



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

**Instituto de Investigaciones Químico
Biológicas**

**“Regulación de la arquitectura de la raíz por cationes trivalentes y
su impacto en las respuestas a la deficiencia de fosfato”**

Presenta:

M. C. León Francisco Ruíz Herrera

**Tesis que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias en
Biología Experimental**

Director de Tesis

D.C. José López Bucio

Morelia, Michoacán,

Marzo 2012

Este trabajo está dedicado especialmente a mis papas, Ing. José Francisco Ruíz Vega y M. D. H. Marta Leticia Herrera Mares, a quienes pertenece esta Tesis

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la asesoría del D. C. José López Bucio. El presente trabajo recibió el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de becario 163652.

AGRADECIMIENTOS

Al D.C. José López Bucio

Por toda la dedicación a este trabajo y por su infinita paciencia durante el proceso de publicación del mismo, pero sobre todo por su apoyo incondicional y desinteresado en el desarrollo de mi carrera profesional dentro de la U.M.S.N.H.

Al comité Sinodal

A los D.C. Carlos Cervantes Vega, Elda Beltrán Peña, Miguel Martínez Trujillo y Lenin Sánchez Calderón, agradezco sus comentarios y sugerencias aportados al trabajo y a mi formación durante las evaluaciones de cada semestre.

A los D.C. Juan José Valdez Alarcón y Luis Herrera Estrella, por los valiosos comentarios aportados a la Tesis.

Al Colegio de Profesores del IIQB

Por haber contribuido a mi educación dentro de Universidad los últimos ocho años.

A mis compañeros de laboratorio y amigos

Randy, Javier, Ramón, Hexon, Quique, Chava-cano, Deyanira, Amira, Edith, Aaron, Alejandro y a los que se fueron D.C. Poncho y Alina, por haberme ayudado siempre que lo necesité, tanto en lo académico como en lo personal.

A todos los amigos y compañeros del IIQB, son muchos y algunos ya no se encuentran en el Instituto, entre ellos Sr. Doc. Prof. Arnoldo López, Idolina y Carmen; a mis amigos de toda la vida Mario, Tomas, Edith, Beto, Lalo e Ivan.

A mi familia

A mi papá Francisco y a mi mamá Marta, a mis hermanos Bismarck y Carla, a mis sobrinas Paola y Alexa, y a mis tíos y primos por su apoyo.

CONTENIDO

I.	RESUMEN	1
II.	ABSTRACT	3
III.	INTRODUCCIÓN	5
IV.	ANTECEDENTES	9
	4.1. Uso de fertilizantes	9
	4.2. Elementos de tierras raras	10
	4.3. Los REEs como fertilizantes	11
	4.4. Efecto de los REEs en la bioquímica y fisiología de las plantas	12
	4.5. Los REEs como contaminantes ambientales	14
	4.6. Suelos ácidos	15
	4.6.1. Síndrome de tolerancia al aluminio	16
	4.6.2. Especies químicas de aluminio en el suelo	17
	4.7. El fósforo en las plantas	17
	4.7.1. Captación y transporte de fósforo	18
	4.7.2. Transportadores de Pi	21
	4.8. Respuesta de las plantas a la deficiencia de fosfato	22
	4.8.1. Adaptaciones bioquímicas	22
	4.8.1.1. Solubilización del fósforo inorgánico	24
	4.8.1.2. Velocidad de translocación de fósforo	24
	4.8.2. Adaptaciones fisiológicas	25
	4.8.3. Adaptaciones morfológicas	26
	4.8.3.1. Regulación de la arquitectura de la raíz	26
	4.8.3.2. Genes Implicados en las respuestas a la deficiencia de P	27
	4.9. Funciones de las auxinas en la regulación de las respuestas a la deficiencia de fosfato	31
V.	JUSTIFICACIÓN	33

VI.	HIPÓTESIS	33
VII.	OBJETIVOS	34
	7.1. Objetivos generales	34
	7.2. Objetivos específicos	34
VIII.	RESULTADOS	35
	8.2. Capítulo I	36
	8.3. Capítulo II	56
	8.4. Capítulo III	78
IX.	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	126
X.	REFERENCIAS	132

INDICE DE FIGURAS

- Fig 1. Modelo de algunos procesos adaptativos de las plantas a la deficiencia de Pi 20
- Fig 2. Modelo de una posible ruta de señalización a la deficiencia de Pi en *Arabidopsis thaliana* 28
- Fig 3. Modelo de señalización propuesto para la toxicidad de lantánidos como cationes trivalentes (La^{3+} y Gd^{3+}) y de hidróxidos de aluminio [$\text{Al}(\text{OH})_2^+$ y $\text{Al}(\text{OH})_3$] 128

I. RESUMEN

Los suelos ácidos limitan la productividad de los cultivos a nivel mundial, debido principalmente a su alto contenido de aluminio (Al^{3+}) y a la baja disponibilidad de fósforo (P). El aluminio es un catión trivalente que interactúa con el fosfato para formar fosfatos de aluminio que son altamente insolubles y por lo tanto inaccesibles para su captación por el sistema radicular de las plantas.

Algunos cationes trivalentes se utilizan actualmente en la agricultura como aditivos de fertilizantes, entre ellos los elementos de tierras raras como el lantano (La^{3+}) y el gadolinio (Gd^{3+}). Aunque se han documentado resultados positivos en el crecimiento de las plantas por la aplicación de estos cationes en concentraciones bajas, cada vez es más evidente el efecto rizotóxico causado por La^{3+} y Gd^{3+} , lo que hacen necesarias investigaciones para conocer las interacciones de estos elementos con los nutrientes esenciales, principalmente el P, y sus consecuencias en la fisiología de las plantas. Una de las respuestas de la raíz que es común al aluminio, a elementos de tierras raras y a la deficiencia de P, es la rápida inhibición del crecimiento de la raíz primaria. Lo anterior sugiere que las plantas presentan mecanismos de respuesta similares al estrés causado por la toxicidad por cationes trivalentes y por la carencia de P. Alternativamente, los cationes podrían reaccionar directamente con el fosfato formando precipitados insolubles y causando por lo tanto síntomas de deficiencia de P.

Para lograr un mejor entendimiento entre las interacciones de los cationes trivalentes La^{3+} , Gd^{3+} y Al^{3+} con el fósforo, en este trabajo utilizamos a la planta modelo *Arabidopsis thaliana* en sistemas de crecimiento *in vitro*, evaluando los cambios en la arquitectura de la raíz y la expresión de genes inducibles por deficiencia de fosfato (*AtPT2* y *AtMGD2*) que ocurren en plantas silvestres tratadas con LaCl_3 , GdCl_3 y AlCl_3 . Los resultados obtenidos indican que el efecto del La^{3+} y Gd^{3+} en las raíces ocurre principalmente por la precipitación de fosfato en el medio. El análisis de las respuestas de las mutantes resistentes a deficiencia de fosfato *lpi* y *lpr* de *Arabidopsis* proporcionó evidencia de una interacción génica modulando las

respuestas al fosfato y a los cationes trivalentes. Por el contrario, análisis similares, realizados en plantas silvestres, mutantes y líneas reporteras, revelaron interacciones en la señalización por Al que son independientes de la precipitación del P. Por ejemplo, se evidenció que la modulación de la sensibilidad a auxinas en el periciclo para la formación de raíces laterales bajo tratamientos con Al depende del receptor de auxinas TIR1 y de sus homólogos AFB2 y AFB3. Así también, como de los factores de transcripción ARF7 y ARF19, debido a que las mutantes *tir1-1 afb2-1 afb3-1* y *arf7-1 arf19-1* forman escasas raíces laterales, en comparación con plantas silvestre, en respuesta a este catión. Estos resultados sugieren que los efectos del Al y de la deficiencia de P sobre el periciclo comparten mecanismos de señalización a través de una ruta regulada por auxinas. Un hallazgo interesante fue que las mutantes *arf7-1 arf19-1* son resistentes a la inhibición de la raíz primaria por Al, lo que indica que el meristemo radicular activa mecanismos de señalización específicos que difieren del periciclo.

Los resultados de este trabajo indican que los cationes trivalentes (La^{3+} , Gd^{3+} y Al^{3+}) pueden afectar el crecimiento de las plantas a través de diversos mecanismos que incluyen la precipitación de P, alteraciones en la arquitectura de la raíz y la inducción de genes que participan en la captación de P. Dichos procesos son específicos para cada catión y pueden ocurrir mediante rutas de señalización con elementos comunes o distintos, dependiendo del contexto celular en la raíz.

II. ABSTRACT

Acid soils limit crop productivity worldwide, mainly due to high concentration of aluminum (Al^{3+}) and low phosphorus (P) availability. Aluminum is a trivalent cation that interacts with phosphate to form aluminum phosphates that are highly insoluble and unavailable for uptake by the root.

Certain cations are currently used in agriculture as fertilizer additives, including the rare earth elements lanthanum (La^{3+}) and gadolinium (Gd^{3+}). Although positive results have been documented in the growth of plants by the application of these cations in low concentrations, it is increasingly appreciated that they may cause rizotoxic effects. Additional research efforts are thus necessary to understand the interactions of trivalent cations with the essential nutrients, especially P and its impact on plant physiology.

One of the responses of the root that is common to aluminum, rare earth elements and phosphorus deficiency, is a rapid inhibition of primary root growth. This suggests that plants might have similar mechanisms to cope with stress caused by trivalent cation toxicity and phosphorus deficiency. Alternatively, the cations could interact directly with phosphorus to form insoluble precipitates and thereby causing symptoms of P deficiency in plant tissues.

To gain a better understanding of the interactions between trivalent cations La^{3+} , Gd^{3+} and Al^{3+} with phosphorus, in this work we used the model plant *Arabidopsis thaliana* grown *in vitro* to evaluate changes in root architecture and the expression of genes inducible by phosphate deficiency (*AtPT1*, *AtPT2*, and *AtMGD2*) occurring in plants treated with LaCl_3 , GdCl_3 , and AlCl_3 . Our results indicate that the effects of La^{3+} and Gd^{3+} modulating root system architecture occurs primarily by the precipitation of phosphate in the medium. The analysis of the responses of *Arabidopsis* phosphate deficiency resistant mutants *lpi* and *lpr* provides evidence for a genetic interaction modulating responses to phosphate and trivalent cations. In contrast, similar analysis performed on wild-type seedlings and in mutant or transgenic *Arabidopsis* lines in response to aluminum revealed novel interactions in

plant signaling that are independent of the precipitation of P. For example, it was found that modulating auxin sensitivity in pericycle cells to form lateral roots under aluminum treatment depends on the auxin receptor TIR1 and its homologues AFB2 and AFB3, as well as the transcription factors ARF7 and ARF19, since the mutants *tir1-1*, *tir1-1 afb2-1 afb3-1* and *arf7-1 arf19-1* developed fewer lateral roots than WT seedlings in response to Al³⁺. These results suggest that the effects of aluminum and phosphate deficiency interact at the level of auxin signaling. An interesting finding was that the double mutant *arf7-1 arf19-1* defective on auxin-related transcription factors was resistant to inhibition of primary root by aluminum, thus indicating that active root meristems specifically sense the Al³⁺ signal to modulate cell proliferation.

Taken together, our results indicate that trivalent cations La³⁺, Gd³⁺ and Al³⁺ can affect plant growth through various mechanisms including precipitation of P, alterations in root architecture and the induction of genes that participate in P uptake. These processes are cation-specific and can occur through signaling routes with common or independent elements depending on the particular cell context in the root.

III. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es el onceavo elemento más abundante en la corteza terrestre. Aunque el P total en el suelo es abundante, por lo general está presente en formas químicas no disponibles para ser captadas por las plantas (Schachtman *et al.*, 1998; White y Hammond, 2008). La disponibilidad de P es limitante en la mayoría de los suelos del mundo, incluyendo los arenosos semiáridos, los de origen volcánico, los alcalinos de las áreas subtropicales, así como los ácidos y anegados ricos en materia orgánica de los trópicos y subtrópicos (Oberson *et al.*, 2001; Tiessem, 2008). A nivel mundial se calcula que los suelos con problemas de disponibilidad de P cubren una extensión de 2,000 a 5,700 millones de hectáreas (Oberson *et al.*, 2001; Hinsinger, 2001; Cakmak, 2002).

La mayor parte del P en el suelo (más del 99%) está presente como fosfatos, ya sea como fosfatos inorgánicos (poza o reservorio inorgánico) o fósforo orgánico (poza o reservorio orgánico). La forma inorgánica soluble, los ortofosfatos (Pi), está disponible para ser captada por las plantas. El Pi tiene carga negativa, reaccionando fácilmente con cationes de la superficie de las partículas del suelo (Al^{3+} y Fe^{3+} en suelos ácidos y Ca^{2+} y Mg^{2+} en alcalinos), disminuyendo su movilidad y solubilidad en agua, respectivamente (Bieleski, 1973; Tiessen, 2008). El Pi en el suelo también se fija al reservorio orgánico en forma de ácidos nucleicos, fosfolípidos y, principalmente, como *myo*-inositolhexacisfosfato, los cuales no están disponibles para las plantas. El Pi fijo en la poza orgánica constituye entre el 20 y el 80% del total del fósforo encontrado en las capas superficiales del suelo (horizonte O u orgánico). Estos reservorios de Pi deben ser solubilizados, degradados y mineralizados para liberar Pi soluble y hacerlo disponible para la nutrición vegetal (Schachtman *et al.*, 1998; White y Hammond, 2008).

La disponibilidad de P es uno de los principales factores limitantes para el crecimiento y productividad vegetal, tanto en sistemas agrícolas como naturales. La concentración del P en los tejidos vegetales varía del 0.1 al 0.5% del peso seco (Vance *et al.*, 2003). Las plantas adquieren el P de la solución del suelo a través de

su sistema radicular en forma de fosfatos inorgánicos (Pi) de tipo ortofosfatos, principalmente como H_2PO_4^- y en menor medida como HPO_4^{2-} . La concentración de Pi en la solución del suelo va de 0.1 a 10 μM , un nivel bajo si lo comparamos con la concentración requerida por las plantas que va de 5 a 10 mM (Schachtman *et al.*, 1998; Hinsinger, 2001; Vance *et al.*, 2003; Kirkby y Johnston, 2008).

La disponibilidad de P se ve afectada por diversos factores: principalmente la baja tasa de difusión (10^{-12} a 10^{-5} $\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$), su interacción con componentes inorgánicos en el suelo, su rápida conversión por la actividad de microorganismos a formas orgánicas que no pueden ser captadas por las plantas y finalmente por la temperatura y humedad del suelo (Kirkby y Johnston, 2008). Los iones de aluminio (Al) y hierro (Fe), los cuales predominan en los suelos ácidos del mundo, interactúan estrechamente con el P formando compuestos insolubles que no pueden ser asimilados por las plantas. El P también interactúa con los iones de calcio (Ca) y magnesio (Mg) presentes en suelos alcalinos, causando la precipitación del P. Estas interacciones son influidas por el pH de la solución del suelo, debido a que el P esta principalmente disponible en el intervalo de pH de 6.5 a 7.5 (Holford, 1997; Schachtman *et al.*, 1998; Raghothama, 1999; Hinsinger, 2001; Vance *et al.*, 2003; Marschner, 2011).

El P es necesario para el crecimiento y reproducción de las plantas, por ello es considerado un macronutriente esencial. La sintomatología típica de la carencia de P en las plantas comienza como un cambio gradual en la coloración del follaje, iniciando como un verde oscuro en las hojas jóvenes para después tornarse en púrpura en las hojas viejas, lo anterior como consecuencia de la acumulación de antocianinas. Las plantas carentes de P también muestran un crecimiento reducido debido a los cambios en la velocidad de división y elongación celular, una reducción en el tamaño y el número de flores y semillas, así como cambios en la fenología, disminuyendo en gran medida la productividad de las plantas (Bould *et al.*, 1986; Benton, 2012).

En la mayoría de los sistemas agrícolas, la cantidad de Pi soluble disponible en el suelo no es suficiente para sustentar una velocidad de crecimiento rápida de los cultivos. Alcanzar altos niveles de productividad en suelos con poca disponibilidad

de Pi requiere un suministro constante de Pi en forma de fertilizantes. La tasa de recuperación del Pi aplicado como fertilizante por las plantas es muy baja, debido a que más del 80% queda inmovilizado e inasequible (Holford, 1997; Schachtman *et al.*, 1998). Para compensar la baja tasa de captura por las plantas, los agricultores frecuentemente aplican un exceso de fertilizantes con Pi, para garantizar la productividad de los cultivos (Goldstein, 1992).

Los yacimientos de P, también llamados rocas de fosfato, son la principal fuente de materia prima para la fabricación de fertilizantes. Las reservas totales de este recurso natural no renovable se estiman en 45,780 millones de toneladas; sin embargo, tomando en cuenta el aumento permanente en el uso de fertilizantes, los depósitos de la roca fosfórica están disminuyendo rápidamente (Cisse y Mrabet, 2004). Esta situación ha contribuido a la discusión de una posible “crisis de fosfato” en un futuro (Abelson, 1999). Las consecuencias negativas de dicha crisis (depósitos de fosfato cada vez más pequeños en ambientes agrestes con costos de minería cada vez más altos) han provocado la necesidad urgente de obtener variedades de cultivos con requerimientos de fertilizantes reducidos para aumentar la productividad.

De acuerdo con algunas proyecciones, la población mundial está creciendo a un ritmo de más de 160 personas por minuto; lo que ocasionaría que para el año 2050 la población mundial sea de de 10,000 millones de habitantes (Hoisington *et al.*, 1999; Cakmak, 2002). La consecuencia de tal explosión demográfica, sería que para alimentar a dicha población mundial sería necesario incrementar masivamente la producción de alimentos. El Modelo internacional para el Análisis de las Políticas de los Productos Agrícolas y el Comercio (*The International Model for Policy Analysis of Agricultural Commodities and Trade*, IMPACT) ha estimado que la producción de cereales a nivel mundial se deberá incrementar en un 57% entre 1997 y el 2050 (Hoisington *et al.*, 1999; Rosegrant y Cline, 2003; Rosegrant *et al.*, 2008). Uno de los principales problemas para poder lograr un incremento en la producción de alimentos será la disponibilidad de suelos arables y fértiles adicionales; se estima que el área utilizada para la producción de cultivos sólo se puede expandir un 10% (Rosegrant *et al.*, 2001; Cakmak, 2002) debido a las áreas perdidas para la

agricultura, principalmente por la urbanización y la escasez de agua (Scherr, 1999). Por lo tanto, para hacer frente a la demanda de alimentos, el objetivo principal sería incrementar la productividad por unidad de área cultivable. Actualmente, grandes cantidades de fertilizantes minerales son aplicados para mejorar la calidad y productividad de los cultivos; sin embargo, esto tiene efectos adversos en el ambiente. Estrategias como la aplicación de estiércol, el uso de sistemas de rotación de cultivos basados en legumbres y el reciclaje de los residuos de los cultivos, son recomendadas para mejorar la fertilidad del suelo, así como incrementar la eficiencia en el uso de los nutrientes y disminuir el uso de fertilizantes (FAO, 2000; Yadav *et al.*, 2000; Timsina y Connor, 2001). Sin embargo, estas estrategias no serán suficientes para mantener la producción agrícola al nivel que se requiere para enfrentar la necesidad de alimentos en el futuro.

IV. ANTECEDENTES

4.1. Uso de fertilizantes

Las plantas son los productores primarios en los ecosistemas y por lo tanto requieren niveles adecuados de nutrientes minerales para lograr un crecimiento y productividad óptimos. Entre los nutrientes requeridos para el crecimiento de las plantas, el N, K y P son los principales componentes de los fertilizantes y representan un porcentaje significativo de los costos de producción. En las plantas de interés agrícola, en las cuales la biomasa total o la producción de granos son componentes clave de la productividad, el suministro de Pi debe ser mantenido en niveles adecuados. Se estima que una nutrición subóptima de P puede conducir a pérdidas del 10 al 15% de la productividad máxima (Raghotama, 1999; Shenoy y Kalagudi, 2005). Para evitar estas pérdidas, una práctica común en la agricultura intensiva es aplicar fertilizantes que contienen Pi. Algunas proyecciones indican que para incrementar la capacidad productiva de los cultivos, y así satisfacer las demandas mundiales de alimentos para el año 2020, el uso de fertilizantes debe incrementarse de 144 millones de toneladas en 1990 a 208 millones en 2020 (Bumb y Baanante, 1996; FAO, 2000). Por otro lado, Byrnes y Bumb (1998) consideran que un aumento en la productividad también provocaría una disminución de los nutrientes del suelo, lo que ocasionaría un incremento en el consumo de fertilizantes de 208 millones de ton a 300 millones (Cakmak, 2002). A pesar de las cantidades excesivas de fertilizantes con Pi actualmente utilizadas, la productividad de los cultivos no es la esperada. Lo anterior se debe a la alta fijación del Pi en el suelo y a la baja tasa de recuperación de Pi total aplicado por los cultivos (10-15%). Esta tasa de recuperación podría incrementarse hasta un 50%, si se llevaran a cabo aplicaciones periódicas y estacionales de fertilizante (Syers *et al.*, 2008).

4.2. Elementos de tierras raras

En China, además de los macronutrientes esenciales, una práctica común en la agricultura es el suministro de elementos de tierras raras (*rare earth elements*, REEs) a los fertilizantes. La industria de fertilizantes en China produce un total de 5 millones de toneladas de compuestos suplementados con REEs, lo cual es suficiente para fertilizar 6.68 millones de ha de tierras cultivables (Anon, 1998; Bradsher, 2011; Meyer y Rodrigues, 2011). El consumo de REEs ha alcanzado 1,100 toneladas por año, principalmente con propósitos agrícolas (Yan, 1999; Meyer y Rodrigues, 2011).

Los REEs son miembros del Grupo IIIA de la tabla periódica, tienen propiedades químicas y físicas similares e incluyen a los 15 lantánidos (Ln) además del escandio (Sc) y el itrio (Y). A pesar de su nombre, los REEs están ampliamente distribuidos en el ambiente. La abundancia relativa en la corteza terrestre varía de $66 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ del cerio (Ce), $40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ del neodimio (Nd), $35 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ del lantano (La) al $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de tulio (Tm), con excepción del prometio (Pm) que es extremadamente raro. Así, que la abundancia ambiental del La es similar a la de otros elementos, como el Cu o el Zn; incluso la abundancia de los REEs más escasos, como el Lu y el Tm, es superior a la de otros elementos como el Cd y el Se (Greenwood y Earnshaw, 1984; Tyler, 2004).

Los REEs generalmente se presentan como cationes trivalentes. El radio iónico efectivo disminuye gradualmente desde el del La^{3+} (103.2 pm) hasta el del Lu^{3+} (86.1 pm). Los radios iónicos del La^{3+} y del Gd^{3+} (93.5 pm) son similares a los del catión divalente Ca^{2+} (100 pm) y los efectos biológicos de estos elementos se han atribuido a esta similitud (Evans, 1990). Los iones de los elementos más pequeños de la serie, llamados elementos ligeros de tierras raras (*'light' rare earth elements*, LREEs), y los medianos (*'mean' rare earth elements*, MREEs), como el La y el Gd, respectivamente, forman complejos estables con aniones electronegativos, como el PO_4^{3-} (Tyler, 2004). Los REEs en la naturaleza se encuentran frecuentemente como minerales de fosfatos. Entre los principales minerales que contienen Ln se encuentran la monacita [$\text{Ln}, \text{Th}(\text{PO}_4)$] (Forster, 1998), la xenotima [$(\text{Y}, \text{Ln})(\text{PO}_4)$]

(Sabourdy *et al.*, 1997; Alex *et al.*, 1998; Masau *et al.*, 2000) y las apatitas (fluorofosfatos) (Braun *et al.*, 1993; Bauluz *et al.*, 2000).

4.3. Los REEs como fertilizantes

Como sucede con la mayoría de los metales pesados en solución, concentraciones de REEs mayores que las que se encuentran naturalmente en los organismos, presentan efectos tóxicos. Sin embargo, existen reportes que respaldan que pequeñas cantidades de REEs ($\sim 10 \mu\text{M}$) favorecen la producción de biomasa y el crecimiento de las plantas vasculares (El-Ramady, 2010 a, b). Desde hace más de 30 años, con el fin de mejorar la nutrición de los cultivos, mezclas de REEs en los fertilizantes son ampliamente utilizadas en la agricultura en China (El-Ramady, 2010 a,b). Los primeros reportes del uso de REEs como fertilizantes han mostrado diversos problemas. La mayoría de dichos estudios se han publicado en revistas locales y son escasos los reportes disponibles para el público internacional. La traducción de los artículos es ambigua y poco clara, mientras que los detalles sobre los diseños experimentales, metodologías, análisis estadísticos y resultados están generalmente incompletos (Brown *et al.*, 1990). Así que se piensa que dichos fertilizantes podrían haber contenido elementos traza, como el molibdeno o el boro, que serían los responsables de los efectos benéficos reportados. Otro problema en las evaluaciones en campo es que los REEs generalmente se aplican junto con compuestos nitrogenados, como la urea, por lo que en realidad se están evaluando los efectos de los REEs junto con los del nitrógeno (Xu *et al.*, 2002). Además, los reportes de la relación dosis-respuesta eran prácticamente nulos hasta hace apenas 10 años (Wang *et al.*, 2001).

En el mercado internacional existen tres tipos de fertilizantes provenientes de China suplementados con REEs: el Changle-Yizhisu (CY), que contiene REEs en forma de nitratos; el Nongle (NL), en forma de cloruros y óxidos; y el MAR (mezcla de aminoácidos y tierras raras), el cual contiene 17 aminoácidos junto con La, Ce, Pr y Nd (Pang *et al.*, 2002). En China, la principal fuente de REEs para uso agrícola son extractos de vetas minerales, que incluyen monacita, xenotima y apatitas (Xiong,

1995). Actualmente se aplican dosis de REEs superiores a los $0.23 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$ (Xu *et al.*, 2002). Los REEs son aplicados anualmente en forma de spray a las semillas y en el follaje.

4.4. Efecto de los REEs en la bioquímica y fisiología de las plantas

Los REEs han sido utilizados como trazadores en diversos estudios fisiológicos. El Dy^{3+} y el Eu^{3+} se ensayaron para caracterizar los sitios de unión a Ca^{2+} en el fotosistema II de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Burda *et al.*, 1995). Varios cationes trivalentes de lantánidos se han usado en la evaluación del apilamiento de las membranas de los tilacoides y la distribución espacial de los complejos proteicos en los fotosistemas I y II (Karukstis y Gruber, 1986; Mills y Hind, 1978). Con el Gd^{3+} se ha evaluado la liberación de calcio por canales en el retículo endoplasmático de la zarzaparrilla (*Bryonia dioica*), los cuales fueron bloqueados efectivamente por el Gd^{3+} (Klusener *et al.*, 1995). Estos últimos iones se han utilizado como inhibidores de canales de calcio involucrados en la exudación del xilema en el simplasto de las raíces de maíz (*Zea mays*) (Schwenke y Wagner, 1992), así como en otros estudios de investigación fisiológica que involucran canales de calcio, por ejemplo la liberación de Ca^{2+} vacuolar (Johannes *et al.*, 1992; Klusener *et al.*, 1995). Otros iones de REEs, por ejemplo el La^{3+} , también se han utilizado como bloqueadores para evaluar la importancia de los canales de Ca^{2+} en plantas (Lewis y Spalding, 1998).

Por otro lado, se ha reportado que bajas concentraciones de iones de REEs presentan efectos benéficos en algunas funciones fisiológicas de plantas. El reemplazo del Ca^{2+} por iones de REEs no siempre inhibe la actividad de enzimas dependientes de calcio (Morishima *et al.*, 1986). Algunos iones de lantánidos son capaces de reemplazar los iones endógenos de Ca^{2+} de la peroxidasa en rábano (*Armoracia rusticana*), manteniendo la estructura y actividad de la enzima (Morishima *et al.*, 1986). Sin embargo, a diferencia de otras proteínas de unión a Ca^{2+} , la afinidad de la peroxidasa por iones de Ln^{3+} es menor que la de los iones de Ca^{2+} , así que los iones de Ln^{3+} son fácilmente sustituidos por los de Ca^{2+} (Morishima

et al., 1986). Los iones de Eu^{3+} son capaces de reemplazar a los de Ca^{2+} en la calmodulina, manteniendo su capacidad para activar a la NAD-cinasa (EC 2.7.1.23, NADK, enzima que transforma el NAD en NADP) en plántulas de chícharo (*Pisum sativum*) (Amann *et al.*, 1992). Los iones de Nd^{3+} , al tener un radio iónico similar al de los iones de Ca^{2+} , reemplazan a los de Ca^{2+} en las membranas celulares de nabo (*Brassica napus*) bajo condiciones de deficiencia de calcio (Wei y Zhou, 2000). He y Loh (2000) reportaron que una combinación de $0.5 \mu\text{M}$ de nitrato de cerio y $0.5 \mu\text{M}$ de nitrato de lantano es efectiva para promover la floración en *Arabidopsis thaliana*. Bajas concentraciones de LaCl_3 en una solución nutritiva promueven la actividad de ATPasa y la velocidad de fotofosforilación en cloroplastos de tabaco (Chen *et al.*, 2000). Los autores proponen que a una concentración adecuada los iones de La^{3+} aceleran las reacciones luminosas de la fotosíntesis *in vivo*. El LaCl_3 promueve la activación de la ribulosa bisfosfato carboxilasa (RuBPasa, también llamada Rubisco) en tabaco, incrementado la fijación de CO_2 . Se han reportado más efectos promotores sobre el crecimiento y desarrollo vegetal con iones de La^{3+} que con los de Gd^{3+} (El-Ramady, 2010a,b).

Otros estudios realizados indican que los REEs incrementan la actividad del fotosistema II en el helecho *Dicranopteris dichotoma* al unirse a la clorofila (Hong *et al.*, 1999; 2001). En espinaca (*Spinacia oleracea*) se ha sugerido que los iones de Ce^{3+} entran al cloroplasto, se unen a la clorofila y reemplazan a los iones de Mg^{2+} para formar Ce-clorofila. El Ce^{3+} estimula el crecimiento de la espinaca, incrementa el contenido de clorofila y la velocidad de fotosíntesis (Hong *et al.*, 2002; El-Ramady 2010 a).

Los resultados del efecto benéfico de los iones de REEs en la fotosíntesis de las plantas parcialmente contradicen otra serie de experimentos realizados en campo, los cuales han mostrado un efecto negativo de dichos iones en las plantas (Ghanotakis *et al.*, 1985; Bakou *et al.*, 1992; Bakou y Ghanotakis, 1993; Ono, 2000, Tyler, 2004; El-Ramady 2010a,b). Estas discrepancias parecen ser el resultado de las diferencias y a menudo, mayores concentraciones de iones REEs aplicadas en los estudios donde se observan efectos inhibitorios. Así, otros investigadores han

reportado efectos tóxicos en las plantas (Diatloff *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 2002). En diversos estudios se han observado efectos dañinos del exceso de REEs en la biomasa de los microorganismos del suelo (Chu *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004), en la transformación del nitrógeno (Xu y Wang, 2001; Zhu *et al.*, 2002) y la evolución del CO₂ (Chu *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2004). Sin embargo, en los últimos 15 años la aplicación de los REEs no sólo se ha limitado a China sino también a Japón, Rusia, Estados Unidos, etc., por lo que existe una preocupación creciente respecto a los efectos adversos de la acumulación de REEs en los suelos (Chu *et al.*, 2007).

4.5. Los REEs como contaminantes ambientales

El uso de REEs en varias industrias así como su aplicación creciente en la agricultura plantea un problema ambiental potencial por la acumulación en los suelos de estos elementos (Hu *et al.*, 2002). La mayoría de los REEs que se aplican directamente en solución a las semillas o en forma de aerosol a los cultivos eventualmente llegarán al suelo. También la producción y uso de fertilizantes con fosfato causan emisiones de REEs tanto al suelo como a la atmósfera (Volokh *et al.*, 1990). El superfosfato, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2(\text{aq})$, fertilizante producido por la reacción entre ácido sulfúrico concentrado con apatita, $\text{Ln}\cdot\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{s})$, en la península de Kola (norte de Rusia) contiene 2.6 mg de REEs por gramo de producto final (Todorovsky *et al.*, 1997). A una tasa normal de fertilización de P de $300 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{año}^{-1}$, los suelos tratados con este producto podrían contener más REEs como contaminantes que los que intencionalmente se aplican en la agricultura en China. Además, la fosfogibsite rica en REEs, uno de los principales subproductos industriales de la producción de fertilizantes con P, también se utiliza en la agricultura, principalmente en Rusia (Gorbunov *et al.*, 1992).

Otra fuente de contaminación por REEs es la industria petroquímica. Los productos a partir de los cuales se realiza el craqueo catalítico del petróleo (proceso petroquímico por el cual moléculas orgánicas simples, como hidrocarburos ligeros, se producen a partir de moléculas orgánicas complejas, como kerógenos e

hidrocarburos pesados), son minerales ricos en REEs (por ejemplo, monacita). Los sedimentos marinos en las costas de California E.E.U.U. están claramente contaminados con REEs debido a dicha actividad petrolera (Olmez *et al.*, 1991) y probablemente lo mismo sucede en otras partes del mundo. Evidencias recientes indican que una gran cantidad de actividades humanas, como la combustión de hidrocarburos fósiles, la incineración de desperdicios, procesos metalúrgicos, etc., provocan la emisión de REEs al aire, agua y suelo, lo que resulta en efectos adversos para la vida vegetal (Meyer y Rodrigues, 2011).

4.6. Suelos ácidos

En sentido estricto se considera que un suelo es ácido si tiene un pH menor a 6.6, aunque existen diversos grados de acidez (Tabla 1). Los efectos perjudiciales de la acidez no se manifiestan hasta que se alcanzan valores de pH inferiores a 5.5 debido a la toxicidad del aluminio y a la baja biodisponibilidad de los elementos nutrientes, como el P (Porta *et al.*, 2003). Aproximadamente el 30% de los suelos en el mundo son ácidos, principalmente en regiones tropicales y subtropicales. La productividad de cultivos de primera necesidad, y en particular de granos, se ve impactada negativamente en estas regiones. Por ejemplo, la producción del 20% del maíz y 13% del arroz a nivel mundial ocurre en suelos ácidos, limitando la productividad de los cultivos en varios países en vías de desarrollo donde la producción de alimentos es crítica (Kochian *et al.*, 2004; Horst *et al.*, 2007).

La disponibilidad de Pi es particularmente escasa en los suelos ácidos anegados de los trópicos y subtrópicos, debido a su fijación con óxidos de Al y Fe en la superficie de las arcillas minerales. Por lo tanto, la disponibilidad de Pi es uno de los principales factores limitantes de la productividad de los cultivos en suelos ácidos (Chen *et al.*, 2000). Debido a la baja disponibilidad de este nutriente mineral esencial, las plantas han desarrollado numerosos mecanismos adaptativos para obtener el Pi del suelo. Estas respuestas incluyen un aumento en la proliferación de las raíces laterales, pelos radiculares más largos y abundantes y la asociación con hongos micorrícicos arbusculares (Raghothama, 1999). Cada vez resulta más difícil

la agricultura en los suelos ácidos y se ha recurrido a diferentes estrategias correctivas como la aplicación de cal para aumentar el pH, y el uso de fertilizantes fosfatados se ha convertido en una práctica fundamental.

Tabla 1. Clasificación de los suelos ácidos establecidas por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) (tomado de Porta *et al.*, 2003).

pH	Evaluación	Efectos
<4.5	Extremadamente ácido.	Condiciones muy desfavorables.
4.5 – 5.0	Muy fuertemente ácido	Toxicidad por Al ³⁺ y Mn ²⁺ .
5.1 – 5.5	Fuertemente ácido	Exceso de Co, Cu, Fe, Mn, Zn. Deficiencia de Ca, K, N, Mg, Mo, P, S. Suelos sin carbonato de calcio. Actividad bacteriana escasa.
5.6 – 6.0	Medianamente ácido	Intervalo adecuado para la mayoría de los cultivos.
6.1 – 6.5	Ligeramente ácido	Máxima disponibilidad de nutrientes.
6.6 – 7.3	Neutro	Mínimos efectos tóxicos. Por debajo de pH 7.0 el carbonato de calcio no es estable en el suelo.

