. (1999) encontraron que el área foliar y la biomasa de las plántulas de *Albizia lebbek* fueron afectadas a una concentración de 1 mM.

1.8. Efectos del cromo en el metabolismo de nutrientes minerales

Debido a la similitud estructural de los compuestos del Cr con los derivados de algunos elementos esenciales como SO_4^{2-} y PO_4^{3-} , estos pueden afectar la nutrición de las plantas de manera compleja (Shanker et al., 2005), interfiriendo con la captación, translocación y/o acumulación de varios nutrientes (Gardea-Torresdey et al., 2005).

La toxicidad del Cr puede ser explicada en parte por la interferencia en el metabolismo de los nutrientes (Zayed y Terry, 2003). El Cr(VI) disminuye la entrada de fósforo (P), potasio (K), hierro (Fe), magnesio (Mg) y manganeso (Mn) (Turner y Rust, 1971). Terry (1981) reportó que concentraciones tóxicas de Cr(VI) (>2 mg/kg) en plantas de remolacha, inhiben la absorción de calcio (Ca). Barceló et al. (1985) describieron la inhibición en la captación de P, K, Zn, Cu y Fe, en plantas de frijol expuestas a Cr(VI) en una solución nutritiva; además, reportaron que el Cr agrava la clorosis por deficiencia de Fe, al interferir con su metabolismo. Algunos de los efectos inhibitorios en el crecimiento de la raíz y del follaje podrían ser causados por

la competencia del CrO_4^{2-} con estos nutrientes, mediante la interacción de ambos en el transporte al interior de las células. La entrada del Cr(VI) en las raíces de las plantas ocurre mediante un transporte activo, pero se carece de información concluyente sobre los mecanismos de transporte involucrados. Se ha estudiado la inhibición en la captación de Cr (VI) por algunos aniones que forman elementos del grupo VI de la tabla periódica, en mayor medida por SO_4^{2-} , el cual ejerce una inhibición competitiva debido a la similitud estructural de los iones (Shewry y Peterson, 1974).

1.9. Resistencia de las plantas al cromo

Los mecanismos de resistencia al Cr en las plantas no se han esclarecido, sin embargo, se ha observado que algunos miembros de la familia *Brassicaceae* acumulan grandes cantidades de Cr, los cuales se han utilizado como un modelo para el estudio de la resistencia natural a metales pesados (Zayed et al., 1998). Las plantas son capaces de reducir el Cr(VI) a Cr(III) en las raíces y se sugiere que este proceso podría estar catalizado por reductasas de Cr similares a las encontradas en bacterias, sin embargo, hasta la fecha estas enzimas no se han identificado (Lytle et al., 1998).

1.10. Efectos del cromo en *Arabidopsis*

Estudios sobre los efectos del Cr(VI) sobre el crecimiento de *Arabidopsis* revelaron que concentraciones de 400 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ reducen en un 60% la germinación de la semilla, mientras que el tratamiento con 800 μM nulifica la germinación. Una concentración relativamente baja de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (100 μM) causó un incremento significativo en la producción de biomasa, tanto de raíz como de brotes, mientras que concentraciones altas (de 400 a 800 μM) redujeron notablemente el peso fresco de la planta, produciendo además un amarillamiento de las hojas (Ortiz-Castro et al., 2006; 2007).

La arquitectura de la raíz de *Arabidopsis* también se ve afectada por la presencia de Cr en el medio, la exposición a 100 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ causó un incremento en la longitud de los pelos radicales en más de 4 veces respecto al control sin $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$,

mientras que concentraciones mayores de 100 μM ocasionaron una disminución en el crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de más raíces laterales. También se reportó una reducción de la longitud en la zona de elongación de la raíz primaria, así como el engrosamiento de las raíces primaria y laterales en 200 μM $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (Ortiz-Castro et al., 2006; 2007).

Estudios más recientes demostraron que el PO_4^{3-} y SO_4^{2-} disminuyen el efecto tóxico causado por el $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ al restaurar el crecimiento de la raíz primaria y reafirman la hipótesis de que el Cr compite con estos aniones por la entrada a la planta (Ortiz-Castro et al., 2008). Estos estudios sugieren la participación de transportadores de PO_4^{3-} y SO_4^{2-} en el transporte del $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ al interior de la célula.

1.11. *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh

Arabidopsis thaliana (L) Heynh, es una planta vascular de la clase de las dicotiledóneas, subclase dilénida, orden caprales, familia Brassicaceae (Strasburger, 2004). Es una angiosperma de tamaño pequeño, de unos 30 cm, con un ciclo de vida corto (6-8 semanas), se autopoliniza, tiene una alta fecundidad y una producción de semilla abundante, lo cual la hace de fácil manejo y la mejor opción para estudios *in vitro* (Fig. 1). Por estas características, *Arabidopsis* se ha convertido en un modelo de estudio importante en las investigaciones sobre los efectos de nutrientes y metales sobre el desarrollo vegetal.

1.12. Crecimiento y desarrollo post-embrionario de las plantas

El crecimiento y desarrollo vegetal involucra la integración de señales ambientales y endógenas, las cuales junto con el programa genético intrínseco determinan la morfofisiología de la planta (Gray, 2004). Una característica de su desarrollo post-embrionario es la gran plasticidad, susceptible a diversas modificaciones causadas por interacciones con su ambiente biótico y abiótico (Forde et al., 2001). Mientras que el hábito sedentario de las plantas permite una organización relativamente simple, sus mecanismos adaptativos son diversos y sofisticados.

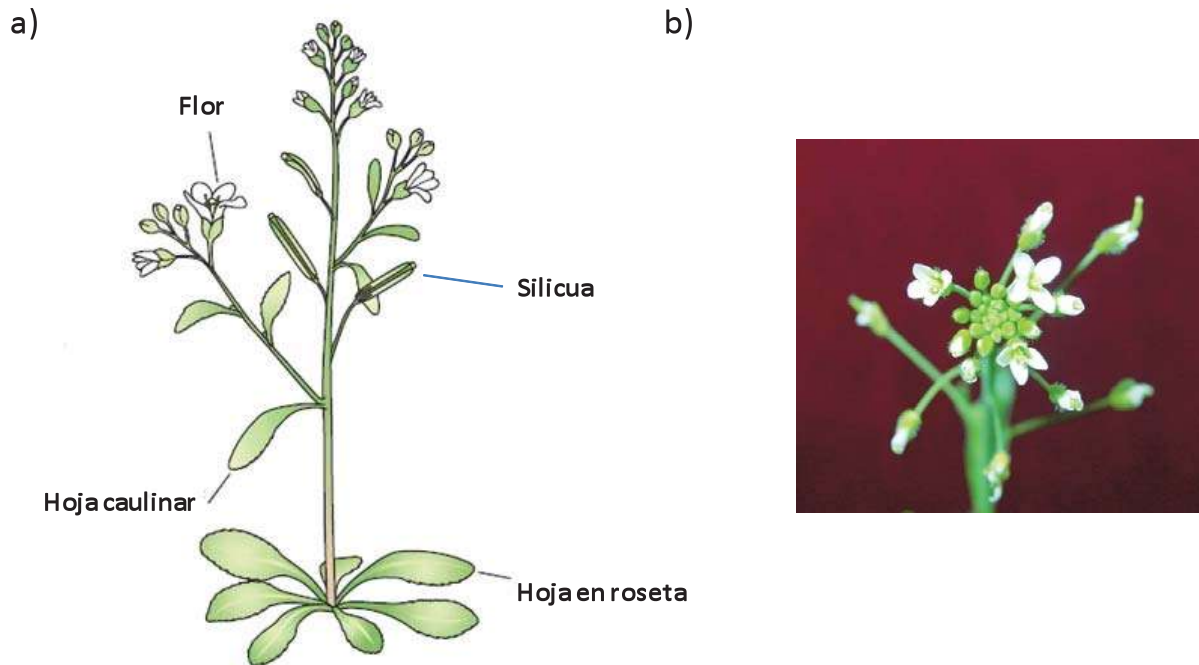


Figura 1.- *Arabidopsis thaliana*. a) Dibujo de una planta adulta de *Arabidopsis* que muestra varios de sus órganos. b) Fotografía de las flores (Modificado de Taiz y Zeiger, 2006). Cortesía Martínez-Trujillo.

Las plantas al no poder trasladarse a hábitats óptimos, se adaptan a su ambiente local. Estas adaptaciones pueden ocurrir a un nivel fisiológico, genético y molecular. La activación del programa de desarrollo post-embriionario requerido está modulado por la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, luz, agua, gravedad y los organismos con los que coexiste (Taiz y Zeiger, 2006).

1.13. Reguladores del crecimiento vegetal

Los responsables de cada aspecto del desarrollo vegetal, desde la embriogénesis hasta la senescencia, son varias moléculas orgánicas denominadas fitohormonas o reguladores del crecimiento (Kepinski, 2006). Las fitohormonas pueden considerarse mensajeros químicos que permiten la comunicación entre células, tejidos y órganos (Kucera et al., 2005). Entre las fitohormonas más estudiadas están las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico, cada una de las cuales actúa en bajas concentraciones para regular diversos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal.

1.13.1. Auxinas

Las auxinas, cuyo nombre deriva de la palabra griega “auxein” que significa “crecer”, regulan las respuestas trópicas a la luz y gravedad, la arquitectura general de la raíz y del follaje, la formación de los órganos y el desarrollo vascular (Teale et al., 2006). La principal auxina en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA). El AIA actúa como molécula señal durante los procesos de división, elongación y diferenciación celular, desde la embriogénesis al establecer la polaridad basal-apical del embrión y en la formación de los meristemos de la raíz y el follaje, hasta el desarrollo post-embriionario (Taiz y Zeiger, 2006; Teale et al., 2006).

La biosíntesis de auxinas ocurre tanto en el follaje como en la raíz (Ljung et al., 2001). Las auxinas sintetizadas son transportadas a tejidos específicos donde generan cascadas de señalización que modifican el desarrollo (Benjamins y Scheres, 2008). Entre las respuestas de las plantas a las auxinas se puede resaltar el desarrollo y la arquitectura de la raíz en donde la auxina y su distribución tiene un papel crucial al permitir la formación y mantenimiento del meristemo radicular, mientras que el gradiente de concentración de esta hormona permite la elongación celular (Grieneisen et al., 2007).

1.13.2. Citocininas

Las citocininas comprenden una clase de moléculas derivadas de la adenina, implicadas en diversos procesos durante el ciclo de vida de la planta, que incluyen el control de la división celular tanto en el follaje como en la raíz, la diferenciación vascular, la biogénesis de los cloroplastos, el desarrollo y la ramificación del follaje, la raíz y las inflorescencias, el balance de nutrientes, la senescencia de las hojas, la tolerancia al estrés y el desarrollo de semillas (Kieber, 2001; Müller y Sheen, 2007). Las citocininas se identificaron inicialmente como moléculas capaces de estimular la división celular en plantas (Miller et al., 1955). Posteriormente, se determinó que las citocininas pueden activar la división celular induciendo a uno de los activadores del ciclo celular, la ciclina D3 (CYCD3) (Riou-Khamlichi et al., 1999). En concordancia con esta capacidad, las citocininas regulan la actividad de los meristemos apicales del follaje, sin embargo, se ha observado que tienen una función opuesta en el

meristemo radicular. En plantas con una deficiencia moderada de citocininas se reduce el crecimiento del follaje y se acelera la elongación de la raíz (Werner et al., 2003).

Las células madre del meristemo apical de la raíz se encuentran en la punta de la raíz y las citocininas facilitan la salida de células indiferenciadas de la zona meristemática a la zona de elongación y su posterior diferenciación, con lo que controlan la longitud de la zona meristemática (Dello Ioio et al., 2007) y permiten la diferenciación de los tejidos como la vasculatura (Higuchi et al., 2004). Sin embargo, se requiere un nivel mínimo de citocininas para mantener la población de células madre indiferenciadas y dividiéndose en el meristemo radicular, cuando sus niveles se incrementan pueden inhibir la división celular (Nishimura et al., 2004).

1.13.3. Giberelinas

Las giberelinas (GAs) son una gran familia de compuestos diterpenoides sintetizados a partir del geranil geranil difosfato (GGDP), con más de 100 miembros, de los cuales sólo algunos son reguladores bioactivos del crecimiento vegetal produciéndose en el sitio en que se tiene su efecto. Estas moléculas controlan diversos procesos del desarrollo vegetal como la germinación de las semillas, la elongación de los tallos, la expansión de las hojas y el desarrollo de tricomas, flores y frutos. La concentración de GAs puede ser modificada por estímulos como la luz y la temperatura, por lo que pueden considerarse como sensores ambientales (Olszewski et al., 2002, Gou et al., 2010).

Durante la germinación, las GAs promueven el crecimiento del embrión y/o reducen las restricciones físicas impuestas por el endospermo y la testa, que impiden la protrusión de la radícula. En el endospermo y el córtex de ejes embrionarios de semillas de *Arabidopsis*, se sintetizan GAs bioactivas, particularmente en los sitios en que las células se expanden rápidamente (Olszewski et al., 2002).

Uno de los efectos de las GAs bioactivas es promover la diferenciación de órganos al inducir la pérdida de la identidad meristemática. En la raíz, la endodermis tiene un papel muy importante en la expansión celular dependiente de GAs en la elongación de la zona de crecimiento de la raíz, permitiendo que las células se

expandan sólo en la zona de elongación en respuesta a GAs (Ubeda-Tomás et al., 2008). Las GAs son importantes en la adaptación de la planta al estrés. Son capaces de integrar el desarrollo aéreo y de la raíz, donde la disminución del crecimiento del follaje estimula el desarrollo del sistema radicular a través de la reducción en GAs, produciendo plantas pequeñas con un sistema radicular más exploratorio (Gou et al., 2010).

1.13.4. Etileno

El etileno es un hidrocarburo insaturado que regula diversos procesos metabólicos y del desarrollo en las plantas. Este compuesto se forma a partir de la metionina vía S-adenosil-L-metionina (AdoMet) y 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico (ACC). Las enzimas que catalizan la conversión de AdoMet a ACC y a ACC a etileno son la ACC sintasa y la ACC oxidasa, respectivamente (Kende, 1993). Diversas señales ambientales y endógenas regulan la biosíntesis de etileno, principalmente a través de la expresión diferencial de genes que codifican la ACC sintasa (Adams y Yang, 1979).

En términos amplios, el etileno desencadena la senescencia de los órganos en las plantas, actúa como una hormona en condiciones de estrés biótico y abiótico, exhibiendo diversos efectos morfogénéticos. Entre los procesos de senescencia, el etileno induce la maduración de los llamados frutos climatéricos como el mango y la guayaba, lo que se ha investigado con mayor detalle debido a su gran importancia agronómica (Bleecker y Kende, 2000).

La naturaleza química simple del etileno contrasta con su compleja regulación. Esto se ilustra por la multiplicidad de genes que codifican enzimas claves para la biosíntesis de etileno, receptores múltiples de etileno y la complejidad de los pasos reguladores involucrados en la señalización y control de la síntesis y reciclaje de RNAm y de proteínas. Además, existen amplias interacciones del etileno con otras hormonas (Lin et al., 2009).

La actividad del etileno como una molécula señal depende de la capacidad de las células para controlar las concentraciones cambiantes de éste y la transducción de esta información en las respuestas fisiológicas adecuadas para cada tipo de

célula (Bleecker y Kende, 2000). La expresión diferencial de genes se ha implicado en muchos sistemas de respuesta a etileno (Deikman, 1997). Los genes que codifican diversas proteínas contienen elementos promotores que son objeto de regulación por el etileno, como son las asociadas con el ablandamiento de la pared celular durante la maduración del fruto, las enzimas hidrolíticas que disuelven la pared celular durante la abscisión (desprendimiento de órganos), las proteínas inducidas por la defensa ante patógenos y las proteasas que se activan durante la senescencia de hojas (Bleecker y Patterson, 1997; Deikman, 1997).

1.13.5. Ácido abscísico

El ácido abscísico (ABA) regula procesos como la maduración y dormancia de las semillas, la apertura de estomas, la tasa de crecimiento en respuesta a estrés ambiental incluyendo la sequía, el frío y la salinidad. El ABA se sintetiza principalmente en los tejidos vasculares y es movilizado al tejido blanco, aunque también puede ser producido en el sitio en el que se utiliza (Nambara y Marion-Poll, 2005). El ABA actúa a través de una cadena de señalización con una gran cantidad de componentes que incluye factores de transcripción, proteínas de unión a RNA, cinasas y fosfatasa (Huang et al., 2007). Sin embargo, en el caso del ABA, no existe un modelo universal de su señalización, debido a que en los diferentes tipos celulares en los que éste es activo se manifiesta con distintos resultados fisiológicos (Wasilewska et al., 2008). La señalización propuesta para ABA incluye proteínas G, lipasas, fosfatasa y cinasas en los primeros eventos, seguida de la liberación de un segundo mensajero, entre los que se incluyen al inositol trifosfato (IP₃), al Ca²⁺ y al K⁺, que actúan en la regulación de la función estomática mediante fosforilación (Huang et al., 2007; Finkelstein et al., 2002).

En la mayoría de los tejidos vegetativos, los genes regulados por ABA están involucrados en respuestas a estrés biótico y su principal respuesta es la deshidratación celular. En semillas en proceso de maduración, los genes regulados por ABA incluyen aquellos necesarios para la síntesis de reservas y la adquisición de la tolerancia a la desecación (Finkelstein et al., 2002). En etapas iniciales de la embriogénesis, el ABA previene el aborto de las semillas y promueve el crecimiento

del embrión. En contraste, durante la fase tardía de la embriogénesis el ABA se incrementa y bloquea el crecimiento del embrión. Este compuesto es necesario para inducir la latencia de la semilla y la germinación es precedida por una disminución de los niveles de ABA (Nambara y Marion-Poll., 2005). Esta hormona se considera integradora de diferentes señales ambientales y una de las respuestas ante estos estímulos es el desarrollo de primordios de raíces laterales (De Smet et al., 2006).