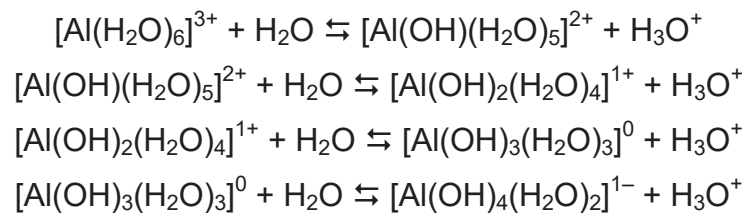
4.6.1. Síndrome de toxicidad por aluminio

Además de la deficiencia de fósforo, la toxicidad por aluminio (Al) en suelos ácidos es el factor más importante que determina la composición de la vegetación natural y limita la productividad de los cultivos. Se estima que a nivel mundial del 30 al 40% de la productividad de las tierras cultivables está limitada por la acidez del suelo ocasionada por el aluminio (Uexküll and Mutert, 1995; Eswaran *et al.*, 1997). El Al puede estar presente en la solución del suelo en formas mononucleares y polinucleares. Aunque la función específica del polímero hidroxilado Al₁₃ en la toxicidad por Al no es del todo clara, diferentes autores coinciden en que las especies mononucleares de Al, particularmente Al³⁺, más que Al(OH)²⁺ y Al(OH)₂⁺, son las especies de aluminio más fitotóxicas (Kinraide, 1991). Se considera que los complejos orgánicos e inorgánicos de Al son menos activos (Horst *et al.*, 2007). Además de la toxicidad por Al existen otros factores que afectan el crecimiento de las plantas en los suelos ácidos. Este “síndrome” de toxicidad por Al en suelos ácidos puede ser exacerbado por niveles tóxicos de Mn y Fe, así como por

deficiencias en diversos elementos minerales esenciales, siendo el P el principal nutriente limitante (Ma, 2007).

4.6.2. Especies químicas del aluminio en el suelo

El Al en solución acuosa se ioniza rápidamente dando lugar a especies monoméricas de Al (Navarro, 2003). Un ión monomérico con seis moléculas de agua da lugar al ionizarse a los siguientes productos:



La ionización avanza y genera iones H_3O^+ y los iones hidroxialumínicos hidratados que se forman tienden a polimerizarse. La solución del suelo mantiene en equilibrio iones Al^{3+} y $\text{Al}(\text{OH})_n^{(3-n)+}$ que, al hidrolizarse, liberan protones que provocan una disminución del pH.

El comportamiento del Al monomérico en el suelo condiciona las características de los suelos ácidos. Existen formas intercambiables, el Al^{3+} , junto con las que resultan de su hidrólisis, $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, fase sólida $\text{Al}(\text{OH})_3$ (gibbsite) y formas aniónicas, tales como $\text{Al}(\text{OH})_4^-$ y $\text{Al}(\text{OH})_5^{2-}$. La existencia en forma soluble de las distintas especies de Al depende del intervalo de pH considerado y de la fuerza iónica. Debido a que el Al sólo actúa con un único estado de valencia, la presencia de unas especies u otras dependerá exclusivamente del pH (Paterson *et al.*, 1991).

4.7. El fósforo en las plantas

En los ecosistemas, la productividad primaria, la estructura y la diversidad (número de especies y heterogeneidad) está limitada en gran medida por la disponibilidad de P (Tiessen, 2008). Debido a que el P es un elemento esencial

durante el desarrollo del ciclo de vida vegetal, las plantas se han adaptado a cambios en la disponibilidad de Pi en los ecosistemas. Aunque la cantidad total de P en la corteza terrestre es elevada, su concentración en suelo generalmente varía de 100 a 300 mg P·kg⁻¹ de suelo, o 200 a 600 kg P·ha⁻¹ (Mengel, 1997). Para mantener una adecuada productividad de los cultivos es necesario fertilizarlos con P.

A pesar de las limitaciones antes mencionadas, el Pi es indispensable en todos los procesos celulares, no solo de las plantas, sino de los seres vivos en general. Durante el desarrollo, la reproducción y la adaptación al ambiente de las plantas vasculares, el P es esencial en la regulación post-traducciona de las enzimas y el control de las rutas de transducción de señales al participar en la fosforilación y desfosforilación de proteínas. El Pi también está involucrado en eventos fisiológicos como la fotosíntesis, la respiración, la asimilación de carbono y nitrógeno y metabolismo de lípidos. Además, el Pi es un componente estructural de diversas biomoléculas tales como ácidos nucleicos, fosfolípidos y otros compuestos necesarios para el metabolismo energético como el ATP y el NADPH. Por lo tanto, el Pi es indispensable para el crecimiento, desarrollo, fertilidad y reproducción no solo de las plantas, sino de todos los seres vivos (Abelson, 1999; Ticcioni y Abel, 2004).

4.7.1. Captación y transporte de fósforo

Las formas disponibles de Pi (fósforo inorgánico, principalmente ortofosfatos) en el suelo son rápidamente tomadas por las raíces en crecimiento, generando un área circundante llamada “zona de explotación” con escaso Pi disponible, dicha zona se recargará lentamente por difusión y mineralización (Hinsinger, 2001). El Pi entra a través de las membranas de las células de la epidermis y se transporta de manera simplástica en contra del gradiente de concentración, debido a que la concentración de Pi en el suelo rara vez supera los 10 μM (en general está en un rango de 1 a 2 μM), mientras que en el interior de las células puede alcanzar concentraciones milimolares (Raghothama, 1999). La energía requerida para el transporte del Pi es proporcionada por ATPasas que generan un gradiente de H⁺ en la membrana celular. Este último gradiente es utilizado para co-transportar Pi al interior de la

célula. Se ha propuesto que existe un mecanismo dual para la captación de fosfato, el cual se caracteriza por la actividad constitutiva de transportadores de Pi de baja afinidad que operan a altas concentraciones de Pi (milimolar,) y la activación de genes que codifican transportadores de Pi de alta afinidad, que funcionan a concentraciones bajas de Pi (micromolar) (Schachtman *et al.*, 1998; Raghothama, 1999).

Dentro de la raíz, el Pi se transporta al xilema para su movilización al tallo, las hojas, las flores y los frutos. Se ha propuesto que la proteína PHOSPHATE1 (PHO1) (que no es un transportador de fosfato, sino una proteína con dominio terminal SPX de unión la subunidad G_{β}) está implicada en la carga de Pi al xilema mediante un mecanismo aún desconocido (Duan *et al.*, 2008). La proteína PHO1 se expresa en el tejido vascular de la raíz y la mutante *pho1* hiperacumula Pi en la raíz debido a su incapacidad para cargar el fosfato al xilema (Poirier *et al.*, 1991; Hamburger *et al.*, 2002). Por último, el Pi transportado a las hojas deja el xilema y se distribuye a los tejidos restantes. En condiciones de senescencia y de carencia de Pi, el fosfato es movilizado desde las hojas viejas a las jóvenes y a otros tejidos. En este proceso, la proteína PHOSPHATE2 (PHO2) y el microRNA mir399 son los reguladores clave (Delhaize y Randall, 1995; Fujii *et al.*, 2005; Chiou, 2007).

Una vez dentro de las células, el Pi puede seguir diferentes vías (Fig. 1): a) utilización en las vías de biosíntesis de fosfolípidos y ácidos nucleicos; b) transporte a los plastidios y/o las mitocondrias para ser utilizado en procesos metabólicos (p. ej., síntesis de ATP), c) transporte a las vacuolas para su almacenamiento; o d) movilización a otras células (Rausch y Bucher, 2002). La ruta que siga el Pi dependerá del tipo de tejido y de los requerimientos metabólicos de la célula.

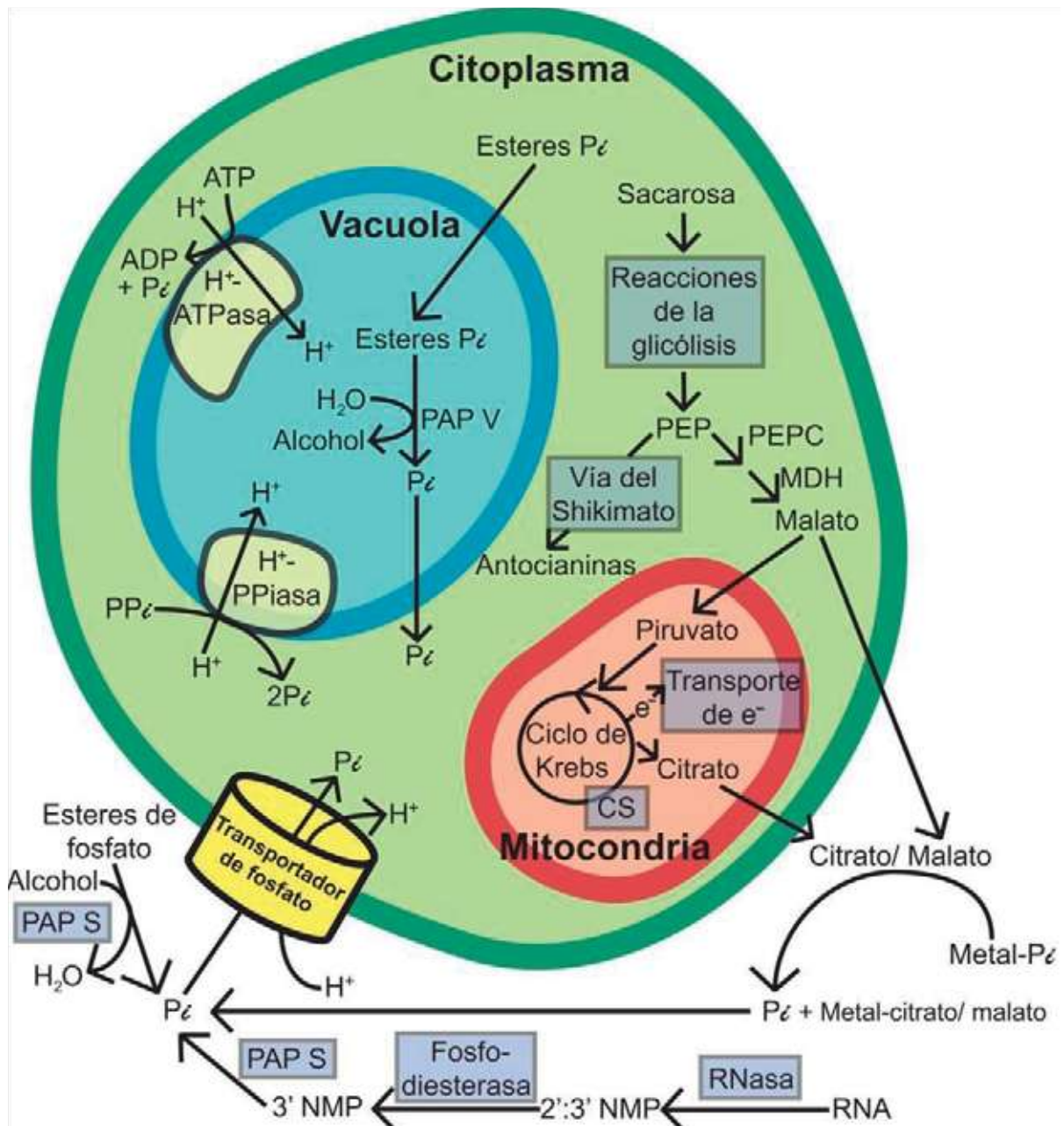


Figura 1. Modelo de algunos procesos adaptativos de las plantas a la deficiencia de Pi (fosfato, ortofosfatos). Rutas alternativas a la glicólisis, la cadena de transporte de electrones mitocondrial y el bombeo de protones al tonoplasto facilitan la respiración celular y el mantenimiento del pH vacuolar al evitar el uso de adenilatos y fosfato. Las raíces excretan grandes cantidades de ácidos orgánicos (malato, citrato), a través de rutas donde interviene la PEPC (fosfoenolpiruvato carboxilasa), MDH (malato deshidrogenasa) y citrato sintasa (CS), solubilizan el Pi unido a metales (p. ej., Al). Fosfatasa ácidas púrpuras secretadas (PAP S) hidrolizan el Pi unido a moléculas orgánicas, como RNA y ésteres de fosfato. Fosfatasa ácidas púrpuras vacuolares reciclan el Pi unido a monoésteres intracelulares no esenciales. En el tonoplasto la bomba de fosfato inorgánico dependiente de protones (PPIasa) hidroliza pirofosfato (PPI) para producir Pi e introducir H⁺ a la vacuola; la bomba de protones dependiente de ATP (H⁺-ATPasa) realiza un proceso similar, pero hidroliza ATP en ADP y Pi (Modificado de Plaxton y Tran, 2011).

4.7.2. Transportadores de Pi

La captación, transporte y translocación de Pi en las plantas se lleva cabo por transportadores de Pi (Pht). Hay cuatro familias de transportadores de Pi, llamadas Pht1, Pht2, Pht3 y Pht4 (Raush y Bucher, 2002). La familia de genes de transportadores de fosfato 1 (*Pht1*) codifica co-transportadores de H⁺/Pi de alta afinidad que modulan la captación de Pi a través de la membrana celular. En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado nueve miembros de la familia *Pht1* (*Pht1;1* a 9) (Muchhal *et al.*, 1996; Mitsukawa *et al.*, 1997 a, b; Lu *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Okumura *et al.*, 1998). La expresión de los promotores de cuatro miembros de la familia *Pht1* (*Pht1;1*, *Pht1;2*, *Pht1;3* y *Pht1;4*) se inducen durante la deficiencia de Pi de manera específica en la raíz, lo que sugiere su participación en la captación de Pi del suelo bajo condiciones limitantes de Pi (Muchhal *et al.*, 1996; Mitsukawa *et al.*, 1997 a b; Lu *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1997; Okumura *et al.*, 1998). Los miembros de la familia de genes *Pht1* también pueden tener una función importante en la translocación del Pi dentro de la planta, debido a que se ha detectado su expresión en flores, hojas, polen, vasculatura y brotes de plántulas (Karthikeyan *et al.*, 2002; Mudge *et al.*, 2002). Las familias de transportadores *Pht2* y *Pht3* codifican transportadores de Pi asociados a organelos (Daram *et al.*, 1999). *Pht2;1*, el único miembro de la familia *Pht2* es un transportador de baja afinidad localizado en la membrana del cloroplasto (Daram *et al.*, 1999; Versaw y Harrison, 2002). La familia *Pht3*, la cual tiene tres miembros, codifica proteínas localizadas en la mitocondria (Daram *et al.*, 1999). La familia de genes *Pht4* comprende seis miembros que comparten similitudes con los transportadores de Pi de animales SLC17/tipo1 (Guo *et al.*, 2008). Los genes *Pht4* se expresan tanto en raíz como en hojas, cinco se localizan en los plastidios y uno en el aparato de Golgi y probablemente están involucrados en el transporte de Pi entre el citosol y los plastidios y el aparato de Golgi (Guo *et al.*, 2008). Aunque se ha demostrado funcionalmente que el sistema de transporte de baja afinidad de Pi está presente en las raíces de las plantas, los genes que codifican estos transportadores todavía no se han identificado.

4.8. Respuestas de las plantas a la deficiencia de fosfato

Las plantas han desarrollado mecanismos elaborados para adaptarse a largos periodos de deficiencia de Pi. Dichos mecanismos incluyen una compleja serie de cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos que en conjunto se conocen como respuestas a la deficiencia de Pi, las cuales permiten a las plantas enfrentar mejor las condiciones limitantes de Pi (Kochian *et al.*, 2004).

4.8.1. Adaptaciones bioquímicas

En plantas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en condiciones de deficiencia de Pi la mayor cantidad de este nutrimento se almacena como ortofosfato, mientras que solo una pequeña cantidad está presente como lípidos, ésteres y ácidos nucleicos. Durante las condiciones de limitación de fosfato, éste se moviliza desde el reservorio de fosfato inorgánico y de los fosfolípidos, mientras que los ácidos nucleicos no se ven afectados (Poirier *et al.*, 1991). Para adquirir Pi adicional y mantener su metabolismo, las plantas activan dos respuestas bioquímicas principales que les permiten mejorar la captación de Pi: a) incrementan la disponibilidad de Pi endógeno y del suelo y b) incrementan la movilización y reciclaje de Pi dentro de la planta (Raghotama, 1999; Vance *et al.*, 2003). Los procesos que conducen a incrementar la captación de Pi del suelo incluyen modificaciones en la química de la rizósfera inducidas por la raíz y la movilización de varias formas orgánicas e inorgánicas de P para ser captado por las plantas. La respuesta bioquímica general de las plantas a la limitación de Pi incluye un incremento en la producción de enzimas para liberar Pi como fosfatasas, el reemplazamiento de fosfolípidos por lípidos que no contienen Pi (p. ej. galactolípidos), la expresión de genes involucrados en el transporte de Pi de alta afinidad y el incremento en la liberación de H⁺ y la exudación de ácidos orgánicos.

Para redistribuir el Pi interno y maximizar la captación del Pi externo, las plantas producen y exudan fosfatasas ácidas (APasas). La función de las APasas intracelulares (vacuolares) o extracelulares (secretadas) es proporcionar Pi a la

planta a partir de los reservorios internos y externos de fosfato orgánico disponibles (Ticconi y Abel, 2004). Estas APasas catalizan la hidrólisis de un amplio espectro de monoésteres de ortofosfatos y anhídros. El estudio de diversos genes que codifican APasas ha revelado la expresión diferencial en tiempo y en tejido de dichos genes (Wu *et al.*, 2003; Zimmermann *et al.*, 2004; Amtmann *et al.*, 2006; Bozzo *et al.*, 2006).

Los ácidos nucleicos presentes en la materia orgánica en descomposición representan una fuente importante de Pi extracelular y pueden ser utilizados por las plantas bajo condiciones de deficiencia de Pi. La inducción de genes por la deficiencia de Pi que codifican ribonucleasas es un proceso rápido y reversible, el cual es sensible a los cambios en la concentración del nutriente (Bariola *et al.*, 1994; Köck *et al.*, 1995; Köck *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2008). Así, la removilización de Pi a partir de ácidos nucleicos extra- e intracelulares contribuye a mantener una concentración citoplásmica constante de Pi (Abel *et al.*, 2002). En las membranas celulares, el Pi está presente como un componente de los fosfolípidos, los cuales constituyen uno de los principales reservorios de Pi en las plantas. Cuando las plantas crecen bajo condiciones de deficiencia de Pi la abundancia relativa de los fosfolípidos disminuye y la de los lípidos no fosfolípidos (por ejemplo sulfoquinovosildiacilglicerol (SQDG), digalactosildiacilglicerol (DGDG) y monogalactosildiacilglicerol (MGDG)), sintetizados por las DGDG y MGDG sintasas, así como por sulfolípidos sintetizados por las enzimas SQD1 y SQD2, aumenta (Essingmann *et al.*, 1998; Härtel *et al.*, 2000; Sanda *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2002; Dörmann y Benning, 2002; Andersson *et al.*, 2003; Jouhet *et al.*, 2004; Andersson *et al.*, 2005; Benning y Otha, 2005; Kobayashi *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Kobayashi *et al.*, 2009). Las fosfolipasas DZ1 y DZ2 (PLDZ1 y PLDZ2) y la fosfolipasa del fosfoinosítido C5 (PLC5) participan en la hidrólisis de fosfolípidos de membrana (Cruz-Ramírez *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Gaude *et al.*, 2008). Durante este proceso altamente controlado, la expresión de genes que codifican las enzimas que hidrolizan los fosfolípidos está regulada por la disponibilidad de Pi.

4.8.1.1. Solubilización del fósforo inorgánico

Durante la limitación de Pi diversas especies de plantas exudan ácidos orgánicos para movilizar varios tipos de compuestos asociados al Pi, como el FePO_4 , AlPO_4 o $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (Zhang *et al.*, 1997). Los principales ácidos liberados por la raíz son el malato y el citrato, facilitando así la quelación de cationes comúnmente asociados con el Pi en el suelo (Bar-Yosef, 1991; Jones y Darrah, 1994; Lan *et al.*, 1995; Jones 1998). Altas tasas de exudación de ácidos orgánicos están asociadas con una mayor capacidad para movilizar P en una gran variedad de plantas, entre las que se incluye el frijol (*Cajanus cajan*), el rábano (*Rhaphanus sativa*), el nabo (*Brassica napus*), la cebada (*Hordeum vulgare*) y el arroz (*Oryza sativa*) (Otani *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Kirk *et al.*, 1999; Gahoonia *et al.*, 2000). En plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) que sobreexpresan el gen que codifica una citrato sintasa bacteriana, el incremento en la expulsión de citrato por las raíces permite a las líneas transgénicas hacer un uso más eficiente del P quelado en forma de Ca-P (López-Bucio *et al.*, 2000).

4.8.1.2. Velocidad de translocación de fosfato

El transporte de Pi entre los compartimentos subcelulares es importante en la regulación metabólica. Los transportadores de Pi son proteínas integrales de membrana responsables de la adquisición y movilización del Pi a diferentes tejidos y órganos. Los transportadores de alta afinidad de Pi (familia *Pht1*) funcionan a bajas concentraciones de Pi y la expresión de sus genes está modulada por la disponibilidad de Pi (Karthikeyan *et al.*, 2002; Raghothama y Karthikeyan, 2005). Los genes *Pht1* se han encontrado en una gran cantidad de especies diferentes de plantas que incluyen arroz, cebada, maíz (*Zea mays*), papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Lycopersicon esculentum*) y tabaco (Kai *et al.*, 2002; Paszkowski *et al.*, 2002; Schunmann *et al.*, 2004; Nagy *et al.*, 2006). Los patrones de expresión de los diversos miembros de la familia *Pht1* son diferenciales, lo cual indica que los genes *Pht1* están regulados por distintos mecanismos que les confieren una expresión

tejido-específica que promueve la translocación del Pi en respuesta a la deficiencia de Pi o señales internas (Chen *et al.*, 2008).

4.8.2. Adaptaciones fisiológicas

Las plantas responden a la concentración de Pi en los tejidos, permitiendo con ello un uso eficiente de los recursos internos de C, N, S y P (White *et al.*, 2005; Amtmann *et al.*, 2006; Hammond y White, 2008). En condiciones de deficiencia de P, cuando las reservas vacuolares de Pi se agotan, las respuestas parecen ser activadas o moduladas por una disminución en la entrega de Pi a los brotes (Jeschke *et al.*, 1997) con una consecuente reducción en el metabolismo, impactando directamente la fotosíntesis, glicólisis y respiración (Jeschke *et al.*, 1997; Hammond *et al.*, 2003; Plaxton, 2004; Hammond y White, 2008). La reducción en la fotosíntesis es evidente por la regulación corriente abajo de genes que codifican para proteínas involucradas en este proceso, incluyendo las subunidades de los fotosistemas, la subunidades pequeñas de la Rubisco y enzimas necesarias para la síntesis de clorofila (Wu *et al.*, 2003; Morcunde *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007). Bajo limitación de Pi se han reportado cambios en la síntesis, translocación y degradación de sacarosa, así como la transcripción diferencial de genes que codifican invertasas, la sacarosa sintasa, las sintasas de sacarosa fosfato y fosfatasas de sacarosa fosfato. Además, los patrones de expresión de diversos transportadores de fosfato están modificados en brotes y raíces (Hammond *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Hammond *et al.*, 2005; Misson *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2007). Así mismo, en plantas deficientes en Pi, la disminución en el ADP y el Pi celular resulta en una disminución en la eficiencia de la respiración al inhibirse la ruta del citocromo c en el transporte de electrones (Vance, 2003).

4.8.3. Adaptaciones morfológicas

Para hacer frente a la deficiencia de Pi, las plantas pueden modificar el programa de desarrollo post-embrionario a través de mecanismos por los cuales se incrementan la capacidad exploratoria de la raíz y su superficie de absorción.

4.8.3.1. Regulación de la arquitectura de la raíz

La modificación del programa de desarrollo de la raíz se refleja en cambios en la arquitectura radicular como consecuencia de las alteraciones en el crecimiento y expansión celular, la actividad del meristemo apical de la raíz, la formación de pelos radiculares, así como por la formación y desarrollo de raíces laterales. El incremento en la longitud y número de pelos radiculares es una adaptación en respuesta a la deficiencia de Pi (Bates y Lynch, 2001). Las especies que desarrollan más pelos radiculares son más eficientes en la captura de Pi del suelo, favoreciendo su adaptación al estrés (Gahoonia *et al.*, 2000).

Algunos estudios sugieren que la formación de pelos radiculares ectópicos es causada por alteraciones en el arreglo posicional de las células de la epidermis. La carencia de Pi afecta el patrón radial de la raíz, haciendo a las células corticales más cortas y numerosas. El resultado de lo anterior es un desorden en la posición de las células epidérmicas adyacentes a las células corticales generando más células que finalmente se convertirán en pelos radiculares (Ma *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis* los cambios en la arquitectura de la raíz por deficiencia de Pi, incluyen el arresto del meristemo apical de la raíz y un incremento en el número y tamaño de las raíces laterales (Williamson *et al.*, 2001; Linkohr *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2002; Al-Ghazi *et al.*, 2003; Nacry *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2007; Pérez-Torres *et al.*, 2008). Las modificaciones en la arquitectura de la raíz que se observan en el frijol común (*Phaseolus vulgaris*) consisten en un aumento en las raíces adventicias y una mayor dispersión de las raíces laterales (Lynch y van Beem, 1993); respuestas similares en el desarrollo de raíces laterales se han observado en maíz (Zhu y Lynch, 2004) y trigo (Manske *et al.*, 2000; Liao *et al.*, 2006).

En *Arabidopsis* la deficiencia de Pi induce un programa de crecimiento determinado, que comienza con alteraciones en la división y elongación celular que posteriormente conducen a un cambio irreversible a partir de un programa de crecimiento indeterminado a uno determinado. En este proceso, el centro quiescente del meristemo radicular desempeña una función primordial, exhibiendo una inhibición de la elongación celular seguida de una pérdida progresiva de las células meristemáticas, procesos modulados por genes de oxidasas multicobre codificadas por los genes LPR (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005, 2006; Svistoonoff *et al.*, 2007).

El análisis de varias mutantes afectadas en la respuesta a la falta de Pi, tales como *pdr2* (*phosphate deficiency response 2*), *lpi* (*low phosphorus insensitive*) y *lpr* (*low phosphate root*), sugieren que el meristemo es el sitio donde se percibe la concentración externa de Pi (Fig. 2a) (Abel *et al.*, 2002; Ticcioni *et al.*, 2004; Sánchez-Calderón *et al.*, 2006; Svintonooff *et al.*, 2007). En experimentos realizados por Svintonooff y col. (2007) se observó que la raíz primaria detiene su crecimiento cuando la punta de la raíz está en contacto con un medio carente de Pi, aun cuando el resto del sistema radicular está en contacto con un medio rico en Pi.

4.8.3.2. Genes implicados en la respuesta a deficiencia de P

A través de tecnología de microarreglos se han identificado un gran número de genes con expresión diferencial en respuesta a la deficiencia de Pi en *Arabidopsis*, *Lupinus albus*, *Oryza sativa* y *Zea mays* (Hammond *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Misson *et al.*, 2005; Morcunde *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007). Wu y col. (2003) mostraron que de los 6,172 genes analizados, 1,800 mostraron cambios de dos órdenes de magnitud bajo condiciones de deficiencia de Pi. Misson *et al.* (2005) realizaron un análisis espacio-temporal de la expresión de 22,810 genes, representando casi todo el genoma de *Arabidopsis*, en donde se indujeron 612 genes y reprimieron 254 genes en condiciones de deficiencia de Pi. A pesar del gran número de genes de respuesta a Pi que se han identificado solo se conoce la función de unos cuantos.

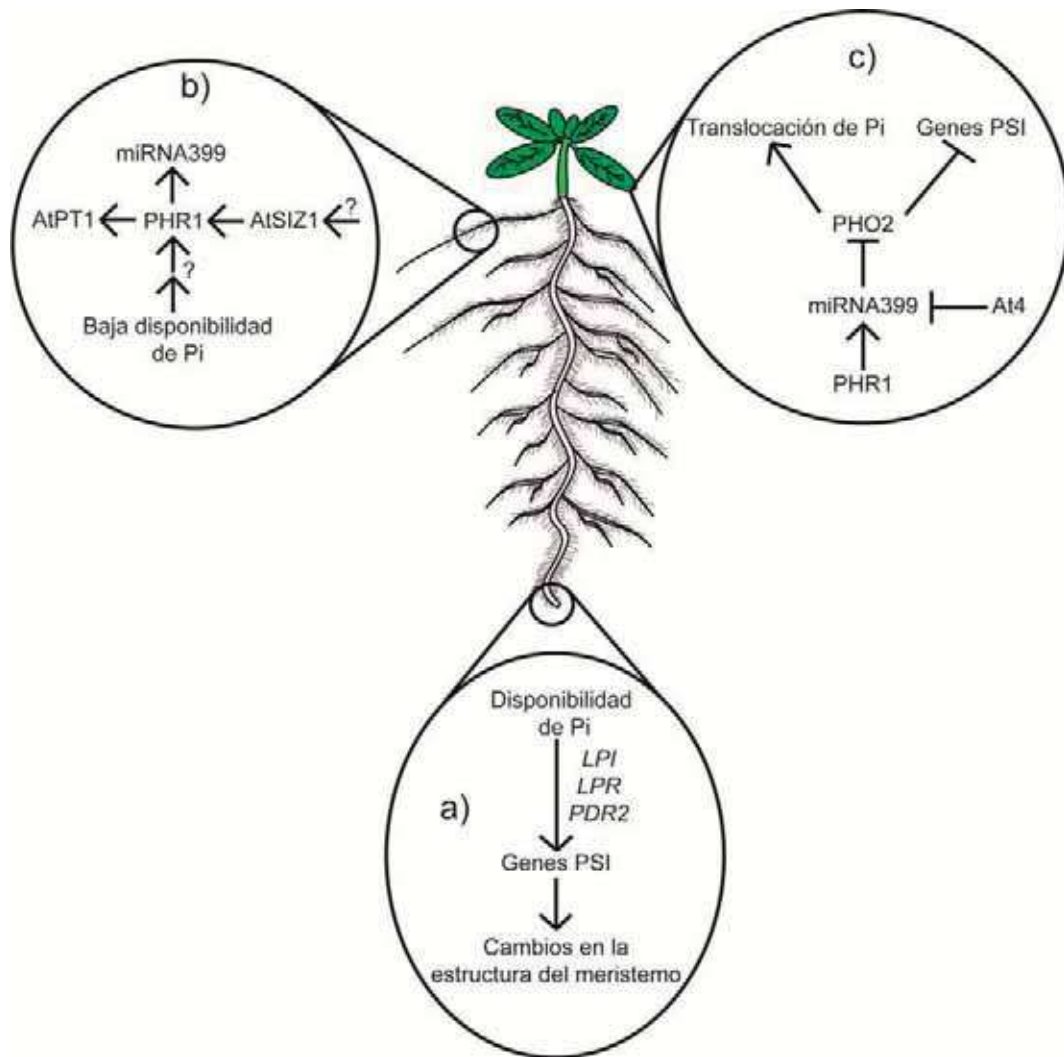


Figura 2. Modelo de una posible ruta de señalización a la deficiencia de Pi en *Arabidopsis thaliana*. (a) El Pi es percibido por el meristemo de la raíz a través de un sensor aún no identificado, el cual desencadena rutas que involucran cambios en la arquitectura de la raíz y en un subconjunto de genes inducidos por deficiencia de fosfato (*phosphate starvation genes, PSI*). (b) De manera similar, a través de una ruta todavía no identificada, factores de transcripción de respuesta a la deficiencia de Pi, como PHR1, se activan. (c) PHO2 participa en la translocación de Pi de los brotes a la raíz a través del xilema, PHO2 actúa como un inhibidor de algunos genes PSI y es regulado de manera negativa por un microRNA (miRNA3999) (modificado de Bari *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2006).

El gen PHR1 codifica un factor transcripcional tipo MYB que es homólogo a PSR1 (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1), el cual a su vez es un factor transcripcional involucrado en la respuesta a Pi en *Chlamydomonas reinhardtii*. Lo anterior, sugiere un mecanismo muy antiguo para sentir la señal de Pi en ancestros unicelulares fotosintéticos, presente en plantas vasculares (Grossman *et al.*, 2010). La expresión de varios genes inducidos por la limitación de Pi, se encuentra

reducida en la mutante *phr1* (Rubio *et al.*, 2001; Bari *et al.*, 2006), sugiriendo que PHR1 regula un conjunto de genes de respuesta a P en *Arabidopsis* (Fig. 2b). El dominio tipo MYB de PHR1 se une a un motivo GNATATNC en el DNA denominado *P1BS* (Rubio *et al.*, 2001). Esta secuencia palindrómica imperfecta está presente en una región promotora de genes de respuesta a la deficiencia de Pi (Franco-Zorrilla *et al.*, 2004; Misson *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2007). Como la transcripción de PHR1 no se altera por el estatus de Pi en la planta, se ha sugerido que la regulación de PHR1 ocurre a nivel traduccional. Subsecuentemente, se encontró que PHR1 es blanco de SIZ1 [SAP (SCAFFOLD ATTACHMENT FACTOR, proteína inhibidora de señales de transcripción activadas y activador de la transcripción), MIZ1 (Msx2-INTERACTIN ZINC FINGER)], una ligasa SUMO E3 (Miura *et al.*, 2005), siendo la sumoilación uno de los mecanismos de control activados en respuesta a la privación de Pi. La mutante *siz1* muestra hipersensibilidad y patrones de expresión alterados de genes inducibles por la deficiencia de Pi, incluyendo *AtIPS1* (*A. thaliana induced by phosphate starvation 1*) y *AtRNS1* (*A. thaliana ribonuclease 1*), los cuales son genes regulados por PHR1. SIZ1 es considerado también un regulador positivo de PHR1 (Miura *et al.*, 2005).

El estudio de la mutante *pho2* ha proporcionado conocimientos importantes relacionados con la homeostasis de Pi en plantas. PHO2 es una enzima conjugasa de ubiquitina (UBC24) y la mutante *pho2* exhibe una hiperacumulación de Pi en brotes, tanto en condiciones de deficiencia como de suficiencia de Pi (Delhaize y Randall, 1995; Aung *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006). PHO2 está conservado en angiospermas y se han reportado ortólogos de arroz, *Medicago truncatula* y *Populus trichocarpa* (Bari *et al.*, 2006). PHO2 se regula por el microRNA 399 (miR399). La expresión de miR399 se incrementa rápidamente durante la deficiencia de Pi y está parcialmente inhibida en la mutante *phr1*, lo que sugiere que PHR1 se requiere para la expresión de miR399 y por lo tanto se localiza corriente arriba en la señalización Pi por PHO2. Los resultados de diversas investigaciones indican que la ruta de señalización se activa en deficiencia de Pi, conectando PHR1 con PHO2 a través de la abundancia de miR399 (Fig. 2c) (Bari *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2006). El sitio de unión del miR399 está localizado en la región 5' no traducida de su blanco,

conduciendo a la degradación del transcrito de PHO2. Análisis promotor-reportero demostraron que UBC24/PHO2 y miR399 co-localizan en el cilindro vascular (Aung *et al.*, 2006). La regulación coordinada de estos genes respalda la función de UBC24/PHO2 y miR399 en la regulación de la translocación y removilización de Pi (Aung *et al.*, 2006; Bari *et al.*, 2006; Chiou *et al.*, 2006; Chiou, 2007). Además de la expresión en el cilindro vascular, miR399 también se encuentra en el ápice de la raíz y en las células del mesófilo, lo que sugiere la posibilidad de blancos adicionales de miR399 desconocidos en estos tejidos. En otra serie de experimentos con plantas sobeexpresoras de miR399, se encontró que miR399 es capaz de moverse de los brotes a las raíces a través del floema y actuar como una señal sistémica (Lin *et al.*, 2008; Pant *et al.*, 2008).

La familia de genes *IPS1/At4* contiene múltiples marcos de lectura abiertos cortos que se inducen por deficiencia de Pi (Shin *et al.*, 2006). *At4* está implicado en la localización interna de Pi entre brotes y raíz durante el estrés por falta de Pi y se ha sugerido que los niveles transcripcionales se pueden ajustar postranscripcionalmente por miR399 (Shin *et al.*, 2006). En un trabajo publicado por Franco-Zorrilla y col. (2007), los autores demostraron que estos transcritos no-codificantes disminuyen las respuestas a la deficiencia de P a través de un proceso denominado “mimetismo del blanco”. En este proceso, cuando *IPS1* se expresa, secuestra a miR399 a través de una interacción complementaria, lo que resulta en la acumulación del blanco de miR399 el mRNA de PHO2, debido a que reduce su degradación. Estos resultados sugieren que las respuestas a la limitación de P están estrechamente reguladas y que la homeóstasis sistémica de Pi está fuertemente regulada por el control de la estabilidad de proteínas mediada por PHO2. Diversos componentes homólogos del proceso sistémico de homeóstasis de Pi se han identificado en frijol y arroz (Doerner, 2008; Valdéz-López y Hernández, 2008; Zhou *et al.*, 2008), lo que muestra que la homeóstasis sistémica de Pi está conservada en plantas vasculares.

4.9. Función de las auxinas en la regulación de las respuestas a la deficiencia de fosfato

Para sobrevivir, las plantas necesitan ajustes fisiológicos durante su desarrollo que garanticen la adquisición de los recursos edáficos. Por lo tanto, las fitohormonas probablemente funcionan como integradoras de los procesos del desarrollo con las señales ambientales. Las fitohormonas más estudiadas con relación a la señalización de Pi son las auxinas (López-Bucio *et al.*, 2002; Al-Ghazi *et al.*, 2003; Nacry *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2007), las citocininas (Martín *et al.*, 2000; Franco-Zorrilla *et al.*, 2002; Franco-Zorrilla *et al.*, 2005; Kobayashi *et al.*, 2006), el etileno (Borch *et al.*, 1999; Dolan, 2001; Ma *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2003; Ruzicka *et al.*, 2007; Stepanova *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2007) y recientemente el ácido jasmónico (Chacón-López *et al.*, 2010).

En las plantas, las auxinas desempeñan una función reguladora clave en diversos procesos del crecimiento y desarrollo, que incluyen la división celular, elongación y diferenciación celular, así como la germinación, la floración y la senescencia (Paciorek y Friml, 2006). En condiciones de deficiencia de Pi la arquitectura de la raíz se modifica para mejorar la captación de este nutriente. Las plantas que crecen en condiciones de deficiencia de Pi tienen un mayor número y longitud de raíces laterales, raíces adventicias y pelos radiculares.

En *Arabidopsis*, las auxinas desempeñan una función importante en la modulación de los efectos de la deficiencia de Pi sobre la arquitectura radicular (López-Bucio *et al.*, 2002; Al-Ghazi *et al.*, 2003; Nacry *et al.*, 2005; Jain *et al.*, 2007), debido a su papel central en la formación y elongación de raíces laterales y pelos radiculares (Stals e Inzé, 2001). En el lupino blanco y en *Arabidopsis*, las plantas tratadas con el inhibidor de transporte de auxinas ácido 2,3,5-triiodobenzóico y el ácido N-1-naftilftalámico (NPA, inhibidor del transporte de auxinas), presentaron una disminución en la formación de raíces proteoides y laterales inducida por la carencia de Pi (Gilbert *et al.*, 2000; López-Bucio *et al.*, 2003, 2005). Pérez-Torres y col. (2008) mostraron que en condiciones de deficiencia de Pi la sensibilidad a auxinas se incrementa. En experimentos realizados con *Arabidopsis* estos autores observaron

que plántulas crecidas con el inhibidor de transporte de auxinas NPA bajo un régimen de carencia de Pi fueron capaces de formar primordios de raíces laterales, en comparación con plántulas crecidas con NPA y suficiencia de Pi que no los forman. En el mismo sentido, plántulas crecidas en deficiencia de Pi y transferidas a medio con NPA y auxinas exógenas presentaban una mayor formación de primordios de raíces laterales comparadas con plántulas crecidas con exceso de Pi y transferidas a medio con la misma concentración de NPA y auxinas (Pérez-Torres *et al.*, 2008). Con base en estas observaciones, quedó de manifiesto que las células del periciclo son más sensibles a la proliferación de raíces laterales provocada por las auxinas en plantas crecidas en deficiencia de Pi. Los mismos autores mostraron que el incremento en la sensibilidad a auxinas en condiciones de deficiencia de Pi se debe a la inducción de la familia de receptores a auxinas TIR1/AFB1-5 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1-5).

V. JUSTIFICACIÓN

El fósforo es un nutriente limitante para el desarrollo y crecimiento de las plantas cuya disponibilidad en el suelo puede estar afectada por la abundancia de cationes trivalentes. Debido en parte a que los ortofosfatos forman sales insolubles con el lantano (La) y el gadolinio (Gd), así como con el aluminio (Al) en suelos ácidos.

El entendimiento de las rutas de señalización que modulan las respuestas en la arquitectura de la raíz por cationes trivalentes (La^{3+} , Gd^{3+} y Al^{3+}) en ambientes con escasa disponibilidad de fosfato, proporcionará herramientas útiles para mejorar la productividad de los cultivos a través de una captación de fosfato más eficiente.

VI. HIPÓTESIS

Los cationes trivalentes (La^{3+} , Gd^{3+} y Al^{3+}) modulan la arquitectura de la raíz e inducen la expresión de genes que participan en la captación de P en *Arabidopsis thaliana*.

VII. OBJETIVOS

7.1. Objetivo general

Caracterizar los efectos de diferentes cationes trivalentes sobre la arquitectura de la raíz y sobre la expresión de genes regulados por la deficiencia de fósforo en *Arabidopsis thaliana*.

7.2. Objetivos específicos

1. Estudiar el efecto de los cationes trivalentes La^{3+} , Gd^{3+} y Al^{3+} sobre la arquitectura de la raíz en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* y en mutantes resistentes a la deficiencia de fosfato.
2. Determinar la especiación de los cationes trivalentes en el medio de cultivo y la formación de precipitados de fosfato en el medio de cultivo para *Arabidopsis thaliana*.
3. Evaluar el efecto de los cationes trivalentes sobre genes inducibles por la deficiencia de fosfato.
4. Caracterizar el efecto de los cationes trivalentes sobre la arquitectura de la raíz de plantas mutantes afectadas la ruta de señalización a auxinas.

VIII. RESULTADOS

Los principales resultados generados durante la realización del presente proyecto se presentan en los capítulos I, II y III. El capítulo I corresponde al capítulo de un libro publicado por nuestro grupo de trabajo, el capítulo II a un artículo publicado en una revista internacional de arbitraje estricto (***Plant and Soil***, Springer; Factor de Impacto de 2.7) y el capítulo III a un artículo enviado a la revista ***Plant Cell and Environment*** (Blackwell; Factor de Impacto de 5.2).

Capítulo I

FRONTERAS EN LA BIOLOGÍA DEL DESARROLLO DE LAS PLANTAS

Fronteras en la biología del desarrollo de las plantas

Editado por:

Elda Beltrán Peña
José López Bucio



Contenido

Prefacio	III
Contenido	IV
Índice de autores	IX
1 La arquitectura de las plantas <i>Randy Ortiz-Castro y José López-Bucio</i>	2
1.1 Introducción	3
1.2 La evolución de la arquitectura de las plantas	3
1.3 Arquitectura del follaje	4
1.3.1 Filoraxis	4
1.3.2 Ramificación y dominancia apical	5
1.3.3 Filoración: crecimiento determinado e indeterminado	6
1.3.4 Estructura de las hojas	6
1.4 Arquitectura de la raíz	7
1.4.1 Sistemas radiculares	7
1.4.2 Regulación de la arquitectura radicular	9
1.4.2.1 Desarrollo embrionario de la raíz	9
1.4.2.2 Partes del sistema radicular	9
1.4.2.3 Regulación por nutrientes	11
1.5 Conclusiones	12
1.6 Referencias	12
2 Los reguladores del crecimiento vegetal <i>Alma Márquez-Cisneros y José López-Bucio</i>	16
2.1 Introducción	17
2.2 Auxinas	17
2.3 Citocininas	19
2.4 Etileno	20
2.5 Giberelinas	20
2.6 Ácido abscísico	21
2.7 Lípidos	22
2.8 Conclusiones	23
2.9 Referencias	23

3 Las auxinas en el control del crecimiento y desarrollo vegetal	28
<i>Georgina Hernández-Mora, Ma. Elena Meléndez-Rojas y Éida Beltrán-Pérez</i>	
3.1 Homeostasis de las auxinas	29
3.1.1 Biosíntesis de las auxinas	29
3.1.2 El transporte de las auxinas	29
3.2 La respuesta a auxinas: el mecanismo Aux/ALA-ARF	32
3.3 El desarrollo de la raíz	33
3.4 Relación entre la señalización de auxinas y el transporte polar de auxinas	35
3.5 Conclusiones	35
3.6 Referencias	36
4 La genómica funcional aplicada al desarrollo	40
<i>Alfonso Méndez-Bravo, Lenin Fern. Ruiz-Herrera y José López-Bacín</i>	
4.1 Introducción	41
4.2 Sistemas genéticos de las células vegetales	41
4.2.1 Cantidad de DNA en el genoma	42
4.2.2 Complejidad y variaciones de los genomas	42
4.2.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio	43
4.3 ¿Por qué estudiar la expresión de los genes?	44
4.4 Expresión de genes a gran escala, el transcriptoma	44
4.4.1 Microarreglos de DNA	45
4.5 Perspectivas	45
4.6 Referencias	47
5 Superóxido dismutasa en plantas	50
<i>Araceli Areola-Esteva, Éida Casimí-Mercado y Ernesto García-Pineda</i>	
5.1 Introducción	51
5.2 Producción de especies reactivas de oxígeno	51
5.3 Superóxido dismutasas	53
5.4 Superóxido dismutasas de hierro	54
5.5 Superóxido dismutasa de manganeso	54
5.6 Superóxido dismutasa de cobre y zinc	55
5.7 Actividad y expresión de SOD bajo condiciones de estrés oxidativo	56
Inducción de SOD por temperatura	56
Cambio en la expresión de SOD durante el desarrollo	56

5.8 Perspectivas	57
5.9 Referencias	57
6 El género de hongos <i>Trichoderma</i> y su función en la rizósfera	60
Héctor Ángel Cuevas-Correa, Elda Behrén-Peña y José López-Baclo	
6.1 Introducción	61
6.2 Micoparasitismo	61
6.3 Interacción de <i>Trichoderma</i> con las plantas	62
6.4 Efecto de compuestos indólicos sobre el crecimiento de <i>Trichoderma</i>	63
6.5 Inducción de resistencia en las plantas	64
6.6 Protección de semillas contra el ataque de hongos patógenos	65
6.7 Protección directa a suelos y diferentes cultivos	66
6.8 Control sobre diferentes microorganismos fitopatógenos	66
6.9 <i>Trichoderma</i> como agente para la biodegradación de compuestos agrotóxicos	67
6.10 <i>Trichoderma</i> como alternativa para el ahorro de fertilizantes químicos y pesticidas	67
6.11 Producción de compuestos orgánicos volátiles	68
6.12 Perspectivas	68
6.13 Referencias	68
7 Distribución y funciones de la serotonina y la melatonina en las plantas	72
Ramón Magro-Flores, Elda Behrén-Peña y José López-Baclo	
7.1 Introducción	73
7.2 Funciones de la serotonina y la melatonina en animales	74
7.3 Distribución de la serotonina y la melatonina en las plantas	74
7.4 Biosíntesis de la serotonina y melatonina	76
7.5 Posibles funciones de la serotonina y melatonina en las plantas	76
7.6 Respuestas a estrés	79
7.7 Regulación del crecimiento y desarrollo	80
7.8 Conclusiones y perspectivas	81
7.9 Referencias	81
8 TOR: regulador central del crecimiento en organismos eucariotes	86
Rein Peto-Creer, Ma. Eliza Mellado-Rojas y Elda Behrén-Peña	
8.1 Introducción	87

8.2 Cascada de señalización PI3K-TOR activada por insulina y factores de crecimiento parecidos a insulina	87
8.3 Proteína cinasa blanco de la rapamicina (TOR)	87
8.4 Efectores de la activación de TOR: cinasa de la proteína ribosomal S6 (S6K) y proteína de enlace al factor de inicio de la traducción 4E-BP	91
8.5 Complejo de esclerosis tuberosa TSC1/TSC2: regulador de la actividad de TOR	91
8.6 La GTPasa Rheb: activador de TOR	92
8.7 Cascada hVps34 encargada de percibir los nutrientes (aminoácidos) disponibles para el crecimiento celular	92
8.8 Activación de TOR dependiente del nivel energético	92
8.9 La Ruta TOR en plantas	93
8.10 Conclusiones y perspectivas	95
8.11 Referencias	96
9 Oligogalacturónidos: una conexión entre defensa y desarrollo	102
<i>Esmer Yáñez-Pérez-Olivero, Elda Behran-Pérez y Hiram Rojas de la Cruz</i>	
9.1 Introducción	103
9.2 Estructura de la pared celular	103
9.3 Oligogalacturónidos en la señalización de defensa	106
9.4 Papel de los OGs en el crecimiento y desarrollo	108
9.5 Entrecruzamiento de la señalización de los OGs con la señalización de las fitohormonas	109
9.6 Relación entre los OGs y calcio	110
9.7 Conclusiones	110
9.8 Perspectivas	111
9.9 Referencias	112
10 Metabolismo y señalización del óxido nítrico en plantas	116
<i>Javier Raya-González, Elda Behran-Pérez y José López-Bucio</i>	
10.1 Introducción	117
10.2 Participación del óxido nítrico en la señalización en animales	117
10.3 Producción de óxido nítrico en plantas	120
10.4 Señalización del óxido nítrico en plantas	121
10.5 Interacción del óxido nítrico con las hormonas vegetales	123
10.6 Conclusiones	124

10.7 Referencias	125
11 Respuestas de las plantas a los suelos ácidos: tolerancia al aluminio y uso eficiente del fósforo	130
Leon Francisco Ruiz-Herrera, Elda Beltrán-Pérez y José López-Baón	
11.1 Introducción	131
11.2 Acidez del suelo	131
11.3 Formas del aluminio en el suelo	131
11.4 Mecanismos de inhibición del crecimiento de la raíz inducidos por aluminio	132
11.4.1 Inhibición de la expansión celular	132
11.4.2 Efectos del aluminio sobre el protoplasto	132
11.4.3 Efectos del aluminio en la división celular	133
11.4.4 Zona de transición distal de la raíz: sitio para la percepción y transducción de la señal del aluminio	134
11.5 Mecanismos moleculares de tolerancia al aluminio	134
11.6 Disponibilidad de fósforo (P) en el suelo e interacción con el aluminio	134
11.7 Tolerancia al estrés por deficiencia de fósforo	135
11.7.1 Arquitectura de la raíz en deficiencia de fósforo	136
11.7.2 Transportadores de fósforo y exudación de fosfatasas	137
11.8 Señalización por calcio en las plantas en respuesta al estrés	137
11.8.1 Señalización por calcio en respuestas al aluminio	137
11.8.2 Señalización por calcio en respuesta a la deficiencia de fósforo	138
11.9 Conclusiones	139
11.10 Referencias	139



CAPÍTULO 10

Respuestas de las plantas a los suelos ácidos:
Tolerancia al aluminio y uso eficiente del
fósforo

Respuestas de las plantas a los suelos ácidos: Tolerancia al aluminio y uso eficiente del fósforo

León Francisco Ruiz-Herrera, Elda Beltrán-Peña y José López-Bucio

Los suelos ácidos limitan la productividad de los cultivos a nivel mundial, ya que comprenden aproximadamente el 50% de los suelos potencialmente cultivables. Debido a lo anterior, el entendimiento de los mecanismos bioquímicos, moleculares y celulares que confieren a las plantas tolerancia a la acidez ha sido uno de los principales retos de la biología en los últimos años. La acidez de los suelos se debe principalmente a la disminución en el pH causado por cambios ambientales o actividades humanas. En estas condiciones, el aluminio se libera de las partículas del suelo y afecta el crecimiento de la raíz. En este capítulo se discuten los mecanismos de inhibición del crecimiento de la raíz inducido por Al, así como las respuestas que las plantas han desarrollado para tolerar concentraciones tóxicas de este metal. Entre otros efectos, el Al limita la disponibilidad de fósforo (P), así que las plantas que crecen en suelos ácidos también han desarrollado mecanismos para optimizar la captación de P, que incluyen la expresión de transportadores de P de alta afinidad, la exudación de fosfatasas y la modificación de la arquitectura de la raíz. Nuevas investigaciones realizadas en el campo sugieren que tanto la toxicidad por Al como la deficiencia de P convergen en rutas de señalización comunes que utilizan el calcio (Ca^{2+}) como segundo mensajero.

10.1 Introducción

Los suelos ácidos se caracterizan por tener un pH menor a 5.5 y limitan la producción agrícola a nivel mundial. Aproximadamente el 50% de los suelos potencialmente cultivables tienen problemas de acidez. Estos se localizan principalmente en las trópicos y subtropicos, así como en las regiones de las frentes boreales del hemisferio norte (Summer y Noble, 2003).

En los suelos ácidos la toxicidad por aluminio (Al) es el factor más importante que determina la distribución de la vegetación y limita la productividad de los cultivos, incluyendo los cereales como el maíz y el arroz. El aluminio puede estar presente en solución en el suelo en formas mononucleares y polinucleares. Aunque la función específica del polímero hidroxal Al_3 en la toxicidad por aluminio no es del todo clara, diferentes autores coinciden en que las especies mononucleares de Al, particularmente Al^{3+} , más que los hidróxidos como el $Al(OH)^{2+}$ y el $Al(OH)_2^+$, son las especies de aluminio más dañinas para las plantas. Los complejos orgánicos e inorgánicos de Al se considera que son menos tóxicos (Summer y Noble, 2003; Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2005; Horst *et al.*, 2007).

Además de la toxicidad por Al existen varios factores que limitan la producción agrícola en los suelos ácidos. Este "síndrome" del suelo puede estar también relacionado con niveles tóxicos de manganeso (Mn) y hierro (Fe), así como deficiencias en diversos elementos minerales esenciales, siendo el fósforo (P) el principal nutriente en escasez en suelos ácidos (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2005). Así, el presente trabajo presenta los principales avances realizados durante la última década en el entendimiento de las respuestas adaptativas de las plantas a los suelos ácidos. Una parte importante se dirige al análisis de los mecanismos bioquímicos, moleculares y celulares implicados en la tolerancia al Al. También se discuten resultados recientes sobre las respuestas de las plantas al estrés por deficiencia de fósforo, así como la posible función del calcio (Ca^{2+}) en la señalización de ambos procesos.

10.2 Acidez del suelo

En sentido amplio se considera que un suelo es ácido si tiene un pH menor a 6.6, aunque existen diversos grados de acidez. Los efectos perjudiciales de la acidez no se manifiestan hasta valores de pH inferiores a 5.5 y son debidos a la toxicidad del aluminio y a la poca biodisponibilidad de nutrientes como el fósforo (Summer y Noble 2003).

Los efectos negativos de la acidez sobre las plantas pueden ser debidos a la toxicidad de iones Al^{3+} y Mn^{2+} , presentes en las redes de intercambio y en la fase líquida del suelo. En soluciones nutritivas ácidas, que no contienen aluminio ni manganeso, los efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas pueden ser evitados sin necesidad de elevar el pH, simplemente corrigiendo la carencia de calcio, aportado en forma de $CaCl_2$. Lo anterior evidencia que los iones H_2O^+ no son la causa de la inhibición del crecimiento de las plantas en suelos ácidos. Las plantas son sensibles al exceso de Al^{3+} y Mn^{2+} ya que al aumentar el contenido de estos iones disminuye el crecimiento, el área foliar y el contenido de Ca, Mg y P en los tejidos, aumentando consecuentemente el de Al, Mn y Fe (Ramírez-Rodríguez *et al.*, 2005).

10.3 Formas del aluminio en el suelo

El aluminio en solución acuosa se hidraliza rápidamente dando lugar a formas químicas monoméricas (Menzies, 2003). El comportamiento del aluminio en el suelo condiciona las características de los suelos ácidos. Existen formas intercambiables, el Al^{3+} , junto con las que resultan de su hidrólisis, $Al(OH)^{2+}$, $Al(OH)_2^+$, $Al(OH)_3$ (gibbsite) y formas aniónicas, tales como $Al(OH)_4^-$ y $Al(OH)_5^{2-}$. La existencia en forma soluble de las distintas formas del aluminio depende del intervalo de pH y de la fuerza iónica. Dado que el aluminio solo actúa con un único estado de valencia, la presencia de las distintas formas químicas en el suelo dependerá exclusivamente del pH (Menzies, 2003).

10.4 Mecanismos de inhibición del crecimiento de la raíz inducidos por aluminio

La raíz es la parte de la planta que participa en la absorción de agua y nutrientes y en el anclaje al suelo. El crecimiento de la raíz es un proceso complejo que implica no solo el mantenimiento de la vitalidad de las células, la producción de nuevas células y su elongación, sino también la integración de patrones de crecimiento (grosor/longitud), procesos de diferenciación y la coordinación de señales ambientales y hormonales (Barlow, 2002). Investigaciones recientes sugieren que el aluminio puede ser percibido como una señal para la modulación de diferentes procesos de morfogénesis (Doncheva *et al.*, 2005).

10.4.1 Inhibición de la expansión celular

La expansión de las células de la raíz ocurre en la zona de elongación, localizada en la zona subapical a unos pocos milímetros del ápice. La expansión dirigida por la turgencia requiere de paredes celulares flexibles y de un adecuado suministro de agua para mantener el gradiente de potencial osmótico (Kuchian *et al.*, 2004). La integridad celular es un prerrequisito para la expansión. Lo anterior trae consigo la pregunta de si la muerte celular inducida por aluminio (como un elemento tóxico) es el principal determinante en la inhibición del crecimiento de la raíz.

Diversas investigaciones han reportado que el aluminio induce estrés oxidativo en las raíces. La muerte celular inducida por aluminio se ha observado después de horas de exposición a concentraciones tóxicas de Al. Sin embargo, dichos transitorios de estrés suministran escasa información sobre la dinámica de la inhibición del crecimiento de la raíz. Las circunferencias vitales han revelado que la muerte celular masiva asociada a la compartimentalización celular no es la causa principal de la inhibición de la elongación de la raíz inducida por aluminio. Estudios detallados temporalmente también demostraron que la muerte celular y la oxidación de proteínas en plantas de maíz expuestas a Al ocurre

después de la inhibición de la elongación de la raíz (Corrales *et al.*, 2008).

El Al se acumula en las paredes celulares y en los espacios intercelulares del ápice de la raíz. El Al apoplástico comprende entre el 85 y el 99.9% de la fracción total en las raíces (Horts *et al.*, 2007). Además de la precipitación del aluminio en la superficie de las raíces y en los espacios intercelulares, una forma intercambiable de aluminio se une a las cargas negativas de las pectinas (Blumey *et al.*, 1993), aunque también se puede encontrar en una forma no intercambiable (Éticha *et al.*, 2005).

El Al causa el endurecimiento de las paredes celulares en diversos sistemas experimentales (Ma, 2007). La expansión de la pared celular requiere tanto de una matriz de pared flexible así como de la síntesis de nuevos componentes de la pared. La unión del aluminio a paredes celulares en expansión puede conducir al deterioro de las propiedades mecánicas de las paredes, obstaculizando la elongación de las células (Ma, 2007). Se ha demostrado que la acumulación de celulosa, inducida por el precursor de etileno ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) es un mecanismo importante en la inhibición de la expansión de la pared celular. La producción acelerada del precursor del etileno inducida por el aluminio claramente precede a la inhibición del crecimiento de la raíz en plántulas de frijol. Lo anterior sugiere que el Al afecta la elongación celular mediante un mecanismo directo uniéndose a las paredes celulares o a través de la activación de una cascada de señalización mediada por etileno.

10.4.2 Efectos del aluminio sobre el protoplasto

Aunque las paredes celulares entran en contacto inicial con las mayores concentraciones de Al en la solución del suelo, la mayor parte del Al en el ápice de la raíz se localiza en el apoplasto, indicando que este metal puede ingresar a las células (Horts *et al.*, 2007). El daño inducido por el Al en la conductividad hidráulica en la membrana plasmática y en las membranas de los orgánulos también afecta la expansión celular. La importancia del efecto tóxico del Al en la conductividad hidráulica se refleja en los cambios en la transcripción

de genes de vacuolinas inducida por aluminio, tanto en células vegetales como en animales (Kumar *et al.*, 2008). La membrana plasmática responde muy rápido a la toxicidad por Al mediante una despolarización (Kisnericová y Sakalauskas, 2005). Las membranas proporcionan sitios de unión potenciales al Al, como por ejemplo los grupos fosfato y carboxilo. La afinidad del aluminio por las superficies de vesículas que contienen fosfatidilcolina es 500 veces mayor que la afinidad del Ca (Alexian *et al.*, 1989). La unión del aluminio a la membrana plasmática puede contribuir a los cambios en propiedades clave de dicha estructura, como la fluidez, la conductividad hidrofónica, el potencial de membrana, la actividad de los canales iónicos, la homeostasis del Ca y la inhibición de la H⁺-ATPasa (Ahn *et al.*, 2001; Ma, 2007; Pechenbender *et al.*, 2009).

Inicialmente se pensaba que el aluminio sólo penetraba al simplasto después de un largo periodo de exposición. Debido a que la inhibición de la elongación de la raíz es un proceso rápido, la mayoría de los investigadores se concentró en el apoplasto y en las superficies de unión de la membrana. De hecho, estudios con La³⁺ y Ga³⁺ (usados como análogos de Al³⁺) han mostrado que la velocidad de flujo de estos cationes trivalentes es lenta. Se han reportado velocidades del orden de 20-250 pmol m⁻² s⁻¹ (Ritchie y Rajhupati, 2009). A pesar de esto, se ha medido la entrada de cantidades potencialmente tóxicas de Al al simplasto en cuestión de minutos (Silva *et al.*, 2000). Los mecanismos que permiten el paso del Al a través de la membrana plasmática son todavía desconocidos. En base a los resultados con plantas hiperacumuladoras de aluminio como *Fragopyrum* y *Melilotum* (Watanabe *et al.*, 2001), se propone que el Al³⁺ iónico es captado por un mecanismo pasivo facilitado por un transportador aún no identificado y dirigido por un gradiente electroquímico favorable. El gradiente es mantenido gracias a la unión inmediata del Al entrante con ligandos orgánicos como el citrico y el oxálico.

Se ha propuesto que el transporte del Al a través de la membrana podría ocurrir vía endocitosis. La internalización del aluminio en vesículas endosomales/vacuolares en las células de la zona distal de transición (*distal transition zone*, "DTZ") se ha observado utilizando microscopía de fluorescencia (Horn *et al.*, 2007). Se detectó la presencia de Al en la DTZ de maíz

y *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) aproximadamente 3 h después del suministro de Al en el ápice de la raíz (Lilje *et al.*, 2006). En *A. thaliana* el transporte del Al a través del tonoplasto parece ocurrir mediante un transportador del tipo ABC (ALS1) (Ma, 2007).

10.4.3 Efectos del aluminio en la división celular

El trabajo pionero de Clarkson (1965) (citado en Poschenrieder *et al.*, 2009) demostró que el aluminio afectaba el desarrollo de la raíz y señalaba a la inhibición de la división celular como la causa principal de este efecto. Hace más de 40 años se demostró que la unión del Al a los ácidos nucleicos aumentaba el daño celular causado por exposición a concentraciones altas o prolongadas del metal. En las raíces de maíz y cebolla se han descrito cromosomas deformes, rotos y disolución nuclear.

Por diversas razones en años recientes ha habido un renovado interés en las alteraciones del ciclo celular inducidas por aluminio. Una de ellas es que ha quedado bien establecido que cantidades pequeñas de Al pueden penetrar al simplasto rápidamente. Por otro lado, las alteraciones del ciclo celular por Al podrían ocurrir a través de una cascada de señalización, sin necesidad de que el Al penetre directamente a los núcleos de las células meristemáticas. Los cambios rápidos en el desarrollo en respuesta al Al parecen implicar una compleja coordinación de los eventos celulares que incluyen la inhibición de la elongación de las células, de la división de las células e incluso la estimulación de la diferenciación (Doncheva *et al.*, 2005). El fluoroplátino, un colorante fluorescente específico para aluminio, reveló la presencia del Al en los núcleos del ápice de la raíz después de solo 30 min de exposición a bajas concentraciones del metal (Silva *et al.*, 2000). Se ha observado que la inhibición del ciclo celular inducido por aluminio ocurre en menos de 30 minutos de exposición. La microscopía confocal de meristemas apicales tratados con Al, revelaron un gran número de células en diferentes fases del ciclo celular en plantas creciendo sin Al y el cese casi por completo de la actividad del ciclo celular en las plantas expuestas a este metal.

El efecto negativo sobre el ciclo celular en el

meristemo de la raíz en plantas de maíz no pudo ser atribuido a un efecto citotóxico generalizado del Al (Dombeva *et al.*, 2005). Por el contrario, el tratamiento con Al rápidamente estimuló la actividad del ciclo celular en la parte subapical de la raíz, en la zona de transición. Después de 30 minutos de tratamiento con Al se observaron una gran cantidad de células en división, en cambio en períodos de exposición prolongados (3 h) se formaron nuevas raíces laterales a una corta distancia del ápice de la raíz principal. Esta secuencia de eventos mostró que las plantas son capaces de detectar al Al y reaccionar a él, con un crecimiento de la raíz adaptativo en cuestión de minutos. La estimulación de la división celular con bajas concentraciones de Al se la observó en experimentos con cultivos celulares. En líneas celulares del café (*Coffea arabica*) tolerantes al Al se estimuló la actividad del ciclo celular y de las cinasas tipo A, mientras que en las líneas celulares sensibles al Al se observó una inhibición de las mismas. La respuesta del ciclo es dosis dependiente y la exposición a niveles de Al más altos causan la inhibición de la mitosis y muerte celular (Puschner *et al.*, 2009).

10.4.4 Zona de transición distal de la raíz: sitio para la percepción y transducción de la señal del aluminio

Las investigaciones sobre la sensibilidad espacial al aluminio en diferentes zonas del ápice de la raíz revelaron que la zona de transición, localizada de 1 – 2 mm del ápice de la raíz en el maíz, es el principal blanco de la toxicidad por Al. La zona de transición está localizada entre el meristemo y la zona de elongación. Las células de la zona de transición tienen una arquitectura específica que se ha relacionado con su alta capacidad para detectar factores ambientales (Hurst *et al.*, 2007).

El citoesqueleto tiene una función crucial en dirigir los cambios en la arquitectura de la célula. Se ha documentado en detalle el rápido impacto que tiene el aluminio sobre el citoesqueleto de actina (Ahad y Nick, 2007). Utilizando altas concentraciones de Al, se reportó el efecto del Al sobre el citoesqueleto en células de la epidermis y del córtex exterior de la DTZ en

ápices de raíz de maíz. Bajo condiciones menos severas de toxicidad, se han registrado las alteraciones inducidas por el aluminio en la actina-F en la parte central estelar de la DTZ y en menor extensión, en la parte central de la zona meristemática. Los filamentos de actina también son un blanco temprano del Al en las células meristemáticas de las raíces de *Triticum aestivum* (Puschner *et al.*, 2009).

10.5 Mecanismos moleculares de tolerancia al aluminio

Las plantas adaptadas a crecer en suelos con altas concentraciones de Al³⁺ han desarrollado mecanismos efectivos ya sea para la exclusión del aluminio o para tolerar altas concentraciones del metal en los tejidos (Puschner *et al.*, 2009). La Figura 1 resume algunos de estos mecanismos. El exceso de aluminio se puede neutralizar mediante la producción de ácidos orgánicos, moléculas que tienen alta afinidad por el metal, o mediante su interacción con sustancias férricas, para su posterior acumulación en vacuolas (Kochian *et al.*, 2004). En *A. thaliana* se ha identificado un gen de expresión constitutiva denominada *AtNr1*, el cual codifica una proteína transportadora del tipo ABC (*ATP-binding cassette, "ABC"*), que podría participar en la acumulación del Al en compartimentos intracelulares.

10.6 Disponibilidad de fósforo (P) en el suelo e interacción con el aluminio

El fósforo (P) es el octavo elemento en abundancia en la corteza terrestre, su concentración en suelo generalmente varía de 100 a 300 mg P / kg¹, o 200 a 600 kg P por ha¹. En suelos alcalinos, el fósforo (P) interactúa con cationes para formar compuestos de escasa solubilidad como el fosfato de calcio y en suelos ácidos se combina con el aluminio y hierro para formar

fósforos de aluminio y hierro. El P también se puede encontrar como parte de compuestos orgánicos, lo que constituye del 30 – 60% del P en las capas superiores del suelo. Estas fuentes diversas de P deben ser solubilizadas o mineralizadas para liberar P_i soluble para la nutrición vegetal. Las velocidades a las cuales el P se transforma en las distintas fracciones varían ampliamente, tanto en las cantidades de P en cada uno de las fracciones, así como en las velocidades de solubilidad, respondiendo a distintos factores. Por ejemplo: los exudados radiculares, el tipo de suelo, la concentración total de P, el contenido de materia orgánica, el pH, la temperatura, así como la humedad y las poblaciones microbianas asociadas a la raíz. Uno de los principales factores que afecta la disponibilidad de P_i en el suelo es la presencia de Al, por lo que es probable que en las plantas algunos aspectos de las rutas de percepción, señalización y respuesta a ambos tipos de estrés sean comunes (Kirckby y Johnson, 2008).

10.7 Tolerancia al estrés por deficiencia de fósforo

En casi todos los suelos el fósforo (P) es un nutriente escaso. La disponibilidad del P es baja debido a su unión a cationes y a la fijación en formas orgánicas. La concentración de fósforo disponible en solución va del rango de 1 – 2 μM . La disponibilidad de P_i es particularmente limitante en los suelos ácidos azogados de los trópicos y subtropicales, debido a su fijación con óxidos de Al y Fe en la superficie de las arcillas minerales. Por lo tanto, la disponibilidad de P_i es uno de los principales factores limitantes de la productividad de los cultivos en suelos ácidos. Debido a la baja disponibilidad de este nutriente mineral, las plantas han desarrollado numerosos mecanismos adaptativos para obtener el P del suelo. Uno de tales mecanismos incluye un aumento en la ramificación de las raíces laterales y de pelos radiculares y la asociación con hongos micorrízicos (Lynch y Brown, 2001). También existen variaciones intra- e interespecificas que afectan la capacidad de las plantas para tolerar el estrés por deficiencia de P, una característica conocida como "eficiencia de P" (Lynch, 1995). La eficiencia

de P tiene como base la capacidad superior de ciertas plantas e invertebrados para obtener P del suelo a través de alteraciones en la morfología o arquitectura de la raíz, la exudación de compuestos que movilizan P (por lo general ácidos orgánicos) y alteraciones en los transportadores de P_i en la membrana plasmática. Además, se ha sugerido un aumento en la eficiencia en el uso de P a través de requerimientos disminuidos de este nutriente a nivel celular o una removilización más eficiente dentro de la planta (Lynch y Brown, 2001).