1.14. Morfogénesis de la raíz

La raíz es un órgano especializado en la absorción de agua y nutrientes del suelo que, en el caso de *Arabidopsis*, es simple y accesible desde el punto de vista experimental. Se trata de un sistema radical típico de una dicotiledónea, dominado por una raíz primaria que se forma durante la embriogénesis. Los tejidos de la raíz primaria se generan a partir del meristemo radical y comprenden capas unicelulares concéntricas de epidermis, córtex, endodermis y periciclo, que rodean a los tejidos vasculares (Hardtke, 2006). La disposición regular de sus tejidos y células permite predecir el origen y destino de cada una de sus partes. Los linajes celulares se pueden reconocer fácilmente, ya que forman filas de células alineadas con el eje principal de la raíz como resultado de las divisiones transversales de la región meristemática (Schiefelbein et al., 1997).

La longitud de cada raíz depende de la actividad proliferativa del meristemo radicular. El proceso de diferenciación produce los distintos tipos celulares y los tejidos presentes en la raíz madura. Los procesos implicados en el desarrollo de la raíz se llevan a cabo en regiones específicas, por lo que se pueden distinguir varias regiones con características morfológicas particulares: la zona de división celular, la de elongación celular, la de diferenciación celular y la de maduración celular (López-Bucio et al., 2005) (Fig. 2).

El desarrollo post-embrionario de la raíz depende del meristemo radical. Las células madre del meristemo generan células que se encuentran en transición hacia el desarrollo, las cuales experimentan divisiones adicionales en el meristemo proximal y se diferencian en las distintas columnas celulares en la zona de transición

del meristemo que rodea el límite entre las células que se dividen y las que se expanden (Fig. 2). Para mantener el tamaño del meristemo, la tasa de diferenciación debe ser igual al ritmo de generación de células nuevas (Dello Iorio et al., 2008).

La formación de raíces laterales es importante para el desarrollo de la planta ya que permite la construcción de sistemas radicales ramificados (López-Bucio et al., 2005). En *Arabidopsis* las raíces laterales se originan en las células del periciclo opuestas a los polos del xilema (Taiz y Zeiger, 2006).

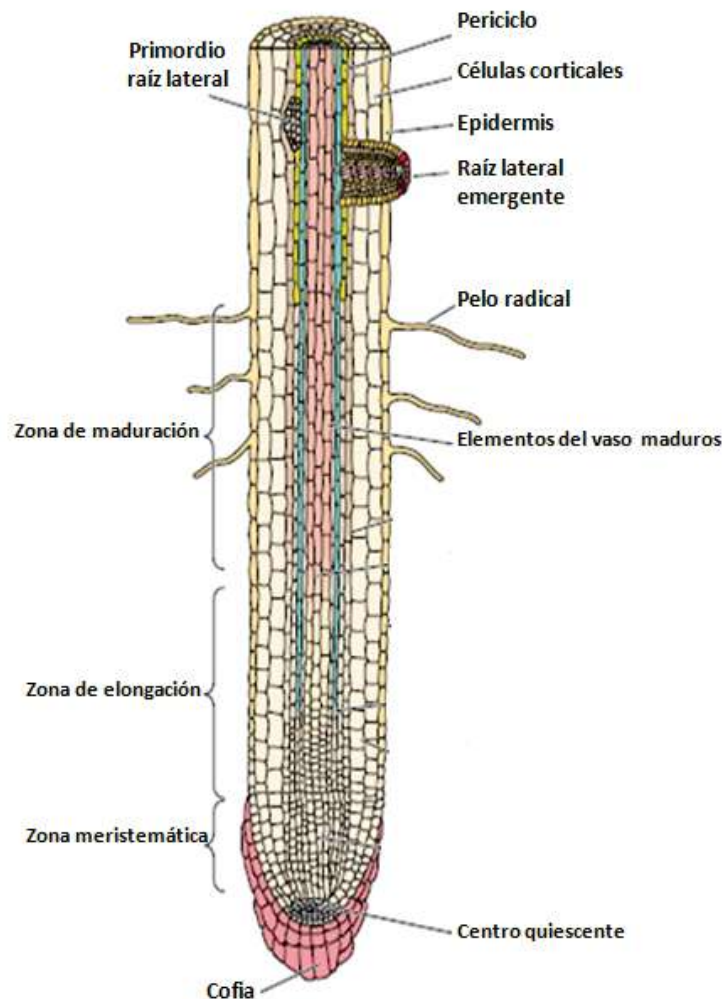


Figura 2. Estructura de la raíz primaria de *Arabidopsis*. Diagrama de una raíz primaria que muestra la cofia de la raíz, la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de diferenciación (Modificado de Taiz y Zeiger, 2006).

1.15. Morfogénesis de la hoja

Las hojas cumplen funciones específicas en la planta, principalmente como órganos fotosintéticos. También juegan un papel importante en la respiración, en las relaciones fuente/destino de carbohidratos, en relaciones hídricas y como sensores ambientales. La mayoría de las hojas tienen tres partes más o menos diferenciadas: una base, un tallo basal, conocido como el peciolo o raquis y una porción distal, conocida como la hoja o lámina, la cual es generalmente de color verde y plana (Van Lijsebettens y Clarke, 1998; Poethig, 1997).

Los eventos tempranos del desarrollo de la hoja se dividen en tres procesos principales: la iniciación del primordio, el establecimiento de la simetría dorsiventral y el desarrollo de un meristemo marginal (Tsukaya, 2002).

La formación de la hoja es el evento más importante en la morfogénesis del meristemo apical del tallo (SAM, por sus siglas en inglés *shoot apical meristem*), que implican los primeros estadios para formar un primordio (Tsukaya, 2002). Las hojas surgen a intervalos regulares y en posición previsible y espaciada, en la periferia del SAM. Son producidas por varias capas de células externas y emergen de la superficie del meristemo ya sea como protuberancias dorsalmente aplanadas o crestas. Las células meristemáticas pueden contribuir a la formación de diferentes primordios foliares dependiendo de su posición dentro del SAM. Una vez que el primordio emerge, éste se extiende lateralmente para reclutar células adicionales del SAM y puede crecer hasta rodear completamente al meristemo del tallo (Poethig, 1997) (Fig. 3).

El primordio de la hoja tiene una simetría radial. Después la simetría dorsiventral se establece por una diferencia en los patrones de división celular entre las células dorsales (adaxial) y ventrales (abaxial) lo que conduce a la formación de la lámina, con diferencias dorsiventrales que se manifiestan por la especialización celular del lado ventral y dorsal, como el desarrollo de los primeros tricomas en el extremo dorsal y por la formación de pequeñas estructuras (estípulas) en la base del lado dorsal que se degradan rápidamente y cuya función no es clara. Esta asimetría dorsiventral es característica de las hojas, es decir, el lado de la hoja hacia el tallo (el

dorsal o superficie adaxial) y la parte orientada lejos del tallo (la superficie ventral o abaxial) son morfológica y anatómicamente diferentes (Van Lijsebettens y Clarke, 1998; Poethig, 1997).

La epidermis de la lámina está compuesta de tres tipos de células con distinta morfología: células epidérmicas, los estomas y los tricomas, con patrones de distribución que varían entre la superficie adaxial y abaxial y entre las diferentes fases de desarrollo de la hoja (Van Lijsebettens y Clarke, 1998).

La expansión de la hoja está regulada por dos procesos de polarización independientes: uno que controla la expansión en la dirección de la anchura y el otro en la dirección de longitud y cada uno contribuye al crecimiento de la lámina en dos dimensiones. La actividad en la división celular ocurre de la base de la hoja a la punta y forma el eje proximal-distal. El crecimiento lateral (en dirección de anchura) se origina de la parte dorsal central (adaxial) del primordio hacia los márgenes de la hoja. La parte ventral del primordio no contribuye al crecimiento de la lámina, pero forma la nervadura (Van Lijsebettens y Clarke, 1998) (Fig. 3).

1.16. Nutrición vegetal

Las plantas son organismos cuyos requerimientos vitales son cubiertos por la luz, el CO₂, el agua, y el suministro de nutrientes minerales por el suelo. Únicamente ciertos elementos químicos son esenciales para las plantas. Un elemento esencial se define como aquel que es un componente intrínseco de la estructura o metabolismo del organismo y cuya ausencia causa severas anomalías en el crecimiento, desarrollo o reproducción (Taiz y Zeiger, 2006). Todos los nutrientes minerales tienen funciones básicas en el metabolismo y fisiología de las plantas, algunos son constituyentes de metabolitos y macromoléculas, incluyendo al nitrógeno (N), el fósforo (P), el boro (B), el azufre (S), otros son cofactores de enzimas, como el magnesio (Mg), el cobre (Cu), el zinc (Zn), el hierro (Fe), el cobalto (Co), el molibdeno (Mo) y el níquel (Ni). Adicionalmente, los nutrientes minerales pueden actuar como electrolitos como el potasio (K), o como segundos mensajeros en

cascadas de señalización, como el calcio (Ca). En muchos casos, un nutriente mineral puede tener varias funciones (Amtmann y Blatt, 2008).

Los elementos esenciales son usualmente clasificados como macronutrientes o micronutrientes, de acuerdo a su concentración relativa en el tejido de la planta. Los macronutrientes, son requeridos en grandes cantidades con relación a los micronutrientes e incluyen al N, K, S, P, Mg y Ca. Algunos micronutrientes son el Fe y el Zn (Taiz y Zeiger, 2006).

1.17. Transporte de macronutrientes

Las plantas poseen proteínas de transporte (transportadores) para la captación de los nutrientes y su movilización a los diferentes tejidos y compartimentos celulares, las cuales difieren entre sí no únicamente en su localización, sino también en su modo de activación, su especificidad y afinidad por el sustrato (Amtmann y Blatt, 2008). Aproximadamente el 5% del genoma de *Arabidopsis*, que comprende unos 1, 000 genes, codifica proteínas con función en transporte a través de membrana (Maathuis et al., 2003).

La regulación de los transportadores de nutrientes está estrechamente relacionada a las funciones del mineral transportado, pudiendo ser afectada por procesos metabólicos y osmóticos (Amtmann y Blatt, 2008). Casi todos los macronutrientes forman parte de macromoléculas como las proteínas (N y S), ácidos nucleicos (N y P), fosfolípidos (P) y la clorofila (Mg). El P y Mg tienen funciones adicionales en la conservación y conversión de la energía (Mg-ATP). De acuerdo con estas funciones, la regulación de los transportadores de N, P, S y Mg tienen el objetivo general de suministrar a la planta moléculas esenciales para la producción de biomasa y energía durante su crecimiento y desarrollo (Amtmann y Blatt, 2006).

El K y el Ca difieren en varios aspectos con otros macronutrientes. Estos no son metabolizados y permanecen en su forma elemental iónica. Además, poseen la peculiaridad de actuar como osmolitos, impulsando el crecimiento y manteniendo el contenido de agua de la planta (Blatt, 2000).

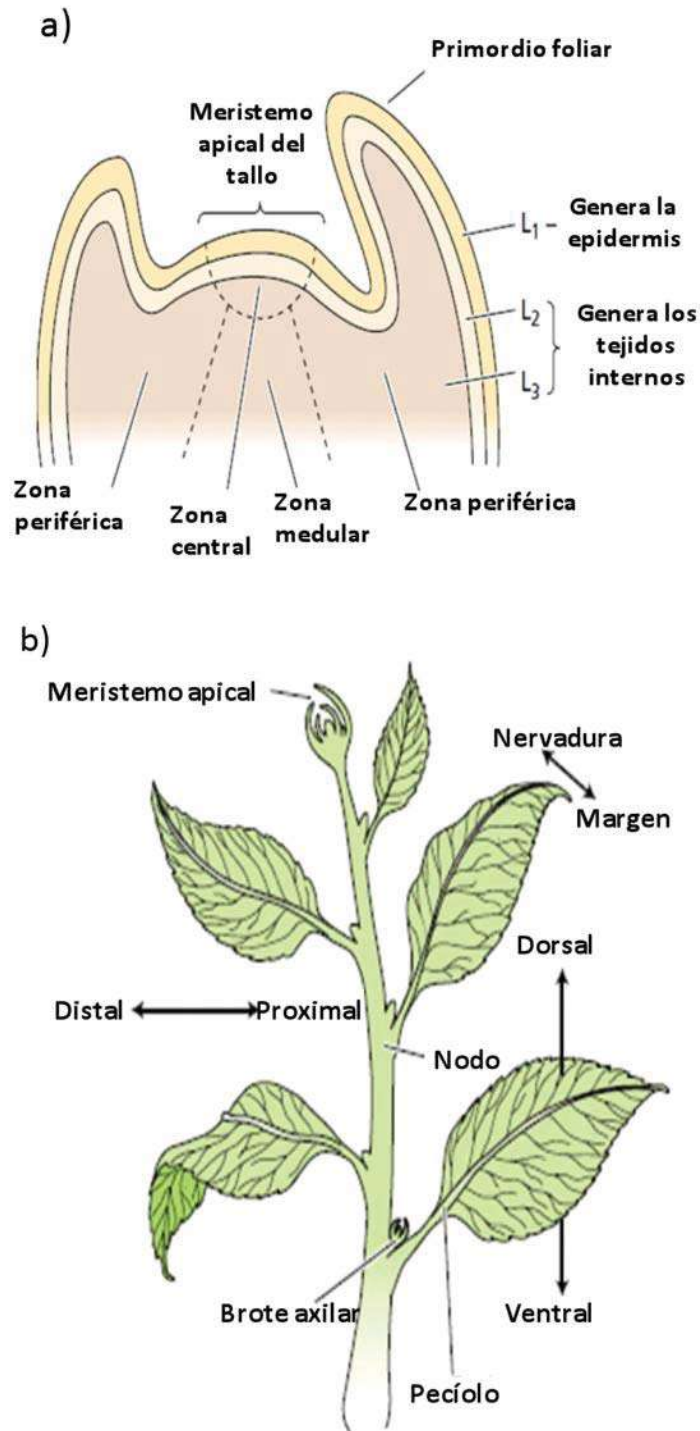


Figura 3. El origen de las hojas en el meristemo apical del tallo. a) Estructura del meristemo. b) Diagrama que muestra los distintos ejes de crecimiento (Modificado de Taiz y Zeiger, 2006).

1.17.1. Nitrógeno

El nitrógeno (N) es un nutriente mineral requerido en grandes cantidades y su disponibilidad es un factor limitante para el crecimiento y desarrollo vegetal (Kraiser et al., 2011). Las plantas adquieren N del suelo en su forma inorgánica, como amonio (NH_4^+) y nitrato (NO_3^-). La abundancia relativa de estos dos iones es muy variable y en gran medida depende de la velocidad de dos procesos microbianos: la mineralización y la nitrificación (Crawford y Forde, 2002).

Las plantas poseen diferentes sistemas de transporte del N para hacer frente a la disponibilidad heterogénea de este nutriente en el suelo. Se han descrito dos tipos de sistemas para la captación de nitrato (NO_3^-) y amonio (NH_4^+), incluyendo un sistema de transporte de baja afinidad (LATS), el cual opera a una alta concentración del nutriente (>1 mM) y un sistema de transporte de alta afinidad (HATS) que predomina en condiciones de deficiencia nutrimental. La modulación de la función HATS y LATS, en coordinación con cambios en los patrones de crecimiento y desarrollo, permiten a la planta hacer frente a la escasez eventual de N en el suelo (Kraiser et al., 2011). Se han identificado dos familias de transportadores, *NRT1* y *NRT2*. La familia de genes *NRT2*, codifica transportadores de NO_3^- de alta afinidad, mientras que *NRT1* codifica transportadores de baja afinidad, con excepción de *NRT1.1*, el cual es un transportador de afinidad dual involucrado en la captación de NO_3^- tanto de baja como de alta afinidad (Kraiser et al., 2011).

1.17.2. Fósforo

En el suelo, el P se encuentra en diferentes formas, como P orgánico y P inorgánico (Pi). Con frecuencia es un nutriente limitante debido a su baja disponibilidad y movilidad. El transporte de P a través de la membrana implica un gasto energético, debido a la concentración relativamente alta de éste en el citoplasma y al potencial negativo de membrana característico de las células. Existen dos sistemas de transporte de P, uno de alta afinidad, cuya actividad se induce en condiciones de deficiencia y uno de baja afinidad, que es constitutivo. Avances recientes en la biología molecular de transportadores de Pi de la membrana

plasmática y del tonoplasto confirman que las plantas tienen múltiples transportadores de Pi, entre los que se *Pht1*, *Pht2* y *Pht4;6* (Bucher et al., 2001; Cubero et al., 2009). La familia *Pht1* contiene transportadores de alta afinidad. Esta familia incluye 17 de los 18 genes de transportadores de Pi en plantas (Mudge et al., 2002). El gen *ARATH;Pht2.1* muestra baja afinidad y es el primer miembro de la familia *Pht2* que ha sido aislado, el cual se expresa principalmente en hojas (Daram et al., 1999). De la familia *Pht1*, al menos 12 genes se inducen en raíz en respuesta a la deficiencia de Pi, los cuales se expresan diferencialmente, mientras que algunos son fuertemente regulados por deficiencia de Pi, otros tienen expresión constitutiva (Mudge et al., 2002).