10.7.1 Arquitectura de la raíz en deficiencia de fósforo

La arquitectura de la raíz se refiere a la configuración espacial del sistema radicular que proviene de una respuesta fisiológica o ambiental (López-Bucio *et al.*, 2003; Lambers *et al.*, 2006). La arquitectura de la raíz incluye la micrólogía, topología y patrones de distribución de estructuras celulares. Debido a que la difusión del P_i en el suelo es lenta, las estrategias de obtención de P dirigidas a expandir el área de superficie celular en contacto con el suelo son una forma efectiva de incrementar la eficiencia de P. Estas estrategias incluyen un incremento significativo en la relación de biomasa raíz/brote y una relocalización subsecuente de carbohidratos para mantener un mayor crecimiento radicular (Lynch, 1995). La deficiencia de fósforo causa cambios significativos en la morfología geométrica y arquitectura en general del sistema radicular (Lynch, 1995; López-Bucio *et al.*, 2002). Dichos cambios se caracterizan por un aumento en la formación de raíces laterales y una disminución en el diámetro de la raíz, incrementando de esta manera el área de superficie de absorción en relación al volumen. Estas alteraciones permiten a la raíz explorar una mayor superficie de suelo. La producción, elongación y proliferación de los pelos radiculares también incrementa el área de exploración radicular para la obtención de P_i (López-Bucio *et al.*, 2003). En algunas especies de plantas adaptadas a llanuras infértiles, la deficiencia de P conduce al desarrollo de agrupaciones de raíces denominadas proteoides con una exudación significativa de ácidos orgánicos que solubilizan el P. La simbiosis de las plantas con micorrizas vesiculares – arbusculares

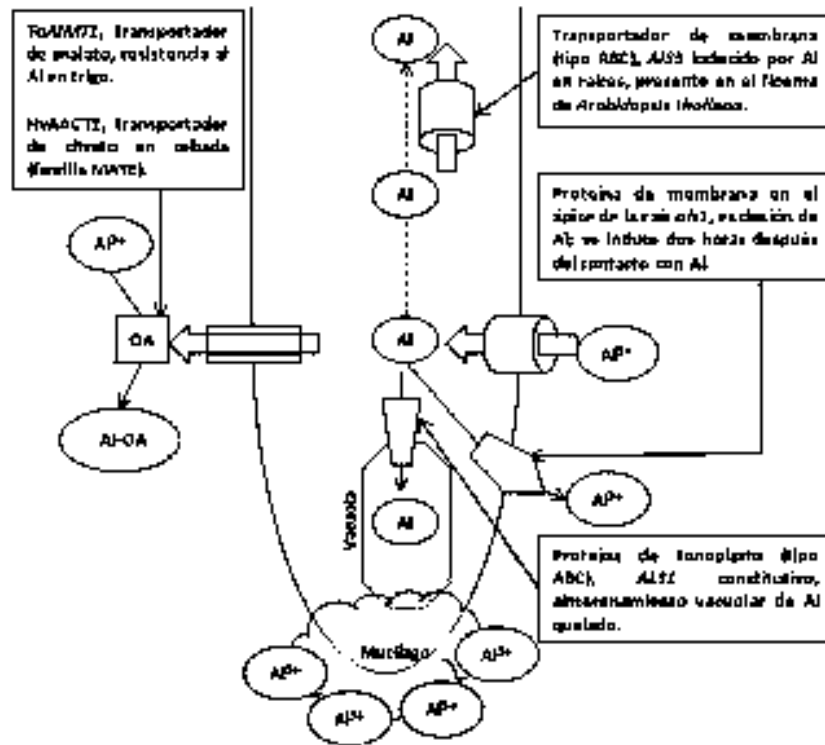


Figura 19.1. Mecanismos de exclusión y distribución del aluminio en el ápice de las raíces. La distribución de las proteínas transportadoras de membrana se relaciona con la excreción de Al. El transporte hacia del floema de la vacuola se muestra primero con los transportadores de citrato orgánicos. El murgajo devuelve al Al³⁺ desde su reserva al ápice de la raíz (Modificado de Xia, 2007).

también estimula la captación de nutrientes minerales de escasa difusión en el suelo, en particular P y Zn (Lamont, 2023).

Diversos grupos de investigación han sugerido que la disminución en la elongación de la raíz primaria en respuesta a la deficiencia de fósforo depende de la percepción local del P en la rizosfera por el meristema radicular y la raíz (Sánchez-Calderón *et al.*, 2005; Svirinocoff *et al.*, 2007). Sánchez-Calderón y col. (2006) realizaron un escrutinio para identificar mutantes de *A. thaliana* capaces de detener el crecimiento de la raíz en condiciones de deficiencia de P. De este escrutinio se aislaron y caracterizaron once mutantes insensibles a la deficiencia de fósforo, llamadas *lpi* (*low phosphate insensitive*) por sus siglas en inglés. Las mutantes *lpi* no presentan el programa de crecimiento determinado característico en la raíz primaria inducido por el

estrés de la deficiencia de P. Svirinocoff y col. (2007) demostraron que el contacto físico del ápice de la raíz primaria de *A. thaliana* con suelo deficiente en fósforo es necesario y suficiente para arrestar el crecimiento de la raíz. También encontraron que las mutaciones de pérdida de función en el gen *low phosphate root2* (*LPR1*) y su parálogo cercano *LPR2* reducen considerablemente esta inhibición. Así, el ápice de la raíz desempeña una función primordial en la percepción de la deficiencia de nutrientes. *LPR1* y *LPR2* codifican enzimas multifuncionales, enzimas involucradas en la descomposición celular.

Por otra parte, la mutante *par2* (*phosphate deficiency response 2*) muestra una respuesta hipersensible del meristema de la raíz a la deficiencia de P. El gen *PDR2* codifica para una ATPasa tipo P, la cual es requerida para el mantenimiento de la proteína SCR (SCARECROW) durante la deficiencia de P. *PDR2*

y *LPR1* interactúan genéticamente. La expresión de ambas proteínas se traslapa en el ápice de la raíz y ambas proteínas se localizan en el retículo endoplasmático (Ticoani *et al.*, 2009). Los análisis de las respuestas de crecimiento de *pdr2* y *lpr1* revelan una interacción entre la homeostasis del Pi y del Fe, lo que sugiere que el crecimiento determinado de la raíz en condiciones de deficiencia de P se debe a un efecto tóxico del Fe (Ward *et al.*, 2008; Ticoani *et al.*, 2009). En plantas silvestres, al reducir la concentración de Fe en un medio deficiente en P se observa la elongación de la raíz primaria, el cambio en la expresión de genes (PSI), un mayor peso de las plantas, una mejor capacidad para captar P y un incremento en el contenido de P en sus tejidos (Ward *et al.*, 2008). Lo anterior sugiere que *PDR2* y *LPR1* son componentes de una ruta en el retículo endoplasmático, la cual modula el crecimiento de la raíz primaria en respuesta a la disponibilidad de Pi y Fe.

De acuerdo con Ward *et al.* (2008), la ausencia de la expresión de *LPR1* proporciona resistencia a la toxicidad por Fe en condiciones de deficiencia de P. Se han reportado algunos casos de MOCs en plantas con actividad ferroxidasa y al menos en lechugas y algas, se han reportado casos de MOCs necesarias para el transporte de alta afinidad de Fe a la célula.

10.7.2 Transportadores de fosfato y exudación de fosfatasas

Existen adaptaciones bioquímicas y moleculares tendientes a aumentar la eficiencia de captación de P por la raíz, estas incluyen un aumento en la expresión de transportadores de P de alta afinidad y la exudación de fosfatasas, enzimas que liberan el P a partir de la materia orgánica.

Los transportadores de Pi de *A. thaliana* pertenecen a la familia Pht1. Estas proteínas se caracterizan por 12 dominios transmembranales localizados en la membrana plasmática y en los organelos. En el genoma de *A. thaliana* se han encontrado 9 transportadores y se han identificado homólogos en otras plantas como tomate y alfalfa. Algunos genes de la familia Pht1 son inducidos especialmente en la raíz en condiciones de deficiencia de Pi, lo que implica su función en la captación de fósforo en la raíz (Sano y Nagata, 2008). Otros genes inducidos

por la carencia de P incluyen fosfatasas ácidas, RNAsas, fosfolipasas y genes relacionados con el metabolismo de fosfolípidos.

10.8 Señalización por calcio en las plantas en respuesta al estrés

El mantenimiento de la homeostasis iónica intracelular es fundamental para la función fisiológica de una célula viva. El Ca^{2+} es un mensajero celular que regula una gran cantidad de procesos fisiológicos, tales como el balance iónico, la expresión de genes, el metabolismo de lípidos, proteínas y carbohidratos, crecimiento, división y desarrollo celular y procesos de secreción. Otros estímulos externos tales como la luz y varios factores de estrés, pueden traer consigo cambios en el nivel celular de Ca^{2+} , lo que puede afectar el crecimiento y desarrollo de la planta (McAinsh y Schroeder, 2009). El Ca^{2+} se almacena en las vacuolas, el retículo endoplasmático, las mitocondrias y está presente en la pared celular. Así, en vista de la amplia diversidad de funciones que regulan los niveles de Ca^{2+} , es probable que parte de la ruta de señalización del estrés por aluminio y deficiencia de fósforo en suelos ácidos sea mediada por Ca^{2+} (McAinsh y Schroeder, 2009; Tuteja, 2009).

10.8.1 Señalización por calcio en respuestas al aluminio

La interferencia del Al con la homeostasis del Ca^{2+} ha sido bien establecida (Kang et al., 2003). El aluminio causa un incremento en el calcio citosólico, lo cual puede deberse a la entrada de calcio del apoplasto o a la liberación de sus sitios de almacenamiento intracelular, o a ambos.

También se ha descrito en tallos, hojas y estomas de *Arabidopsis thaliana* la expresión de un proteína de membrana que participa en la percepción del calcio extracelular. Este receptor putativo parece mediar los niveles de Ca^{2+} intracelular por medio de la ruta del fosfatidilinositol (Figura 2) (Pei y Gilroy, 2008;

Tuteja, 2009). Se ha reportado que el aluminio inhibe la fosfolipasa C, lo cual afecta la síntesis de ácido fosfatídico (Peschnerrieder *et al.*, 2009; Tuteja, 2009).

Al comparar el transcriptoma de rizotoxicidad por Al, NaCl, Cd y Cu, Zhao *et al.*, (2009) reportan un conjunto de 16 genes que se traslapan para los cuatro factores de estrés. Este grupo de genes incluye a proteínas tipo calmodulinas (*calmodulin*, "CaM") y proteínas relacionadas con calmodulinas (*CaM-Like protein*, "CML"). Lo anterior sugiere que la ruta de señalización en respuesta a aluminio podría incluir proteínas tipo CaM y CML (Tuteja, 2009; Zhao *et al.*, 2009).

10.8.2 Señalización por calcio en respuesta a la deficiencia de fósforo

En el transcriptoma de *A. thaliana* en condiciones de deficiencia de fósforo aumenta considerablemente

la expresión de genes de rutas de señalización dependientes de Ca²⁺, por ejemplo CaMs, CLMs, proteínas patriculas u calineurinas (*Calineurin B-like protein*, "CBLs") y proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺ (*Calcium-dependent protein kinases*, "CDPKs"). Por ejemplo, una CDPK aumenta progresivamente sus niveles de expresión, hasta alcanzar niveles de inducción de unas 16 veces después de 72 horas en condiciones de deficiencia de fósforo (Bari *et al.*, 2006). Por lo antes mencionado, es probable que otros genes de respuesta a fósforo también se activen a través de rutas de señalización dependientes de Ca²⁺.

La deficiencia de P regula el crecimiento de los pelos radiculares haciéndolos más largos y densos (López-Bucio *et al.*, 2003). En *A. thaliana* el gen *RJRD2* codifica para una proteína homóloga de estrés oxidativo respiratorio (AurboHC) esencial para el crecimiento del ápice de los pelos radiculares. Los miembros de esta familia son oxidasas de NADPH de membrana plasmática (*NADPH oxidase*, "NOX") (a los NOX de plantas se les conoce como RBOH por las siglas *Respiratory Burst Oxidase Homologues*). Los RBOH de plantas presentan en su dominio N-terminal dos motivos de unión

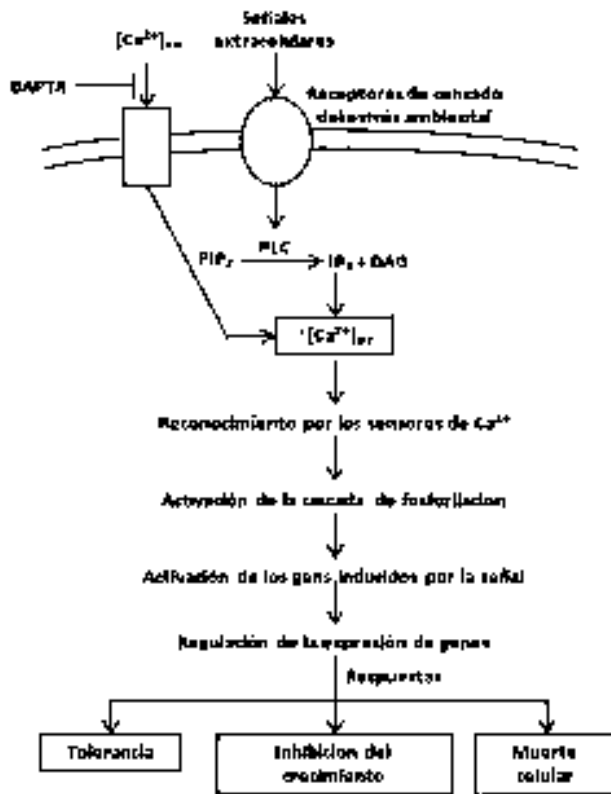


Figura 10.2 Efecto de las señales ambientales y los sensores sobre la concentración de Ca²⁺ celular. Una adecuada regulación de los niveles de Ca²⁺ es importante para la sobrevivencia de la célula. Las células vegetales poseen vegetales que sintetizan Ca²⁺, el cual puede ser liberado al citoplasma cuando se requiere. Hasta el momento no se ha estudiado de manera exhaustiva cuál es la fuente de Ca²⁺ que incrementa los niveles en el citosol en respuesta a una señal, pero en general se sabe que el Ca²⁺ liberado proviene principalmente de una fuente extracelular (el espacio apoplásmico), debido que el ácido 1,2-bis (3-oxoindol-5-yl) etano-3,3',5'-tricarboxílico (BAFTA) bloquea los canales del calcio en muchas ocasiones. El Ca²⁺ liberado podría entrar a la fosfolipasa C conduciendo a la liberación del fosfolípido (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, "PIP₂") a sus dos dominios (dominio oxidoplasma, "IP₃") con la consecuente liberación del Ca²⁺ de dicho compartimento intracelular (Tuteja, 2009).

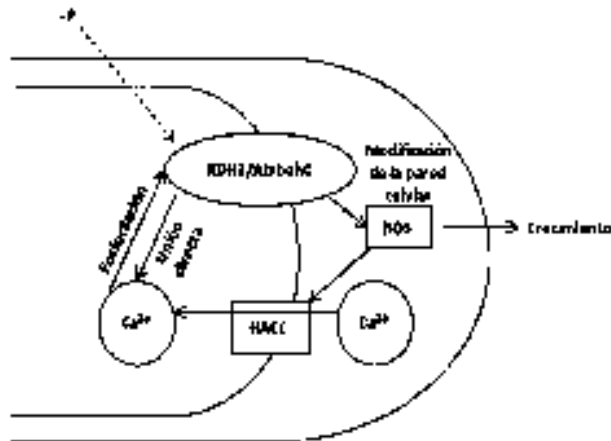


Figura 10.1 Mecanismo de retroalimentación positiva en el ápice de las raíces para mantener el crecimiento bajo deficiencia de fósforo. La proteína de membrana RHD2/AtrbohC, ROS y Ca^{2+} generan una retroalimentación positiva que produce ROS en el apoplasto, las cuales activan los canales de calcio en la membrana plasmática e inducen el influxo de Ca^{2+} a la célula. El Ca^{2+} puede entrar directamente a los motivos EF de RHD2 o activar la producción de ROS. RHD2/AtrbohC también puede ser activado por una fosforilación dependiente de Ca^{2+} , la cual puede ser controlada por una proteína como depuración de Ca^{2+} (CDPK). Este tipo de retroalimentación está restringida al ápice de los pelos radicales debido a que RHD2 se localiza exclusivamente en el ápice de los pelos en crecimiento. La deficiencia de P induce la transcripción de RHD2/AtrbohC, lo que promueve el crecimiento de los pelos radicales, principio fundamental de la deficiencia de P (Medvedev de Shin *et al.*, JCS, Bell *et al.*, 2009).

a Ca^{2+} . Lo anterior sugiere que el calcio puede ser un regulador importante de la actividad de RHD2/AtrbohC durante el crecimiento de los pelos radicales (Bell *et al.*, 2009).

Bell y col. (2009) sugieren un mecanismo de retroalimentación positiva en el ápice de los pelos radicales para mantener el crecimiento de los mismos. RHD2/AtrbohC produce especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species, "ROS") hacia el exterior de la célula, lo que a su vez activa canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática que inducen el influxo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula. El Ca^{2+} se une directamente a RHD2 y activa la producción de ROS. RHD2/AtrbohC también puede activarse por fosforilaciones dependientes de Ca^{2+} , las cuales pueden ser controladas por una UDPK. Este mecanismo de retroalimentación positiva se restringe a la punta del pelo radicular por el control de la localización de RHD2 y mantiene el crecimiento local de la punta del pelo. La expresión de RHD2 está regulada por la deficiencia de fósforo (Shin *et al.*, 2005). Es probable entonces que la carencia de P regule de manera positiva la transcripción o la actividad de RHD2 vía la homeostasis de Ca^{2+} (Figura 3).

10.9 Conclusiones

En los últimos años se ha realizado un progreso significativo en el entendimiento de los mecanismos físicos de tolerancia de las plantas a los suelos ácidos, así como en el desarrollo de cultivos más resistentes a tales tipos de suelos. Ahora conocemos diversos aspectos sobre la biología celular y molecular de la tolerancia al Al, que implican la expresión de genes de resistencia y mecanismos de detoxificación internos. La tolerancia a los suelos ácidos también depende de una mejor capacidad de las plantas para adquirir P. Resulta interesante que las dos adaptaciones más comunes de las plantas a los suelos ácidos, la tolerancia al aluminio y la eficiencia de fósforo, podrían tener mecanismos de señalización comunes alterando los niveles intracelulares de Ca^{2+} .

Esta última ruta de señalización tiene como blanco final la modulación de programas de crecimiento y desarrollo que afectan la arquitectura de la raíz con el impacto subsiguiente en la capacidad adaptativa de las plantas.

Referencias

- Abad, A., and Nick P. 2007. "Actin is bundled in activated-tagged tobacco mutants that tolerate aluminum". *Planta* 225: 451 – 468.
- Ahn, S. J., Sivaguru, M., Chung, G. C., Rangel, Z., and Matsumoto H. 2001. Aluminum-induced growth inhibition is associated with impaired efflux and influx of H⁺ across the plasma membrane in root apices of squash (*Cucurbita pepo*). *J. Exp. Bot.* 52: 1959 – 1966.
- Akerson, M. A., Munnis, D. N., and Burau R. G. 1989. "Adsorption of Al³⁺ to phosphatidylcholine vesicles". *Biochem Biophys. Acta.* 986: 33 – 40.
- Bari, R., Dan Panu, B., Sitt, M., and Scheible W. R. 2006. "PHO2, microRNA399 and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants". *Plant Physiol.* 141: 988 – 999.
- Barlow, P.W. 2002. "Cellular patterning in root meristems: its origin and significance". In Wasek, Y., Esfah, A., and U. Kalkafi (Eds.). *Plant roots: the hidden half*. Mercah Dekker. Third edition. New York, U.S.A. 135: 49 – 82.
- Bell, E., Takeda, S., and Dolan L. 2009. "Reactive oxygen species in growth and development". Del Rio, L. A., and A. Puppo (Eds.). *Reactive oxygen species in plant signaling*. In: *Signaling and communication in plants* (ed. by Baluška, F., and J. Vivanco). Springer-Verlag. Berlin, Germany. 245: 43 – 53.
- Blaney, F. P. C., Asher, C. J., Kerven, G. L., and D. G. Edwards. 1993. "Factor affecting sorption by calcium pectate". *Plant Soil.* 192: 269 – 275.
- Curales, I., Poschenrieder, C., and J. Barceló. 2008. "Boron-induced amelioration of aluminum toxicity in a monocot and dicot species". *J. Plant Physiol.* 165: 541 – 550.
- Doncheva, S., Amenós, M., Poschenrieder, C., and J. Barceló. 2005. "Root cell patterning—a primary target for aluminum toxicity in maize". *J. Exp. Bot.* 56: 1213 – 1220.
- Eticha, D., Strass, A., and W. J. Horst. 2005. "Localization of aluminum in the maize root apex can modify detect cell wall-bound aluminum?". *J. Exp. Bot.* 56: 1351 – 1357.
- Horst, W. J., Kufelmeier, M., Schmohl, N., Sivaguru, M., Wang, Y., Felle, H. H., Hedrich, R., Schneider, W., and A. Stah. 2007. "Significance of root apoplasts for aluminum toxicity and resistance of maize". Sattelmacher, B., and W. J. Horst (Eds.). *The apoplasts of higher plants: compartments of storage, transport and reactions*. Springer-Verlag. Dordrecht, The Netherlands. 457: 49 – 66.
- Idősi, P., Schlücht, M., Pavlovkin, J., Lichtscheidl, I., Baluška, F., and M. Ovečka. 2006. "Aluminum toxicity in plants: immobilization of aluminum into cells of the transition zone in *Arabidopsis* root apices related to changes in plasma membranes potential, endosomal behavior, and nitric acid production". *J. Exp. Bot.* 57: 4201 – 4213.
- Kirkby, E. A., and A. E. Johnston. 2008. "Soil and fertilizer phosphorus in relation to crop nutrition". Wise, J. D., and J. P. Hammond (Eds.). *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions*. In: *Plant ecophysiology*, vol. 7 (ed. by De Kok, L. J., Hawkesford, M. J., and I. Stulen). Springer-Verlag. Dordrecht, The Netherlands. 289: 177–223.
- Kisnieriemi, V., and V. Sakalauskas. 2005. "Al³⁺ induced membrane potential changes in *Nitellopsis obtusa* cells". *Biologika.* 1: 31–34.
- Kochian, L. V., Huelsenbeck, G. A., and M. A. Vitteirus. 2004. "How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency". *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 459–493.
- Kumar, M., Taylor, G. J., and M. K. Deyholts. 2008. "Transcription responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*". *Mol. Genet. Genomics.* 274: 339 – 357.
- Lambert, H., Shane, M. W., Cromer, M. D., Pears, S. J., and E. J. Veneklaus. 2006. "Root structure and function for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits". *Ann. Bot.* 98: 693 – 713.
- Lainout, B. 2003. "Structure, ecology and physiology of root clusters—a review". *Plant Soil.* 284: 1–19.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., and L. Herrera-Estrella. 2003. "The role of nutrient availability in regulating root architecture". *Curr. Opin.*

- Plant Biol. 6: 280–287.
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M. F., Simpson, J., and L. Herrera-Estrella. 2002. "Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system". *Plant Physiol.* 132: 244–256.
- Lynch, J. 1995. "Root architecture and plant productivity". *Plant Physiol.* 109: 7–13.
- Lynch, J. P., and K. Brown. 2001. "Topsoil foraging – an architectural adaptation of plant to low phosphorus availability". *Plant Soil.* 237: 225–237.
- Ma, J. Y. 2007. "Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants". Kwang, W. J. (Ed.), vol. 264. International review of cytology: a survey of cell biology. Academic press, U.S.A. 264: 225–252.
- McAinsh, M. R., and J. I. Schroeder. 2009. "Cross-talk in Ca²⁺ signaling pathways". In: Yoshioka, K., and K. Shinzaki (Eds.). Signal cross-talk in plant stress responses. Wiley-Blackwell, Singapore. 210: 59–95.
- Menzies, N. W. 2003. "Toxic elements in acid soils: chemistry and measurement". Rengel, Z. (Ed.). Handbook of soil acidity. Marcel Dekker, U.S.A. 496: 267–296.
- Pei, Z.-M., and S. Gibroy. 2008. "Calcium signaling and their regulation". Yang, Z. Intracellular signaling in plants. In: Annual plant reviews, vol. 33 (Eds. Roberts, J. A., Evans, D., McClanus, M. T., and J. K. C. Rose). Wiley – Blackwell 430: 137–162.
- Pochechieder, C., Amenis, M., Corrales, I., Doncheva, S., and J. Barceló. 2009. "Root behavior in response to aluminum toxicity". Baluška, F. (Ed.). Plant-environment interactions. From sensory plant biology to active plant behavior. In: Signaling and communication in plants (ed. by Baluška, F., and J. Vírmanová). Springer-Verlag, U.S.A. 308: 21–43.
- Ramírez-Rodríguez, V., López-Bucio, J., and L. Herrera-Estrella. 2005. "Adaptive responses of plants to nonoptimal soil pH". Jenks, M. A., and P. M. Hasegawa (Eds.). Plant abiotic stress. Wiley-Blackwell, India. 288: 145–164.
- Rengel, Z., and W. H. Zhang. 2003. "Role of dynamics of intracellular calcium in aluminum-toxicity syndrome". *New Phytol.* 159: 295–314.
- Ritchie, R. J., and S. S. Rajbapat. 2008. "Al-toxicity studies in yeast using gallium as an aluminum analogue". *Biomaterials.* 21: 379–393.
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J. G., and L. Herrera-Estrella. 2005. "Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*". *Plant Cell Physiol.* 46: 174–184.
- Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Gutiérrez-Osuga, A., Hernández-Abreu, E., and L. Herrera-Estrella. 2006. "Characterization of low phosphate insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency". *Plant Physiol.* 140: 879–889.
- Sano, T., and T. Nagata. 2008. "Phosphate uptake and transport to plant cells". Farwal, P., Singh, R. P., and O. P. Dhakker (Eds.). Plant membrane and vacuolar transporters. CAB International, U.K. 384: 131–147.
- Shin, K., Berg, R. H., and D. P. Schachtman. 2005. "Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency". *Plant Cell Physiol.* 46: 1350–1357.
- Silva, I. R., Smyth, T. J., Moxley, D. F., Carter, T. E., Allen, N. S., and T. W. Ruffy. 2000. "Aluminum accumulation at nuclei of cells in the tip root. Fluorescence detection using lumogallin and confocal laser scanning microscopy". *Plant Physiol.* 123: 543–552.
- Sununer, M. E., and A. D. Noble. 2003. "Soil acidification: the world story". Rengel, Z. (Ed.). Handbook of soil acidity. Marcel Dekker, U.S.A. 49n: 1–28.
- Sviridovoff, S., Creff, A., Raymond, M., Signillat-Claude, C., Ricard, L., Blanchet, A., Nussbaum, L., and T. Desnos. 2007. "Root tip contact with low phosphate media reprograms plant root

- architecture". *Nat. Genet.* 19: 792 – 796.
- Ticconi, C. A., Lucero, M. D., Sakhanwala, S., Adamson, A. W., Creff, A., Nussbaum, L., Deane, T., and S. Abel. 2009. "ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental responses of root meristems to phosphate availability". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 14174 – 14179.
- Tuteja, N. 2009. "Integrated calcium signaling in plants". Baluška, F. and S. Moncuso (Eds.). *Signaling in plant*. In: *Signaling and communication in plants* (ed. by Baluška, F., and J. Vivanco). Springer-Verlag, Berlin, Germany. 308: 29–50.
- Ward, J. T., Lahner, B., Yakobova, E., Salt, D. E., and K. G. Raghothama. 2008. "The effect of iron in the primary root elongation in *Arabidopsis* during phosphate deficiency". *Plant Physiol.* 147: 1181–1191.
- Watanabe, T., Osaka, M., and T. Tsubono. 2003. "Al uptake kinetics in roots of *Melastoma malabathricum* L. – an Al accumulator plant". *Plant Soil.* 231: 283–291.
- Zhan, C.-R., Ikka, T., Sawaki, Y., Kobayashi, Y., Suzuki, Y., Hibino, T., Sato, S., Sakurai, N., Shibata, D., and H. Koyama. 2009. "Comparative transcriptomic characterization of aluminum, sodium chloride, cadmium and copper rhizotoxicities in *Arabidopsis thaliana*". *BMC Plant Biol.* 9: 32 – 47.

Capítulo II

Plant Soil
DOI 10.1007/s11104-011-1026-1

REGULAR ARTICLE

Rare earth elements lanthanum and gadolinium induce phosphate-deficiency responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings

León F. Ruiz-Herrera · Lenin Sánchez-Calderón · Luis Herrera-Estrella · José López-Bucio

Received: 5 July 2011 / Accepted: 9 October 2011
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

Abstract

Aims The aim of this work was to investigate the effects of rare earth elements lanthanum (La^{3+}) and gadolinium (Gd^{3+}) on root system architecture and interactions with low phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*.

Methods Detailed analysis of root system architecture was performed in *Arabidopsis* WT seedlings and in low phosphorus insensitive mutants *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* in response to REEs. Expression studies of P-deficiency regulated phosphate transporters *AtPT1*, *AtPT2* and *AtMGD2* were also conducted. The role of auxin as a mediator of root morphogenetic changes by

Gd^{3+} was evaluated by using the auxin-inducible marker gene *DR5::uidA* and auxin-signaling mutants *tir1*, *tir1 afb2 afb3*, *arf7*, *arf19* and *arf7 arf19*.

Results We found that increasing concentrations of REEs inhibited primary root growth and increased root hair and lateral root development in WT seedlings. These effects were reduced in low phosphorus insensitive mutants *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1*. Gd^{3+} activated the expression of *AtPT1*, *AtPT2* and *AtMGD2* markers. Lateral root formation by Gd^{3+} decreased in *tir1 afb2 afb3* and *arf7 arf19* mutants.

Conclusions Our results suggest that REEs affect RSA in *Arabidopsis* by inducing low-P adaptive responses by creating P deficiency conditions in the growth medium by precipitating phosphate.

Responsible Editor: Robert Reid.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11104-011-1026-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. F. Ruiz-Herrera · J. López-Bucio (✉)
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas,
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo,
Edificio B3, Ciudad Universitaria,
C. P. 58030 Morelia, Michoacán, Mexico
e-mail: jlbucio@umich.mx

L. Sánchez-Calderón · L. Herrera-Estrella
Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad,
CINVESTAV Irapuato,
C. P. 36821 Irapuato, Guanajuato, Mexico

Keywords Lanthanum · Gadolinium · Phosphate deficiency · *Arabidopsis thaliana* · Auxin mutants

Abbreviations

ABA	Abscisic acid
AR	Adventitious root
IAA	Indole-3-acetic acid
LR	Lateral roots
LRD	Lateral root density
P	Phosphorus
PLD	Phospholipase D
PRL	Primary root length
RAM	Root apical meristem

Published online: 11 November 2011

 Springer

RSA Root system architecture
 REEs Rare earth elements
 ROS Reactive oxygen species

Introduction

Rare earth elements (REEs) comprise seventeen chemical elements in the periodic table, specifically the fifteen lanthanoids plus scandium and yttrium. Despite their name, REEs, with the exception of the radioactive promethium, are relatively plentiful in the Earth's crust, with cerium being the 25th most abundant element at 68 parts per million, which is similar to copper. There exist more than 190 minerals that contain REEs in considerable amounts (Wytenbach et al. 1998; Tyler 2004).

The extensive application of REEs in agricultural practices in China has brought remarkable economic benefits (Wytenbach et al. 1998; Pang et al. 2002; Tyler 2004). The Chinese fertilizer industry produces a total of 5 million tons of ammonium carbonate fertilizer enriched with REEs that is applied to 6.68 million ha farmland. REEs consumption for agricultural purposes has reached 1,100 tons per year. In addition, REEs are waste products from industry of cell phones, hybrid cars and smart homes (Bradsher 2011). These facts have led to an increasing concern about the impact of REEs on the environment. For instance, maximum permissible concentrations of some REEs for surface water, sediment and soil have been established in The Netherlands (Kubera et al. 2007).

The reported data of REE effects on field and laboratory tests in plants are often contradictory and inconsistent. Several reports show the beneficial effects of low doses of REEs on a wide range of crops when applied as foliar sprays, seed treatments, or added to soil or liquid rooting media (Pang et al. 2002; Tyler 2004; El-Ramady 2010a). REEs induce germination of rice seeds (Hong et al. 2000), the transition to flowering in *Arabidopsis thaliana* (He and Loh 2000), and growth and taxol production in cell cultures of *Taxus yunnanensis* (Wu et al. 2001). In contrast, La^{3+} inhibits root growth in many plant species including barley (van Steveninck et al. 1976), wheat (Parker et al. 1988; Hu et al. 2002; Kataoka et al. 2002), mungbean (Diatloff and Smith 1995a, b), soybean (Sun and Li 1990; Liu et al. 1997), and in

Arabidopsis thaliana (Kobayashi et al. 2007). However, the mechanisms underlying the positive or toxic effects of REEs on plant growth and development are far from clear.

Physiological studies have revealed that REE toxicity has a complex nature with apoplastic and symplastic effects. Trivalent cations La^{3+} and Gd^{3+} may react to negative charged ligands within the apoplast, in the plasma membrane or the cell wall (Reid et al. 1996; Yemiyahu et al. 1997; Wei and Zhou 2000; Shomer et al. 2003; Shi et al. 2005; Wang et al. 2007; Ritchie and Raghupathi 2008). La^{3+} and Gd^{3+} have been used to inhibit Ca^{2+} channels with subsequent perturbations to abscisic acid (ABA) signaling (Hagenbeek et al. 2000; He and Loh 2002), inhibition of cyclin-dependent kinases (CDPKs, Polya et al. 1987; Pang et al. 2002) and phospholipase D (PLD, Gampala et al. 2001) as well as modification in reactive oxygen species (ROS) homeostasis (Jabs et al. 1996; Shi et al. 2005; Wang et al. 2005; Wang et al. 2007).

The root system architecture (RSA) is an important trait determining plant growth and adaptation to mineral and/or metal stress. It makes reference to the complexity of the root system, which is the result of the growth response to environmental conditions and includes the morphology, topology and distribution patterns of primary and lateral roots, adventitious roots and root hairs (Dinkerlaker et al. 1995; Lynch and Brown 2001; Williamson et al. 2001; López-Bucio et al. 2003; Luthers et al. 2006). RSA is important both for nutrient and water uptake and is the prime site for interactions with microorganisms at the rhizosphere (López-Bucio et al. 2003; Pérez et al. 2009; Malamy 2010). La^{3+} application causes nutrient alterations and disturbance of cell proliferation, cytoskeletal organization and root swelling (Liu and Hasenstein 2005; Wang et al. 2011). REEs show strong affinity for phosphate in vitro. Interaction of La^{3+} and Gd^{3+} with phosphate produces insoluble salts that precipitate in the form of LaPO_4 or GdPO_4 (Ding et al. 2005). This opens the possibility that P deficient soils supplied with REEs may encounter problems to sustain plant growth, whereas addition of La^{3+} or Gd^{3+} could reduce the potential for P toxicity in concentrated nutrient solutions. Hence, positive growth responses might be obtained when REEs are added to growth media containing initially high P concentrations.

Currently, direct evidence linking REEs application with plant P responses is lacking.

Phosphate deficiency has a notable effect upon the architecture of the root system of *Arabidopsis thaliana*, inhibiting primary root growth and stimulating lateral root and root hair formation, which allows for an increased root biomass in the upper layers of the soil for more efficient nutrient foraging (Williamson et al. 2001; López-Bucio et al. 2002; Al-Ghazi et al. 2003; Pérez-Torres et al. 2008). The reduction in primary root growth is due to a determinate low P-induced root developmental program that arrests cell division in the primary root meristem and promotes differentiation within the root tip, which is absent in the *low phosphate sensitive* (*lps*) or *low phosphate resistant* (*lpr*) mutants of *Arabidopsis thaliana* (Sánchez-Calderón et al. 2005; Sánchez-Calderón et al. 2006; Svitounoff et al. 2007). A central role has been proposed for the phytohormone auxin (indole-3-acetic acid, IAA) in RSA responses to P deficiency. It has been shown that the increased lateral root development in *Arabidopsis* seedlings grown in low P conditions is dependent of auxin transport and signaling (López-Bucio et al. 2002; López-Bucio et al. 2005). Moreover, Pérez-Torres et al. (2008) reported that LR formation and maturation in response to phosphate deficiency is mediated by changes in auxin sensitivity. Low P alters the expression of auxin-responsive genes and stimulates pericycle cells to proliferate. Modulation of auxin sensitivity by low P was found to depend on the family of auxin receptors TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1)/AUXIN SIGNALING F-BOX BINDING1 to 5 (AFB1-5), as well as the transcription factors AUXIN RESPONSE FACTOR7 and 19 (ARF7 and ARF19) (Dhanasekiri et al. 2005; Kupinski and Leyser 2005).

Due to the use of REEs not only as fertilizers, but as rough materials for high technology products, their levels in soils are increasing (Tyler 2004; Bandsher 2011). Therefore, it is of fundamental importance to determine the rhizotoxicity of REEs or their growth promoting capability in plants amenable to genetic analysis in order to determine the mechanisms of plant adaptation to REEs. Since La^{3+} and Gd^{3+} show strong affinity for anions, they might bind and interact with PO_4^{3-} . Thus, it is of interest to find out if La^{3+} and Gd^{3+} affects RSA and investigate a possible

cross-talk with the low P adaptation mechanisms. In this report, we studied the effects of REEs on root development and low P-induced gene expression in *Arabidopsis* seedlings and characterized the involvement of auxin signaling in RSA responses to Cd^{2+} .