1.17.3. Azufre

El azufre es un elemento esencial para la célula, debido a que está presente en los aminoácidos cisteína, metionina y en muchas biomoléculas importantes implicadas en la estructura y actividad biológica de las proteínas (Davidian y Kopriva, 2010).

El azufre está disponible para las plantas principalmente en la forma de sulfato (SO_4^{2-}) (Leustek y Saito, 1999). Una vez que el SO_4^{2-} ingresa por las células de la raíz, éste se acumula transitoriamente en las vacuolas, o bien entra a la compleja ruta metabólica de reducción de SO_4^{2-} en los cloroplastos de las hojas. La coordinación del transporte de SO_4^{2-} del suelo a la raíz y a través de la planta requiere la existencia de mecanismos específicos de señalización que permiten controlar y regular a las proteínas involucradas en su captación y transporte, así como su asimilación (Davidian y Kopriva, 2010). Estas proteínas reguladoras se expresan en respuesta a las señales internas y externas de disponibilidad de SO_4^{2-} percibidas por la planta.

Los genes que codifican los transportadores de SO_4^{2-} se clasifican dentro de 5 sub-familias (SULTR1 a SULTR5) con base en la similitud de su secuencia. En *Arabidopsis*, se identificaron 14 miembros (Davidian y Kopriva, 2010). Los transportadores de alta afinidad se expresan exclusivamente en la raíz, mientras que los de baja afinidad se expresan constitutivamente. El nivel de transcrito de los genes

pertenecientes a los transportadores de alta afinidad se incrementa rápidamente ante la deficiencia de azufre, mientras que los de baja afinidad son insensibles o responden más lentamente a los cambios en el abastecimiento de SO_4^{2-} (Leustek y Saito, 1999).

1.17.4. Regulación de la expresión de los transportadores de iones

La abundancia de los transcritos de los transportadores de iones suele variar con la concentración de su sustrato en el medio de crecimiento. Mientras algunos transportadores se inducen por la disminución en la concentración del sustrato, otros se inducen por un incremento en la concentración del mismo, lo que muestra una diferencia fundamental en las rutas de señalización que permiten a las plantas adaptarse ante diferentes situaciones nutricionales que incluyen el agotamiento progresivo de los nutrientes minerales o su reabastecimiento después de un periodo de escasez en el suelo. En ambos casos, el resultado de los eventos reguladores son altos niveles de expresión de un transportador específico (Amtman y Blatt, 2006).

Varios estudios indican la participación de fitohormonas en la respuesta de las plantas a las limitaciones de nutrientes minerales. Contrariamente, las condiciones nutricionales de la planta influyen en la biosíntesis de las hormonas, lo que sugiere una fuerte interrelación entre la homeostasis nutricional y el estímulo hormonal (Rubio et al., 2009).

1.18. Disponibilidad de nutrientes minerales y respuestas adaptativas

La capacidad de las plantas para responder a la disponibilidad de nutrientes minerales es de fundamental importancia para su adaptación al ambiente. Nutrientes como el NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} y Fe actúan como señales cuya abundancia puede ser detectada por la raíz. Estas señales pueden activar cascadas de señalización que modifican la división celular y procesos de diferenciación que están mediadas por reguladores del crecimiento como las auxinas, las citocininas y el etileno (López-Bucio et al., 2003).

Además de la regulación de los sistemas de captación de nutrientes minerales, las plantas han desarrollado plasticidad en su respuesta a variaciones en

la concentración y distribución de los diferentes nutrientes. La disponibilidad de nutrientes minerales puede afectar el desarrollo radicular para facilitar su absorción por la raíz (López-Bucio et al., 2003). La comprensión de los mecanismos mediante los cuales las células perciben y responden a los cambios en el suministro de nutrientes sigue siendo un gran desafío en biología vegetal.

Una de las adaptaciones más notables para asegurar una adecuada adquisición de nutrientes, es la modulación de la arquitectura del sistema radical en respuesta al suministro de N, P y S. La deficiencia de N inhibe rápidamente el crecimiento de la planta, produce clorosis en las hojas e induce la acumulación de antocianinas. El NO_3^- , se encuentra distribuido de una manera desigual en el suelo, por lo que muchas especies pueden adaptarse a esta situación mediante la proliferación de sus raíces preferentemente dentro de los parches ricos en nutrientes. Las plantas de *Arabidopsis* crecidas en un medio deficiente de NO_3^- , mostraron una inducción en la elongación de raíces laterales en respuesta a la exposición de una sección de la raíz primaria a altas concentraciones de NO_3^- (Zhang y Forde, 1998). Contrariamente, un efecto inhibitorio global se presenta en altas concentraciones de NO_3^- en todo el sistema radicular. Algunos de los componentes de la ruta de señalización que regula la arquitectura de la raíz en respuesta a la disponibilidad de nutrientes se han identificado e incluyen factores de transcripción de la familia MADs box (López-Bucio et al., 2003).

Cuando el suministro de Pi es limitado, las plantas muestran un retraso en el crecimiento y una coloración verde oscuro en las hojas, las cuales pueden presentar malformaciones y contener pequeños puntos de tejido muerto llamados puntos necróticos (Taiz y Zeiger, 2006). En cuanto al desarrollo del sistema radical, éste cambia para potenciar la captación de PO_4^{3-} mediante alteraciones en los patrones de ramificación, la longitud total de la raíz, la elongación de los pelos radicales y la formación de raíces laterales. Las raíces laterales y los pelos radicales ayudan a la adquisición de PO_4^{3-} mediante la exploración de un volumen mayor de suelo al aumentar la superficie de exploración de la raíz (López-Bucio et al., 2003).

En algunas especies, se presenta la formación de cúmulos de raíces proteoides en respuesta a limitación de PO_4^{3-} (Schachtman et al., 1998). Este efecto

se estudió en *Lupinus albus* L., cuyas raíces normales agotan su crecimiento después de varios días en escasez de PO_4^{3-} y forman raíces proteoides que se caracterizan por tener pelos radicales de gran tamaño (López-Bucio et al., 2003). Algunos de estos efectos se observan también en plantas de *Arabidopsis* sometidas a deficiencia de Pi, las cuales muestran una alta densidad de raíces laterales creciendo muy cerca unas de otras y que están cubiertas densamente por pelos radicales (López-Bucio et al., 2003).

Las plantas de *Arabidopsis* también desarrollan un sistema radical ramificado bajo condiciones limitantes de SO_4^{2-} . En plántulas creciendo en un medio con un suministro adecuado de SO_4^{2-} , la raíz primaria se alarga y las raíces laterales se desarrollan a cierta distancia de la punta de la raíz. En contraste, en plantas deficientes a SO_4^{2-} , las raíces laterales se forman cerca de la punta de la raíz y a una densidad incrementada. El aumento en el crecimiento del sistema radicular bajo condiciones limitantes de SO_4^{2-} se relaciona con la activación transcripcional del gen NITRILASA 3 (*NIT3*). Las nitrilasas son enzimas capaces de convertir el indol-3-acetonitrilo a ácido indol-3-acético. Las plantas deficientes en SO_4^{2-} también tienen incrementado el nivel de auxinas, sugiriendo la participación directa de *NIT3* en la síntesis de auxinas y en la ramificación de las raíces (Kutz et al., 2002).

1.19. Control de la expresión génica

El comportamiento de una célula está determinado no únicamente por los genes que heredan, sino también por cuáles de estos genes se expresan en un momento determinado. En la transcripción se produce el RNA mensajero, que en eucariontes es modificado para convertir el transcrito primario en un transcrito maduro y funcional, que después es leído en los ribosomas para llevar a cabo la síntesis de proteínas. Las células eucariontes contienen múltiples y diferentes RNA polimerasas, que transcriben distintas clases de genes, las cuales necesitan interactuar con una variedad de proteínas adicionales para iniciar específicamente la transcripción. En la expresión génica, algunos RNAs no codifican para proteínas y tienen funciones como RNA transportadores de aminoácidos, RNAs que forman parte estructural de ribosomas y RNAs que participan en la regulación de la

expresión de otros genes (microRNAs)(Lewin, 2008). La regulación de la expresión génica permite a las células adaptarse a cambios en su ambiente y es responsable de las distintas actividades de las múltiples tipos de células que comprenden a los organismos multicelulares (Cooper y Hausman, 2006).

El control de la expresión génica se define como el conjunto de mecanismos que determinan que en cada célula sólo se exprese específicamente una selección de genes hasta generar proteínas. La vía que conduce desde el DNA hasta proteínas consiste de muchas etapas y en principio todas ellas se pueden regular. Así, las células pueden controlar la expresión génica en los siguientes pasos: (1) regulando cuándo y con qué frecuencia se transcribe un gen concreto (control transcripcional), (2) controlando el modo de maduración o procesamiento de los transcritos primarios de RNA (control del procesamiento de RNA), (3) seleccionando los mRNA maduros del núcleo que van a ser exportados al citosol y dónde van a localizarse en el citosol (control del transporte y localización del RNA), (4) seleccionando los mRNA citoplasmáticos que van a ser traducidos por ribosomas (control traduccional), (5) desestabilizando selectivamente algunas moléculas del mRNA citoplasmático (control de la degradación de los mRNA), o (6) activando, inactivando, degradando o ubicando de modo selectivo las proteínas ya sintetizadas (control de la actividad proteica) (Alberts et al., 2002). Además, en las últimas dos décadas se ha establecido que el empaquetamiento del DNA dentro de la cromatina y su modificación por metilación confiere niveles adicionales de regulación de la expresión de genes eucariontes, proceso conocido como epigenética (Lewin, 2008).

La expresión de genes en eucariontes está controlada principalmente a nivel de la iniciación de la transcripción, por lo que un entendimiento de los cambios en los niveles de transcritos permite obtener la información global más importante sobre la expresión génica en un organismo, debido a factores biológicos o ambientales (Alberts et al., 2002).

1.20. Microarreglos de DNA

La genética y la ingeniería genética proporcionan potentes herramientas para el estudio de la función biológica tanto en células como en organismos. El estudio de

la expresión de genes a escala genómica es una de las tecnologías que pueden utilizarse para examinar simultáneamente la expresión de miles de genes, proporcionando panorámicas detalladas de los patrones dinámicos de expresión génica que subyacen a procesos celulares complejos (Alberts et al., 2002).

La detección de secuencias específicas en una muestra compleja mediante el marcado de un fragmento conocido de DNA se remonta a la técnica del Southern blot y posteriormente se adaptó a moléculas específicas de RNA (Northern blot). Estos métodos permitieron el análisis de la expresión de un solo gen o muy pocos genes y proporcionaron las bases conceptuales para la tecnología de los microarreglos de DNA, en los que el análisis de la expresión transcripcional puede hacerse con genomas completos (Russell et al., 2008). En los microarreglos de DNA las secuencias representativas de cada gen se encuentran unidas a soportes sólidos o laminillas. El análisis involucra una hibridación comparativa, en donde dos muestras de RNA provenientes de dos condiciones experimentales, son marcadas de manera independiente con diferentes reporteros fluorescentes: ambas muestras marcadas son después combinadas e hibridadas juntas en el mismo microarreglo, lo cual permite un análisis comparativo entre las dos condiciones experimentales. Los datos obtenidos del análisis son procesados y se aplican diferentes herramientas estadísticas y analíticas para identificar cambios en la expresión global de genes (Gibson y Muse, 2004; Russell et al., 2008).

1.21. El genoma de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh

Arabidopsis es un modelo biológico importante para la identificación de genes y la determinación de sus funciones con base en el conocimiento y análisis de su genoma. La secuencia del genoma de *Arabidopsis* provee los medios para entender las diferencias entre plantas y otros eucariontes y los fundamentos para la caracterización funcional a detalle de los genes de las plantas y sus respuestas al ambiente. La estructura del genoma de *Arabidopsis* revela que ha ocurrido una duplicación del genoma completo, seguida por una subsecuente pérdida de genes y duplicación extensiva de genes locales, dando como resultado un genoma dinámico, enriquecido por la transferencia lateral de genes de cianobacterias. El genoma de

Arabidopsis contiene alrededor de 25, 000 genes codificando 11, 000 familias de proteínas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000).

A pesar de las dimensiones pequeñas de su genoma (125 millones de pb), en comparación con otras plantas como el arroz con más de 400 millones de pb y el maíz con más de 3, 000 millones de pb, *Arabidopsis* presenta las características típicas de otras angiospermas en lo referente a morfología, anatomía, crecimiento, desarrollo y respuestas al ambiente. Por esta razón, debe contar con el mismo número de genes esenciales que cualquier otra de las 250, 000 especies de plantas con flores que han aparecido en el planeta en los últimos 150 millones de años. Por lo tanto, se considera que a partir del estudio de este organismo se pueden obtener conclusiones extrapolables a la mayor parte de las especies vegetales (Meyerowitz, 1994).

1.22. Estudios de expresión global de genes

El estudio del perfil transcripcional de células del centro quiescente en la raíz de *Arabidopsis* ha permitido entender los mecanismos moleculares que determinan las propiedades de las células madre en el meristemo de la raíz (Nawy et al., 2005). También se han realizado estudios con microarreglos en plantas de maíz (Calderón-Vázquez et al., 2008), con el fin de conocer las adaptaciones moleculares a la deficiencia de Pi. En este último estudio usaron un genotipo de maíz tolerante a la deficiencia de Pi e identificaron genes involucrados en procesos bioquímicos, afectados temporalmente por el estrés nutricional y un grupo de factores de transcripción regulados diferencialmente por la disponibilidad del nutriente.

1.22.1. Respuesta a nutrientes

Un análisis del perfil transcripcional de genes sensibles a la deficiencia de SO_4^{2-} en *Arabidopsis*, reveló los efectos globales de la nutrición de SO_4^{2-} en múltiples rutas metabólicas. Se analizó el transcriptoma de plantas silvestres sometidas a deficiencia de SO_4^{2-} y de la mutante *se1-10*, la cual presenta una disfunción en el transportador *SULTR1;2*. El agrupamiento jerárquico de los genes sensibles a la deficiencia de SO_4^{2-} en plantas silvestres y en la mutante, indicaron que la captación y

la asimilación de SO_4^{2-} inducen su expresión por la deficiencia del nutriente. El perfil de expresión de los genes mostró la inducción de genes que pueden disminuir el daño oxidativo y la formación de especies reactivas de oxígeno (Maruyama-Nakashita et al., 2003).

Otro nutriente cuya deficiencia ha sido estudiada en plantas de *Arabidopsis* es el fósforo. Los cambios en la morfología de la planta y algunos procesos bioquímicos están asociados con la deficiencia de Pi. En un análisis de la expresión global de genes, se reveló una coordinada inducción y represión de 612 y 254 genes sensibles a P, respectivamente. La clasificación de algunos de estos genes indica su participación en varias rutas metabólicas, como el transporte de iones, la transducción de señales, la regulación transcripcional y otros procesos relacionados al crecimiento y desarrollo vegetal (Misson et al., 2005).

1.22.2. Respuesta a metales pesados

Para estudiar los efectos del cadmio (Cd) en *Arabidopsis* a nivel molecular, se realizó un análisis de la respuesta transcripcional en base a la concentración y el tiempo de exposición a este metal. Se establecieron perfiles de respuesta, en los que se demostró la existencia de una red que modula diferencialmente la expresión de genes involucrados en la asimilación-reducción del S y el metabolismo del glutatión. En conjunto, los resultados sugieren que para hacer frente a los efectos del Cd, las plantas activan la ruta de asimilación de SO_4^{2-} , mediante el incremento en la transcripción de genes implicados en la síntesis de glutatión y para la biosíntesis de fitoquelatinas (PC). El primer paso de la ruta de asimilación de S es la entrada de SO_4^{2-} por las raíces y su distribución a los diferentes órganos. Interesantemente, entre los 14 transportadores de SO_4^{2-} identificados en *Arabidopsis*, el nivel de transcripción de seis de ellos se modificó en respuesta a Cd. En conjunto, todos estos resultados sugieren que el incremento en la entrada de SO_4^{2-} inducida por Cd involucra una regulación transcripcional de los genes que codifican transportadores de SO_4^{2-} (Herbette et al., 2006).

El arsénico (As) en su forma química $[\text{As}(\text{V}); \text{AsO}_4^{3-}]$, tiene una gran similitud química y estructural con el PO_4^{3-} . El análisis transcripcional en *Arabidopsis* en

respuesta a As, mostró la represión de numerosos genes que se inducen por la escasez de PO_4^{3-} . Los genes relacionados a antioxidantes se regularon diferencialmente, con inducción de los genes que codifican a la superóxido dismutasa (SOD) Cu/Zn, así como una chaperona. Por otro lado, la SOD Fe, fue fuertemente reprimida en respuesta a este estrés, así como varios factores de transcripción. Los genes involucrados en la asimilación y metabolismo del SO_4^{2-} fueron inducidos. Estas observaciones se confirmaron por ensayos de actividad de SOD, cuyos niveles se incrementaron (Abercrombie et al., 2008).

II. JUSTIFICACIÓN

Los cambios fenotípicos observados con anterioridad en *Arabidopsis* en respuesta a tratamientos con Cr, sugieren que se afectan varios procesos a nivel genético. Además, se sabe que el Cr entra a la célula por un transporte activo, aunque se desconoce el mecanismo específico involucrado y cómo repercute éste en la nutrición mineral por NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . Para generar información sobre estos procesos, el análisis de la expresión global de genes en *Arabidopsis* en respuesta al Cr(VI), se presenta como una excelente alternativa que se puede complementar con estudios sobre la interacción del Cr con NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} en bioensayos *in vitro* evaluando el crecimiento de la planta.

III. HIPÓTESIS

El Cr afecta a nivel transcripcional la expresión de genes implicados en la captación de nutrientes minerales y en la adaptación al estrés en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar los efectos del Cr en la expresión global de genes en *Arabidopsis* y su relación con la disponibilidad de nutrientes y adaptación al estrés.

4.2. Objetivos particulares

- Caracterizar los efectos del Cr(VI) sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de *Arabidopsis*.
- Determinar los cambios en la expresión global de genes de *Arabidopsis* en respuesta a Cr(VI).
- Relacionar los cambios de expresión global con rutas específicas de detoxificación de metales, transporte de nutrientes y adaptación al estrés.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico y condiciones de crecimiento

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia 0 (Col-0) y las líneas transgénicas *CyCB1::uidA* (Colón-Carmona et al., 1999), que expresa el promotor del gen que codifica la ciclina mitótica de *Arabidopsis* CYCB1;1 fusionado al gen *uidA*, *AtPT1::uidA* (Karthikeyan et al., 2002), que contiene el promotor del gen que codifica el transportador de fosfato de baja afinidad *AtPT1*, fusionado al gen *uidA* y *AtPT2::uidA*, que contiene el promotor del gen que codifica el transportador de fosfato de alta afinidad (Karthikeyan et al., 2002). Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) por 5 min. y cloro al 20% por 7 min. Posteriormente, se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril y se trataron en un periodo de escarificación en la oscuridad a 4°C, durante 48 h en agua destilada estéril. Las semillas se germinaron y crecieron en cajas de Petri con el medio de cultivo MS 0.2x (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 0.6% y agar para plantas al 1% (w/v) (Phytotechnology laboratories A111).

Para evaluar el efecto del Cr en *Arabidopsis*, se prepararon medios MS 0.2x suplementados con diferentes concentraciones de cromato ($K_2CrO_4^{2-}$) o dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7^{2-}$) en un rango de concentraciones de 0 a 200 μ M, para establecer las condiciones estimulantes e inhibitorias sobre el crecimiento. Para evaluar el efecto del Cr en la competencia por nutrientes se prepararon medios MS 0.2x suplementados con diferentes concentraciones de nutrientes como fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4), sulfato de potasio (K_2SO_4) y nitrato de potasio (KNO_3) en las concentraciones 1, 2, 3, 4 y 5 mM, adicionados con o sin 140 μ M de $K_2CrO_4^{2-}$.

Para el análisis de los microarreglos, se prepararon medios MS 0.2x suplementados con dos diferentes concentraciones 20 y 140 μ M $K_2CrO_4^{2-}$, se sembraron 40 semillas de *A. thaliana* (Col-0) por tratamiento y se crecieron por 13 días para realizar la extracción de RNA. Las plantas se germinaron y crecieron en una cámara de crecimiento (Percival AR95L), con un fotoperiodo de 18 h luz y 6 h de oscuridad, una intensidad de luz de 100 μ mol $m^{-2}s^{-1}$ y una temperatura de 22 °C. Las cajas de Petri se colocaron en una posición vertical dentro de la cámara de cultivo

para favorecer el crecimiento de las raíces sobre la superficie del medio y cuantificar la longitud de la raíz primaria.

5.2. Cuantificación de biomasa y análisis estadísticos

El crecimiento de la raíz primaria se registró usando una regla. El número de raíces laterales (RL) se determinó por conteo de las RL presentes en la raíz primaria de la punta de la raíz a la zona de transición del tallo. Para todos los experimentos, los datos globales se analizaron estadísticamente en el programa SPSS10. Para evaluar las diferencias en la respuesta en crecimiento y desarrollo de la raíz y peso fresco de follaje de las plantas silvestres y las líneas transgénicas, se usó un análisis univariado y multivariado con la prueba de significancia de Tukey. Las plantas se cosecharon a los 12 y 14 días para cuantificar la biomasa. Se determinó el peso fresco del sistema radicular y del follaje con una balanza analítica (Ohaus® New Jersey, USA), con una precisión de 0.0001 g.

5.3. Análisis histoquímico de la actividad de GUS

Las plantas transgénicas con el gen reportero *uidA* (Jefferson et al., 1987) se tiñeron en 0.1% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β D-glucurónido en buffer de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1M, pH 7), con 2 mM de ferrocianuro de potasio y 2 mM de ferricianuro de potasio, por 12 horas a 37 °C. Las plantas se clarificaron y fijaron de acuerdo a Malamy y Benfey (1997). Las raíces así procesadas se cubrieron con láminas de vidrio y se sellaron con barniz de uñas comercial.

5.4. Microscopía

El sistema radicular de *Arabidopsis* se analizó con un microscopio estereoscópico (MZ6; Leica Microsystems). El meristemo de la raíz primaria se visualizó en preparaciones semipermanentes de las raíces clareadas, usando un microscopio compuesto (Zeiss Axiostar Plus; Carl Zeiss) a un aumento de 400X y 1000X. Las imágenes se capturaron con una cámara digital Cyber-shot DSC-S75 (Sony Electronics) adaptada al microscopio y se procesaron con el software Axio Vision 4AC.

5.5. Aislamiento de RNA, marcaje, hibridación y procesamiento de imágenes

El RNA total se aisló de plantas de *Arabidopsis* de 13 días, usando el reactivo Trizol (Invitrogen) y se repurificó con el kit de RNeasy (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA total se marcó de acuerdo al protocolo recomendado por www.maizearray.org. Para cada tratamiento con Cr (20 y 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$) y control sin Cr, se usaron cuatro réplicas biológicas para la síntesis de la sonda. Para cada muestra se amplificaron 1.5 μg de RNA total en presencia de aminoalil- dUTP (Ambion), usando el kit de Aminoalil Mensaje Amp II (Ambion). Las sondas de RNA amplificadas se marcaron con colorantes fluorescentes Cy3 y Cy5 (Amersham). Las sondas marcadas con colorantes fluorescentes se purificaron con columnas RNeasy (Qiagen). Para la hibridación, las sondas se mezclaron y se resuspendieron en la solución de hibridación (50% formamida, solución saturada de citrato (SSC) 5X (500 mM NaCl, 50 mM citrato de sodio pH 7, duodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1%, 0.4 μg μl RNAt-1, y 0.2 μg μl -1 DNA de espermatozoos de salmón), durante 14 h. Las láminas se lavaron durante 5 min. en cada una de las siguientes soluciones: (i) 2X SSC, 0.1% SDS/42°C, (ii) 0.1x SSC / RT, y dos lavados finales con 0.05X SSC a temperatura ambiente.

5.6. Diseño experimental y plataforma del microarreglo

El diseño permitió contrastar la expresión de genes entre plantas de *Arabidopsis* sometidas a 20 y 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$. Se obtuvieron cuatro réplicas biológicas al mezclar al menos 50 plantas obtenidas al azar. Este experimento implicó un total de ocho grupos de hibridaciones con las laminillas, incluyendo las comparaciones de intercambio directo y tinte. Se utilizaron los microarreglos de oligonucleótidos de *Arabidopsis* (MOA) <http://ag.arizona.edu/microarray/>, que contienen cerca de 32,000 puntos individuales con todos los genes de *Arabidopsis* identificados a la fecha.

5.7. Normalización y análisis de datos

Los datos de las 8 láminas se importaron en el software R 2.2.1 del (<http://www.R-project.org>) y se llevó a cabo una corrección de fondo, utilizando el

método de análisis multichip (RMA) (Irizarry et al., 2003). La normalización de la intensidades de la señal corregida dentro de las laminillas se realizó utilizando el método "printtploess" (Yang et al., 2002) utilizando el paquete Limma (Smyth et al., 2003); www.bioconductor.org). Los niveles de significancia (valor p) se ajustaron por el método de tasas de falsos descubrimientos (FDR) (Benjamini y Hochberg, 1995). Con base en estos análisis estadísticos, los puntos con las pruebas con un FDR inferior o igual al 5% y con cambios en la intensidad de la señal entre el 20 o 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ y el control, de 2.0 veces o más, se consideraron como expresados diferencialmente.

5.8. Clasificación funcional de los genes diferenciales

Los genes regulados por $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ se clasificaron en categorías funcionales de acuerdo con los criterios de dos bases de datos: *MAPMAN* del *Max Planck Institute* (<http://mapman.mpimp-golm.mpg.de/>) y *Gene Ontology* del *The Arabidopsis Information Resource* (<http://arabidopsis.org>).

VI. RESULTADOS

6.1. Efectos del cromo sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de *Arabidopsis*

Para evaluar el efecto del Cr, las plantas de *Arabidopsis* fueron germinadas y crecidas en medios MS 0.2x suplementados con $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ y se analizó el crecimiento de la raíz primaria a los 10 días después de la germinación (d.a.g.). Encontramos que en concentraciones de 20 y 40 μM se observa un efecto estimulador del crecimiento en la longitud de la raíz primaria, además de un aumento significativo del peso fresco de la raíz y del follaje en comparación con el control (Fig. 4). Tal efecto del $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ en las plantas lo denominamos como moderado. Por otra parte, las concentraciones superiores a 60 μM mostraron un efecto dosis dependiente en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y una disminución en el peso fresco, estos efectos los denominamos como inhibitorios (Fig. 4).

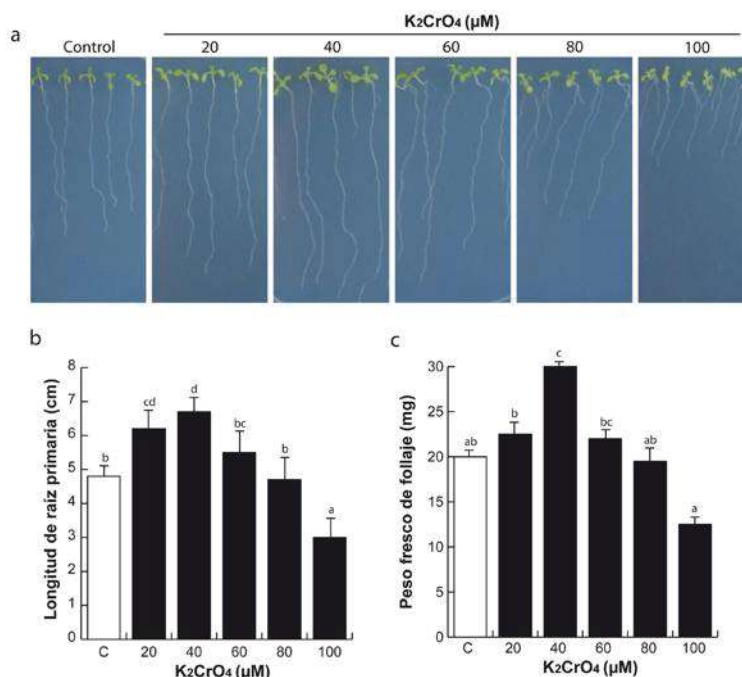


Figura 4. Efecto del cromato sobre el crecimiento de *Arabidopsis*. Las plantas de *Arabidopsis* se germinaron y crecieron en medio MS 0.2x suplementado con diferentes concentraciones de cromato de potasio. a) Imágenes representativas del crecimiento. b) Longitud de la raíz primaria. c) Peso fresco de follaje. Los datos muestran el promedio $\pm$ desviación estándar. Las diferentes letras indican la diferencia estadística con una $P < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces con resultados similares.

6.2. Efecto del cromo sobre la expresión de *CyCB1::uidA*

Para analizar los cambios en la actividad mitótica en el meristemo de la raíz primaria de *Arabidopsis* utilizamos plantas transgénicas que expresan el marcador *CyCB1::uidA* (Colón-Carmona et al., 1999). Las plantas de esta línea se germinaron y crecieron en medio MS 0.2x suplementados con distintas concentraciones de $K_2CrO_4^{2-}$ en un rango de 0 a 80 μM durante 10 días y posteriormente se analizó la actividad de la β -glucuronidasa. En concentraciones de 20 a 60 μM , se observó la actividad mitótica en el meristemo de la raíz primaria (Fig. 5). Sin embargo, el efecto inhibitorio del crecimiento de la raíz primaria en concentraciones mayores de 80 μM de $K_2CrO_4^{2-}$ corresponde con una disminución en la actividad mitótica en el meristemo y un acelerado proceso de diferenciación celular, caracterizado por la presencia de pelos radicales cercanos al ápice de la raíz primaria (Fig. 5).

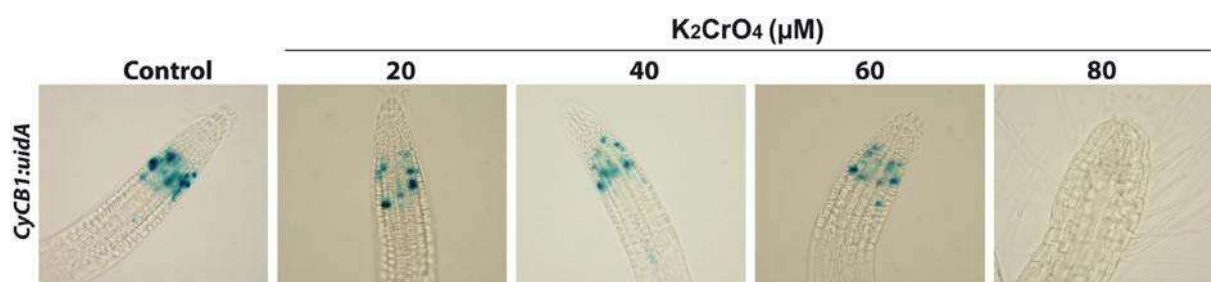


Figura 5. Efecto del cromo en la expresión del marcador de la división celular *CyCB1::uidA*. Las plantas de *Arabidopsis CyCB1::uidA* se germinaron y crecieron en medio MS 0.2x suplementado con cromo por 10 d. Las plantas fueron procesadas para la actividad de la β -glucuronidasa, las fotografías son imágenes representativas de al menos 10 plantas analizadas.

6.3. Efecto de los nutrientes en la respuesta de la raíz al cromo

Para determinar la interacción de los nutrientes en la respuesta a Cr, se analizaron los efectos del CrO_4^{2-} en combinación con nitrato de potasio (KNO_3), sulfato de potasio (K_2SO_4) y fosfato de potasio (K_2HPO_4). Para esto, las plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x suplementado con o sin una concentración inhibitoria de 140 μM $K_2CrO_4^{2-}$ y 3 o 5 mM de NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . El efecto inhibitorio del crecimiento de la raíz primaria, así como la disminución en biomasa y la clorosis del follaje a causa del CrO_4^{2-} , se

revertieron en gran medida en los tratamientos suplementados con PO_4^{3-} y SO_4^{2-} pero no con NO_3^- . El fenotipo de las plantas de *Arabidopsis* en el tratamiento con CrO_4^{2-} y suplementadas con los nutrientes que sí restauraron el crecimiento, mostraron una raíz primaria de longitud similar al control sin Cr y no hubo clorosis en las hojas, mostrando una mejor recuperación del efecto del Cr cuando las plantas recibieron un suministro de PO_4^{3-} (Fig. 6).

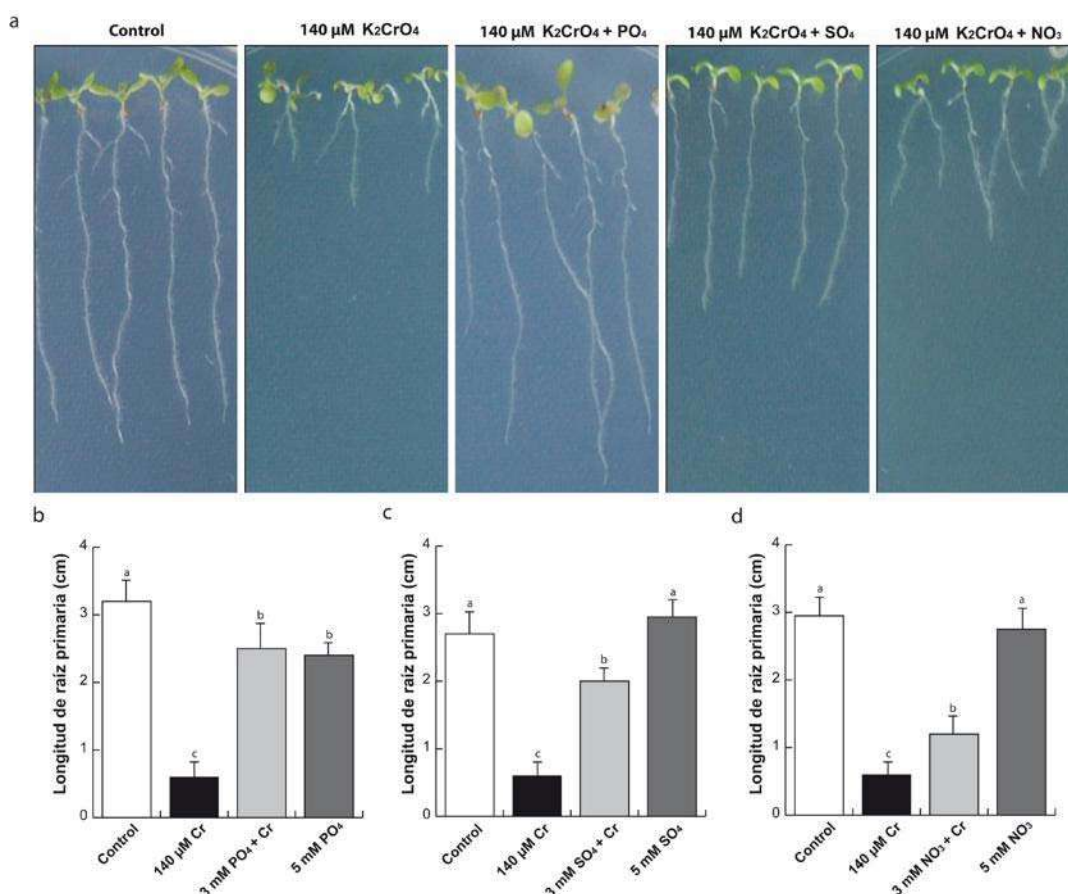


Figura 6. Efecto de los nutrientes en la restauración del crecimiento de la raíz primaria afectado por el cromo. Las plantas de *Arabidopsis* se germinaron y crecieron en medio MS 0.2x suplementado con diferentes concentraciones de fosfato, sulfato o nitrato y con o sin cromato. Las plantas se crecieron por 10 días después de la germinación. a) Imágenes representativas del crecimiento de las plantas. b) Longitud de la raíz primaria de plantas crecidas en medios suplementados con fosfato con y sin cromato. c) Longitud de la raíz de plantas suplementados con sulfato con y sin cromato. d) Longitud de la raíz de plantas suplementadas con nitrato con o sin cromato. Los datos muestran la media $\pm$ desviación estándar de 30 plantas analizadas. Las diferentes letras indican la diferencia estadística con una $P < 0.05$.