Materials and methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana ecotype Col-0, the transgenic lines *DR5::uidA* (Lilmasov et al. 1997), *CycB1.1::uidA* (Colón-Carmona et al. 1999), *AtPT1::GLS*, *AtPT2::GLS* (Karthikeyan et al. 2002), *AtMGD2::GLS* (Kobayashi et al. 2006), and the mutant lines *lpr1-3* (Sánchez-Calderón et al. 2005), *lpr1-1 lpr2-1* (Svitounoff et al. 2007), *tir1-1* (Ruegger et al. 1998), *arf1-1 afb2-1 afb3-1* (Dhanasekiri et al. 2005), *arf7-1 arf19-1*, and the double mutant *arf7-1 arf19-1* (Okushina et al. 2005), were used in most experiments. Seeds were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% (v/v) bleach for 7 min. After five washes in distilled water, seeds were germinated and grown on Petri dishes containing sterile modified MS medium (pH 7.0, 0.6% [w/v] Suc. and 1% [w/v] agar). The basic MS medium (Sigma) 0.2X contained 0.25 mM KH_2PO_4 , 4.125 mM NH_4NO_3 , 3.758 mM KNO_3 , 0.6 mM CaCl_2 , 0.3 mM MgSO_4 , 1.0 μM KI, 20.04 μM H_3BO_3 , 19.99 μM $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 6.0 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 μM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.021 μM $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 19.99 μM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 20.0 μM $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Seeds were grown in Petri dishes under a photoperiod of 16 h of light and 8 h of darkness and a temperature of 22°C using a plant growth cabinet (Percival AR95L, Percival Scientific). Plates were placed vertically at an angle of 65° to allow root growth along the surface of the agar and to allow the unimpeded growth of the hypocotyl into the air.

REE treatments and computer simulations

Nutrient medium was supplemented with GdCl_3 or LaCl_3 (at 50 μM intervals). The compounds were dissolved in DMSO (stock 0.5 mM), added to cooled (50°C) molten medium and poured into plates.

Computer simulations were carried out using the GEOCHEM-EZ program (Shaff et al. 2010).

Histochemical analysis

For histochemical analysis of GUS activity, *Arabidopsis* seedlings were incubated overnight at 37°C in a GUS reaction buffer (0.3 mg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide in 100 mM sodium phosphate, pH 7), and the stained seedlings were cleared by the method described by Malamy and Benfey (1997). For each marker line and for each treatment, at least 15 transgenic plants were analyzed. A representative plant was chosen for each lanthanide treatment and imaged using Nomarski optics on a Leica DMR microscope.

Analysis of root architecture traits

The *Arabidopsis* root system was analyzed with an EZ4D stereomicroscope (Leica). All emerged secondary roots that were clearly visible using a 30X objective were taken into account when counting the number of LRs or ARs. For all experiments, the overall data were statistically analyzed in the SPSS 10 program as described by López-Bucio et al. (2002). Roots of *Arabidopsis* seedlings were cleared and observed by microscopy to classify the stage of LR development.

Results

REEs modulate root system architecture in *Arabidopsis thaliana*

We characterized the effects of La^{3+} and Gd^{3+} on RSA by growing WT *Arabidopsis thaliana* (Col-0) seedlings over the surface of agar-solidified Petri plates containing Murashige and Skoog (MS) 0.2X medium supplemented with varied concentrations of GdCl_3 and LaCl_3 . The evaluated root architecture parameters were primary root length (PRL), total number of lateral roots per plant (LR) and lateral root density (LRD). At 12 days after germination (d.a.g.) *A. thaliana* seedlings had a PRL of 4.3 cm, whereas treatments with GdCl_3 and LaCl_3 showed a dose-dependent inhibition in primary root growth (Fig. 1a). The most active compound repressing primary root growth was GdCl_3 decreasing PR length by 80% at a

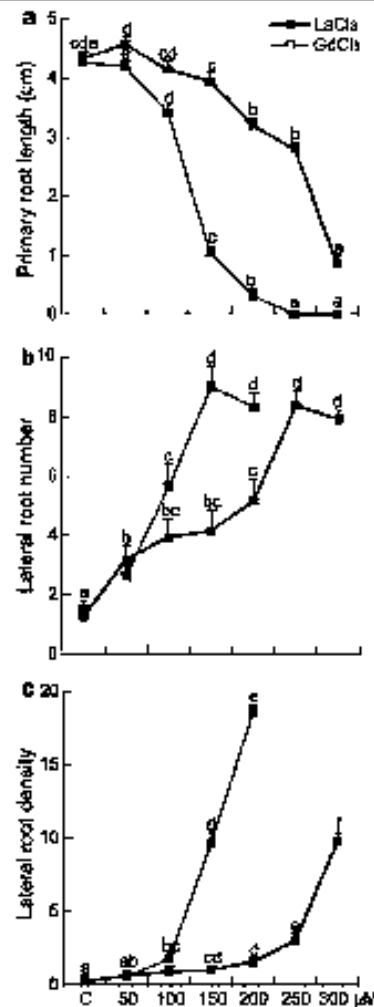


Fig. 1 *Arabidopsis* root developmental response to REE³⁺. *Arabidopsis* Col-0 seedlings were grown for 12 days on agar plates supplied with DMSO or with LaCl_3 (black line) or GdCl_3 (grey line) at 50 μM concentration intervals and the primary root length (a) total lateral root number (b) and lateral root density (c), determined. Values shown represent the mean of 45 seedlings per treatment \pm SD. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results

150 μM concentration (Fig. 1a). LR and LRD values increased in response to GdCl_3 and LaCl_3 supply (Fig. 1b and c) giving rise to a highly branched root system with second and third order lateral roots

(Fig. S1). $GdCl_3$ and $LaCl_3$ also had an effect upon the structure of the primary root meristem (RAM), inducing differentiation events such as the formation of root hairs and the formation of lateral roots close to the root apex (Fig. S1).

Low phosphate insensitive mutants are resistant to the effects of REEs in RSA modulation

The alterations in RSA observed in seedlings treated with $GdCl_3$ and $LaCl_3$ were similar to that observed in *Arabidopsis* seedlings grown under phosphate deficiency (López-Bucio et al. 2002; Sánchez-Calderón et al. 2005; Pérez-Torres et al. 2008). To determine whether the primary root growth inhibition could be due because the REEs are inducing a low P deficiency response, we compared the RSA of *Arabidopsis* WT (Col-0) seedlings and low phosphate resistant *lpl1-3* (Sánchez-Calderón et al. 2005) and *lpr1-1 lpr2-1* mutants (Svitoonoff et al. 2007). When grown in medium without REEs, RSA was similar in WT and in both mutant lines (Fig. 2a-c), whereas when treated with $GdCl_3$, the *lpl1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* mutants showed resistance to primary root growth inhibition and LR induction as compared to WT seedlings (Fig. 2a-c, Fig. S2). The mutants did not exhibit root hair or LR formation close to the root tip (Fig. 3a-f), which is typically induced by 150 μM $GdCl_3$ in WT seedlings.

Gd^{3+} affects cell division in the primary root meristem

Phosphate deficiency inhibits primary root growth by inducing the entrance of the primary root into a determinate developmental program, which arrests cell division at the meristem (Sánchez-Calderón et al. 2005). To determine whether $GdCl_3$ could inhibit primary root growth by decreasing cell proliferation, we performed a dose-response analysis monitoring cell division in the primary root meristem in WT or *lpl1-3* seedlings expressing the *CycB1;1:uidA* reporter (Colón-Carmona et al. 1999). In medium without Gd^{3+} the expression of *CycB1;1:uidA* was clearly revealed as a patchy pattern at the primary root meristem both in WT plants and in *lpl1-3* mutants (Fig. 4a). 150 μM $GdCl_3$ treatment totally decreased expression of the marker in WT plants, while *lpl1-3* seedlings still retained *CycB1;1:uidA* expression

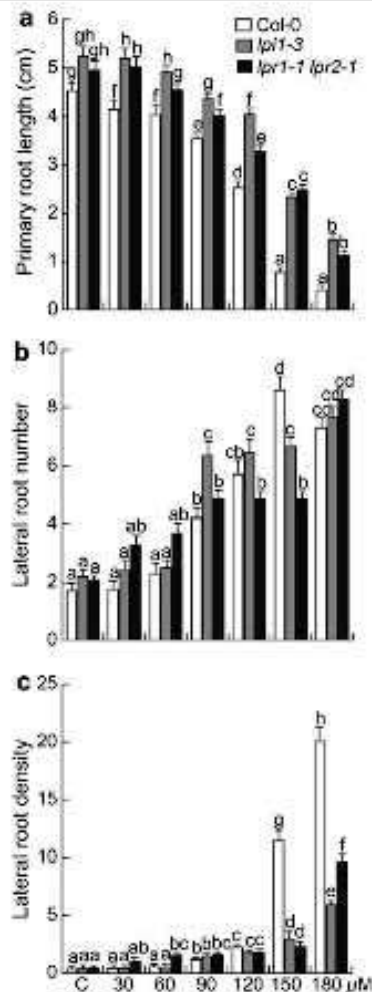
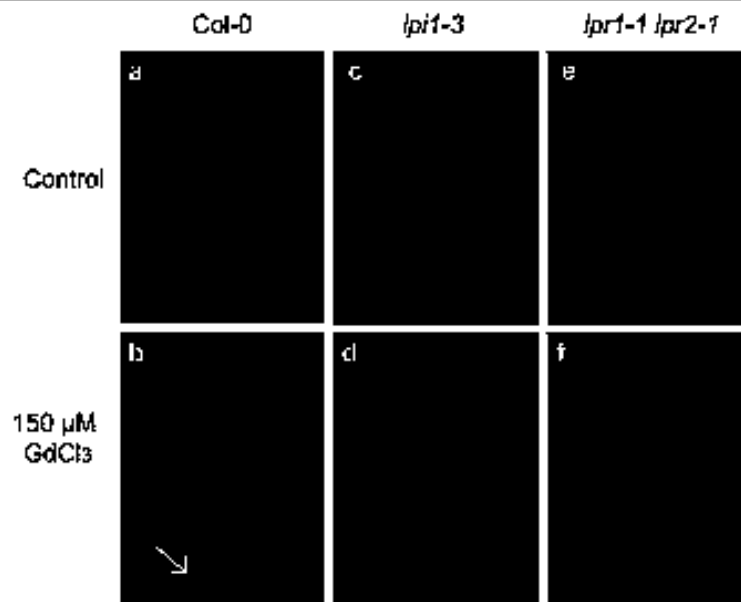


Fig. 2 Effect of Gd^{3+} on root development in low phosphate resistant *Arabidopsis* mutants. *Arabidopsis* WT (Col-0, white bars) and mutant (*lpl1-3*, gray bars), or (*lpr1-1 lpr2-1*, black bars) seedlings were grown for 12 days side by side over the surface of agar plates supplied with the solvent (DMSO) or increasing $GdCl_3$ concentrations and the mean primary root length (a), total lateral root number (b) and lateral root density (c) determined for 45 seedlings. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results

(Fig. 4a). Figure 4b shows that as the $GdCl_3$ concentration in the medium increases, the length of the root meristem decreases both in WT and *lpl1-3*

Fig. 3 Effect of Gd^{3+} on primary root tip structure in *Arabidopsis* WT seedlings and low phosphate resistant mutants. Root tip structure in seedlings treated with the solvent (control) or 150 μ M $GdCl_3$. Notice that *lpr1-3* (c and d) and *lpr1-1 lpr2-1* (e and f) mutants are resistant to Gd^{3+} -induced meristem exhaustion when compared to WT (a and b) seedlings. WT and mutant seedlings were grown side by side on medium supplied with DMSO or $GdCl_3$ for 12 days. Photographs are representative individuals of 45 seedlings. Arrow (b) indicates the former primary root tip in a WT seedling treated with Gd^{3+}



seedlings. However, in most $GdCl_3$ concentrations tested the length of the meristem in *lpr1-3* mutants was greater than in WT seedlings. This was particularly evident in 150 μ M $GdCl_3$. These results show that *lpr1-3* is partially resistant to the cell division arrest induced by Gd^{3+} on the primary root meristem.

Gd^{3+} induces expression of phosphate-regulated genes

Several genes have been found to be induced by phosphate deficiency. These include genes involved in P uptake, metabolism of phospholipids, phosphatases and RNases (Raghothama 1999). To investigate whether Gd^{3+} treatment could induce low P-regulated gene expression, we monitored the expression directed by the promoters of the *AtPT1* and *AtPT2* P transporter genes. As previously reported (Kambhikyan et al. 2002), *AtPT1::uidA* plants grown in P-sufficient medium without Gd^{3+} showed GUS expression in the entire root system, except in root tips (Fig. 5a-c). In plants grown in medium supplemented with 150 μ M $GdCl_3$, *AtPT1::uidA* activity was also detected in the primary root tip (Fig. 5d-f). Control *AtPT2::uidA* plants showed no detectable GUS activity in the root system

(Fig. 5g-i). However, when treated with 150 μ M $GdCl_3$ the plants showed high *AtPT2::uidA* expression in the root system except the most distal part of the root tip (Fig. 5j-l).

In plants that are deprived of phosphorus, phospholipids are replaced by galactolipids, which are synthesized by DGDG and MGDG synthases (Essigmann et al. 1998; Hlirni et al. 2000; Sanda et al. 2001; Yu et al. 2002; Kobayashi et al. 2009). The promoter of the MGD2 synthase in *A. thaliana* fused to the β -glucuronidase gene (*AtMGD2::GUS*) is induced by P deficiency (Kobayashi et al. 2006). We found that $GdCl_3$ strongly induced the expression of *AtMGD2::GUS* in leaves and in the primary root (Fig. S3). Our results show that $GdCl_3$ activate low P-induced gene expression in *Arabidopsis* seedlings.

Phosphate application resumes PR growth in plants exposed to Gd^{3+}

If Gd^{3+} causes a low P-induced response in the root, then we hypothesize that by adding phosphorus to the medium, the primary root should resume growth. To test this hypothesis, increasing concentrations of

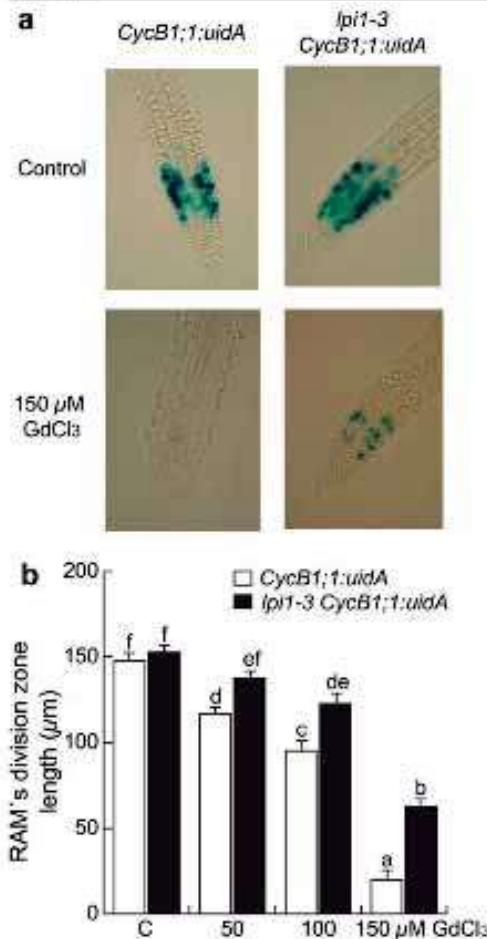


Fig. 4 Effect of Gd^{3+} on *CycB1;1:uidA* expression in transgenic wild-type and *lpi1-3* background. (a) 12 h GUS staining of *CycB1;1:uidA* primary roots in WT and *lpi1-3* seedlings grown for 9 days in medium with DMSO or 150 μ M $GdCl_3$. Photographs are representative of 20 stained plants. (b) Mean length of the *CycB1;1:uidA* expression domain. Values shown in B represent the mean \pm SD of 45 seedlings analyzed per treatment. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results

KH_2PO_4 were added to the growth media (with an initial P concentration of 0.25 mM) supplied or not with 150 μ M $GdCl_3$ and PR growth and LR formation analyzed in WT, *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* seedlings. The primary root growth in response to

Gd^{3+} was normalized by adding P to the medium (Fig. 6a). It just required an extra 0.25 mM P concentration to resume PR growth in WT and mutant seedlings (Fig. 6a) and to reduce LR number and LRD in WT plants to the levels observed in seedlings grown without Gd^{3+} (Fig. 6b and c). The same tendency was documented in *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* mutants (Fig. 6a-c). Phosphorus also resumed cell division in the primary root meristem and prevented the formation of root hairs and lateral roots close to the apex (Fig. S4).

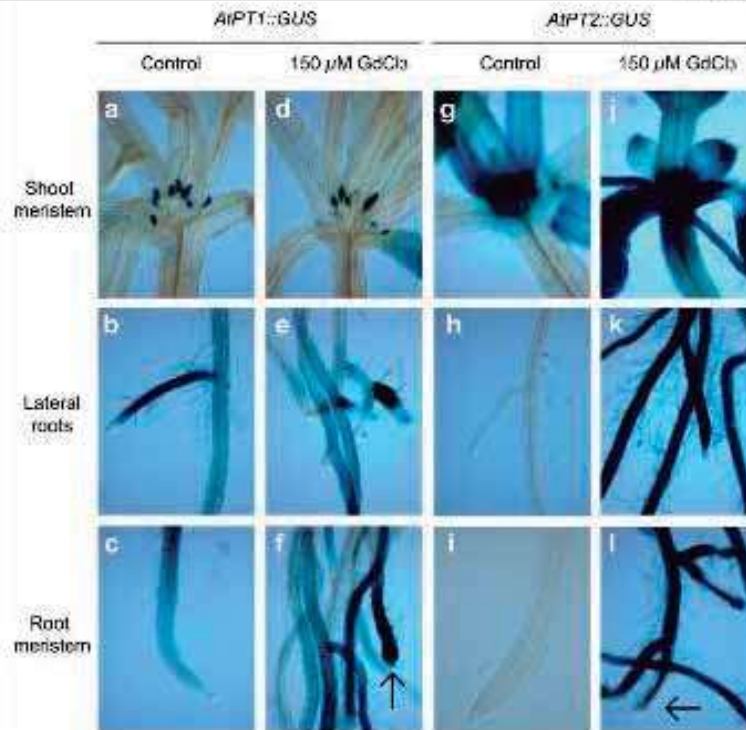
Due to the similarity between Gd^{3+} and La^{3+} ions with Ca^{2+} , these REEs have been widely used as Ca^{2+} channel blockers (for reviews see Evans 1990 and Sigel and Sigel 2003). Our MS 0.2X medium has a $CaCl_2$ concentration of 0.3 mM. To determine if Gd^{3+} and La^{3+} may be affecting Ca^{2+} availability and in this way regulate RSA, we performed experiments to evaluate PR, LR and LRD responses in medium supplemented with 1.5, 3.0 and 6.0 mM $CaCl_2$. Our results show that PR growth could be partially (60%) reestablished in WT seedlings by 6.0 mM $CaCl_2$ (Fig. 7a). Both *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* mutants reacted better to $CaCl_2$ treatments resuming PR at lower concentrations (Fig. 7a). In our experiments, 6.0 mM $CaCl_2$ also normalized LR formation and LRD in WT and mutant lines (Fig. 7b and c).

Gd^{3+} induces lateral root development by altering auxin signaling

PR growth and LR formation are regulated by auxin signaling. Since auxin triggers various developmental effects through the activation of auxin-responsive genes, we tested the possibility that Gd^{3+} could alter auxin-regulated gene expression in Arabidopsis roots. To address this question, we performed analysis of the expression of the auxin-responsive marker gene *DR5:uidA* (Ulmasov et al. 1997). In control seedlings, the expression of *DR5:uidA* was mainly observed in the primary root tip (Fig. 8a and b). In seedlings treated with 120 and 150 μ M $GdCl_3$, we found a decrease in *DR5:uidA* expression at the PR tip, but increased expression in LR (Fig. 8c-f).

Auxin is perceived by direct binding to the *transport inhibitor response 1* protein (TIR1), a member of a small family of F-box proteins (Dharmasiri et al. 2005; Kepinski and Leyser 2005). This interaction

Fig. 5 Effect of Gd^{3+} on *AtPT1::GUS* and *AtPT2::GUS* expression. *AtPT1::GUS* and *AtPT2::GUS* expressing seedlings were grown for 12 days in medium supplied with DMSO (Control) or 150 μ M $GdCl_3$. Photographs are representative of 20 stained plants of each line. Arrows (f and l) indicate the primary root tip. The experiment was repeated three times with similar results.



accelerates the Skp1, Cdc53/Cullin1, F-box protein ubiquitin ligase-catalyzed degradation of Aux/IAA repressor proteins, allowing de-repression of auxin regulated genes by auxin response transcription factors ARFs (Gray et al. 2001). To determine whether the TIR1 family of auxin receptors and ARFs are involved in Arabidopsis RSA responses to $GdCl_3$, we analyzed PR growth and LR formation in response to 150 μ M $GdCl_3$ in WT (Col-0) Arabidopsis seedlings and in *tir1-1* and *tir1afb2afb3*, single and triple mutants, respectively, and in *arf7arf19* double mutants. In medium lacking $GdCl_3$, WT and all three mutant lines tested showed similar PR growth of 4.5 cm at 12 d.a.g. (Fig. 9a), while 150 μ M $GdCl_3$ caused a 75% PR growth reduction in all lines tested (Fig. 9a). Interestingly, the increase in LR formation observed in WT seedlings when treated with $GdCl_3$ was clearly reduced in *tir1afb2afb3* triple mutants and in *arf7arf19* double mutants (Fig. 9b). These results show the

involvement of auxin signaling in LR development induced by Gd^{3+} .

GEOCHEM-EZ predicts La^{3+} precipitation as $LaPO_4$

To define REE solubility and predict lanthanum species in the MS0.2X solution at pH 7.0 and in treatments with excess phosphate or calcium in the Arabidopsis growth medium, simulations were undertaken using the computer program GEOCHEM-EZ (Shaff et al. 2010). In the MS0.2X medium lacking $LaCl_3$, a 214 μ M $H_2PO_4^-$ concentration was predicted, which clearly increased with supply of 0.5 mM KH_2PO_4 (Table 1). In contrast, in media supplemented with 300 μ M $LaCl_3$, the precipitation of $LaPO_4$, was predicted, with a decrease of over 99% of $H_2PO_4^-$ in the solution. Treatment with 6 mM calcium also predicted a reduction of soluble P, an accumulation of $LaPO_4$ and a 53 μ M La^{3+} in the system (Table 1). These simulations show that despite the precipitation of

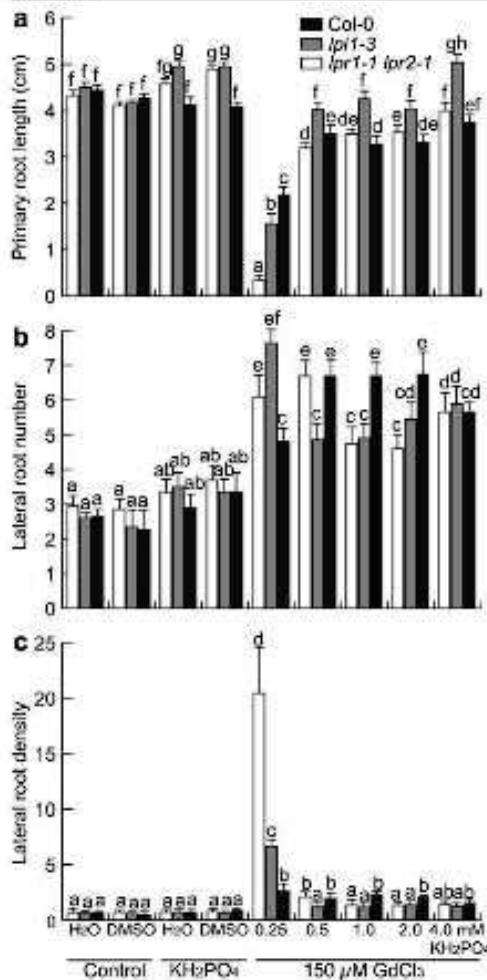


Fig. 6 The effect of phosphate in root development of WT and low phosphate resistant mutants treated with Gd^{3+} . WT (white bars) or mutant seedlings (*lpr1-3* gray bars), and (*lpr1-1 lpr2-1* black bars) were grown side by side for 12 days on medium with different P treatments supplied or not with Gd^{3+} and the mean primary root length (a), lateral root number (b) and lateral root density determined for 45 seedlings per treatment. Different letters are used to indicate means (\pm SD) that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results

$LaPO_4$ is already predicted when calcium is supplemented to the medium, the normalization of primary root growth indicates that REEs may also inhibit growth by acting as calcium channel blockers.

Discussion

REEs affect root system architecture in *A. thaliana*

La^{3+} and Gd^{3+} belong into the REEs group, which include 17 trivalent elements with similar properties. Reports of toxic effects of these elements in plant growth have raised concern for the use of REEs in agriculture (Diatloff and Smith 1995a; b; Liu and Hasenstein 2005). Indeed, REEs exist as trivalent cations over a wide pH range and most trivalent ions are toxic to plants (Rengel and Zhang 2003). Several REEs were found to inhibit Ca^{2+} uptake by plant cells and to directly block Ca^{2+} channels (El-Ramady 2010b).

Our data are consistent with a previous report showing the root growth-repressing effects of La^{3+} and Gd^{3+} in *Arabidopsis* seedlings (Kobayashi et al. 2007). Gd^{3+} elicited the greatest inhibitory effect on primary root growth (Fig. 1a) and therefore was selected to perform a detailed analysis of REEs on RSA, low P-regulated gene expression and interactions with auxin signaling. Gd^{3+} induced the formation of a highly branched root system including secondary, tertiary and quaternary lateral roots and an abundance of long root hairs (Fig. 1a-c; Fig. S1). Moreover, the primary root tips of Gd^{3+} -treated seedlings were 30–40% thicker than control seedlings and root hair differentiation progressed towards the root tip until it reached the meristem region (Fig. S1). The modulation of RSA by REEs is unlikely to be due to cell toxicity, as lateral root and root hair formation was normally observed to proceed at high concentrations of La^{3+} and Gd^{3+} . Moreover, leaves of WT *Arabidopsis* seedlings treated with REEs did not show chlorosis or necrosis symptoms during the course of our experiments. Instead, the roots of Gd^{3+} -treated plants progressively lose cells in the meristem as a consequence of decreased cell division events and premature cell differentiation. The reduction of cell proliferation was caused by a reduction in the number of meristematic cells and a decrease in mitotic activity as observed using the *CycB1.1::uidA* reporter gene (Fig. 4). This response was highly dependent upon the Gd^{3+} concentration in the medium. The PR growth inhibition and stimulation of LR development observed in response to REEs is similar to the determinate developmental program described in *Arabidopsis* seedlings grown under phosphate

Fig. 7 The effect of calcium in root development of WT and low phosphate resistant mutants treated with Gd^{3+} . WT (white bars) or mutant seedlings (*lpr1-3*, gray bars), and (*lpr1-1 lpr2-1*, black bars) were grown side by side for 12 days on medium with different Ca treatments supplied or not with Gd^{3+} and the mean primary root length (a), lateral root number (b) and lateral root density determined for 45 seedlings per treatment. Different letters are used to indicate means (\pm SD) that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results

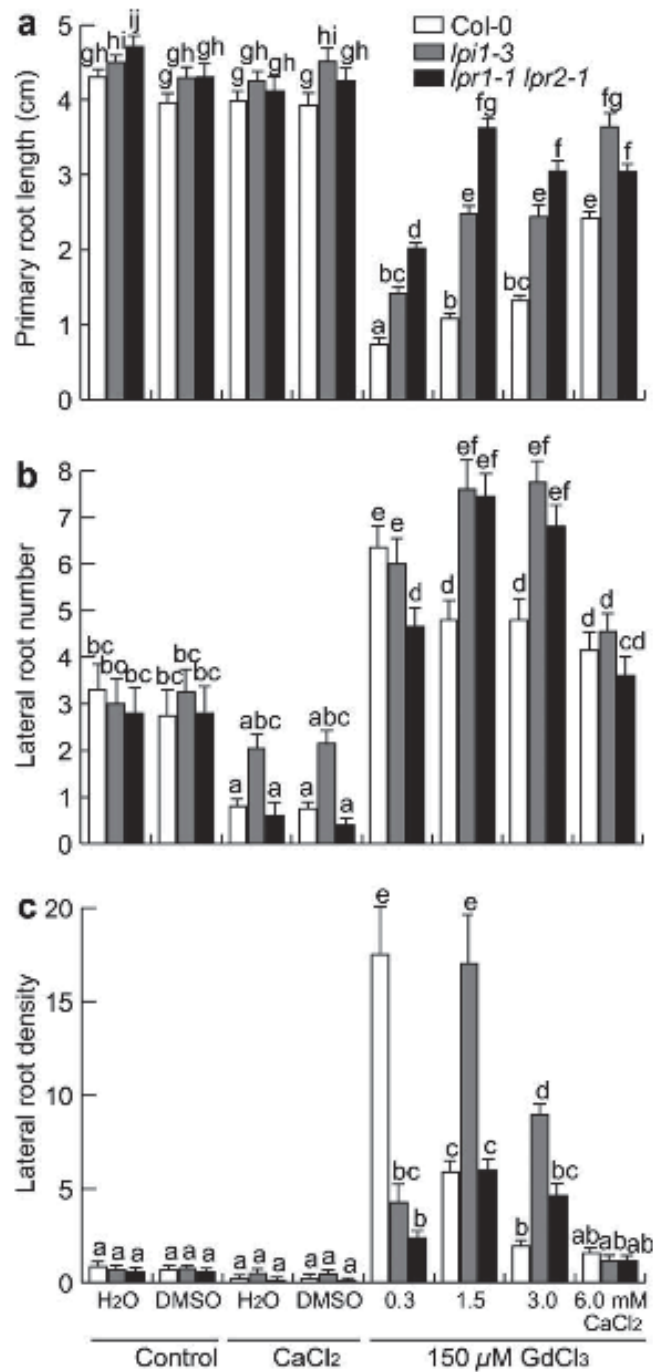
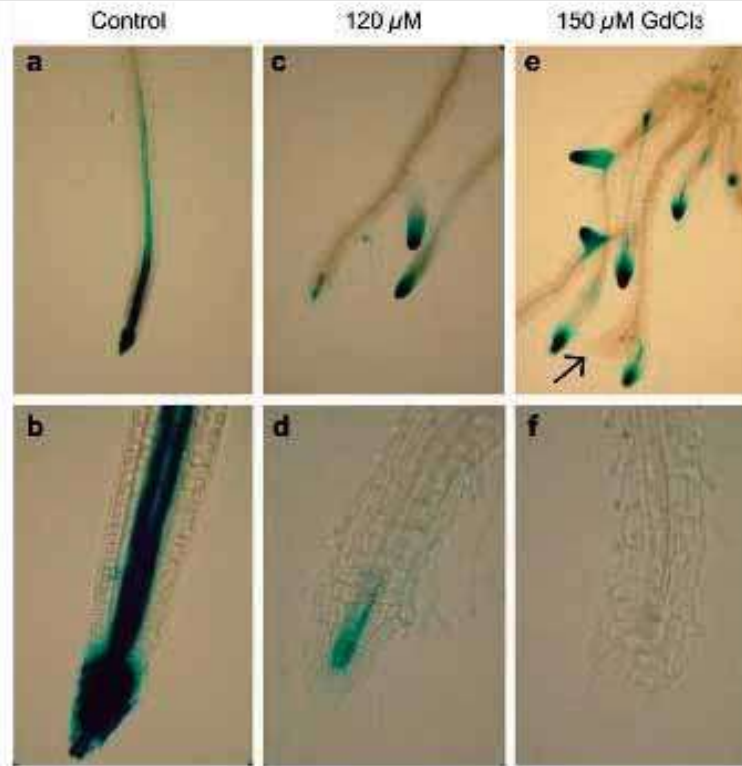


Fig. 8 Effect of Gd^{3+} on auxin-inducible gene expression. *Arabidopsis* transgenic seedlings expressing the auxin-inducible marker *DR5::uidA* were grown for 12 d in medium supplemented with DMSO (control, a and b) or the indicated $GdCl_3$ concentrations (c – f). Microscope photographs were taken at 10X (a, c, e) or 40X (b, d, f) magnification. Notice that Gd^{3+} decreases GUS expression in the primary root tip region (d and f), matching with differentiation events such as root hair formation and lateral root formation close to the apex zone (c – f). Photographs are representative of 20 stained plants. Arrow (e) indicates the primary root tip

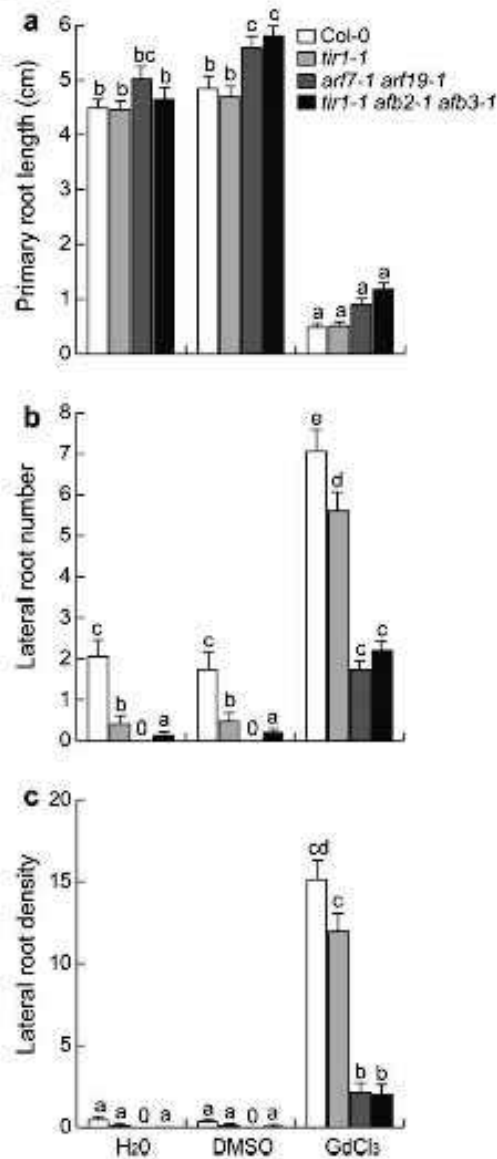


deficiency (López-Bucio et al. 2002; Sánchez-Calderón et al. 2005; Pérez-Torres et al. 2008). This effect can be explained because REEs can react with phosphate producing insoluble salts that precipitate in the form of lanthanum phosphate ($LaPO_4$, Table 1) or gadolinium phosphate ($GdPO_4$) (Evans 1990; Quiquampoix et al. 1990; Diatloff and Smith 1995a; b; Cotton 2006). Alternatively, disruption of Ca^{2+} homeostasis could be a primary target of both REEs and P-deficiency. Interestingly, aluminium (Al^{3+}), another trivalent cation causes an increase in cytosolic Ca^{2+} activity, potentially disrupting numerous biochemical and physiological processes, including those involved in root growth. Since La^{3+} and Gd^{3+} are of increasing abundance in agricultural soils, it is tempting to speculate that the root system may be modified depending on the REE concentration, which may be of adaptive value towards increasing P uptake. In fact, several REEs could stimulate malate efflux from wheat (*Triticum aestivum* L.) roots

(Kataoka et al. 2002), which may help plants acquire phosphorus from sparingly soluble sources from soil (Zhang et al. 1997; López-Bucio et al. 2000).