6.4. Efecto del cromo en la expresión de los transportadores de fosfato *AtPT1* y *AtPT2*

Las líneas transformantes *AtPT1::uidA* y *AtPT2::uidA* de *Arabidopsis*, reportan la expresión de genes que codifican transportadores de Pi de baja y alta afinidad, respectivamente (Karthikeyan, et al., 2002; Mudge et al., 2002). El patrón de expresión de GUS para ambos genes, en plantas sometidas a Cr(VI): $K_2CrO_4^{2-}$ y $K_2Cr_2O_7^{2-}$ en diferentes concentraciones (0 a 100 μM), mostró una expresión moderada para *AtPT1* en ambos tratamientos de Cr(VI), siendo ligeramente más intensa a mayores concentraciones de ambos compuestos (Fig. 7). La expresión de GUS para *AtPT2* no se presenta en concentraciones bajas de CrO_4^{2-} , comenzando a ser evidente en medios con 80 μM , con expresión principalmente en la raíz. En medios con $Cr_2O_7^{2-}$, la tinción es más intensa en concentraciones más bajas. En concentraciones de 70 μM $K_2Cr_2O_7^{2-}$ y mayores, la expresión de GUS para *AtPT2* es muy fuerte en la raíz y el follaje (Fig. 8).

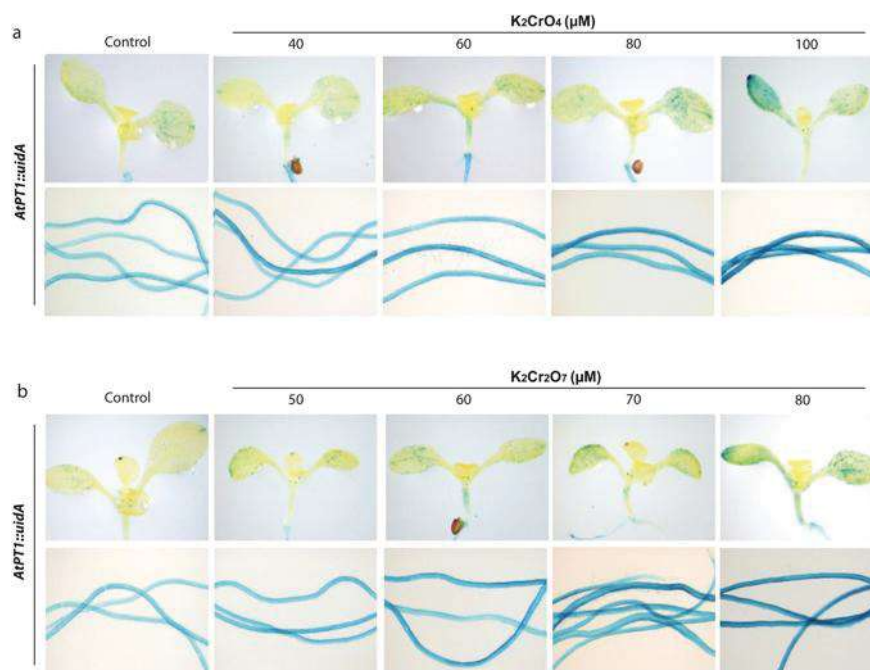


Figura 7. Efecto del cromato y dicromato de potasio en la expresión de *AtPT1::uidA*. a) Efecto del cromato en la expresión de *AtPT1::uidA*. b) Efecto del dicromato en la expresión de *AtPT1::uidA*. Las plantas se procesaron para la actividad de la β -glucuronidasa a los 10 días después de la germinación en medio con las concentraciones indicadas de Cr. Las fotografías son imágenes representativas de 10 plantas analizadas.

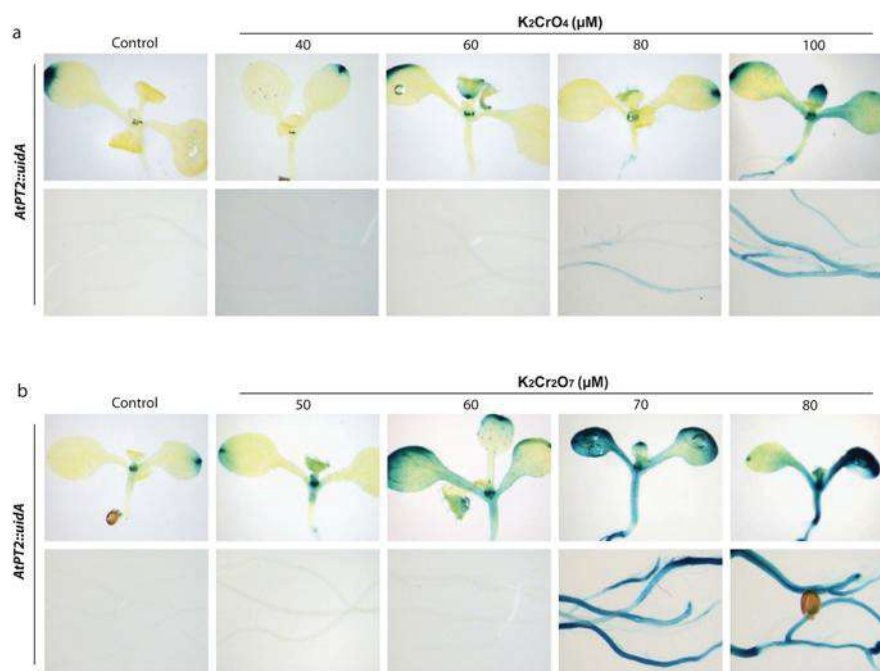


Figura 8. Expresión de *AtPT2::uidA* en medios con cromato y dicromato. Las plantas de *Arabidopsis* que expresan el marcador *AtPT2::uidA* se germinaron y crecieron en medio MS 0.2x suplementadas con diferentes concentraciones de Cr(VI) por 10 días. a) Efecto del cromato en la expresión de *AtPT2::uidA*. b) Efecto del dicromato en la expresión de *AtPT2::uidA*. Las fotografías muestran imágenes representativas de al menos 10 plantas analizadas.

La activación transcripcional del gen *AtPT2* es rápida y específica en respuesta a cambios en la disponibilidad de PO_4^{3-} y se ha reportado inducción en la expresión de este gen durante la deficiencia del nutriente (Karthikeyan et al., 2002). Estudios del transporte de PO_4^{3-} han demostrado que la actividad de los transportadores de alta afinidad es inducible durante la deficiencia de PO_4^{3-} , mientras que los de baja afinidad permanecen constitutivos (Karthikeyan et al., 2002). Con base en lo anterior, se decidió analizar la interacción del Cr(VI) con los nutrientes que revirtieron los efectos del $Cr_2O_7^{2-}$ en el crecimiento de la raíz, el PO_4^{3-} y SO_4^{2-} , en esta ocasión utilizando la línea transformante *AtPT2::uidA*. Se utilizaron medios con una concentración inhibitoria de $K_2CrO_4^{2-}$ (140 μM), en combinación con 3 mM de cada nutriente. La tinción de GUS en plantas crecidas en el tratamiento con CrO_4^{2-} y sin nutrientes añadidos es muy evidente, con un patrón de expresión en raíz primaria y follaje, pero en plantas crecidas en medios con SO_4^{2-} sólo hay una ligera expresión

en algunas partes de la planta como la zona de diferenciación hasta el hipocotilo y en las hojas. Además, en medios suplementados con PO_4^{3-} , no se observa expresión de GUS para *AtPT2* en toda la planta (Fig. 9).

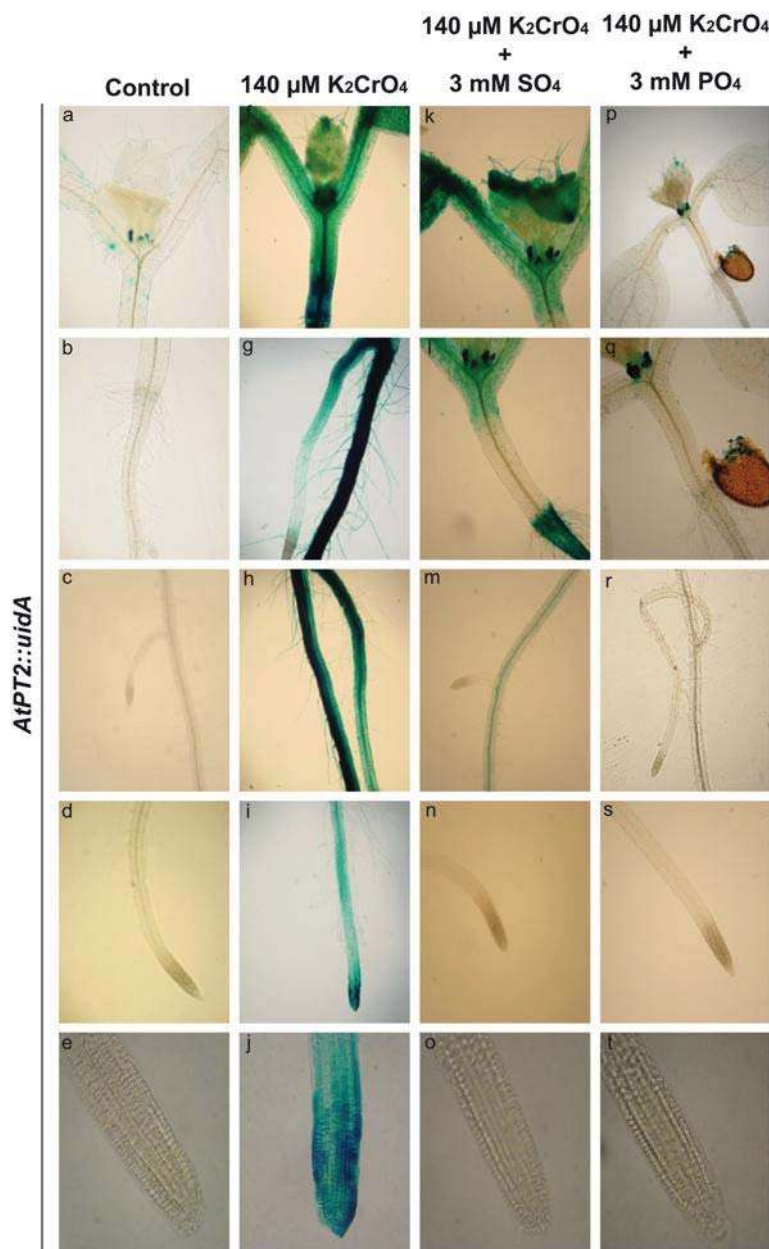


Figura 9. Efecto del cromato en la expresión de *AtPT2::uidA* en medios suplementados con fosfato o sulfato. Plantas de *Arabidopsis* que expresan el marcador *AtPT2::uidA* se germinaron y crecieron en medio MS 0.2x suplementadas con diferentes concentraciones de cromato con sulfato o fosfato, por 10 días. Las fotografías son representativas de al menos 10 plantas analizadas.

6.5. Expresión global de genes en respuesta al cromo en plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

La expresión de 761 genes, de los aproximadamente 25, 000 genes que constituyen el genoma de *Arabidopsis*, fue modificada significativamente en respuesta a CrO_4^{2-} . El número de genes con expresión inducida en 20 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ (concentración estimulante del crecimiento) fue de 89, mientras que en 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ (concentración inhibidora del crecimiento) 336 genes mostraron una expresión diferencial. Tan solo 12 genes, cuya expresión es inducida, lo fue para ambas concentraciones (Fig. 10). La mayoría de estos genes pertenecen a la categoría de reguladores transcripcionales y algunos otros son de función desconocida (Fig. 11).

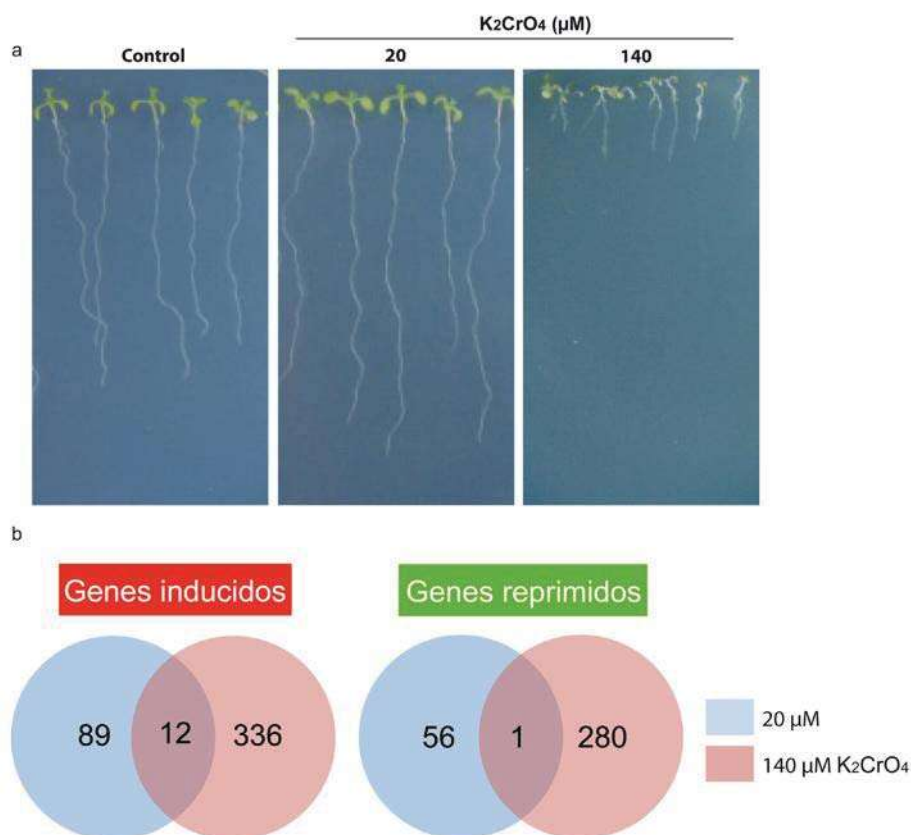


Figura 10. Efecto del cromo en la expresión global de genes. a) Imágenes representativas del crecimiento de plantas de *Arabidopsis* suplementadas con 20 y 140 μM de cromato. b) Número de genes con expresión regulada diferencialmente en los dos tratamientos.

En la concentración estimulante del crecimiento ($20 \mu\text{M K}_2\text{CrO}_4^{2-}$), una de las categorías funcionales mejor representada incluye genes involucrados en la señalización y síntesis de proteínas (Fig. 11).