Gd^{3+} induces expression of genes involved in adaptation to low P stress

Recently, genes encoding phosphate transporters have been isolated from *Arabidopsis* and other plant species, and their transcripts were found to be highly inducible by P-deficiency, resulting in enhanced P uptake when the nutrient is available (Raghothama 1999). The results obtained from the expression analysis of *AtPT1::uidA* and *AtPT2::uidA* by Gd^{3+} are similar to those elicited by low P, with increased expression of the promoters in the entire root system including the root tips (Fig. 5). Interestingly, Sánchez-Calderón et al. (2005) showed that determinate growth was required for high expression levels of *AtPT1::uidA* in primary root tips. We also found a high level of



expression of this marker gene in the apparently exhausted primary root meristems of seedlings grown at 150 μM Gd^{3+} (Fig. 5f). Treatment with 250 and 300 μM La^{3+} increased expression of *AtPT2::uidA* in leaves and roots (Fig. S5). These results confirm that the effects of REEs inhibiting primary root growth are

Fig. 9 Effect of Gd^{3+} on root system architecture in WT and auxin-related Arabidopsis lines. WT and *tir1-1*, *tir1-1 afb2-1 afb3-1*, and *arf7-1 arf19-1* Arabidopsis mutants were grown for 12 d in medium supplemented with 150 μM Gd^{3+} and the mean primary root length (a), lateral root number (b) and lateral root density (c) determined for 45 seedlings per treatment. Notice the decreased lateral root formation in *tir1-1 afb2-1 afb3-1* triple mutant and in *arf7-1 arf19-1* double mutants in response to Gd^{3+} . Different letters are used to indicate means (\pm SD) that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results

unlikely due to cell damage at the root tip, since they could sustain high P transport expression levels.

Phosphate is a component of phospholipids, which constitute one of the greatest P pools in plants. In seedlings grown under P deficiency, the relative abundance of phospholipids is reduced, but the abundance of other lipids such as sulphoquinovosyl-diacylglycerol (SQDG), digalactosyl-diacylglycerol (DGDG) and monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG) increases (Essigmann et al. 1998; Härtel et al. 2000; Dörmann and Benning 2002; Andersson et al. 2003; Jouhet et al. 2004; Andersson et al. 2005; Benning and Ohta 2005; Kobayashi et al. 2006; Li et al. 2005). The galactolipids monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG) and digalactosyl-diacylglycerol (DGDG) constitute the major glycolipids of the thylakoid membranes in chloroplasts. In Arabidopsis, the formation of MGDG is catalyzed by a family of three MGDG synthases, which are encoded by two types of genes, namely type A (*AtMGD1*) and type B (*AtMGD2* and *AtMGD3*). Promoter:GUS fusion analysis revealed that expression of *AtMGD2* and *AtMGD3*, but not *AtMGD1*, are strongly induced during phosphate starvation, particularly in roots. Because only DGDG accumulates in roots during phosphate deprivation, it was proposed that type B MGDG synthases may be acting primarily to supply MGDG as a precursor for DGDG synthesis (Kobayashi et al. 2004). To examine the spatial expression of a low P-regulated MGDG synthase under REEs treatment, we investigated the effects of Gd^{3+} in *AtMGD2::GUS* expression in Arabidopsis transgenic plants expressing this marker (Kobayashi et al. 2004). *AtMGD2::GUS* seedlings were stained intensely, especially in shoots in response to 120 and 150 μM Gd^{3+} . The staining was also observed in roots and was higher than that detected under control conditions. Our results indicate that REEs are able to induce MGDG synthases, which may be necessary for

Plant Soil

Table 1 Composition of the MS 0.2X nutrient solution used for *Arabidopsis thaliana* seedling cultivation. The activities of major ions and ion complexes predicted with GEOCHEM-EZ are shown. The pH of all solutions was adjusted to 7.0 adding KOH

Ion	MS 0.2X	0.5 mM KH ₂ PO ₄	6.0 mM CaCl ₂	500 μM LaCl ₃		
				MS 0.2X	0.5 mM KH ₂ PO ₄	6.0 mM CaCl ₂
			mM			
[La ³⁺]				0.0502		0.0527
[LaHPO ₄]				0.2497	0.3000	0.2473
[Ca ₂ (PO ₄) ₂]	0.0175	0.0401	0.2222			
[H ₂ PO ₄ ⁻]	0.2144	0.4024	0.0167	0.0061	0.1711	0.0012
[SO ₄ ²⁻]	0.3205	0.3219	0.2573	0.3195	0.3196	0.2550
[Cl ⁻]	0.5984	0.5983	5.5649	0.6681	0.6982	6.2753
[NH ₄ ⁺]	4.0874	4.0879	4.0899	4.0879	4.0878	4.0899
[Ca ²⁺]	0.5645	0.4965	5.5662	0.58902	0.5684	5.9038
[Mg ²⁺]	0.2815	0.2727	0.2935	0.2947	0.2966	0.2941
[K ⁺]	4.1407	4.1107	4.1107	4.1570	4.4406	4.1545
[Na ⁺]	0.0202	0.0202	0.0202	0.0200	0.0202	0.0202
[NO ₃ ⁻]	7.8837	7.8837	7.8127	7.8836	7.8836	7.8836

survival under P-deficiency by means of galactolipid biosynthesis in *Arabidopsis*.

LPI and LPR genes are required for the root architectural changes induced by Gd³⁺

The root architecture of higher plants is determined to a larger extent by the activities of the root meristems, in which most postembryonic cell division takes place. The isolation of *low phosphorus insensitive mutants (lpi)* and *low phosphorus resistant (lpr)* mutants provides strong evidence that root meristem exhaustion under low P availability is not a direct consequence of a nutritional deficiency, but rather is under control of a genetic program that controls root growth (Sánchez-Calderón et al. 2005; Světlíková et al. 2007). Although the mechanisms by which P starvation regulates meristem activity remain unclear, nevertheless, the finding that *lpi* and *lpr* mutants do not enter a determinate root growth program under low P conditions suggests that the corresponding genes are negative regulators of meristem maintenance under this stressing condition. Our data showed that the arrested primary root growth observed in WT seedlings by Gd³⁺ was reduced in both *lpi1-3* single mutants and in *lpr1-1 lpr2-1* double mutants (Figs. 2, 3 and 4). LPR1 and LPR2 encode multicopper

oxidases (MCOs) (Světlíková et al. 2007), thus highlighting the important role of MCOs in root adaptation to high levels of REEs. Since *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* mutants are not P hyperaccumulators and they are specifically resistant to inhibition of primary root growth by low P availability, overall, our results strongly indicate a crosstalk in REEs response and the sensing and/or response to low concentrations of P. This conclusion is also supported by our findings that supplying P to the growth medium normalized primary root growth under an inhibitory Gd³⁺ concentration (Fig. 6). Interestingly, Ca²⁺ supply also partially restored growth of WT and mutant seedlings (Fig. 7), thus indicating that the effects of REEs modulating RSA operates, at least in part, by acting as calcium channel blockers.

Auxin signaling is involved in LR formation in response to Gd³⁺

In *Arabidopsis*, LRs are initiated by the auxin-dependent local activation of pericycle cells at the xylem poles. Auxin is required at several stages of LR development, initially to establish a population of rapidly dividing pericycle cells and later for the emergence of LRs (Péret et al. 2009). Therefore, the

control of LR formation by auxin involves the complex regulation of biosynthesis, transport, and the ability of cells to respond to this phytohormone in an appropriate manner (Okushima et al. 2005). Our results showed that seedlings treated with REEs exhibited an increase in LR number and LRD compared with control seedlings. To evaluate the contribution of auxin responsiveness in the altered lateral root formation in response to REEs, we used transgenic plants expressing the *DR5::uid4* construct, which is useful in studying auxin-regulated gene expression in *Arabidopsis* (Ulanovsky et al. 1997). As previously reported (Sabotini et al. 1999), we observed β -glucuronidase (GUS) activity in the columella and protoxylem of primary roots of 12-d-old transgenic *DR5::uid4* seedlings grown in medium without Gd^{3+} (Fig. 8a and b). In medium supplemented with 120 or 150 $\mu M Gd^{3+}$, a reduction of the *DR5::uid4* maximum in primary root tips was clearly observed, which was accompanied by differentiation processes in this region. For instance, root swelling occurred and root hairs were formed very close to the root meristem (Fig. 8a-f). Expression of the *DR5::uid4* auxin-responsive gene marker increased in developing LRs (Fig. 8c), suggesting that auxin redistribution could be involved in the activation of LR formation by Gd^{3+} .

Auxins regulate diverse aspects of plant growth and development by promoting the degradation of transcriptional repressors called Aux/IAA proteins through the action of the ubiquitin protein ligase $SCF^{TIR1/AFB}$. In recent work, the F-box protein subunit of $SCF^{TIR1/AFB}$, a protein called TIR1, was shown to function as an auxin receptor (Dharmasiri et al. 2005; Kepinski and Leyser 2005). To determine whether the TIR1 family of auxin receptors and ARFs are involved in *Arabidopsis* responses to REEs, we analyzed PR growth and LR formation in response to Gd^{3+} in WT *Arabidopsis* seedlings and in *tir1-1* and *tir1 afb2 afb3*, single and triple mutants, respectively, and in *arf7 arf19* double mutants. Our analysis of primary root growth revealed that Gd^{3+} similarly inhibited primary root growth in WT and all three auxin-related mutant lines tested (Fig. 9a). In solvent-treated WT seedlings and *tir1-1* mutants 150 $\mu M Gd^{3+}$ clearly induced LR formation (Fig. 9). When a triple *tir1 afb2 afb3* mutant or *arf7 arf19* double mutant were analyzed, it was found that LR formation was little stimulated by Gd^{3+} treatment

(Fig. 9). These results further confirm that REEs induce a pericycle cell response very similar to that observed in plants subjected to P deficiency and is under auxin control.

Lanthanum affects RSA in *Arabidopsis* by inducing low-P adaptive responses by precipitating phosphate

To more precisely determine which responses of seedlings can be directly attributed to REEs (e.g. blocking of Ca channels) and which responses are due to a manifestation of induced phosphate deficiency, we performed simulations using GEOCHEM-EZ to predict lanthanum species in the MS0.2X solution at pH 7.0 and in treatments with addition of phosphate or calcium in the nutrient medium. Our data showed that in the MS0.2X medium supplied with 300 $\mu M LaCl_3$, lanthanum was predicted to cause precipitation of $LaPO_4$ (Table 1). This explains why an excess of phosphate (i.e. 0.5 mM) fully restored primary root growth in plants exposed to REEs. Three additional lines of evidence indicate that REEs may induce low-P adaptive responses by creating P deficiency conditions in the growth medium (i) the resistance of *lpr1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* *Arabidopsis* mutants to the effects of REEs in primary root growth inhibition; (ii) the effects of REEs on *AtP11*, *AtP12* and *AtMGD2* gene expression and (iii) the role of auxin as a mediator of root morphogenetic changes by REEs as supported by the finding that Gd^{3+} no longer stimulated lateral root formation in auxin receptor mutants *tir1 afb2 afb3* and in *arf7 arf19*.

Our simulation of La^{3+} , H_2PO_4 and $LaPO_4$ presented in Table 1 indeed suggests that phosphate precipitation is a major effect of lanthanum under our growth conditions. However, the greater activity of gadolinium than lanthanum in root developmental processes (Fig. 1) and the observation that calcium is able to partially restore primary root growth under an inhibitory concentration of gadolinium (Fig. 7) indicates that additional mechanisms are involved in RSA adjustment by REEs, perhaps acting as calcium channel blockers.

To our knowledge, this is the first report demonstrating that REEs could induce a low P-response in plants, which may have practical application in agriculture as REEs are increasingly used as fertilizers and are accumulating in soils as

products from industrial practices. We speculate that the net effect of REEs application on plant growth would depend on the amount of P available in the soil and the concentration supplied to plants. Our data provides useful information at the interface of plant biology and soil sciences. Whether other trivalent cations such as Al^{3+} are also able to induce root developmental alterations interfering with the low P rescue mechanisms is currently under investigation.

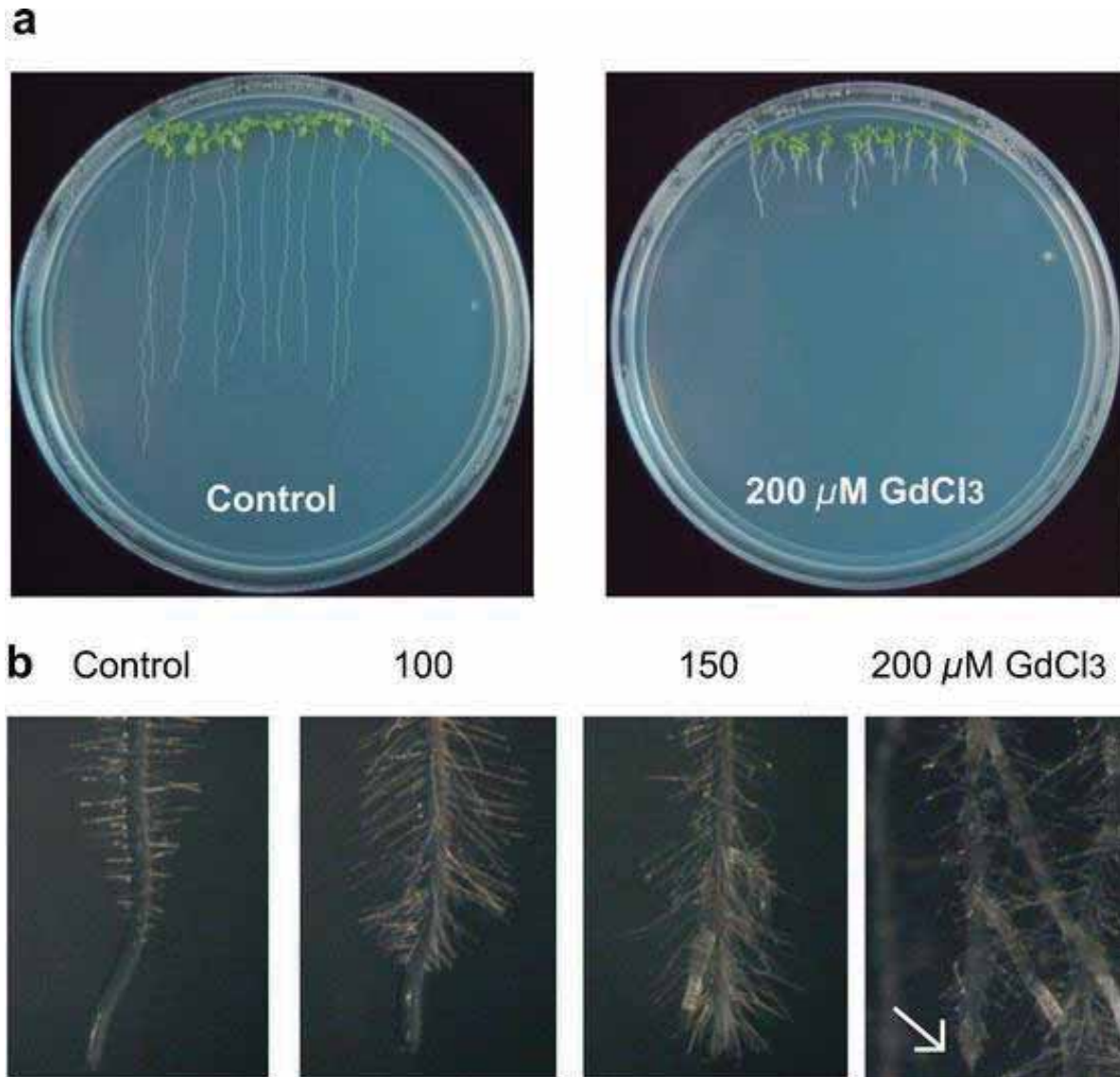
Acknowledgments This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, grant no. 43978) and the Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, México, grant no. CIC 2.26). We thank Drs Peter Doerner, Tom Guilfoyle, Mark A. Estelle, Thierry Destos and Hiroyuki Ohta for kindly providing us with *Arabidopsis* transgenic and mutant seeds.

References

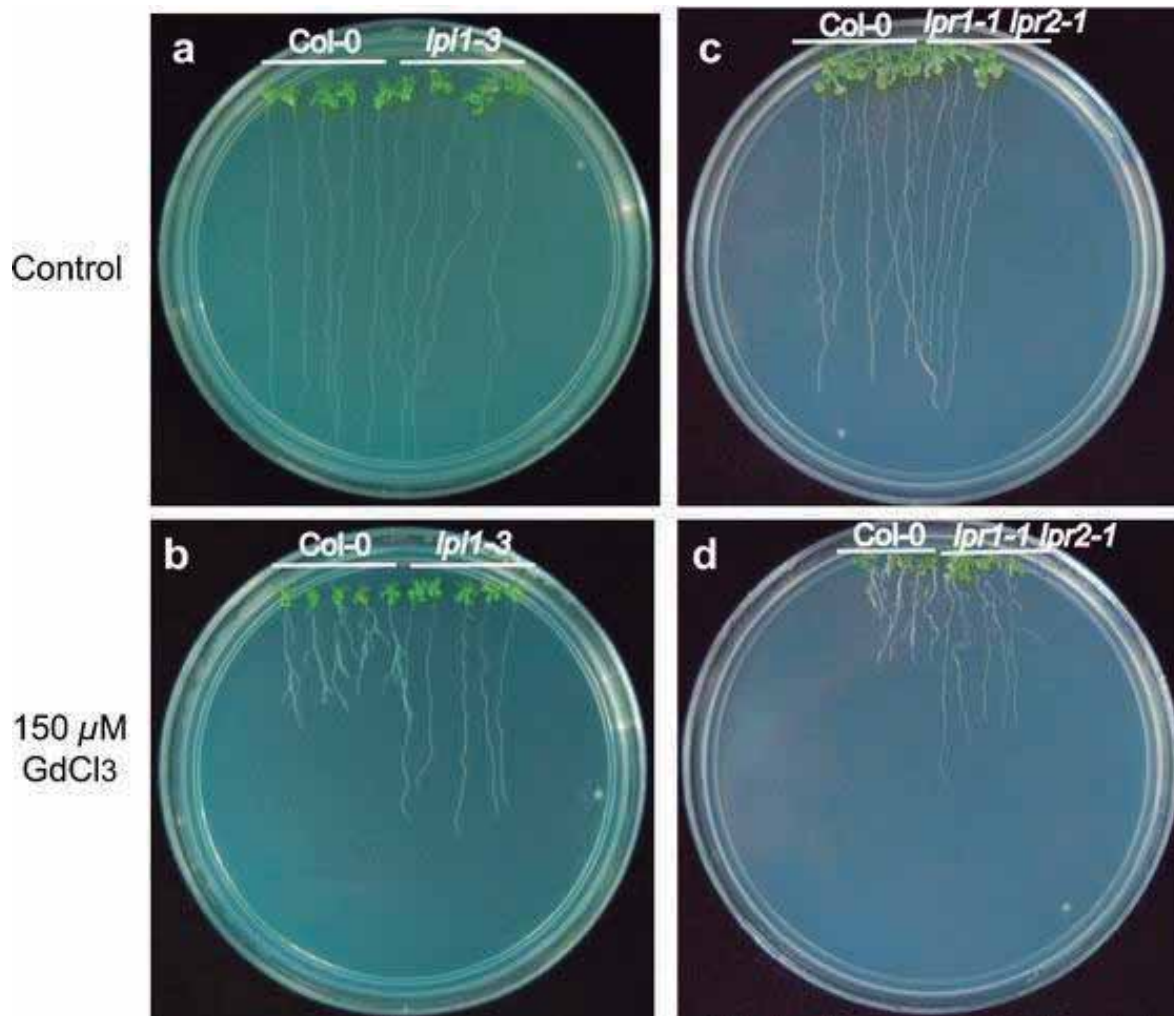
- Al-Ghazi Y, Muller B, Pinloche S, Tranbarger TJ, Naury P, Rossignol M, Tardieu F, Doumas P (2003) Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signaling. *Plant Cell Environ* 26:1053–1066
- Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Liljeborg C, Sandelius AS (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosylacylglycerol. *FEBS Lett* 537:128–132
- Andersson MX, Larsson KE, Tjellstrom H, Liljeborg C, Sandelius AS (2005) The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* 280:27578–27586
- Benning C, Ohta H (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem* 280:2397–2400
- Bradsher K (2011) Taking a risk for rare earths. *The New York Times*. http://www.nytimes.com/2011/03/09/business/energy-environment/09rare.html?_r=1&ref=science. Accessed 08 March 2011
- 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
- Cotton S (2006) Lanthanide and actinide chemistry. John Wiley & Sons Ltd, London
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435:441–445
- Diatloff E, Smith FW (1995) Rare earth elements and plant growth. II. Responses of corn and mungbean to low concentrations of lanthanum on dilute, continuously flowing nutrient solutions. *J Plant Nutr* 18:1977–1989
- Diatloff E, Smith FW, Asher CJ (1995) Rare earth elements and plant growth. I. Effects of lanthanum and cerium on root elongation of corn and mungbean. *J Plant Nutr* 18:1963–1976
- Ding SM, Liang T, Zhang C, Yan J, Zhang Z (2005) Accumulation and fractionation of rare earth elements (REEs) in wheat: controlled by phosphate precipitation, cell wall absorption and solution complexation. *J Exp Bot* 56:2765–2775
- Dinkerlaker B, Römhild V, Marschner H (1995) Distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Bot Acta* 108:183–200
- Dörmann P, Benning C (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci* 7:112–118
- El-Ramady H (2010a) Ecotoxicology of REEs. VDM Verlag Dr. Müller, Lexington
- El-Ramady H (2010b) Ecotoxicology of rare earth elements. Ecotoxicology of rare earth elements within soil and plant environments. VDM Verlag Dr. Müller, Lexington
- Essigmann B, Güler S, Narang RA, Linke D, Benning C (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1950–1955
- Evans CH (1990) Biochemistry of the lanthanides. Plenum Press, New York
- Gampala SSL, Hagenbeek D, Rock CD (2001) Functional interaction of lanthanum and phospholipase D with abscisic acid signaling effectors VP1 and ABI-1 in rice protoplasts. *J Biol Chem* 276:9855–9860
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M (2001) Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414:271–276
- Hagenbeek D, Quatrano RS, Rock CD (2000) Trivalent ions activate abscisic acid inducible promoters through an *ABI1*-independent pathway in rice protoplasts. *Plant Physiol* 123:1553–1560
- Härtel H, Dörmann P, Benning C (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10649–10654
- He YW, Loh CS (2000) Cerium and lanthanum promote floral initiation and reproductive growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 159:117–124
- He YW, Loh CS (2002) Induction of early bolting in *Arabidopsis thaliana* by triacantanol, cerium and lanthanum in correlated with increased endogenous concentrations of isopentenyl adenosine (iPA₂os). *J Exp Bot* 53:505–512
- Hong F, Wei Z, Zhao G (2000) Effect of lanthanum on aged seed germination of rice. *Biol Trace Elem Res* 75:205–213
- Hu Z, Ding ZH, Chen YJ, Wang XR, Dai LM (2002) Bioaccumulation of lanthanum and cerium and their effects on the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Chemosphere* 48:621–629
- Jabs T, Dietrich RA, Dangl JL (1996) Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273:1853–1856
- Jouhet J, Maréchal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* 167:863–874
- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, D'Urzo MP, Damsz B, Raghobama KG (2002) Regulated expression

- of *Arabidopsis* phosphate transporter. *Plant Physiol* 130:221–233
- Kataoka T, Stekelburg A, Nakanishi TM, Delhaize E, Ryan PR (2002) Several lanthanides activate malate efflux from roots of aluminum-tolerant wheat. *Plant Cell Environ* 25:453–460
- Kepinski S, Leyser O (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435:446–451
- Kobayashi K, Awai K, Takamiya I-K, Ohta H (2004) *Arabidopsis* type B monogalactosyldiacylglycerol synthase genes are expressed during pollen tube growth and induced by phosphate starvation. *Plant Physiol* 134:640–648
- Kobayashi K, Masuda T, Takamiya K, Ohta H (2006) Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. *Plant J* 47:238–248
- Kobayashi Y, Ikka T, Kimura K, Yasuda O, Koyama H (2007) Characterization of lanthanum toxicity for root growth of *Arabidopsis thaliana* from the aspect of natural genetic variation. *Funct Plant Biol* 34:984–994
- Kobayashi K, Awai K, Nakamura M, Nagatani A, Masuda T, Ohta H (2009) Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthase are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant J* 57:322–331
- Kučera J, Mizerá JR, Vávrová M (2007) Pollution of agricultural crops with lanthanides, thorium and uranium studied by instrumental and radiochemical neutron activation analysis. *J Radioanal Nucl Chem* 271:581–587
- Lambers H, Shane MW, Cramer MD, Pears SJ, Veneklass EJ (2006) Root structure and function for efficient acquisition of phosphorus: matching morphological and physiological traits. *Ann Bot* 98:693–71
- Li MY, Welti R, Wang XM (2005) Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases Df1 and Df2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiol* 142:750–761
- Liu M, Hasenstein KH (2005) La^{3+} uptake and its effect on the cytoskeleton in root protoplasts of *Zea mays* L. *Planta* 220:658–666
- Liu S, Wang L, Zhang S (1997) Studies on the absorption and distribution of rare earth elements in soybean. *Acta Agric Boreali-occidentalis Sinica* 6:217–223
- López-Bucio J, Nieto-Jacobo MF, Ramírez-Rodríguez V, Herrera-Estrella L (2000) Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. *Plant Sci* 160:1–13
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol* 192:244–256
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6:280–287
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Pérez-Torres A, Rampey RA, Bartel B, Herrera-Estrella L (2005) An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiol* 137:681–691
- Lynch JP, Brown K (2001) Topsoil foraging—an architectural adaptation of plant to low phosphorus availability. *Plant Soil* 237:225–237
- Malamy JE (2010) Lateral root formation. In: Beeckman T (ed) *Annual Plant Reviews*, Vol 37. Wiley-Blackwell, Singapore, pp 83–126
- Malamy JE, Benfey PN (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33–44
- Okushima Y, Overvoorde PJ, Arima K, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Lui A, Nguyen D, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* 17:444–463
- Pang X, Li D, Peng A (2002) Application of rare earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in soil. *Environ Sci Pollut Res* 9:143–148
- Parker DR, Kinraide TB, Zelazny LW (1988) Aluminum speciation and phytotoxicity in dilute hydroxyaluminum solutions. *Soil Sci Soc Am J* 52:438–444
- Péret B, Larrieu A, Bennett MJ (2009) Lateral root emergence: a difficult birth. *J Exp Bot* 60:3637–3643
- Pérez-Torres C-A, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Herrera-Estrella L (2008) Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* 20:3258–3272
- Polya GM, Klucis E, Haritou M (1987) Resolution and characterization of two soluble calcium dependent protein kinases from silver beech leaves. *Biochim Biophys Acta* 931:68–77
- Quiquampoix H, Ratcliffe RG, Rattović S, Rattović S, Vučinić Ž (1990) ^1H and ^{31}P NMR investigation of gadolinium uptake in maize roots. *J Inorg Biochem* 38:265–275
- Raghothama KG (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:665–693
- Reid RJ, Rangel Z, Smith FA (1996) Membrane fluxes and comparative toxicities of aluminium, scandium and gallium. *J Exp Bot* 47:1881–1888
- Rengel Z, Zhang WH (2003) Role of dynamics of intracellular calcium in aluminium toxicity syndrome. *New Phytol* 159:295–314
- Ritchie RJ, Raghupathi SS (2008) Al-toxicity studies in yeast using gallium as an aluminium analogue. *Biomaterials* 21:379–393
- Ruegger M, Dewey E, Gray WM, Hobbie L, Turner J, Estelle M (1998) The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev* 12:198–207
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey B, Leyser HMO, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99:463–472

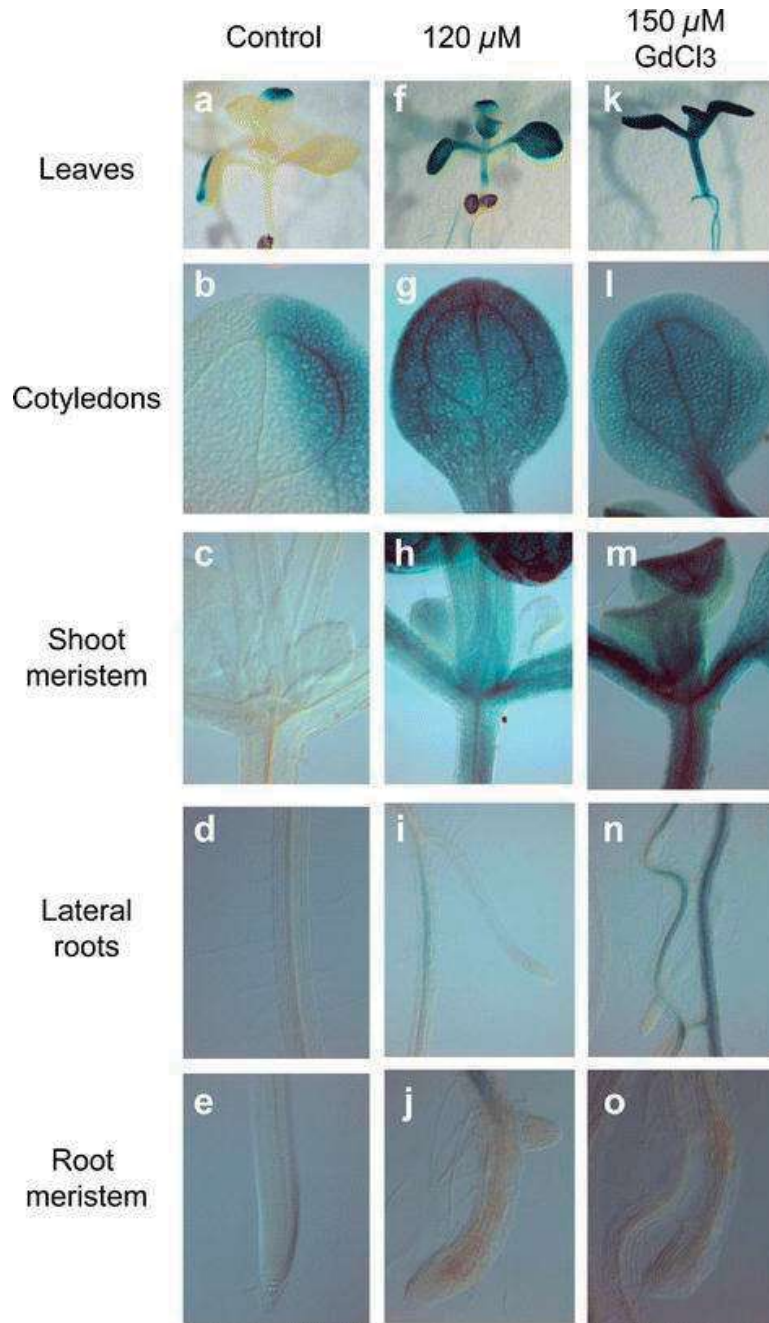
- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Cruz-Ramírez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovsky JG, Herrera-Estrella L (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46:174–184
- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Gutiérrez-Ortega A, Hernández-Abreu E, Herrera-Estrella L (2006) Characterization of *low phosphorus insensitive* mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiol* 140:879–889
- Sanda S, Leustek T, Theisen MJ, Garavito RM, Benning C (2001) Recombinant *Arabidopsis* SQD1 converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose in vitro. *J Biol Chem* 276:3941–3946
- Shaff JE, Schultz BA, Craft EJ, Clark RT, Kochian LV (2010) GEOCHEM-EZ: a chemical speciation program with greater power and flexibility. *Plant Soil* 330:207–214
- Shi P, Chen GC, Huang ZW (2005) Effects of La^{3+} on the active oxygen-scavenging enzyme activities in cucumber seedling leaves. *Russ J Plant Physiol* 53:294–297
- Shomer I, Novacky AJ, Pike SM, Yermiyahu U, Kinraide TB (2003) Electrical potentials of plant cell walls in response to the ionic environment. *Plant Physiol* 133:411–422
- Sigel A, Sigel H (2003) Metal ions in biological systems the lanthanides and their interrelations with biosystems, vol 40. Marcel Dekker, Netherlands
- Sui J, Li F (1990) The initial studies on lanthanum distribution in soybean seedling after treating root with rare earth elements. *Rare Earth* 11:32–34
- Svitoonoff S, Creff A, Reymond M, Sigot-Claude C, Ricard L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T (2007) Root tip contact with low phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat Genet* 19:792–796
- Tyler G (2004) Rare earth elements in soil and plant systems—a review. *Plant Soil* 267:191–206
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle T (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963–1971
- van Steveninck RFM, van Steveninck ME, Chescoe D (1976) Intracellular binding of lanthanum in root tip of barley (*Hordeum vulgare*). *Protoplasma* 90:89–97
- Wang X, Shi G, Xu Q, Wang C (2005) Toxic effects of lanthanum, cerium, chromium and zinc on *Potamogeton malainus*. *J Rare Earths* 23:367–375
- Wang X, Shi GX, Xu QS, Xu BJ, Zhao J (2007) Lanthanum- and cerium-induced oxidative stress in submerged *Hydrilla verticillata* plants. *Russ J Plant Physiol* 54:693–697
- Wang C, Lu X, Tian Y, Cheng T, Hu L, Chen F, Jiang C, Wang X (2011) Lanthanum resulted in unbalance of nutrient elements and disturbance of cell proliferation cycles in *F. faba* L. seedlings. *Biol Trace Elem Res*. doi:10.1007/s12011-010-8939-z
- Wei ZG, Zhou X (2000) The effect of neodymium on physiological activities in oilseed rape during calcium starvation. *J Rare Earths* 18:57–61
- Williamson LC, Ribetoux SCPC, Fitter AH, Leyser HMO (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126:875–890
- Wu J, Wang C, Mei X (2001) Stimulation of taxol production and excretion in *Taxus* spp cell cultures by rare earth chemical lanthanum. *J Biotechnol* 85:67–73
- Wytenbach A, Furrer V, Schleppe P, Tobler L (1998) Rare earth elements in soil and in soil grown plants. *Plant Soil* 199:267–273
- Yermiyahu U, Rytwo G, Brauer DK, Kinraide TB (1997) Binding and electrostatic attraction of lanthanum (La^{3+}) and aluminum (Al^{3+}) to wheat root plasma membrane. *J Membr Biol* 159:239–252
- Yu B, Xu C, Benning C (2002) *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limiting growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5732–5737
- Zhang FS, Ma J, Cao YP (1997) Phosphorus deficiency enhances root exudation of low-molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raphanus sativus* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. *Plant Soil* 196:261–264



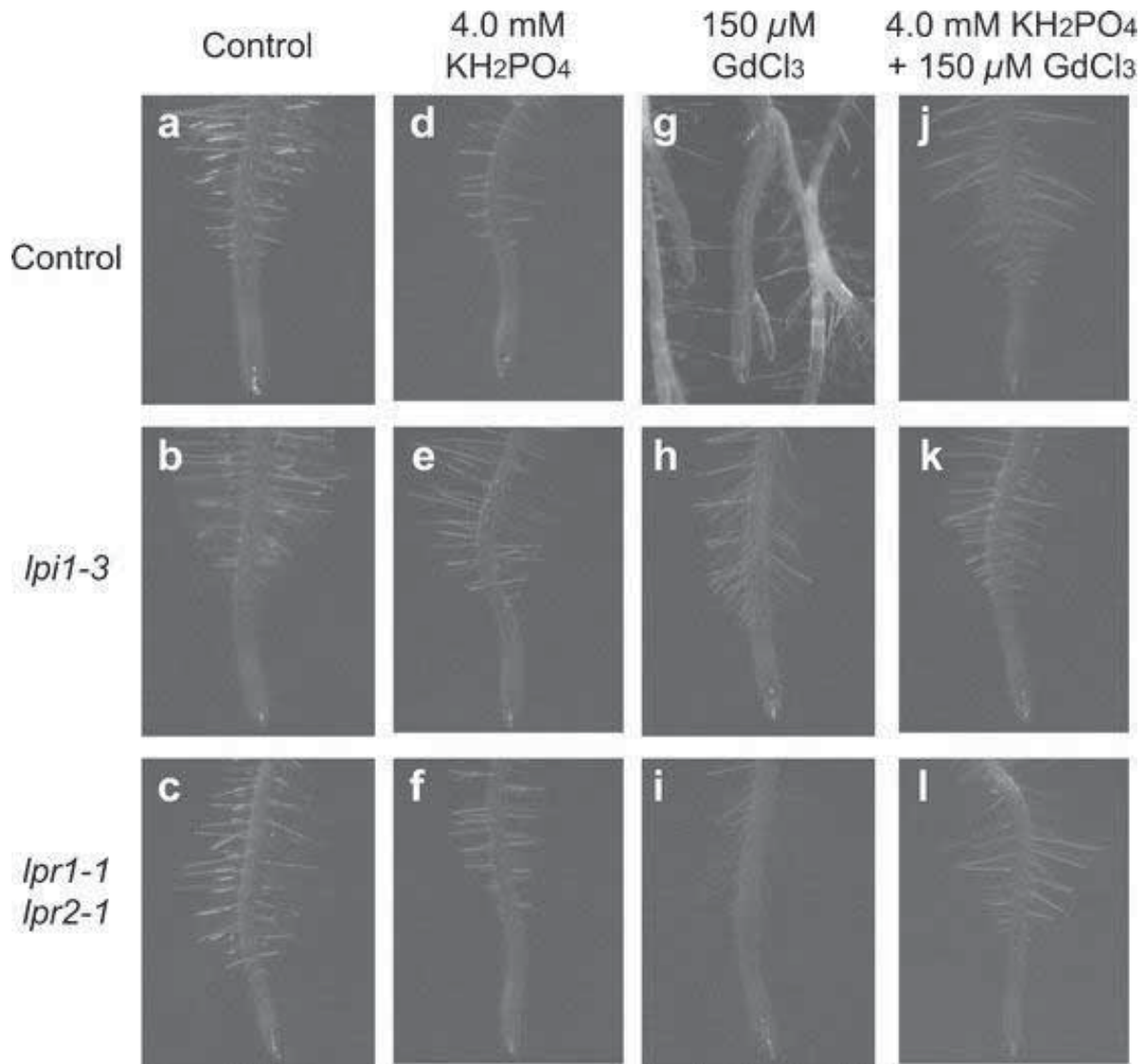
Supplementary Fig. 1 Effects of Gd^{3+} on Arabidopsis root system architecture. Arabidopsis WT (Col-0) seedlings were grown for 12 days in medium supplemented with the solvent (*left plate*) or with 200 μM GdCl_3 (*right plate*). Microscope photographs (**b**) of root tips from seedlings supplemented with increasing concentrations of Gd^{3+} . Photographs in (**a**) are representative of 9 independent plates analyzed.



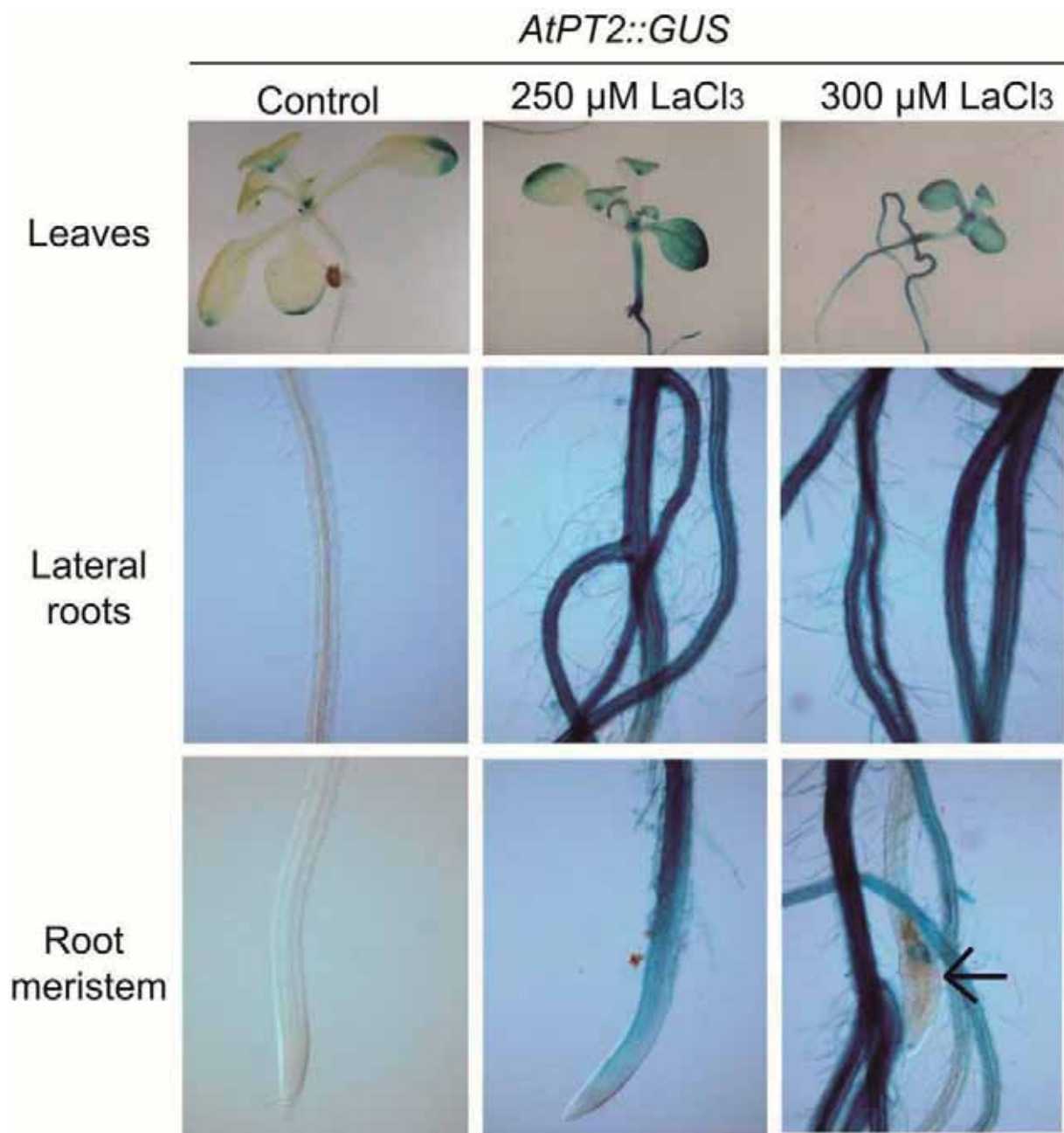
Supplementary Fig. 2 Effects of Gd³⁺ on Arabidopsis root system architecture in WT and low phosphate resistant mutants. Arabidopsis WT (Col-0) seedlings and *lpr1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* mutants were grown for 12 days in medium supplemented with the solvent (*upper plates*) or with 150 μ M GdCl₃ (*lower plates*). Photographs are representative of 9 independent plates analyzed. The experiment was repeated three times with similar results.



Supplementary Fig. 3 Effect of Gd^{3+} on *AtMGD2::GUS* expression. GUS staining was performed overnight in WT plants grown for 12 days in medium with solvent (controls) or with two increasing concentrations of GdCl_3 (120 and 150 μM). Gd^{3+} induced expression of *AtMGD2* in leaves (**f** and **k**), cotyledons (**g** and **l**), shoot meristem (**h** and **m**), lateral roots (**i** and **n**), but not in the root meristem (**j** and **o**), despite the clear effect of gadolinium in this zone. Photographs are representative of 20 stained plants.



Supplementary Fig. 4 Effect of phosphate in root tip structure of WT and low phosphate resistant mutants treated with Gd³⁺. WT and mutant seedlings *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* were grown side by side for 12 days on medium with different P treatments supplied or not with Gd³⁺ and the primary root tip photographed. Notice that a 4 mM P treatment completely reverts the effect of Gd³⁺ on differentiation in root tips.



Supplementary Fig. 5 Effect of La^{3+} on *AtPT2::GUS* expression. *AtPT2::GUS* expressing seedlings were grown for 12 days in medium supplied with DMSO (Control) or with the indicated LaCl_3 concentrations. Photographs are representative of 20 stained plants. Arrow in 300 μM LaCl_3 treatment indicates the primary root. The experiment was repeated three times with similar results.

Capítulo III

Plant, Cell & Environment



Aluminum induces low phosphate adaptive responses and modulates primary and lateral root growth by differentially affecting auxin signaling in Arabidopsis seedlings.

Journal:	Plant, Cell & Environment
Manuscript ID:	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Lopez-Bucio, Jose; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas Ruiz-Herrera, León; Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Environment Keywords:	nutrients/other, heavy metals
Physiology Keywords:	development, hormones
Other Keywords:	Arabidopsis, Aluminum, Phosphorus, Root architecture
Abstract:	Plant productivity in acid soils is limited mainly by aluminum (Al) toxicity and phosphorus (P) deficiency, both of which are characterized by a rapid inhibition of root growth. In this work we investigated Al and P interactions in roots of Arabidopsis thaliana seedlings. Al inhibited primary root growth by affecting cell cycle progression and causing differentiation of cells in the root meristem. These effects were reduced in low phosphorus insensitive lpr1-3 and low phosphate resistant lpr1-1 lpr2-1 Arabidopsis mutants. Al also activated the expression of the low phosphate-induced P transporter AtPT2 in roots indicating that it activates a low P rescue system. The role of auxin as a mediator of morphogenetic changes by Al was evaluated by using the auxin-signaling mutants tir1, tir1afb2afb3, and arf7arf19. Our results show the requirement of auxin receptors for Al-induced LR formation and reveal an important role of ARF7 and ARF19 transcription factors in both primary and lateral root responses to Al. We conclude that lateral root formation in response to Al toxicity and P deficiency may involve common signaling mechanisms, while a pathway involving AR7 and ARF17 is important for primary root growth inhibition by Al.

SCHOLARONE[®]
Manuscripts

1 Full Title

2 Aluminum induces low phosphate adaptive responses and modulates primary and
3 lateral root growth by differentially affecting auxin signaling in Arabidopsis seedlings

4

5 Full name of authors:

6 León F. Ruíz-Herrera and José López-Bucio*

7 Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San
8 Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria. C. P. 58030 Morelia, Michoacán,
9 México.

10 *Corresponding author:

11 Name: José López-Bucio

12 Address: Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de
13 San Nicolás de Hidalgo. Edificio B3, Ciudad Universitaria. C. P. 58030 Morelia,
14 Michoacán. México.

15 Telephone: 5 443 3265788, Fax: (443) 3265788

16 e-mail: jbucio@umich.mx.

17

18 **ABSTRACT**

19

20 Plant productivity in acid soils is limited mainly by aluminum (Al) toxicity and phosphorus
21 (P) deficiency, both of which are characterized by a rapid inhibition of root growth. In this
22 work we investigated Al and P interactions in roots of *Arabidopsis thaliana* seedlings. Al
23 inhibited primary root growth by affecting cell cycle progression and causing
24 differentiation of cells in the root meristem. These effects were reduced in *low*
25 *phosphorus insensitive lpi1-3* and *low phosphate resistant lpr1-1 lpr2-1* *Arabidopsis*
26 mutants. Al also activated the expression of the low phosphate-induced P transporter
27 *AtPT2* in roots indicating that it activates a low P rescue system. The role of auxin as a
28 mediator of morphogenetic changes by Al was evaluated by using the auxin-signaling
29 mutants *tir1*, *tir1afb2afb3*, and *arf7arf19*. Our results show the requirement of auxin
30 receptors for Al-induced LR formation and reveal an important role of ARF7 and ARF19
31 transcription factors in both primary and lateral root responses to Al. We conclude that
32 lateral root formation in response to Al toxicity and P deficiency may involve common
33 signaling mechanisms, while a pathway involving AR7 and ARF17 is important for
34 primary root growth inhibition by A

35

36 **Keywords:** Aluminum, phosphate deficiency, *Arabidopsis thaliana*, root architecture,
37 lateral roots, auxin signaling

38

39 **INTRODUCTION**

40

41 Acid soils comprise up to 50% of the world's potentially arable land, in which aluminium
42 (Al) toxicity and phosphorus (P) deficiency limit crop production (von Uexküll & Mutert
43 1995). The greatest areas of acid soils are in the tropic regions of South America, Asia
44 and Africa, although some regions covered by boreal forests in the north hemisphere
45 are also affected by acidity. While low pH can restrict plant growth, in most cases it is
46 the dissolution of toxic metals, particularly Al, which affects growth. It is generally agreed
47 that Al^{3+} is the major phytotoxic Al form that dominates under acidic environments
48 whereas $\text{Al}(\text{OH})_2^+$ and $\text{Al}(\text{OH})_2^{2+}$ species are prevalent under neutral soil conditions
49 (Kinraide 1997; Ritchie 1995).

50 The primary symptom of Al toxicity is a rapid reduction in root growth, resulting in roots
51 with a stunted appearance and limited capacity for water and nutrient acquisition. This
52 effect has been attributed to a disruption in cell expansion and elongation, prior to
53 inhibiting cell division (Kollmeier, Felle & Horst 2000; Doncheva *et al.* 2005). Recent
54 work demonstrated that Al not only affects root growth but also modulates other aspects
55 of root system architecture (RSA), which may be of adaptive significance. A fast change
56 in root cell patterning rather than a general cellular toxic effect was documented in
57 maize seedlings after exposure to Al for a short time (Doncheva *et al.* 2005). Moreover,
58 Rounds & Larsen (2008) showed that Al-induced inhibition of primary root growth in
59 *Arabidopsis* was caused by an arrest of meristem cells in the G2 phase of the cell cycle,
60 which coincided with full differentiation of the root tip, producing long root hairs and
61 lateral roots. By using Evans blue vital staining, the authors demonstrated that in Al-
62 treated roots the inhibition of root growth was not due to death of root cells, but instead

63 to a premature differentiation of the root meristem that correlated with loss of the
64 quiescent center.

65 Plant hormones, particularly auxin and ethylene play critical roles in modulating primary
66 root growth, root hair and lateral root formation, which are critical traits for plant
67 adaptation to soil stress. Sun *et al.* (2010) documented the effects of Al on root
68 elongation in *Arabidopsis* seedlings and showed that an intact ethylene and auxin
69 signaling pathways were required for Al to inhibit primary root growth. Although this work
70 did not investigate the particular contribution of cell division, elongation and or
71 differentiation processes in the hormonal control of root growth in response to Al, it
72 provides important new evidence on the genetic and physiological aspects related to
73 RSA remodeling by this metal.

74 Al toxicity and P deficiency often co-exist in acid soils. Low P availability is a major
75 limiting factor for plant growth. In many soils, Fe and Al oxides bind native and applied
76 P, forming Fe-P or Al-P precipitates that are unavailable to plants. To deal with P
77 deficiency, plants modify their RSA to increase exploratory and absorptive capacities.
78 This strategy enables plant roots to exploit the upper layers of soil, where phosphate
79 tends to accumulate (López-Bucio *et al.* 2002). The first visible event in plants
80 experiencing P deficiency is a strong reduction of primary root growth, which occurs
81 rapidly after transfer to low P medium, followed by an arrest of cell division. This is
82 accompanied by a loss of quiescent center identity (Sánchez-Calderón *et al.* 2005;
83 Svistoonof *et al.* 2007). Interestingly, cell proliferative activity is maintained in the *low*
84 *phosphorus insensitive* (*lpi*; Sánchez-Calderón *et al.* 2006) and *low phosphate resistant*
85 (*lpr*; Svistoonof *et al.* 2007) *Arabidopsis* mutants. Concomitantly with primary root growth
86 inhibition, the formation of lateral roots and root hairs that express high levels of P

87 transporters and phosphatases is enhanced by P starvation (López-Bucio *et al.* 2002;
88 Sánchez-Calderón *et al.* 2005; Pérez-Torres *et al.* 2008). Currently, the link between
89 primary root growth inhibition and the increase in P absorptive capacity is not clearly
90 understood.

91 The role of auxin in RSA remodeling in response to low P has been studied in detail.
92 The existence of distinct mechanisms modulating primary root growth and enhanced
93 lateral root or root hair formation has been proposed based on the observation that the
94 primary root of the *lpi3* mutant is only slightly reduced on low P medium but the mutant
95 still produces more lateral roots and root hairs (Sánchez-Calderón *et al.* 2005).
96 Expression studies of auxin-inducible markers *DR5:uidA* and *BA3:uidA* demonstrated an
97 increased auxin sensitivity of pericycle cells under low P conditions, which was related
98 to an increased expression of the TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/TIR1 auxin
99 receptor and required TIR1 and other members of the AUXIN SIGNALING F-BOX
100 BINDING 1 to 5 (AFB1-5) auxin receptors, as well as the transcription factors AUXIN
101 RESPONSE FACTOR 7 and 19 (ARF7 and ARF19) (Pérez-Torres *et al.* 2008). It is
102 believed that such increase in auxin sensitivity in pericycle cells is directly responsible of
103 increased lateral root initiation and emergence, which are important for plant adaptation
104 to low P availability stress.

105 Although many studies have been conducted to decipher the mechanisms of RSA
106 remodeling by Al toxicity and P deficiency, the responses of plants to these
107 environmental factors have been analyzed separately (i.e. Sánchez-Calderón *et al.*
108 2005; Rounds & Larsen 2008). Moreover, it is possible that these factors may strongly
109 interact through chemical reactions in the rhizosphere and in the signaling pathways
110 they use to modify growth and developmental processes. Several studies have been

111 done to investigate Al and P interactions in plant nutrition. Tan & Keltjens (1990) found
112 that increasing P supply might play a role in reducing Al phytotoxicity in sorghum
113 (*Shorghum bicolor*), possibly through improved root growth and P uptake. P supply also
114 enhanced Al resistance in *Lespedeza bicolor* (Sun *et al.* 2008) and in four soybean
115 (*Glycine max*) accessions differing in P efficiency (Liao *et al.* 2006). To date, little
116 information is available about Al and P interactions in regulating root system
117 architecture.

118 In this report, we investigated the effect of Al in RSA in *Arabidopsis thaliana* WT
119 seedlings and in mutants resistant to P deficiency (*lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1*) or defective
120 in auxin signaling (*tir1*, *tir1afb2afb3*, and *arf7arf19*) as a means to elucidate possible
121 mechanisms of Al and P interaction in *Arabidopsis* in relation to the genetic basis for
122 RSA remodeling under Al toxicity and low P availability. Our results show that the
123 *Arabidopsis lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1*, single and double mutants, respectively, are
124 resistant to Al in primary root growth inhibition and cell division arrest. Moreover, we
125 uncover a novel and unexpected role for ARF7 and ARF19 transcription factors in
126 mediating both primary root growth and lateral root responses to aluminum.

127

128 MATERIALS AND METHODS

129

130 Plant material and growth conditions

131 *Arabidopsis thaliana* ecotype Col-0, the transgenic lines, *CycB1;1:uidA* (Colón-Carmona
132 *et al.* 1999), *AtPT2::GUS* (Karthikeyan *et al.* 2002), and the mutant lines *lpi1-3*
133 (Sánchez-Calderón *et al.* 2006), *lpr1-1 lpr2-1* (Svistoonoff *et al.* 2007), *tir1-1* (Ruegger *et*
134 *al.* 1998), *tir1-1afb2-1afb3-1* (Dharmasiri, Dharmasiri & Estelle 2005), and double

135 mutant *arf7-1 arf19-1* (Okushima *et al.* 2005), were used in most experiments. Seeds
136 were surface sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% (v/v) bleach for 7 min.
137 After five washes in distilled water, seeds were germinated and grown on Petri dishes
138 containing sterilized 0.2X Murashige and Skoog (MS, Sigma) salts medium
139 supplemented with 0.6% [w/v] Suc, and 1% [w/v] agar. For acid medium, the pH was
140 adjusted to (4.0) with HCl 20% (v/v) and for neutral (7.0) pH medium with KOH 10%
141 (v/v). The basic MS salts medium (Sigma) 0.2X contained 0.25 mM KH_2PO_4 , 4.125 mM
142 NH_4NO_3 , 3.758 mM KNO_3 , 0.6 mM CaCl_2 , 0.3 mM MgSO_4 , 1.0 μM KI, 20.04 μM H_3BO_3 ,
143 19.99 μM $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, 6.0 μM $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.02 μM
144 $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.021 μM $\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 19.99 μM $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and 20.0 μM
145 $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Seeds were grown in Petri dishes under a photoperiod of 16 h of light
146 and 8 h of darkness and a temperature of 22 °C using a plant growth cabinet (Percival
147 AR95L, Percival Scientific). Plates were placed vertically at an angle of 65° to allow root
148 growth along the surface of the agar and to allow the unimpeded growth of the hypocotyl
149 into the air.

150

151 Aluminum treatments

152

153 The nutrient medium was supplemented with $\text{AlCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (25 to 175 μM). Al was
154 dissolved in water to prepare a stock solution of 1.0 M and added to hot (90 °C) molten
155 medium and poured into plates.

156

157 Histochemical analysis

158

159 For histochemical analysis of GUS activity, Arabidopsis seedlings were incubated
160 overnight at 37 °C in a GUS reaction buffer (0.5 mg/mL of 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-
161 D-glucuronide in 100 mM sodium phosphate, pH 7), and the stained seedlings were
162 cleared by the method described by Malamy & Benfey (1997). For each marker line and
163 for each treatment, at least 15 transgenic plants were analyzed. A representative plant
164 was chosen for each aluminum treatment and photographs were taken using a Leica
165 DMR microscope.

166

167 **Analysis of root architecture traits**

168

169 The Arabidopsis root system was analyzed with an EZ4D stereomicroscope (Leica). All
170 emerged lateral roots that were clearly visible using a 30X objective were taken into
171 account when counting the number of LR_s. For all experiments, the overall data were
172 statistically analyzed in the SPSS 10 program as described by López-Bucio *et al.*
173 (2002).

174

175 **Hematoxylin staining**

176

177 Staining with hematoxylin was performed as reported for Spence (2001). Briefly,
178 Arabidopsis seedlings were stained with Harris' hematoxylin (Neutral black 1) for 10-15
179 minutes and rinsed with distilled water. Excess of stain was removed with cool 0.5%
180 acid alcohol for 10 minutes and then washed in 3% ammonia water until the hematoxylin
181 turns dark blue (10-20 min). Finally, plant material was rinsed in distilled water.

182

183 **RESULTS**

184

185 **Al modulates root system architecture in Arabidopsis**

186

187 To determine the influence of pH and Al on primary root growth, we characterized the
188 rhizotoxic effect of Al in WT *Arabidopsis thaliana* (Col-0) seedlings grown over the
189 surface of agar-solidified Petri plates containing Murashige and Skoog (MS) 0.2X
190 medium supplemented with $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ adjusted to pH of 4.0 (acid medium) or 7.0
191 (neutral medium). The evaluated RSA parameters were primary root length (PRL), total
192 number of lateral roots per plant (LR) and lateral root density (LRD). When grown in
193 plates with neutral medium without aluminum, *A. thaliana* seedlings had a PRL of 4.4
194 cm, which was 20% greater than that observed in seedlings cultivated on acid medium
195 (Fig. 1a). However, when Al was supplied in the media, the primary root length
196 decreased in a dose-dependent way at both pH conditions. In neutral medium, the 175
197 μM Al treatment inhibited PRL by 58%, while in acid medium, this same Al concentration
198 decreased PR growth by 67% when compared to seedlings grown in medium without Al
199 (Fig. 1a). Concomitantly with PR growth inhibition, a nearly four-fold increase in lateral
200 root density (LRD) was induced by Al at both pH conditions (Fig. 1b, c), indicating that
201 this metal activates lateral root formation and maturation. The observation that Al can
202 modulate root morphogenetic processes in Arabidopsis seedlings suggests that plants
203 can adjust their RSA to adapt to locally high Al concentrations.

204

205 **Low phosphate-related Arabidopsis mutants are resistant to Al in primary root**
206 **growth at neutral pH but not under acidity conditions**

207

208 The RSA modifications caused by Al are similar to those described in Arabidopsis
209 seedlings grown under P deficiency (López-Bucio *et al.* 2002; Sánchez-Calderón *et al.*
210 2005; Pérez-Torres *et al.* 2008). To determine if Al could affect RSA by the same
211 mechanisms that regulate low P-induced primary root growth inhibition, we compared
212 the RSA of Arabidopsis WT (Col-0) seedlings with those of *low phosphate insensitive 1*
213 (*lpi1-3*) (Sánchez-Calderón *et al.* 2006) and *low phosphate resistant (lpr1-1 lpr2-1)*
214 double mutant (Svistoonoff *et al.* 2007) Arabidopsis mutants in medium supplied with
215 increasing concentrations of AlCl_3 at pH of 4.0 or 7.0. Because acidity prevents agar
216 polymerization (data not shown), the agar concentration in the medium was increased to
217 1.2% at pH of 4.0, which is slightly greater than that used at pH 7.0 (1%). This difference
218 in agar concentration had no apparent effect in RSA parameters in WT or mutant
219 seedlings (Fig. 2a-c). We found that in medium without Al, the PR growth of *lpi1-3* and
220 *lpr1-1 lpr2-1* mutants was similar to that seen in WT seedlings (Fig. 2a, d). In medium
221 with pH of 7.0 the *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* mutants were clearly resistant to PR growth
222 inhibition and lateral root induction by all Al concentrations tested (Fig. 2d; Fig. S1).
223 Under acidic conditions, the mutants exhibited resistance to PR growth inhibition by Al at
224 concentrations from 25 to 125 μM , being equally sensitive than WT seedlings at higher
225 concentrations (Fig. 2a; Fig. S1). The increase in lateral root formation was similar in
226 WT, *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* seedlings (Fig. 2b, c). These data indicate that *lpi1-3* and
227 *lpr1-1 lpr2-1* mutants are resistant to PR shortening and LRD increase by Al, and that
228 this response is also influenced by acid pH (Fig. 2a-f; Fig. S1).

229

230 **Low phosphate-related Arabidopsis mutants are resistant to the effects of Al**
231 **inhibiting cell proliferative activity in the primary root meristem**

232

233 The rapid reduction in root growth by Al has been attributed to a disruption in cell
234 elongation, cell division or both (Kollmeier, Felle & Horst 2000; Doncheva *et al.* 2005;
235 Rounds & Larsen 2008). Our analysis of WT primary root tips revealed that the root
236 apical meristem and the root elongation zone decreased in Al-treated seedlings, while
237 differentiation events evidenced by root hair formation progressed towards the root
238 meristem region (Fig. 3a-r). These phenotypical alterations, which were clearly observed
239 at both pH 4.0 and 7.0 in WT seedlings, were reduced in *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* mutants
240 (Fig. 3a-r). To more closely investigate whether Al could inhibit root meristem activity, we
241 compared the expression of the *CycB1;1::GUS* reporter in Arabidopsis WT and in *lpi1-3*
242 seedlings. For this analysis, the *CycB1;1::GUS* transgene was transferred into a *lpi1-3*
243 plant by out-crossing and propagated to obtain a homozygous *lpi1-3 CycB1;1::GUS*
244 population. WT and *lpi1-3 CycB1;1::GUS* seedlings were subsequently grown with or
245 without increased concentrations of Al at pH 7.0, after which roots were stained for GUS
246 activity. As shown in Fig. 4a, in WT and *lpi1-3* seedlings grown in medium lacking Al,
247 there was a very clear patchy pattern of GUS expression indicative of cells entering the
248 G2 phase of the cell cycle. Supply of Al caused a dose-dependent inhibition in
249 proliferating cells expressing *CycB1;1::GUS* in WT seedlings, whereas *lpi1-3*
250 *CycB1;1::GUS* seedlings were more resistant to these effects (Fig. 4a, b). Since Al could
251 affect root growth independently of the acidic conditions and to avoid agar
252 depolymerization by acidity, in the following experiments we focused on the

253 morphogenetic and physiological responses of the root system in plants grown in
254 medium with pH of 7.0.

255

256 **Al induces expression of P deficiency marker *AtPT2::GUS***

257

258 P deficiency induces the expression of genes for enhanced P uptake. Phosphate
259 transporters (Phts) are integral membrane proteins responsible for acquiring and
260 mobilizing P to different tissues and organs. The expression of *AtPT2* (*AtPht1;4*) is
261 induced during P-deprivation in a specific manner, and can be detected in roots,
262 cotyledons, leaves and shoot buds (Karthikeyan *et al.* 2002). To evaluate whether Al
263 could induce *AtPT2* expression, we analyzed the effects of Al on *AtPT2::GUS*
264 expression in Arabidopsis transgenic seedlings expressing this marker. In seedlings
265 grown in medium lacking Al *AtPT2::GUS* expression was absent in the root system and
266 specifically located in hydathodes and shoot buds (Fig. 5a-c). Al treatment changed the
267 *AtPT2::GUS* expression pattern in a dose-dependent manner, inducing GUS expression
268 in the stem, leaves, and primary and lateral roots (Fig. 5d-o). Our results show that Al
269 activates low P-induced gene expression in Arabidopsis seedlings.

270

271 **Phosphate application resumes PR growth in plants exposed to Al^{3+}**

272

273 One of the most toxic chemical species that can be formed from $AlCl_3$ is Al^{3+} . If Al^{3+}
274 causes a low P-induced response in the root, then we hypothesize that by adding
275 phosphorus to the medium, the primary root should resume growth. To test this
276 hypothesis, increasing concentrations of KH_2PO_4 (P) were added to the growth media

277 (with an initial P concentration of 0.25 mM) supplied or not with 150 μM AlCl_3 and PR
278 growth, LR number and LR density analyzed in WT, *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* seedlings.
279 The primary root growth in response to Al^{3+} was normalized by adding P to the medium
280 to a final concentration of 0.5 or 4 mM (Fig. 6a; Fig. S2). It just required a 0.5 mM P
281 concentration to resume PR growth in WT and mutant seedlings (Fig. 6a) and to reduce
282 LR number and LRD in WT plants to the levels observed in seedlings grown without
283 AlCl_3 (Fig. 6b, c). The same tendency was documented in *lpi1-3* and *lpi1-1 lpr2-1*
284 mutants (Fig. 6a-c). Phosphorus also resumed cell division in the primary root meristem
285 and prevented the formation of root hairs and lateral roots close to the apex (Fig. S3).

286

287 **GEOCHEM-EZ predicts Al forms are active without precipitation of P**

288

289 To determine P solubility and predict Al species in the MS0.2X solution at pH 7.0 and
290 4.0 and in treatments with supplied phosphate in the Arabidopsis growth medium,
291 simulations were undertaken using the computer program GEOCHEM-EZ (Shaff *et al.*
292 2010). In the MS 0.2X medium lacking AlCl_3 , 214 and 246 μM H_2PO_4 concentrations
293 were predicted at pHs of 7.0 and 4.0, respectively (Table 1). In media at pH 4.0
294 supplemented with 150 μM AlCl_3 , a decrease in H_2PO_4 was observed. However, a
295 concentration of 179 μM H_2PO_4 was still present, indicating that supply of Al did not
296 totally precipitate phosphate. At pH 7.0, in medium supplied with 150 μM AlCl_3 and
297 excess 0.5 mM H_2PO_4 a further increase in P concentration was evidenced. These
298 simulations also show that different Al species are formed depending on pH with mainly
299 $\text{Al}(\text{OH})_3$ formed at pH 7.0, whereas at pH 4.0 Al^{3+} (46.2 μM) and AlHPO_4^- (66.5 μM) are

300 predominant (Table 1). Taken together, our simulations indicate that precipitation of P is
301 unlikely responsible of root architectural changes induced by AI, specifically at pH 7.0.

302

303 **AI induces LR formation through an auxin signaling pathway**

304

305 The root system architecture of plants is regulated by auxin signaling. Studies focusing
306 on auxin-inducible genes demonstrated an increased sensitivity to auxin in plants grown
307 under low P conditions, which was correlated with more lateral root initiation and
308 emergence (Pérez-Torres *et al.* 2008). Several auxin receptors have been identified,
309 which belong to F-box proteins of the TIR1/AFB1-5 family (Dharmasiri, Dharmasiri &
310 Estelle 2005; Kepinski & Leyser 2005). TIR1 (*transporter inhibitor response 1*) and their
311 partners AFB1 to 5 are essential for auxin-dependent lateral root formation. To
312 determine whether TIR1/AFB1-5 and auxin response factors (ARFs) acting downstream
313 of the receptors could be involved in Arabidopsis RSA changes to AI, we analyzed root
314 parameters in response to increasing concentrations of AI in *tir1-1* and *tir1-1 afb2-1*
315 *afb3-1*, single and triple mutants, respectively, and in *arf7-1 arf19-1* double mutants,
316 when compared to the respective WT (Col-0) seedlings. In medium lacking AI, WT and
317 all three mutant lines tested showed similar PR growth of around 5 cm at 12 d.a.g. (Fig.
318 7a; Fig. S4). From 75 μ M AI onwards WT and *tir1-1 afb2-1 afb3-1* auxin receptor
319 mutants decreased their PRL progressively, with a 60% growth inhibition under a 175
320 μ M AI treatment. Interestingly, *arf7-1 arf19-1* mutants were resistant to the decrease in
321 PRL by AI (Fig. 7a). The increase in LR number and density observed in WT seedlings
322 treated with AI was clearly reduced in *tir1 afb2 afb3* and *arf7 arf19* mutants (Fig. 7b, c;
323 Fig. S4). These results indicate that auxin signaling through the auxin receptors TIR1,

324 AFB2 and AFB3, as well as the transcription factors ARF7 and ARF19 plays an
325 important role in the induction of lateral root formation by Al, while primary root growth
326 regulation involves ARF7 and ARF19 action.

327

328 **The primary root growth zone of *arf7 arf19* double mutants is resistant to Al**

329

330 Because PRL depends on an intact growth zone, it was of our interest to evaluate the
331 effect of Al on the structure of the growth zone in WT, *tir1*, *arf7-1 arf19-1* and in *tir1-1*
332 *afb2-1 afb3-1* mutants. With this aim, the primary root tips were photographed with a
333 stereoscopic microscope and the growth zone measured with a micrometer. We
334 considered the growth zone from the tip to the appearance of the first root hair bulge on
335 epidermal cells. In medium without Al, the phenotype of the root tip was similar in all
336 lines tested, except in *tir1-1 afb2-1 afb3-1*, which formed small root hairs (Fig. 8a). As
337 the aluminum concentration increased, the growth zone decreased in a similar manner
338 in WT, *tir1* and *tir1-1 afb2-1 afb3-1* seedlings. In contrast, in *arf7-1 arf19-1* the growth
339 zone was greater at most Al concentrations tested, including the 175 μ M Al
340 concentration in which the growth zone was two times longer than in WT, *tir1-1* and *tir1-*
341 *1 afb2-1 afb3-1* (Fig. 8b). Another characteristic effect of $AlCl_3$ in WT seedlings was an
342 altered root waving, which was completely absent in *arf7-1 arf19-1* double mutants (Fig.
343 S5). These findings indicate that ARF7 ARF19 transcription factors play an important
344 role in primary root growth inhibition by Al likely modulating cell division and/or
345 elongation in the growth zone.

346

347 **Al accumulation in WT and *arf7-1 arf19-1* root tips**

348

349 Hematoxylin staining in root tips provides a valuable semi-quantitative measure of Al
350 content, which is inversely proportional to both the ability of a plant to exclude Al from
351 the root apex, and its Al resistance (Polle, Konzak & Krittrick 1978). Next, we evaluated
352 the effects of increasing Al concentrations in the media on Al accumulation in primary
353 root tips of WT and *arf7-1 arf19-1* seedlings. Concentrations lower than 100 μM Al
354 exhibited minimal staining on WT root tips, while increasing Al concentrations from 125
355 to 175 μM clearly increased the staining (Fig. 9a-f). Similar effects of Al treatments on
356 hematoxylin staining were observed in *arf7-1 arf19-1* seedlings, whose root tips were
357 clearly stained at 175 μM Al (Fig. 9g-l), indicating an inability to effectively exclude Al at
358 such high concentrations.

359

360 DISCUSSION

361

362 Low P availability and Al toxicity are two stressing factors that limit plant growth in acid
363 soils. Recent studies have shown the similar root morphogenetic responses induced by
364 P deprivation and Al, indicating that some commonalities in signaling might be present
365 (Sánchez-Calderón *et al.* 2005; Rounds & Larsen, 2008).