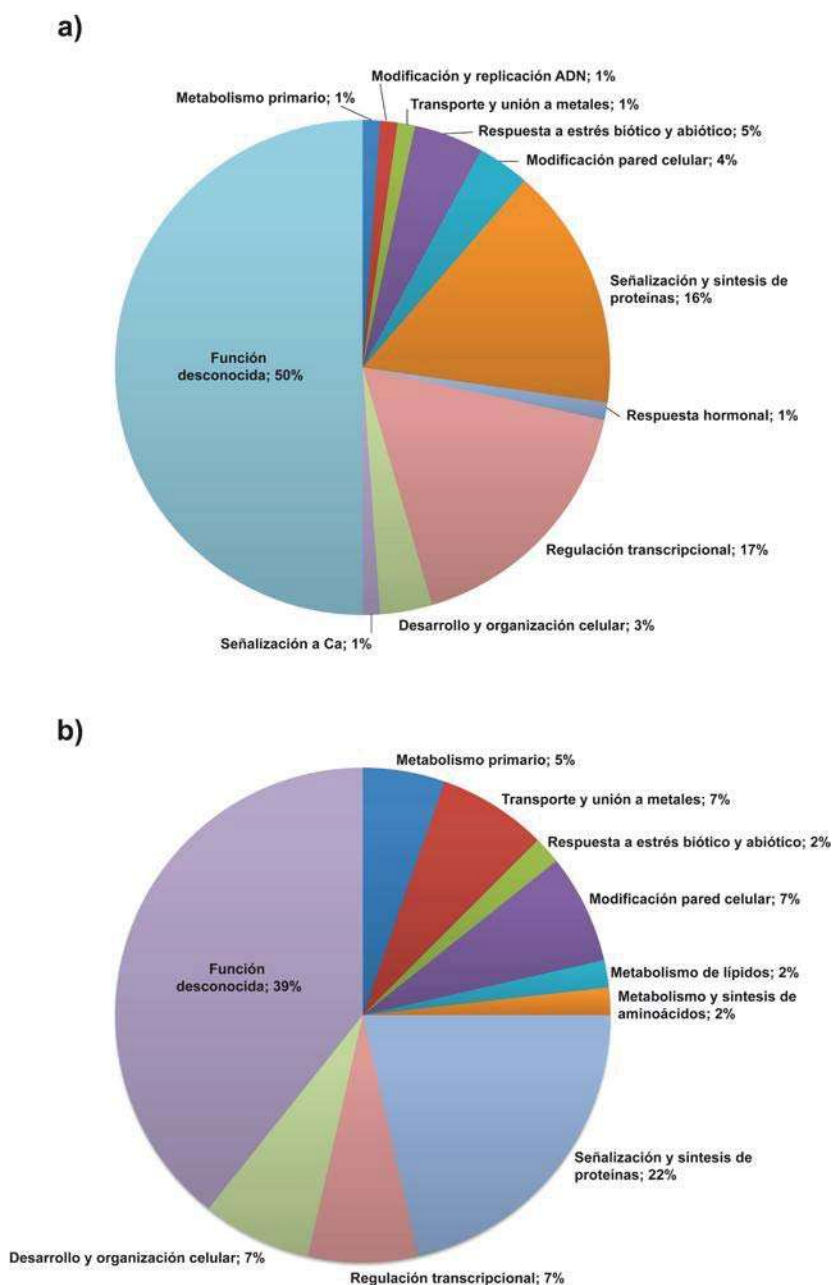


Figura 11. Clasificación funcional de los genes con expresión regulada diferencialmente en $20 \mu\text{M}$ de cromato de potasio. a) Genes con expresión inducida. b) Genes con expresión reprimida.

En cuanto al número de genes con expresión reprimida por CrO_4^{2-} , se encontraron 56 y 280, en los tratamientos de 20 y 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$, respectivamente. Sólo un gen con la expresión reprimida se comparte en ambos tratamientos. En la concentración inhibitoria del crecimiento (140 μM K_2CrO_4), una de las categorías mejor representada tanto para genes con expresión inducida como inhibida, fue la de respuesta a estrés biótico y abiótico (Fig. 12).

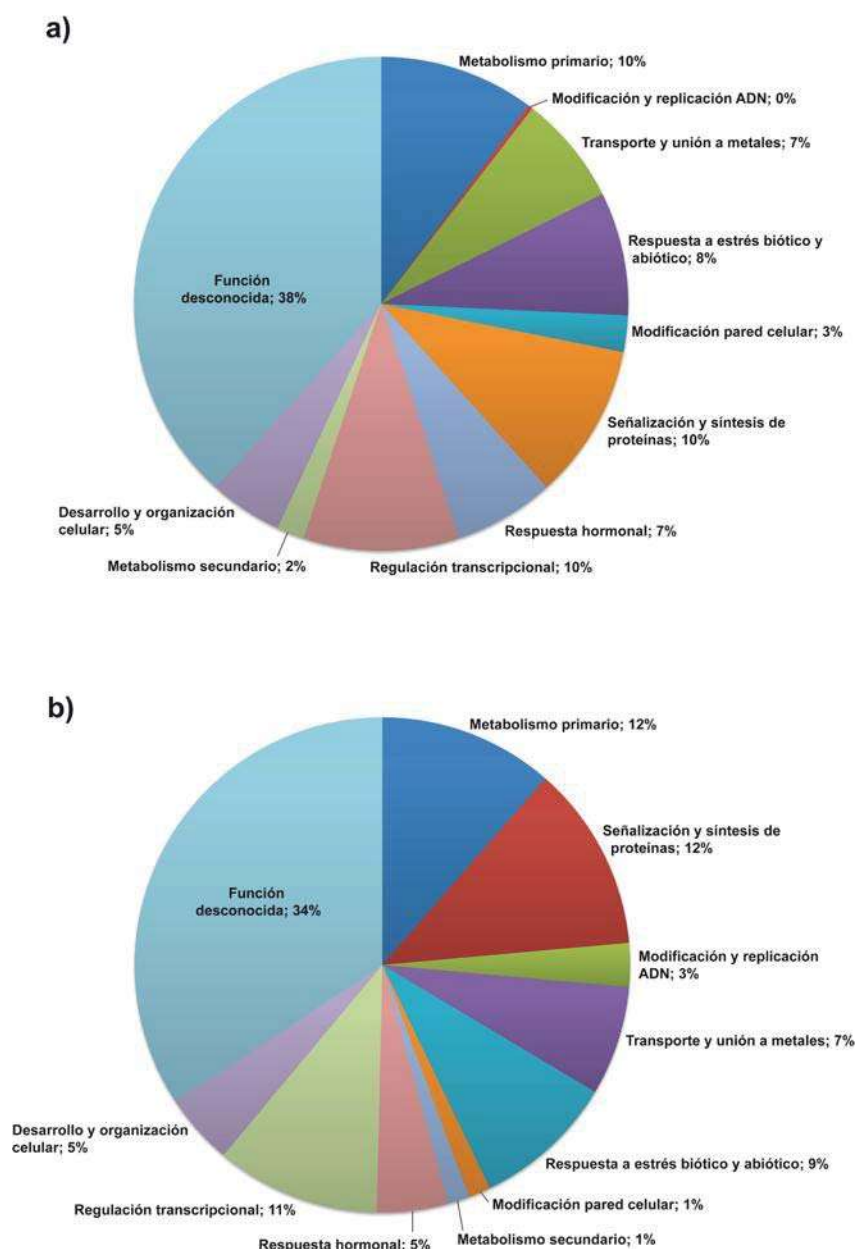


Figura 12. Clasificación funcional de genes con expresión regulada diferencialmente en 140 μM de cromato de potasio. a) Genes con expresión inducida. b) Genes con expresión reprimida.

6.6. Genes implicados en la homeostasis del hierro

Entre los principales genes con expresión inducida en 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ se encuentran el gen At4g19690, que codifica el transportador IRT1, esencial para la captación de hierro (Fe) y de cationes divalentes, con un valor de cambio de 14. Además, el gen At5g23990, con un valor de cambio de 8, codifica una quelato reductasa férrica, la cual es requerida para la adquisición de Fe del suelo y su metabolismo en las plantas. Los dos genes mencionados anteriormente participan en la homeostasis de Fe (Connolly y Guerinot, 2002; Wu et al., 2005). Dos miembros de la familia de citocromos P450, At4g31940 y At4g31950, cuya expresión ha sido también vinculada a la homeostasis de Fe (Murgia et al., 2011), mostraron expresión inducida en la concentración inhibitoria (Tabla 1).

En cuanto a los genes reprimidos en 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$, se encuentra el gen At3g11050, el cual codifica una proteína ferritina, la cual es encargada de aumentar las reservas de Fe en la célula y es regulada en respuesta a este nutriente (Briat et al., 2009) (Tabla 1).

6.7. Regulación hormonal en Arabidopsis en respuesta al cromo

La respuesta hormonal en Arabidopsis se afectó en mayor medida en plantas expuestas a $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ en la concentración inhibitoria (140 μM), con un gran número de genes de respuesta temprana a auxinas, también conocidos como SAURs (At1g29430, At1g29440, At1g29500, At1g29510, At3g03850, At5g18020, At5g18030, At5g18050, At5g18060, At5g18080, At5g27780, At3g53250, At4g34800) los cuales mostraron una expresión inducida (Tabla 1). Los genes SAUR codifican transcritos cortos que se acumulan rápidamente después del tratamiento con auxinas. Hay 72 genes SAUR en Arabidopsis, sin embargo, ninguno de estos ha sido funcionalmente caracterizado, aunque algunos miembros han sido implicados en la respuesta a auxinas mediada por calcio y en el crecimiento de plántulas etioladas (Park et al., 2007).

Uno de los genes con expresión inducida en ambas condiciones es el At2g25170, el cual codifica PICKLE (PKL) (Tabla 1), un factor de remodelación de la cromatina dependiente de ATP, de la familia CHD3 (Zhang et al., 2008). PKL ha sido

implicado en la represión de genes específicos del embrión y en el crecimiento y desarrollo vegetal relacionados a auxinas (Fukaki et al., 2006).

Genes	Símbolo	Descripción	20uM K ₂ CrO ₄	140uM K ₂ CrO ₄	Clasificación funcional
At2g25170	PKL, GYM, CHD3, CHR6, SSL2	chromatin remodeling factor of the CHD3 group	6.37393	3.93712	Modificación y replicación del ADN
At3g49510	---	F-box family protein	5.59538	1.23901	Señalización y síntesis de proteínas
At5g51360	---	Transcription elongation factor (TFIIS) family protein	4.77642	1.10669	Regulación transcripcional
At2g15350	FUT10, ATFUT10	fucosyltransferase 10	4.21290	1.42289	Modificación de pared celular
At2g31500	CPK24	calcium-dependent protein kinase 24	3.84429	1.09820	Señalización y síntesis de proteínas
At3g29050	---	receptor-like protein kinase-related	3.73200	0.79558	Señalización y síntesis de proteínas
At5g54720	---	Ankyrin repeat family protein	3.54526	0.66253	Desarrollo y organización celular
At4g03300	---	transposable element gene	3.44790	0.83780	Señalización y síntesis de proteínas
At3g46860	---	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	3.42523	0.80377	Señalización y síntesis de proteínas
At5g58140	PHOT2, NPL1	phototropin 2	3.15144	1.25167	Señalización y síntesis de proteínas
At4g19690	IRT1	iron-regulated transporter 1	0.91043	21.74979	Transporte y unión a metales
At4g32010	HSL1, HSI2-L1, VAL2	transcriptional factor B3 family protein low similarity to FUSCA3	1.41747	13.96510	Regulación transcripcional
At5g04150	BHLH101	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	1.05936	11.89035	Regulación transcripcional
At5g23990	ATFRO5, FRO5	ferric reduction oxidase 5	0.80497	8.18926	Transporte y unión a metales
At3g56980	BHLH39, ORG3	basic helix-loop-helix (bHLH) DNA-binding superfamily protein	1.29396	7.02222	Regulación transcripcional
At4g31940	CYP82C4	cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 4	0.71352	6.93163	Transporte y unión a metales
At4g31950	CYP82C3	cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 3	1.14596	5.94539	Transporte y unión a metales
At2g16210	---	Transcriptional factor B3 family protein	2.11055	5.89005	Regulación transcripcional
At3g14740	---	RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein	1.11498	5.84946	Regulación transcripcional
At4g34650	SQS2	squalene synthase 2	0.97980	5.48197	Metabolismo primario
At5g14290	---	Mitochondrial ribosomal protein L37	0.15456	1.35685	Señalización y síntesis de proteínas
At3g03400	---	EF hand calcium-binding protein family	0.18822	2.10791	Señalización y síntesis de proteínas
At5g11940	---	Subtilase family protein	0.19393	1.37457	Señalización y síntesis de proteínas
At5g46370	KCO2, ATPPK2, ATKCO2	Ca2+ activated outward rectifying K+ channel 2	0.20284	0.77295	Transporte y unión a metales
At1g61270	---	Transmembrane amino acid transporter family protein	0.20440	1.22431	Transporte y unión a metales
At2g16730	BGAL13	glycosyl hydrolase family 35 protein	0.22920	1.54898	Metabolismo primario
At1g01450	---	Protein kinase superfamily protein	0.24518	1.15802	Señalización y síntesis de proteínas
At5g58970	ATUCP2, UCP2	uncoupling protein 2	0.25639	0.70365	Transporte y unión a metales
At1g68180	---	RING/U-box superfamily protein	0.27861	0.72234	Señalización y síntesis de proteínas
At2g19040	RALFL12	RALF-like 12	0.30364	1.03400	Señalización y síntesis de proteínas
At5g26170	WRKY50, ATWRKY50	WRKY DNA-binding protein 50	1.26838	0.08702	Reguladores transcripcionales
At3g17620	---	F-box and associated interaction domains-containing protein	0.56384	0.13594	Señalización y síntesis de proteínas
At4g32000	---	Protein kinase superfamily protein	0.58514	0.14629	Señalización y síntesis de proteínas
At5g44420	PDF1.2, PDF1.2A, LCR77	plant defensin 1.2	1.83126	0.15071	Respuesta a estrés biótico y abiótico
At2g37770	---	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein	1.18850	0.16255	Metabolismo primario
At5g52720	---	Copper transport protein family	0.94678	0.18128	Respuesta a estrés biótico y abiótico
At5g41780	---	myosin heavy chain-related	0.86705	0.18905	Desarrollo y organización celular
At5g40155	---	Defensin-like (DEFL) family protein	1.02430	0.19405	Respuesta a estrés biótico y abiótico
At5g43310	---	COP1-interacting protein-related	1.05541	0.19431	Metabolismo primario
At5g61160	AACT1	anthocyanin 5-aromatic acyltransferase 1	0.51421	0.19438	Metabolismo secundario

Tabla 1. Principales genes inducidos y reprimidos por el cromo. Los valores de expresión transcripcional para los tratamientos de 20 µM y 140 µM de cromo se presentan como número de veces de cambio (fold change) con respecto al tratamiento control sin cromo. Los genes con incremento en su expresión van aumentando en intensidad hacia el rojo, mientras que los que disminuyen su expresión aumentan su intensidad hacia el verde. La clasificación de la función de los genes se realizó con el MAPMAN del Max Planck Institute y el Gene Ontology del The Arabidopsis Information Resource.

La respuesta a citocininas estuvo también regulada de manera diferencial en *Arabidopsis*. En concentraciones de 140 μM $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ se indujo la expresión de los genes At1g19050, At1g59940, At2g40670 y At5g62920, los cuales pertenecen a los reguladores de respuesta a citocininas (ARRs) tipo A en *Arabidopsis* (Tabla 1). Estos actúan como reguladores negativos que atenúan la respuesta a un elevado nivel de citocininas, un mecanismo de retroalimentación negativa por el cual las plantas disminuyen la sensibilidad a esta hormona. Los elementos de esta familia se inducen rápidamente en respuesta a citocininas y tienen funciones parcialmente redundantes (D'Agostino et al., 2000).

En el microarreglo también están representados genes que participan en la respuesta a etileno cuya expresión fue reprimida en 140 μM (At2g14580, At2g31180, At2g47190, At3g15170, At5g44420). Otros genes con expresión reprimida participan en la respuesta a ácido abscísico (At2g33380, At2g47190, At3g11050, At3g17510, At3g21780 y At5g59220). Un gen implicado en procesos de morfogénesis de la raíz, At3g49110, tuvo una expresión reprimida en respuesta a 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$. Este gen codifica una peroxidasa, la cual se expresa principalmente en la raíz y su papel sugerido es durante la elongación de las células que salen del meristemo (Passardi et al., 2005) (Tabla 1).

6.8. Genes implicados en la respuesta a estrés biótico y abiótico

En la respuesta transcripcional de *Arabidopsis* en 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ se encuentra inducida la expresión de genes que participan en procesos para hacer frente al estrés biótico y abiótico. Hay genes implicados en el sistema de defensa de las plantas, como resistencia a enfermedades (At3g13650, At5g42500, At2g28670, At4g11210 y At2g34930) y quitinasas (At1g56680 y At5g24090). Otros genes con expresión inducida participan en la respuesta al estrés oxidativo, como los que codifican enzimas peroxidases (At1g14540, At5g15180 y At5g19890) y glutatión transferasas (At2g29440, At5g02780, At1g17180 y At2g29470). La represión en la expresión de genes pertenecientes a esta categoría también fue notablemente representada en la concentración inhibitoria (Tabla 1).

VII. DISCUSIÓN

En el crecimiento y desarrollo vegetal participan señales ambientales y endógenas, las cuales junto con el programa genético intrínseco determinan la morfofisiología de la planta (Gray, 2004). Una característica del desarrollo de las plantas es el no seguir un plan de desarrollo rígido, en cambio, continuamente se adaptan al ambiente. Su capacidad para superar las limitaciones de un estilo de vida sedentario está en función de su gran plasticidad para explorar el suelo y el aire en busca de recursos esenciales, tales como la luz, el agua y los nutrientes (Forde et al., 2001).

La presencia del Cr en el medio conduce a cambios en los patrones del crecimiento y desarrollo de las plantas, en especial en la modulación del crecimiento de la raíz y del follaje (Shanker et al., 2005). En el presente trabajo se analizó el efecto del Cr(VI) en *Arabidopsis*, mostrando un efecto dual en el crecimiento. En concentraciones relativamente bajas (20 a 40 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$), se promueve el crecimiento de la raíz y del follaje con un efecto moderado del CrO_4^{2-} . Por el contrario, en concentraciones de 80 μM o mayores, el crecimiento fue inhibido, pero se estimularon procesos de diferenciación celular como la presencia de pelos radiculares muy cercanos a la punta de la raíz y de raíces laterales y adventicias (Fig. 4). Estas concentraciones se consideraron, para propósitos experimentales, como “estimulante” e “inhibitoria”, respectivamente. Ambos efectos, tanto estimulador como inhibidor del crecimiento, ocasionados en respuesta a Cr(VI) se han reportado en plantas de *Amaranthus viridis* L., donde en concentraciones de 10 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ se estimuló el crecimiento de la raíz primaria y en concentraciones de 100 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ocurrió el efecto opuesto (Zou et al., 2006). Asimismo, en plantas de *Arabidopsis* trasplantadas a medios con 100 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, se estimuló el crecimiento de la raíz primaria y se generó un aumento en biomasa tanto de la raíz como del follaje, mientras que a 200 μM de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ se observó el efecto contrario (Ortiz-Castro et al., 2007).

El análisis de la interacción del Cr(VI) y los nutrientes como el PO_4^{3-} y el SO_4^{2-} apoya la propuesta de que el Cr(VI) interfiere en la captación, translocación y

acumulación de estos nutrientes (Gardea-Torresdey et al., 2005). Se ha sugerido una competencia del CrO_4^{2-} con estos nutrientes, mediante la interacción de ambos en el transporte, ya que con una concentración mayor del nutriente que del metal, se revertieron los efectos ocasionados por el CrO_4^{2-} en el crecimiento de la raíz y del follaje, indicando una posible ventaja competitiva para el nutriente en la entrada a la célula (Fig. 6). Existen evidencias que sugieren la participación de los transportadores de SO_4^{2-} en la captación de CrO_4^{2-} . En plantas de Maíz (*Zea mays*), el efecto del CrO_4^{2-} fue relacionado con la captación de SO_4^{2-} (Schiavon et al., 2007), sugiriendo una competencia por el sitio activo de unión de los transportadores de SO_4^{2-} , probablemente debida a la similitud estructural compartida por el CrO_4^{2-} y el SO_4^{2-} . Un efecto similar fue observado en *Pteris vittata* L. en respuesta a Arseniato (AsO_4^{3-}) y su interacción con PO_4^{3-} , mostrando que el PO_4^{3-} incrementa la biomasa de las plantas y alivia la toxicidad provocada por acumulación de altos niveles de AsO_4^{3-} (aproximadamente 1000 μM) (Tu et al., 2003). Asimismo, una mutante en *Arabidopsis* resistente a AsO_4^{3-} (*ars1*), mostró una captación significativamente mayor de PO_4^{3-} que las plantas silvestres, lo que sugiere que las plantas pueden incrementar la tolerancia a AsO_4^{3-} al incrementar el transporte de PO_4^{3-} . Las características de la mutante *ars1* sugieren que sus tejidos tienen suficiente cantidad de PO_4^{3-} para reducir la integración de AsO_4^{3-} a los sitios de unión de PO_4^{3-} en proteínas sensibles a AsO_4^{3-} , incrementando así la tolerancia (Lee et al., 2003). Además, la mutante en *pht1;1-3* muestra una tasa de captación de AsO_4^{3-} muy baja, lo que la hace resistente y le permite acumular hasta el doble de arseniato con relación a las plantas silvestres (Catarcha et al., 2007). En cuanto a la respuesta a CrO_4^{2-} en *Arabidopsis*, nuestros resultados sugieren que el adecuado suministro de nutrientes, como PO_4^{3-} y SO_4^{2-} puede revertir la toxicidad por Cr en las células de las plantas (Fig. 6).

La deficiencia de Pi es uno de los mayores problemas que afectan el crecimiento vegetal, por lo cual existen respuestas altamente eficientes que implican la activación coordinada de genes para aliviar el estrés, entre ellos los transportadores de Pi de alta afinidad y la exudación de ácidos orgánicos y fosfatasa por la raíz (Karthikeyan et al., 2002). Los resultados obtenidos del análisis en la

expresión del gen reportero GUS para los transportadores de Pi: *AtPT1* y *AtPT2* en *Arabidopsis*, cuando las plantas se crecieron en medios con concentraciones inhibitorias de Cr(VI), sugieren que el CrO_4^{2-} y $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ pueden interferir con la translocación de PO_4^{3-} , o afectar su metabolismo dentro de la célula, posiblemente por la interacción en el transporte. Los resultados obtenidos en este trabajo, con el análisis de la expresión del gen reportero GUS para *AtPT2* en medios con Cr suplementados con PO_4^{3-} y SO_4^{2-} , mostraron una disminución en su expresión, lo que aunado al restablecimiento en el crecimiento de la raíz primaria por ambos nutrientes, demuestra que el Cr(VI) deja de tener su efecto tóxico ante la presencia de mayores concentraciones de estos nutrientes. Lo anterior refuerza la propuesta de que el Cr(VI) compite a nivel de transporte o interacción metabólica con PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . Sin embargo, los patrones de expresión de GUS para *AtPT2* en plantas crecidas en medios con SO_4^{2-} no disminuyeron en el follaje y el sistema vascular de la raíz, lo que sugiere que el SO_4^{2-} no revierte todos los efectos del Cr(VI) y sugiere que en estos tejidos no hay una “competencia” entre ambos aniones (Figs. 6 y 9).

La expresión de algunos transportadores de alta afinidad de Pi en otras partes de la planta además de la raíz, apunta a su posible participación en la translocación interna de Pi. El análisis de la actividad de GUS para *AtPT2* fue detectada en todos los tipos de células de la raíz, como en la región meristemática, en la epidermis, cortex y particularmente en la región vascular. Estos estudios muestran que los diferentes transportadores de Pi pueden tener un papel específico en la adquisición y transferencia del nutriente dentro de las raíces (Karthikeyan, et al., 2002).

La respuesta transcripcional en *Arabidopsis* a ambas concentraciones de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ (20 y 140 μM) está modulada diferencialmente, mostrando que la expresión de la mayoría de los genes se induce o se reprime sólo para una de las condiciones experimentales, lo que refleja los distintos procesos que tienen lugar en la planta ante las distintas concentraciones de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ (Fig. 10). El número de genes cuya expresión es compartida fue muy bajo (12 genes con expresión inducida y un gen con expresión reprimida), en comparación con el total de genes expresados en cada concentración, lo que refleja la respuesta diferencial a ambas concentraciones de

Cr(VI) y se correlaciona a las diferencias fenotípicas observadas en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis*.

En la concentración estimulante del crecimiento (20 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$), la categoría funcional mejor representada fue la de señalización y síntesis de proteínas, lo que probablemente conlleva a un aumento en los niveles de las proteínas necesarias para promover el crecimiento celular, debido al fenotipo observado en la planta y su tendencia a un mayor crecimiento, tanto en la longitud de la raíz primaria como en el peso fresco de follaje (Fig. 11). La categoría de factores de transcripción fue también una de las más representativas, tanto en genes con expresión inducida como reprimida, en ambas concentraciones de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ (Figs. 11 y 12), lo cual era previsible, ya que la regulación de la expresión de genes al nivel de transcripción controla muchos de los procesos biológicos en una célula u organismo, tales como la progresión del ciclo celular, el equilibrio metabólico y fisiológico y las respuestas al medio ambiente (Riechmann et al., 2000). Por otro lado, en la concentración inhibitoria del crecimiento (140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$), los genes incluidos en la categoría de respuesta a estrés biótico y abiótico están bien representados, reflejando las respuestas adaptativas que se presentan en la planta para hacer frente a los efectos del Cr que ocasiona un daño celular por estrés oxidativo, lo que a su vez genera la inducción en la expresión de genes que codifican peroxidasas y enzimas glutatión transferasas que pueden ayudar a hacer frente al estrés (Sappl et al., 2009) (Fig. 12).

En la concentración inhibitoria, la planta responde activando genes involucrados en la homeostasis de Fe, cuya respuesta se conoce como “estrategia 1” y es inducida ante la deficiencia de este metal (Tabla 1) (Connolly y Guerinot, 2002). Se ha reportado que este elemento se requiere para la funcionalidad de un amplio rango de enzimas, especialmente aquellas involucradas en procesos de oxidación y reducción, para la síntesis del anillo porfirínico de la clorofila, la reducción de NO_3^- , SO_4^{2-} y la fijación de N_2 (Zou, 2006). Los síntomas tóxicos visibles de Cr(VI) son similares a los de deficiencia de Fe (Sharma et al., 1995), lo que está relacionado en parte a la capacidad del Cr para desplazar otros metales (particularmente Fe) de centros enzimáticos de importancia fisiológica, produciendo un estrés nutrimental (Pandey y Sharma, 2003). Estos efectos del Cr se han confirmado mediante estudios

que se han hecho en *A. viridis*, donde la captación y acumulación restringida de Fe está asociada a la presencia de Cr en sitios contaminados (Zou et al., 2006). Nuestros resultados sugieren que las plantas de *Arabidopsis* en concentraciones de 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$, presentan una deficiencia de Fe y emplean mecanismos específicos para restablecer la homeostasis de este metal. Los síntomas ocasionados por el Cr(VI) en las plantas, como reducción de la expansión de la hoja, pueden ocurrir como resultado de una baja tasa fotosintética, debida a la deficiencia de Fe (Terry, 1981). Además, la clorosis inducida por metales pesados ha sido correlacionada en general con el bajo contenido de Fe, lo que sugiere efectos sobre su movilización y captación (Alcántara et al., 1994).

Se ha encontrado que nutrientes tales como el NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} y Fe actúan como señales que pueden ser percibidas por la raíz y activan mecanismos moleculares que modifican la división celular y procesos de diferenciación celular. Estas respuestas pueden estar mediadas por reguladores del crecimiento, como las auxinas, las citocininas y el etileno, sugiriendo que cambios en el control nutricional alteran la síntesis de hormonas (López-Bucio et al., 2003). La respuesta transcripcional a Cr(VI) en *Arabidopsis*, incluyó también genes que participan en la respuesta hormonal (Tabla 1). Los genes de respuesta a auxinas, como SAUR y IAA, se regularon en respuesta a Cr(VI) con una expresión inducida en la condición de 140 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$.

PICKLE es un factor de remodelación de la cromatina cuya expresión se indujo en ambas concentraciones de CrO_4^{2-} y se ha involucrado en el crecimiento y desarrollo relacionados con auxinas, como la regulación negativa en la ruta de formación de raíces laterales y en la formación de órganos y meristemos. Además, se ha reportado que PICKLE actúa como promotor de la diferenciación celular en animales (Fukaki et al., 2006; Aichinger et al., 2011). PICKLE puede regular múltiples respuestas hormonales a través de la remodelación de la cromatina (Fukaki et al., 2006), lo que sugiere también un posible papel en la señalización por CrO_4^{2-} . La expresión de genes de respuesta a citocininas se indujo en la concentración inhibitoria de CrO_4^{2-} , incluyendo varios miembros la familia de los factores de transcripción ARR del subgrupo A. Estos genes, en su mayoría actúan como reguladores negativos de la

función de las citocininas a través de un mecanismo de retroalimentación que controla la sensibilidad de las células a esta hormona (D'Agostino et al., 2000). Considerando que la respuesta transcripcional en la concentración inhibitoria de CrO_4^{2-} (140 μM) en *Arabidopsis* activa genes de respuesta tanto a auxinas como a citocininas, proponemos que el balance hormonal es clave para la regulación del crecimiento vegetal.

Es sabido que la interacción auxinas-citocininas controla diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo tanto la parte foliar como la raíz (Brenner et al., 2005). Las plantas a esta concentración mostraron un cambio en la morfogénesis, así como una inhibición en el crecimiento de la raíz primaria. Esta inhibición se correlacionó con una disminución de la actividad mitótica de la línea *CycB1::uidA* (Fig. 5), lo que confirma los hallazgos previos sobre la inhibición en la división celular en las raíces de plantas sometidas a Cr(VI) (Corradi et al., 1991; Zou et al., 2006).

El desarrollo post-embrionario de las plantas tiene lugar gracias a los meristemos, donde las células madre se renuevan por si solas y producen células hijas que se diferencian y dan lugar a diferentes órganos estructurales (Dello Iorio et al., 2007). Se ha reportado que las citocininas controlan la diferenciación celular y la actividad meristemática y así determinan el tamaño de los órganos, antagonizando la señal de división celular mediada probablemente por auxinas. Un balance entre la división y diferenciación celular es necesario para mantener y controlar el tamaño del meristemo y crecimiento de la raíz (Dello Iorio et al., 2007, 2008). Considerando que la respuesta genómica a concentraciones inhibitorias de Cr(VI) (140 μM $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$) induce la expresión de genes involucrados en la ruta de auxinas y citocininas, es posible que se establezcan procesos adaptativos, con cambios en los patrones de morfogénesis de la raíz, para hacer frente a estas concentraciones de CrO_4^{2-} . La regulación de genes implicados en el proceso de morfogénesis fue también evidente a concentraciones inhibitorias del metal, como la represión del gen At3g49110 que codifica una peroxidasa, la cual se expresa principalmente en la raíz y cuyo papel sugerido es en el proceso de elongación. Estas modificaciones en la longitud de la raíz son acompañadas por los cambios en la longitud celular, sugiriendo que este

gen está involucrado en las reacciones que promueven la elongación celular (Passardi et al., 2005).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que, dependiendo de la concentración de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$, las plantas responden de manera diferencial, tanto morfológica como transcripcionalmente, mostrando un efecto dual del Cr(VI) en *Arabidopsis* con un efecto estimulador del crecimiento a bajas concentraciones de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ y un efecto inhibitor del crecimiento a altas concentraciones. Los genes regulados permiten que la planta tenga un mejor crecimiento a bajas concentraciones de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$, mientras que en la concentración inhibitoria los genes regulados permiten enfrentar el estrés oxidativo y la interferencia con el metabolismo de nutrientes. La respuesta a concentraciones inhibitorias de Cr(VI) y su reversión con suplementos de nutrientes, apoyan la idea de que los transportadores de iones esenciales están involucrados en la captación de este anión o en la interferencia con el metabolismo de los nutrientes. Esto abre nuevos horizontes para el manejo ambiental de los suelos contaminados con Cr, en donde sería factible obtener un crecimiento adecuado de los cultivos con un manejo adecuado de la nutrición mineral de las plantas.

VIII. RESUMEN DE RESULTADOS

1. El Cr(VI) mostró efectos diferenciales en el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* dependiendo de su concentración: un efecto estimulador en concentraciones de 20 μM de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ y un efecto inhibitor del crecimiento a 140 μM , lo que sugiere un papel importante en la fisiología de las plantas.
2. El PO_4^{3-} y SO_4^{2-} revirtieron los efectos inhibitorios ocasionados por el Cr(VI) en el crecimiento de la raíz y follaje, revelándose una interacción entre la disponibilidad de los nutrientes y la respuesta a un metal potencialmente tóxico.
3. El gen que codifica el transportador de P_i , de alta afinidad *AtPT2* en *Arabidopsis*, mostró expresión inducida en tratamientos con Cr(VI) y una expresión disminuida al nivel basal cuando se aumentó la fertilización fosfatada.
4. La respuesta transcripcional en *Arabidopsis* a ambas concentraciones de $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$ (20 y 140 μM), es modulada diferencialmente. En la concentración estimuladora: 20 μM $\text{K}_2\text{CrO}_4^{2-}$, la categoría funcional mejor representada fue señalización y síntesis de proteínas, mientras que los genes que participan en la homeostasis del Fe, en la respuesta hormonal y estrés oxidativo muestran mayor expresión en la concentración inhibitoria de CrO_4^{2-} (140 μM). Estos resultados confirman la hipótesis de que el efecto biológico del Cr es altamente dependiente de su abundancia en el medio.

IX. CONCLUSIÓN

El Cr(VI) interfiere con la captación y/o metabolismo de nutrientes esenciales y dependiendo de su abundancia en el medio tiene un efecto diferencial en la expresión génica de las plantas, orientada hacia el mayor crecimiento a bajas concentraciones y a la remediación del estrés oxidativo a altas concentraciones del metal.

X. BIBLIOGRAFIA

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P** (2004) *Biología molecular de la célula*, ed. Omega
- Abercrombie JM, Halfhill MD, Ranjan P, Rao MR, Saxton AM, Yuan JS, Stewart CN, Jr.** (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress. *BMC Plant Biol* **8**: 87
- Adams DO, Yang SF** (1979) Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 170-174
- Aichinger E, Villar CB, Di Mambro R, Sabatini S, Kohler C** (2011) The CHD3 chromatin remodeler PICKLE and polycomb group proteins antagonistically regulate meristem activity in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **23**: 1047-1060
- Alcántara E, Romera FJ, Canete M, De la Guardia MD** (1994) Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe(III) reductase in Fe deficient cucumber (*Cucumis sativus* L) plants. *J Exp Bot* **45**:1983–98
- Amtmann A, Blatt MR** (2008) Regulation of macronutrient transport. *New Phytol* **181**: 35–52
- Armienta-Hernández MA, Rodríguez-Castillo R** (1995) Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, México. *Environ Health Perspect* **103**: 47-51.
- Barceló J, Porchenrieder CH, Ruano A, Gunse B** (1985) Leaf water potential in Cr(VI) treated bean plants (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Physiol* **77**: 163–174
- Barceló J, Poschenrieder CH, Gunse B** (1986) Water relations of chromium VI, treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender) under both normal and water stress conditions. *J Exp Bot* **37**: 178-187
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* **57**:289–300
- Benjamins R, Scheres B** (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* **59**: 443-465
- Blatt MR** (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 221–241
- Bleecker AB, Patterson SE** (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**:1169–79
- Bleecker AB, Kende H** (2000) Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 1-18
- Brenner WG, Romanov G A, Kollmer I, Burkle L, Schmulling T** (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J* **44**: 314–333
- Briat JF, Ravet K, Arnaud N, Duc C, Boucherez J, Touraine B, Cellier F, Gaymard F** (2009) New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. *Annals of Botany* **105**:811–822

- Bucher M, Rausch C, Daram P** (2001) Molecular and biochemical mechanisms of phosphorus uptake into plants. *J Plant Nutr Soil Sci* **164**:209–217
- Calderón-Vazquez C, Ibarra-Laclette E, Caballero-Perez J, Herrera-Estrella L** (2008) Transcript profiling of *Zea mays* roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant- and species-specific levels. *J Exp Bot* **59**: 2479–2497
- Catarecha P, Segura MD, Franco-Zorrilla JM, Garcia-Ponce B, Lanza M, Solano R, Paz-Ares J, Leyva A** (2007) A mutant of the *Arabidopsis* phosphate transporter PHT1;1 displays enhanced arsenic accumulation. *Plant Cell* **19**: 1123–1133
- Cervantes C, Campos-García J. (2007).** Reduction and efflux of chromate in bacteria. In: Nies DH, Silver S (eds) *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin
- Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Tavera HL, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R** (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 335–347
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P** (1999) Spatio temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin–GUS fusion protein. *Plant J* **20**:503–508
- Connolly EL, Guerinot M** (2002) Iron stress in plants. *Genome Biol* **3**: REVIEWS1024
- Cooper GM, Hausman RE** (2006) *The Cell: A Molecular Approach* 4 th ed Amer Soc Microbiol Washington and Sinauer Assoc. Sunderland, MA
- Corradi M G, Levi M, Musetti R, Favali MA** (1991) The effect of Cr (VI) on different inbred lines of *Zea mays* L. Nuclei and cell cycle in the root tip tissue. *Protoplasma* **162**: 12–19
- Crawford NM, Forde BG** (2002) Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, tab.0011, www.aspb.org/publications/arabidopsis/
- Cubero B, Nakagawa Y, Jiang XY, Miura KJ, Li F, Raghothama KG, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM** (2009) The phosphate transporter PHT4;6 is a determinant of salt tolerance that is localized to the Golgi apparatus of *Arabidopsis*. *Mol Plant* **2**: 535–552
- D'Agostino IB, Deruere J, Kieber JJ** (2000) Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiol* **124**: 1706 –1717
- Daram P, Brunner S, Rausch C, Steiner C, Amrhein N, Bucher M** (1999) Pht2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2153–2166
- Davidian JC, Kopriva S** (2010) Regulation of sulfate uptake and assimilation--the same or not the same? *Mol Plant* **3**: 314–325
- Davies FT, Puryear JD, Newton RJ, Egilla JN, Grossi JAS** (2002) Mycorrhizal fungi increase chromium uptake by sunflower plants: Influence on tissue mineral concentration, growth, and gas exchange. *J Plant Nutr* **25**:2389–2407

- Deikman J** (1997) Molecular mechanisms of ethylene regulation of gene transcription. *Physiol Plant* **100**:561–66
- Dello Ioio R, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S** (2007) Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* **17**:678-82
- Dello Ioio R, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Constantino P, Sabatini S** (2008) A genetic framework for the control of division and differentiation in the root meristem *Science* **322**:1380-1384
- De Smet I, Zhang H, Inze D, Beeckman T** (2006) A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci* **11**: 434–439
- Dubrovsky JG** (1997) Determinate primary root growth in seedlings of sonoran desert cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *203*:85-92
- Finkelstein RR, Gampala SS, Rock CD** (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* **14 Suppl**: S15-45
- Forde B, Lorenzo H** (2001) The nutritional control of root development. *Plant Soil* **232**: 51–68
- Fukaki H, Taniguchi N, Tasaka M** (2006) PICKLE is required for SOLITARY-ROOT/IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during Arabidopsis lateral root initiation. *Plant J* **48**: 380-389
- Gardea-Torresdey JL, De la Rosa G, Peralta-Videa JR, Montes M, Cruz-Jimenez G, Cano-Aguilera I** (2005) Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Arch Environ Contam Toxicol* **48**: 225–232
- Gibson G, Muse SV** (2004) A primer of genome science, ed. Sinauer Assoc
- Gou J, Strauss SH, Tsai CJ, Fang K, Chen Y, Jiang X, Busov VB** (2010) Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell* **22**: 623-639
- Gray WM** (2004) Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol* **2**: E311
- Grieneisen VA, Xu J, Maree AF, Hogeweg P, Scheres B** (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**: 1008-1013
- Hardtke CS** (2006) Root development--branching into novel spheres. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 66-71
- Herbette S, Taconnat L, Hugouvieux V, Piette L, Magniette ML, Cuine S, Auroy P, Richaud P, Forestier C, Bourguignon J, Renou JP, Vavasseur A, Leonhardt N** (2006) Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of Arabidopsis roots and shoots. *Biochimie* **88**: 1751-1765
- Higuchi M, Pischke MS, Mahonen AP, Miyawaki K, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Shinozaki K, Kato T, Tabata S., et al** (2004) *In planta* functions of the Arabidopsis cytokinin receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8821–8826

- Huang D, Jaradat MR, Wu W, Ambrose SJ, Ross AR, Abrams SR, Cutler AJ** (2007) Structural analogs of ABA reveal novel features of ABA perception and signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* **50**: 414-428
- Huffman EW, Jr., Allaway WH** (1973) Chromium in plants: distribution in tissues, organelles, and extracts and availability of bean leaf Cr to animals. *J Agric Food Chem* **21**: 982-986
- Irizarry R, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*.
- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, D'Urzo MP, Damsz B, Raghothama KG** (2002) Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol* **130**: 221-233
- Kaszycki P, Gabry H, Appenroth KJ, Jaglarz A, Sedziwy S, Walczak T, Koloczek H** (2005) Exogenously applied sulphate as a tool to investigate transport and reduction of chromate in the duckweed *Spirodela polyrhiza*. *Plant Cell Environ* **28**: 260–268
- Katz SA, Salem H** (1993) The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J Appl Toxicol* **13**: 217-224
- Kawanishi S, Inoue S, Sano S** (1986) Mechanism of DNA cleavage induced by sodium cromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J BiolChem* **261**: 5952-5958
- Kende H** (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**:283–307
- Kepinski S** (2006) Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 28-34
- Kieber JJ** (2001) Cytokinin. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, tab.0063, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>
- Kraiser T, Gras DE, Gutiérrez AG, González B, Gutiérrez RA** (2011) A holistic view of nitrogen acquisition in plants. *J Exp Bot* **62**: 1455-1466
- Kucera B, Cohn MA, Metzger GL** (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination *Seed. Sci Res* **15**:281-307
- Kutz A, Müller A, Peter H, Kaiser WM, Piotrowski M, Weiler EM** (2002) A role for nitrilase 3 in the regulation of root morphology in sulfur starving *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **30**: 95–106
- Lee DA, Chen A, Schroeder JI** (2003) *ars1*, an *Arabidopsis* mutant exhibiting increased tolerance to arsenate and increased phosphate uptake. *Plant J* **35**: 637-646
- Leustek T, Saito K** (1999) Sulfate transport and assimilation in plants. *Plant Physiol* **120**: 637-643
- Lewin B** (2008) *Genes VIII*. New York:Oxford University Press
- Lin Z, Zhong S, Grierson D** (2009) Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot* **60**: 3311-3336
- Liu D, Kottke I** (2003) Subcellular localization of chromium and nickel in root cells of *Allium cepa* by EELS and ESI. *Cell Biol Toxicol* **19**: 299-311

- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J* **28**: 465-474
- Lopez-Bucio J, Cruz-Ramirez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 280-287
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Pérez Torres A, Ramírez-Pimentel JG, Sánchez-Calderón L, Herrera-Estrella L** (2005). Root architecture in *C. Turnbull*, CGN ed. *Plant architecture and its manipulation*. Blackwell pp 181-206
- Lytle CM, Lytle FW, Yang N, Qian J-H, Hansen D, Zayed, Terry N** (1998) Reduction of Cr(VI) to Cr(III) by wetland plants: Potential for in situ heavy metal detoxification. *Environ Sci Technol* **32**: 3087–3093
- Maathuis FJ, Filatov V, Herzyk P, Krijger GC, Axelsen KB, Chen S, Green BJ, Li Y, Madagan KL, Sanchez-Fernandez R, Forde BG, Palmgren MG, Rea PA, Williams LE, Sanders D, Amtmann A** (2003) Transcriptome analysis of root transporters reveals participation of multiple gene families in the response to cation stress. *Plant J* **35**:675-92
- Malamy JE, Benfey, PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33–44
- Maruyama-Nakashita A, Inoue E, Watanabe A, Yamaya T, Takahashi H** (2003) Transcriptome Profiling of Sulfur-Responsive Genes in *Arabidopsis* Reveals Global Effects of Sulfur Nutrition on Multiple Metabolic Pathways. *Plant Physiology* **132**: 597-605
- McGrath SP, Smith S** (1990) Chromium and nickel. In: *Heavy Metals in Soils* Ed Alloway BJ. Wiley, New York pp 125-150
- Meyerowitz, E. M** (1994) Plant developmental biology: green genes for the 21st century. *BioEssays* **16**:621–625.
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong F** (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc* **77**: 1392
- Misson J, Raghothama KG, Jain A, Jouhet J, Block MA, Bligny R, Ortet P, Creff A, Somerville S, Rolland N, Doumas P, Nacry P, Herrera-Estrella L, Nussaume L, Thibaud MC** (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 11934-11939
- Mudge SR, Rae AL, Diatloff E, Smith FW** (2002) Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of phosphate transporters in *Arabidopsis*. *Plant J* **31**: 341–353
- Müller B, Sheen J** (2007) Advances in cytokinin signaling. *Science* **318**: 68-69
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* **15**: 473-497.
- Murgia I, Tarantino D, Soave C, Morandini P** (2011) *Arabidopsis* CYP82C4 expression is dependent on Fe availability and circadian rhythm, and correlates with genes involved in the early Fe deficiency response. *J Plant Physiol.* **168**: 894-902
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscissic acid biosynthesis and catabolism. *Annu Rev Plant Biol* **56**: 165-185

- Nawy T, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, Malamy JE, Birnbaum K, Benfey PN (2005) Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *Plant Cell* **17**: 1908-1925
- Nishimura C, Ohashi Y, Sato S, Kato T, Tabata S, Ueguchi C (2004) Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1365-1377
- Olszewski N, Sun TP, Gubler F (2002) Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell* **14 Suppl**: S61-80
- Ortiz-Castro R (2005) Modificaciones en la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. por efecto del cromo. Tesis profesional de Biólogo. Universidad Michoacana. Morelia, Michoacán, México
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C (2006) Modificaciones en el desarrollo de la raíz inducidas por cromo en plantas de *Arabidopsis thaliana*. *Ciencia Nicolaita* **44**: 107-120
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C, Dubrovsky J (2007) Effects of dichromate on growth and root system architecture of Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Science* **172**: 684-691
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C y Carreón-Abud Y (2008) Restauración del crecimiento radical por nutrimentos inorgánicos en *Arabidopsis thaliana* L. expuesta a cromo. *Terra Latinoamericana* **27**: 97-103
- Pandey N, y Sharma CP (2003) Chromium interference in iron nutrition and water relations of cabbage. *Environ Exp Bot* **49**: 195-200
- Park J-E, Kim Y-S, Yoon H-K, Park C-M (2007) Functional characterization of a small auxin-up RNA gene in apical hook development in Arabidopsis. *Plant Sci* **172**: 150-157
- Passardi F, Tognolli M, De Meyer M, Penel C, Dunand C (2006) Two cell wall associated peroxidases from Arabidopsis influence root elongation. *Planta* **223**: 965-974
- Poethig RS (1997) Leaf morphogenesis in flowering plants. *Plant Cell* **9**: 1077-1087
- Prasad MNV, Greger M, Landberg T (2001) *Acacia nilotica* L. bark removes toxic elements from solution: corroboration from toxicity bioassay using *Salix viminalis* L in hydroponic system. *Int J Phytoremed* **3**: 289-300
- Ramachandran V, D'Souza R J, Mistry, KB (1980) Uptake and transport of chromium in plants. *J Nuclear Agric Biol* **9**: 126-128
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang C, Keddie J, Adam L, Pineda O, Ratcliffe OJ, Samaha RR, Creelman R, Pilgrim M, Broun P, Zhang JZ, Ghandehari D, Sherman BK, Yu G (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**: 2105-2110
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacqmard A, Murray JAH (1999) Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**: 1541-1544
- Rubio V, Bustos R, Irigoyen ML, Cardona-López X, Rojas-Triana M, Paz-Ares J (2009) Plant hormones and nutrient signalling. *Plant Mol Biol* **69**: 361-373

- Russell S, Meadows LM, Russell RR** (2008) Microarray Technology in Practice. Academic Press, San Diego pp 449
- Sappl PG, Carroll AJ, Clifton R, Lister R, Whelan J, Harvey Millar A, Singh KB** (2009) The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *Plant J*
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM** (1998) Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiol* **116**:447-453
- Schiavon M, Wirtz, M, Borsa P, Quaggiotti S, Hell R y Malagoli M** (2007) Chromate differentially affects the expression of a high-affinity sulfate transporter and isoforms of components of the sulfate assimilatory pathway in *Zea mays* (L.) *Plant Biol* **9**: 662-671
- Schiefelbein JW, Masucci JD, Wang H** (1997) Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* **9**: 1089-1098
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S** (2005) Chromium toxicity in plants. *Environ Int* **31**: 739-753
- Shanker AK, Djanaguiraman M, Sudhagar R, Chandrashekar CN, Pathmanabhan G** (2004) Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R.Wilczek. cv CO 4) roots. *Plant Sci* **166**: 1035-1043
- Shanker AK, Djanaguiraman M, Venkateswarlu B** (2009) Chromium interactions in plants: current status and future strategies. *Metallomics* **1**: 375-383
- Sharma DC, Chatterjee C, Sharma CP** (1995) Chromium accumulation by barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* **25**: 241-251
- Sharma DC, Sharma CP** (1993) Chromium uptake and its effects on growth and biological yield of wheat. *Cereal Res Commun* **21**: 317- 21
- Sharma DC, Sharma CP, Tripathi RD** (2003) Phytotoxic lesions of chromium in maize. *Chemosphere* **51**: 63-68
- Shewry PR, Peterson PJ** (1974) The uptake and transport of chromium by barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* **25**:785-797
- Shi XL, Dalal NS** (1990) On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium (V) species. *Arch Biochem Biophys* **277**:342-350
- Shupack SI** (1991) The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environ Health Perspect* **92**: 7-11
- Skeffington RA, Shewry PR, Petersen PJ** (1976) Chromium uptake and transport in barley seedlings *Hordeumvulgare*. *Planta* **132**: 209-214
- Smyth G K, Yang Y H, Speed TP** (2003) Statistical issues in microarray data analysis. In: Functional Genomics: Methods and Protocols, M. J. Brownstein and A. B. Khodursky (eds.), Methods in Molecular Biology Vol. **224**, Humana Press, Totowa, NJ, pp 111-136
- Strasburger** (2004) Tratado de botánica. 35ª Ed. Omega. España .
- Taiz L y Zeiger E** (2006) Plant physiology 6ta Ed. Sinauer Associates Inc. Usa.
- Teale WD, Paponov IA, Palme K** (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 847-859

- Terry N** (1981) An analysis of the growth responses of *Beta vulgaris* L. to phytotoxic trace elements. II. Chromium. Final report to the Kearney Foundation of Soil Science. July 1975-June 1980
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Tripathi AK, Tripathi S** (1999) Changes in some physiological and biochemical characters in *Albizia lebbek* as bioindicators of heavy metal toxicity. *J Environ Biol* **20**: 93-98
- Tsukaya H** (2002) Leaf Development, *The Arabidopsis Book*, eds. C.R. Somerville and E.M. Meyerowitz, American Society of Plant Biologists, Rockville, MD, tab.0072, www.aspb.org/publications/arabidopsis/
- Tu C, Ma LQ** (2003) Effects of arsenate and phosphate on their accumulation by an arsenic-hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Plant and Soil* **249**:373-382
- Turner MA, Rust RH** (1971) Effects of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans. *Soil Sci Soc Am Proc* **35**: 755-8
- Ubeda-Tomas S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GTS, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ** (2008) Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol* **10**: 625–628
- Vajpayee P, Tripathi RD, Rai UN, Ali MB, Singh SN** (2000) Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* **41**: 1075–1082
- Van Lijsebettens M, Clarke J** (1998) Leaf development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **36**: 47–60
- Vázquez MD, PoschenriederCh, Barcelo J** (1987) Chromium (VI) induced structural changes in bush bean plants. *Ann Bot* **59**:427–38
- Wasilewska A, Vlad F, Sirichandra C, Redko Y, Jammes F, Valon C, Frei dit Frey N, Leung J** (2008) An update on abscisic acid signaling in plants and more. *Mol Plant* **1**: 198-217
- Werner T, Motyka V, Laucou V, Smets R, Van Onckelen H, Schmulling T** (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**: 2532-2550
- Wu H, Li L, Du J, Yuan Y, Cheng X, Ling HQ** (2005) Molecular and biochemical characterization of the Fe(III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* **46**: 1505-1514
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP** (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15
- Zayed AM, Lytle CM, Qian JH, Terry N** (1998) Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. *Planta* **206**: 293–299
- Zayed AM, Terry N** (2003) Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant and Soil* **249**: 139–156
- Zhang H, Forde B** (1998) An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* **279**: 407-409.

- Zhang H, Rider SD Jr, Henderson JT, Fountain M, Chuang K, et al.** (2008) The CHD3 remodeler PICKLE promotes trimethylation of histone H3 lysine 27. *J Biol Chem* **283**: 22637–22648
- Zou J, Wang M, Jiang W, Liu D** (2006) Effects of hexavalent chromium (VI) on root growth and cell division in root tip cells of *Amaranthus viridis* L. *Pak J Bot* **38**: 673-681
- Zou J, Wang M, Jiang W, y Liu D** (2006) Chromium accumulation and its effects on other mineral elements in *Amaranthus viridis* L. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **48**(1): 7–12