366 The RSA in plants treated with Al under our growth conditions was characterized by the
367 formation of a primary root with limited growth and greater numbers of lateral roots and
368 root hairs developing closer to the root tip when compared to seedlings grown in
369 medium without Al (Fig. 1). Such altered root patterning suggests that signaling between
370 the root cap, the meristem and the pericycle is important for RSA modulation in
371 response to Al. Previous research has shown this kind of cell-to-cell communication. For

16

372 instance, Tsugeki & Fedoroff documented a decreased cell proliferative activity in the
373 primary root meristem of plants that express a diphtheria toxin gene in the root cap. In
374 these plants, the inhibition in primary root growth correlated with an increased lateral
375 root formation, suggesting that under adverse growth conditions that limit primary root
376 growth, enhanced lateral root growth might be of adaptive value (Tsugeki & Fedoroff
377 1999). In contrast to the toxic effects of the diphtheria toxin that kills root cap cells, we
378 observed that Al-treated WT primary roots were fully viable as root hairs developed
379 normally at the root apex region (Fig. 3).

380 Recent studies have shown that P deficiency induces a determinate growth program
381 that includes early cellular differentiation, gradual reduction of cell elongation, loss of the
382 root elongation zone, and meristematic activity (Sánchez-Calderón *et al.* 2005). The *low*
383 *phosphorus insensitive (lpi)* and *low phosphate resistant (lpr)* Arabidopsis mutant lines
384 were identified because of their indeterminate primary root growth under low P
385 conditions, which leads to a long root phenotype under P limitation (Sánchez-Calderón
386 *et al.* 2006; Svistoonof *et al.* 2007). The finding that the genetic lesions affecting *lpi1-3*
387 and *lpr1 lpr2* alter the primary root growth response to Al (Figs. 2 and 3), suggests that
388 P sensing and Al toxicity are mediated by common signaling pathways.

389 It is generally believed that the rapid inhibition of root growth in response to Al can be
390 caused by inhibition of cell elongation or proliferation or both. Our results showed a
391 decrease in mitotic activity induced by Al in the primary root tip of WT Arabidopsis
392 seedlings (Fig. 4). The negative impact of Al on cell proliferation can be explained
393 because Al interacts with nuclear constituents thus affecting DNA replication. Further
394 detailed cellular analysis of WT, and *lpi1-3* seedlings showed that *lpi* lines sustained
395 normal root meristematic activity as revealed by cell counts and *CycB1;1::GUS*

396 expression in the meristematic region (Fig. 4). Taking into account these observations,
397 we conclude that LPI1 modulates an important step in Al sensing by the root tip. The
398 previous finding that *lpi* mutants do not hyper-accumulate P (Sánchez-Calderón *et al.*
399 2006) suggests that meristem maintenance under exposure to Al is not regulated by the
400 shoot P status but rather by local signals derived from Al sensing, perhaps at the root
401 apex region.

402 For a long time, the main rhizotoxic species of Al were thought to be Al^{3+} , $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ and
403 $\text{Al}(\text{OH})_2^+$, which has been controversial (Kinraide 1997). Our data show that certain Al-
404 OH species are likely toxic as $\text{Al}(\text{OH})_3$ were predicted to occur in neutral medium (Table
405 1), in which primary root growth inhibition was clearly documented in WT seedlings (Fig.
406 1). In this medium no Al^{3+} was predicted to occur. In contrast, under acidic conditions,
407 the primary root growth inhibition was exaggerated and both Al^{3+} and $\text{Al}(\text{OH})^{2+}$ were
408 likely present (Table 1), indicating that both Al and acid pH exert complementary effects
409 on growth arrest. Interestingly, supply of soluble P together with Al, clearly decreased
410 the negative effect of Al on primary root growth (Fig. 6). Several reports have
411 documented the beneficial effects of P fertilization on crop productivity in acid soils,
412 which likely occur both by an improved P nutrition and its impact on plant growth and
413 metabolic processes or by decreasing Al activity in roots. Further research is needed to
414 reveal the commonalities and differences between low P and Al signaling in plant
415 metabolic processes.

416 Plants have evolved a number of adaptive mechanisms to acquire phosphate from the
417 soil, including changes in root architecture, association with mycorrhizal fungi, organic
418 acid exudation, and up-regulation of Pi transporters. In the present study, Arabidopsis
419 seedlings were exposed to Al stress under conditions of sufficient P availability.

420 According to chemical speciation calculations (Table 1) enough P was supplied so that,
421 upon addition of Al to the medium, the plants would still have a substantial amount of
422 available P and would not undergo P deficiency. Nevertheless, we observed up-
423 regulation of *AtPT2::GUS* by Al. When P is limiting, the *AtPT2::GUS* gene fusion is
424 expressed constitutively in the plant, including primary roots (Karthikeyan *et al.* 2002).
425 We found that Al induced *AtPT2::GUS* in a dose-dependent pattern in leaves, and in
426 primary and lateral roots similarly to that reported under P deficiency (Fig. 5). The
427 uptake of Al, transfer to the central cylinder and transport to the shoots is a typical
428 feature of plants such as *Hydrangea* (Ma *et al.* 1997; Neumann & Horst 2003) and
429 buckwheat (Ma, Hiradate & Matsumoto 1998). It is possible that Al can be internalized
430 and further transported to aerial tissues causing P deficiency symptoms. Alternatively, Al
431 might activate a signaling cascade responsible of the systemic induction of *AtPT2::GUS*
432 in leaves.

433 Previously, transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in
434 maize roots revealed an induction of low phosphate-responsive genes by Al including
435 three genes encoding purple acid phosphatases, which presumably catalyze the
436 hydrolysis of P fixed in organic compounds in the soil, as well as a high-affinity P
437 transporter (Maron *et al.* 2008). The immobilization of Al by phosphate in the root has
438 been suggested as a potential mechanism of plant Al tolerance. It has been proposed
439 that the accumulation of Al-P complexes at the root surface or in the vacuole might
440 serve as an internal mechanism of Al detoxification that may contribute to Al tolerance
441 (Gaume, Machler & Frossard 2001). Evidence of the role of Al immobilization by P was
442 also recently reported in the highly Al-tolerant species buckwheat (*Fagopyrum*

443 *esculentum*; Zheng *et al.* 2005). Therefore, it is possible that an additional tolerance
444 mechanism that involves high P uptake might be part of the AI response in roots.
445 Plant hormones including auxin and ethylene play critical roles in modulating root
446 growth. Several studies have previously shown that AI may affect auxin transport,
447 leading to alterations in auxin distribution and/or accumulation in roots (Kollmeier, Felle
448 & Horst 2000; Doncheva *et al.* 2005; Shen *et al.* 2008; Sun *et al.* 2010). A recent study
449 indicated that AI reduces the auxin concentration in the transition zone of *Arabidopsis*
450 roots by inhibiting the transport of the PIN2 auxin transporter in vesicles from plasma
451 membranes to endosomes (Shen *et al.* 2008). Consistently, Sun *et al.* (2010)
452 documented less inhibition of root elongation in *aux1-7* and *pin2* mutants defective in
453 auxin transport when compared to WT seedlings, while naphthylphthalamic acid (NPA)
454 an auxin transport inhibitor, substantially alleviated the AI-induced inhibition of root
455 elongation (Sun *et al.* 2010). Our data extends these previous observations by showing
456 that enhanced lateral root formation in response to increasing concentrations of AI is
457 decreased in *tir1-1* and *tir1-1 afb2-1 afb3-1*, single and triple mutants, respectively, and
458 in *arf7-1 arf19-1* double mutants, when compared to WT (Col-0) seedlings. An
459 interesting and unexpected finding is that *arf7-1 arf19-1* mutants were resistant to the
460 primary root growth inhibition by AI (Fig. 7a). These results indicate that auxin signaling
461 through the auxin receptors TIR1, AFB2 and AFB3, as well as the transcription factors
462 ARF7 and ARF19 plays an important role in the induction of lateral root formation by AI,
463 while primary root growth regulation by AI involves ARF7 and ARF19.
464 Our results fit in well with the hypothesis arising from the tight link between auxin and
465 root branching, that alterations in auxin distribution and signaling are likely to be a
466 general feature underlying the response of pericycle cells to both AI and P deficiency.

467 Hence, the P-deficiency induction of LR in Arabidopsis is linked to changes in auxin
468 sensitivity (López-Bucio *et al.* 2002; Pérez-Torres *et al.* 2008). It is unclear at present
469 how these two stresses affect auxin homeostasis, but one possibility is that reactive
470 oxygen species (ROS), which are produced both under low P availability (Tyburski,
471 Dunajska & Tretyn 2009) and Al toxicity (Richards *et al.*, 1998), could act as signaling
472 intermediates leading to changes in auxin homeostasis and thereby affecting RSA.
473 Since *arf7-1 arf19-1* double mutant is resistant to PR growth inhibition by Al, these
474 seedlings could have different affinity for Al. To address this question, we performed
475 hematoxylin staining in WT and in *arf7-1 arf19-1* seedlings exposed to increasing
476 concentrations of AlCl₃. Our data show that the primary root apex of WT and double
477 mutant seedlings has similar affinity for Al (Fig. 9). Release of mucilage by border cells
478 of primary root apex plays a role in protecting root tips from Al-induced cellular damage.
479 As shown in Fig. 9, both normal and mutant plants exuded mucilage in response to Al.
480 These data show that WT and *arf7-1 arf19-1* mutants did not differ on Al binding affinity
481 to the root tip but instead that signaling through ARF7 and ARF19 transcriptional factors
482 is likely important for Al-induced primary root growth inhibition. Interestingly, WT primary
483 roots showed altered root gravitropism in response to Al, with enhanced root waving that
484 coincided with LR initiation on tops of bends. This response was absent in *arf7 arf19*
485 seedlings (Fig. S5), suggesting that an altered gravitropic response perhaps modulated
486 at the level of auxin transport is important for changes in lateral root patterning under Al
487 treatments.

488 Together, our results support the hypothesis that the primary root growth inhibition by
489 low P and Al represents a general mechanism for stress evasion, which leads to a
490 redirection of growth of the root system away from localized sources of stress (e.g. Al) or

491 a means to better exploit the soil environment towards potential novel sources of
492 nutrients (e.g. P). Under stressing conditions, a stimulation of LR formation would
493 partially compensate for the reduction in PR growth. It seems that the sensitivity of LRs
494 to both low P and Al is greater than that of the PR, as these structures are able to grow
495 under both stresses, although this particular response has not been investigated at
496 present. Since Al and P deficiency coexist in acid soils, the formation of an extensive
497 root system would be very important for P acquisition, which is a relatively immobile
498 nutrient. A better P nutrition may lead in turn to an enhanced resistance to Al, allowing
499 the plant to survive in acid soils.

500

501 **ACKNOWLEDGEMENTS**

502

503 We thank Drs. Peter Doerner, Tom Guilfoyle, Kaschandra Raghothama, Mark Estelle
504 and Thierry Desnos for kindly providing us with seeds of Arabidopsis transgenic and
505 mutant lines. This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia
506 y Tecnología (CONACYT, México, grants Nos. 43978 and 60999), and Consejo de la
507 Investigación Científica (UMSNH, México, grant no. CIC 2.26).

508

509 **REFERENCES**

510

511 Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T. & Doerner P. (1999) Spatio-temporal
512 analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant Journal*
513 **20**, 503-508.

- 514 Dharmasiri N., Dharmasiri S. & Estelle M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin
515 receptor. *Nature* **435**, 441-445.
- 516 Doncheva S., Amenós M., Poschenrieder C. & Barceló J. (2005) Root cell patterning—a
517 primary target for aluminum toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* **56**,
518 1213-1220.
- 519 Gaume A., Machler F. & Frossard E. (2001) Aluminum resistance in two cultivars of *Zea*
520 *mays* L.: root exudation of organic acids and influence of phosphorus nutrition. *Plant*
521 *and Soil* **234**, 73–81.
- 522 Karthikeyan A.S., Varadarajan D.K., Mukatira U.T., D'Urzo M.P., Damsz B. &
523 Raghohama K.G. (2002) Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate
524 transporter. *Plant Physiology* **130**, 221-233.
- 525 Kepinski S. & Leyser O. (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor.
526 *Nature* **435**, 446-451.
- 527 Kinraide T.B. (1997) Reconsidering the rhyzotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride
528 complexes of aluminum. *Journal of Experimental Botany* **48**, 1115-1124.
- 529 Kollmeier M., Felle H.H. & Horst W.J. (2000) Genotypical differences in Al resistance of
530 *Zea mays* (L.) are expressed in the distal part of the transition zone. Is reduced
531 basipetal auxin flow involved in inhibition of root elongation by Al? *Plant Physiology*
532 **122**, 945-956.
- 533 Liao H., Wan H., Shaff J., Wang X., Yan X. & Kochian L. (2006) Phosphorus and
534 aluminium interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of
535 specific organic acids from different regions of the intact root system. *Plant*
536 *Physiology* **141**, 674-684.6

- 537 López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M.F.,
538 Simpson J. & Herrera-Estrella L. (2002) Phosphate availability alters architecture and
539 causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant*
540 *Physiology* **192**, 244-256.
- 541 Ma J.F., Hiradate S. & Matsumoto H. (1998) High aluminum resistance in buckwheat.
542 *Plant Physiology* **117**, 753-759.
- 543 Ma J.F., Hiradate S., Nomoto K., Iwashita T. & Matsumoto H. (1997) Internal
544 detoxification mechanism of Al in *Hydrangea*—Identification of Al form in the leaves.
545 *Plant Physiology* **113**, 1033-1039.
- 546 Malamy J.E. & Benfey P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of
547 *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33-44.
- 548 Maron L.G., Kirst M., Chuanzao M., Milner M.J., Menossi M. & Kochian L.V. (1998)
549 Transcriptional profiling of aluminum toxicity and tolerance responses in maize roots.
550 *New Phytologist* **179**, 116-128.
- 551 Neumann A. & Horst W.J. (2003) Effect of aluminium supply on aluminium uptake,
552 translocation, and blueing of *Hydrangea macrophylla* (Thunb.) Ser. cultivars in a peat-
553 clay substrate. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **78**, 463-469.
- 554 Okushima Y., Overvoorde P.J., Arima K., et al. (2005) Functional genomic analysis of
555 the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*:
556 unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *The Plant Cell* **17**, 444-463.
- 557 Pérez-Torres C-A., López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Ibarra-Laclette E., Dharmasiri S. &
558 Herrera-Estrella L. (2008). Phosphate availability alters lateral root development in
559 *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin
560 receptor. *The Plant Cell* **20**, 3258-3272.

- 561 Polle E., Konzak C.F. & Kittrick J.A. (1978) Visual detection of aluminium tolerance
562 levels in wheat by hematoxylin staining of seedling roots. *Crop Science* **18**, 823-827.
- 563 Richards K.D., Schott E.J., Sharma Y.K., Davis K.R. & Gardner R.C. (1998) Aluminum
564 induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **116**, 409-
565 418.
- 566 Ritchie G.S.P. (1995) Soluble aluminium in acid soils: principals and practicalities. *Plant
567 and Soil* **17**, 17-27.
- 568 Rounds M.A. & Larsen P.B. (2008) Aluminum-dependent root growth inhibition in
569 *Arabidopsis* results from AtATR-regulated cell cycle arrest. *Current Biology* **18**, 1495-
570 1500.
- 571 Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Turner J. & Estelle M. (1998) The TIR1
572 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and
573 yeast Grr1p. *Genes & Development* **12**, 198-207.
- 574 Sánchez-Calderón L., López-Bucio J., Chacón-López A., Cruz-Ramirez A., Nieto-
575 Jacobo F., Dubrovsky J.G. & Herrera-Estrella L. (2005) Phosphate starvation induces
576 a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and
577 Cell Physiology* **46**, 174-184.
- 578 Sánchez-Calderón L., López-Bucio J., Chacón-López A., Gutiérrez-Ortega A.,
579 Hernández-Abreu E. & Herrera-Estrella L. (2006) Characterization of *low phosphate
580 insensitive* mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate
581 root development and the activation of genes involved in the adaptation of
582 *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiology* **140**, 879-889.

- 583 Shaff J.E., Schultz B.A., Craft E.J., Clark R.T. & Kochian L.V. (2010) GEOCHEM-EZ: a
584 chemical speciation program with greater power and flexibility. *Plant and Soil* **330**,
585 207–214.
- 586 Shen H., Hou N.Y., Schlicht M., Wan Y.L. & Baluška F. 2008. Aluminum toxicity targets
587 PIN2 in Arabidopsis root apices: effects on PIN2 endocytosis vesicular recycling, and
588 polar auxin transport. *Chinese Science Bulletin* **53**, 2480–2487.
- 589 Spence J (2001) Plant histology. In *Plant Cell Biology* (eds C. Hawes & B. Satiat-
590 Jeunemaitre), pp. 198-206. Oxford University Press, second ed., New York, U.S.A.
- 591 Sun P., Tian Q-Y., Chen J. & Zhang W-H. (2010) Aluminium-induced inhibition of root
592 elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental*
593 *Botany* **61**, 347-356.
- 594 Sun Q.B., Shen R.F., Zhao X.Q., Chen R.F., & Dong X.Y. (2008) Phosphorus enhances
595 Al resistance in Al-resistant *Lespedeza bicolor* but not in Al-sensitive *L. cuneata*
596 under relatively high Al stress. *Annals Botany* **102**, 795-804.
- 597 Svitoonoff S., Creff A., Reymond M., Sigoillot-Claude C., Ricaud L., Blanchet A.,
598 Nussaume L. & Desnos T. (2007) Root tip contact with low phosphate media
599 reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* **19**, 792-796.
- 600 Tan K. & Keltjens W.G. (1990) Interaction between aluminum and phosphorus in
601 sorghum plants. I. Studies with the aluminium sensitive sorghum genotypes TAM428.
602 *Plant and Soil* **124**, 15-23.
- 603 Tsugeki R. & Fedoroff NV (1999) Genetic ablation of root cap cells in Arabidopsis.
604 *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **96**, 12941-12946.

- 605 Tyburski J., Dunajska K. & Tretyn A. (2009) Reactive oxygen species localization in
606 roots of *Arabidopsis thaliana* seedlings grown under phosphate deficiency. *Plant*
607 *Growth Regulation* **59**, 27-36.
- 608 von Uexküll H.R. & Mutert E. (1995) Global extent, development and economic impact
609 of acid soils. *Plant and Soil* **171**, 1-15.
- 610 Zheng S.J., Yang J.L., He Y.F., Yu X.H., Zhang L., You J.F., Shen R.F. & Matsumoto H.
611 (2005) Immobilization of aluminum with phosphorus in roots is associated with high
612 aluminum resistance in buckwheat. *Plant Physiology* **138**, 297–303.
- 613

614

Table 1. Compositions of the MS 0.2X nutrient solution used for *Arabidopsis thaliana* seedling cultivation. Activities of major ions and ion complexes were predicted with GEOCHEM EZ; the pH of alkaline and acid solutions was adjusted to 7.0 and 4.0 adding KOH and HCl, respectively.

Ion	150 μM AlCl_3				
	pH 7	pH 4	pH 7 + 0.5		
			pH 7	pH 4	mM KH_2PO_4
	mM				
$[\text{Al}^{3+}]$	—	—	—	0.0462	—
$[\text{Al}(\text{OH})_2^+]$	—	—	0.0003	0.0030	0.0003
$[\text{Al}(\text{OH})_3]$	—	—	0.1497	—	0.1497
$[\text{AlHPO}_4^-]$	—	—	—	0.0665	—
$[\text{H}_2\text{PO}_4^-]$	0.2144	0.2461	0.2144	0.1796	0.4051
$[\text{SO}_4^{2-}]$	0.3205	0.3174	0.3210	0.3041	0.3223
$[\text{Cl}^-]$	0.5984	0.7585	0.7484	0.9083	0.7483
$[\text{NH}_4^+]$	4.0879	4.1250	4.0879	4.0879	4.0879
$[\text{Ca}^{2+}]$	0.5645	0.5781	0.5650	0.5801	0.4992
$[\text{Mg}^{2+}]$	0.2815	0.2929	0.2817	0.2933	0.2726
$[\text{K}^+]$	4.1407	4.0019	4.1612	4.0019	4.1612
$[\text{Na}^+]$	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202	0.0202
$[\text{NO}_3^-]$	7.8837	7.8837	7.8837	7.8837	7.8836

28

615 **FIGURE LEGENDS**

616

617 **Figure 1.** Arabidopsis root response to low pH and AlCl₃. Col-0 seedlings were grown
618 for 12 days on agar plates supplied with AlCl₃ at 25 μM concentration intervals in
619 medium acidified with HCl (pH = 4 black line) or neutralized with KOH (pH = 7.0 gray
620 line), and the primary root length (a), total lateral root number (b) and lateral root density
621 (c) determined. Values shown represent the mean of 45 seedlings per treatment per line
622 ± SD. Different letters are used to indicate means that differ significantly (P<0.05). The
623 experiment was repeated three times with similar results.

624

625 **Figure 2.** Effects of Al on root development in WT and low phosphate resistant
626 Arabidopsis mutants grown in medium with acid (pH 4.0) and neutral (pH 7.0) pH.
627 Arabidopsis WT (Col-0, white bars) and mutants (*lpi1-3*, gray bars) or (*lpr1-1 lpr2-1*,
628 black bars) were grown for 12 days side by side over the surface of agar plates supplied
629 with increasing AlCl₃ concentrations and the primary root length (a and d), lateral root
630 number (b and e) and lateral root density (c and f) determined for 45 seedlings.
631 Experiments in acid medium were conducted using agar 1.2%, while in neutral medium
632 were conducted in either 1.2% or 1.0% agar concentrations. Different letters are used to
633 indicate means that differ significantly (P<0.05). The experiment was repeated three
634 times with similar results.

635

636 **Figure 3.** Effects of Al on root apex structure in WT and low phosphate resistant
637 Arabidopsis mutants. WT, *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* seedlings were grown in medium with
638 acid (pH 4.0) and neutral (pH 7.0) pH. Root tip structure in seedlings treated with water

639 (control), 125 or 150 μM AlCl_3 is shown. Photographs are representative individuals of
640 45 seedlings.

641

642 **Figure 4.** Expression of *CycB1;1::GUS* affected by AlCl_3 in transgenic wild-type and *lpi1-*
643 3 background. (a) 12 h GUS staining of *CycB1;1::GUS* primary roots in WT and *lpi1-3*
644 seedlings grown for 12 days in medium with varied concentrations of AlCl_3 . Photographs
645 are representative of 20 stained plants. (b) Mean length of the *CycB1;1::GUS*
646 expression domain. Values shown in (b) represent the mean \pm SD of 45 seedlings
647 analyzed per treatment. Different letters are used to indicate means that differ
648 significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results.

649

650 **Figure 5.** Effect of AlCl_3 on *AtPT2::GUS* expression. *AtPT2::GUS* expressing seedlings
651 were grown for 12 days in medium supplied with different concentrations of AlCl_3 .
652 Photographs are representative of 20 stained plants of each line. The experiment was
653 repeated three times with similar results.

654

655 **Figure 6.** Effects of phosphate supply on root development of WT and low phosphate
656 resistant mutants grown in medium with 150 μM AlCl_3 . WT (white bars), *lpi1-3* (gray
657 bars), and *lpr1-1 lpr2-1* (black bars) seedlings were grown side by side for 12 days on
658 agar plates with different P treatments supplied or not with AlCl_3 and the mean primary
659 root length (a), lateral root number (b) and lateral root density determined for 45
660 seedlings per treatment. Different letters are used to indicate means (\pm SD) that differ
661 significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results.

662

663 **Figure 7.** Root system architecture in WT and auxin-related Arabidopsis lines treated
664 with AlCl_3 . WT, *tir1-1*, *tir1-1 afb2-1 afb3-1*, and *arf7-1 arf19-1* Arabidopsis seedlings
665 were grown for 12 days in medium supplemented with increasing concentrations of AlCl_3
666 and the mean primary root length (a), lateral root number (b) and lateral root density (c)
667 determined for 45 seedlings per treatment. Different letters are used to indicate means
668 (\pm SD) that differ significantly ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with
669 similar results.

670

671 **Figure 8.** Root apex structure in WT (Col-0) and auxin-related Arabidopsis mutants as
672 affected by AlCl_3 . (a) Representative photographs of WT, *tir1-1*, *arf7-1 arf19-1* and *tir1-1*
673 *afb2-1 afb3-1* seedlings grown on medium supplied with or without increasing
674 concentrations of AlCl_3 for 12 days. (b) Mean length of the primary root growth zone
675 domain. Values shown represent the mean \pm SD of 45 seedlings analyzed per
676 treatment. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$).
677 The experiment was repeated twice with similar results.

678

679 **Figure 9.** Hematoxylin staining in Al-treated WT (Col-0) and *arf7-1 arf 19-1* roots.
680 Arabidopsis WT (a-f) and *arf7-1 arf 19-1* (g-l) mutant seedling were grown for 12 days in
681 medium with or without increasing concentrations of AlCl_3 and stained with hematoxylin.
682 Arrow indicates mucilage formation in tip root. Photographs are representative of 20
683 stained plants of each line. The experiment was repeated three times with similar
684 results.

685

686 **Figure S1.** Arabidopsis root system architecture as affected by AlCl_3 and pH.
687 Arabidopsis WT (Col-0), *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-2* seedlings were grown for 12 days in
688 medium supplemented with 125 or 150 μM AlCl_3 in acid (pH 4.0; a-f) or neutral medium
689 (pH 7.0; g-l). Photographs are representative of 9 independent plates analyzed per
690 treatment.

691

692 **Figure S2.** Root architecture in WT and *lpi1-3* and *lpr1-1 lpr2-1* mutants in response to
693 Al and P supply. 150 μM AlCl_3 (d) and/or KH_2PO_4 (b) were supplied in the growth
694 medium of plants. Photographs are representative of 9 independent plates analyzed per
695 treatment

696

697 **Figure S3.** Effect of P and Al supply in root apex structure in WT and *lpi1-3* and *lpr1-1*
698 *lpr2-1* Arabidopsis seedlings. Effect of phosphate (a-f) and aluminum (g-i) in primary root
699 tip structure. A small increase in the concentration of phosphate normalizes the structure
700 of the primary root meristem in Al-treated seedlings. Photographs are representative
701 individuals of 45 seedlings.

702

703 **Figure S4.** Root system architecture in WT (Col-0) and auxin related Arabidopsis
704 mutants. Seedlings were treated with water (a), or 125, 150 and 175 μM AlCl_3 (b-d).
705 Photographs are representative of 9 independent plates analyzed per treatment.

706

707 **Figure S5.** Root waving and lateral root formation in response to aluminum in WT (Col-
708 0) and *arf7-1 arf19-1* double mutants. Note that the *arf7-1 arf19-1* double mutant is not

709 only resistant to lateral rot formation but also to primary root waving induced by AI.

710 Photographs are representative individuals of 45 seedlings.

For Review Only

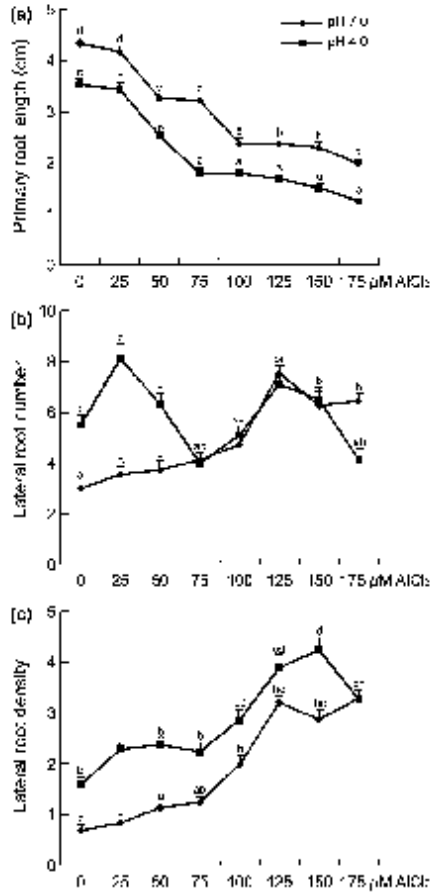


Figure 1
277x584mm (300 x 300 DPI)

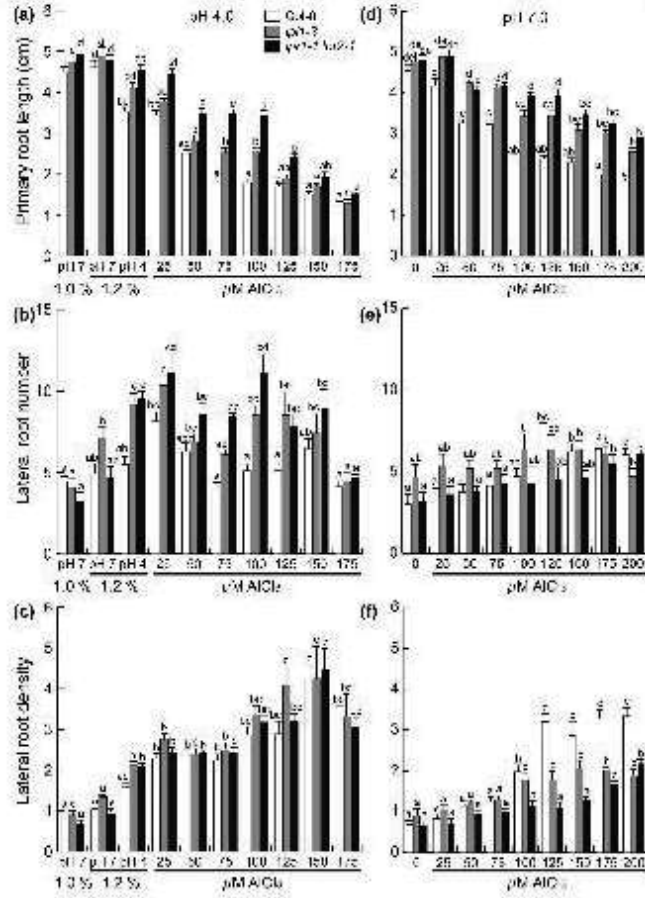


Figure 2
208x288mm (300 x 300 DPI)

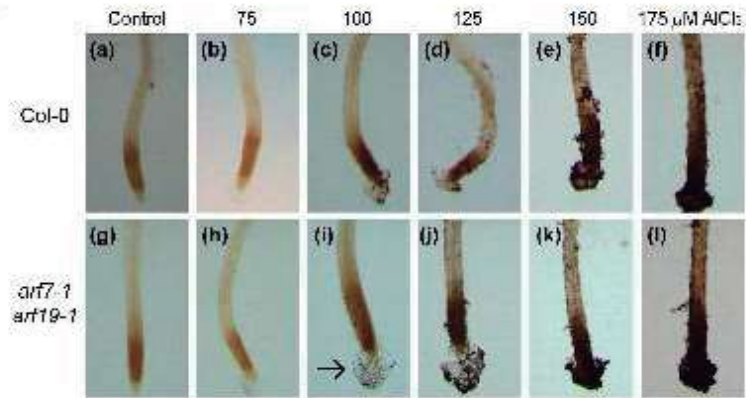


Figure 9
203x106mm (300 x 300 DPI)

Review Only

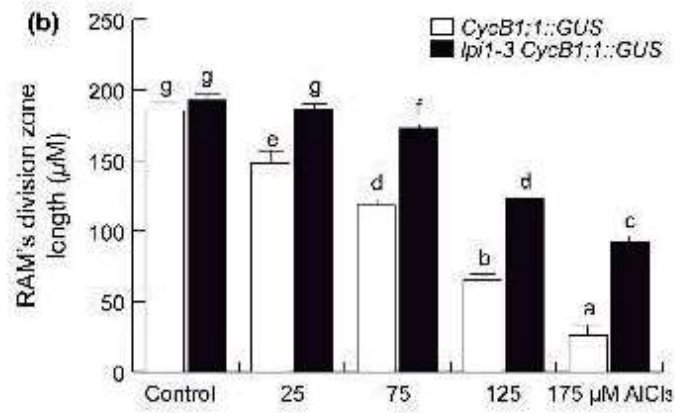
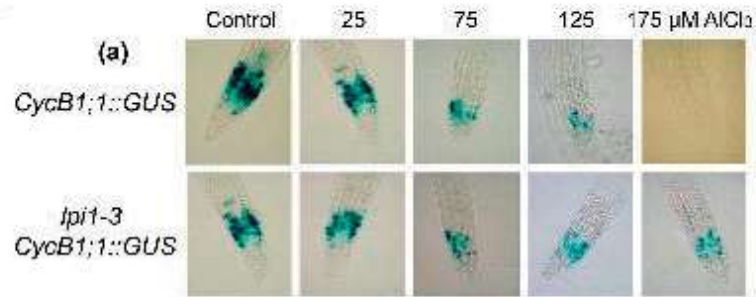


Figure 4
 167x166mm (300 x 300 DPI)

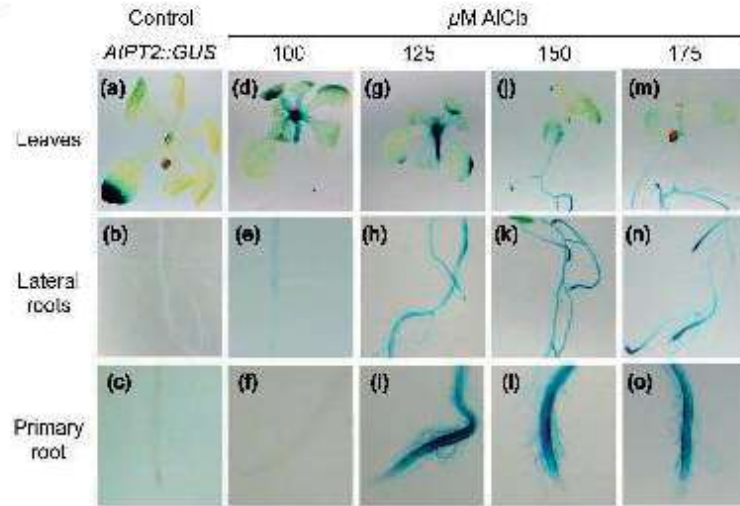


Figure 5
205x138mm (300 x 300 DPI)

ew Only

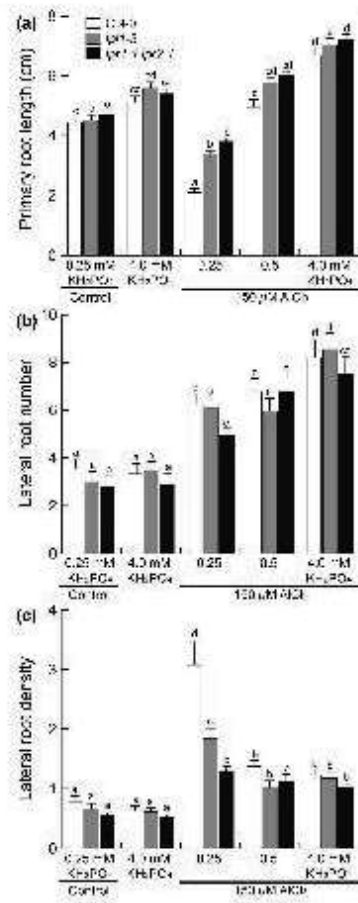


Figure 6
116x296mm (300 x 300 DPI)

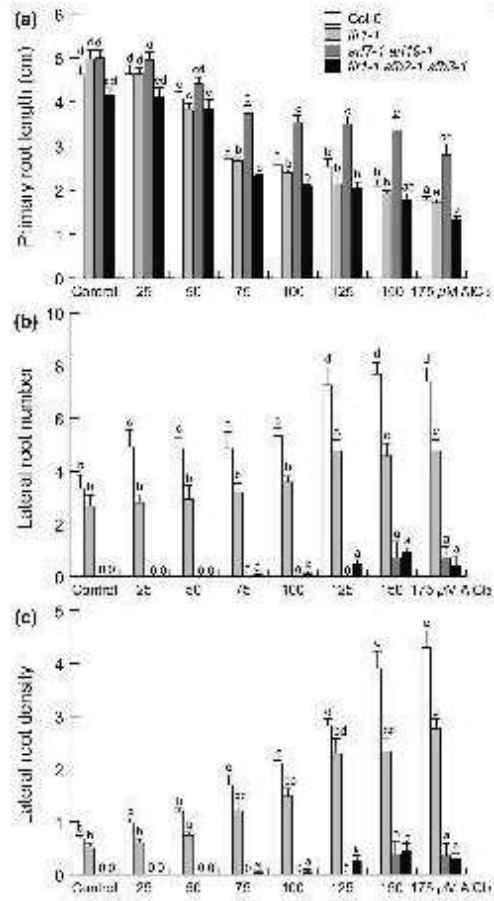


Figure 7
144x268mm (300 x 300 DPI)

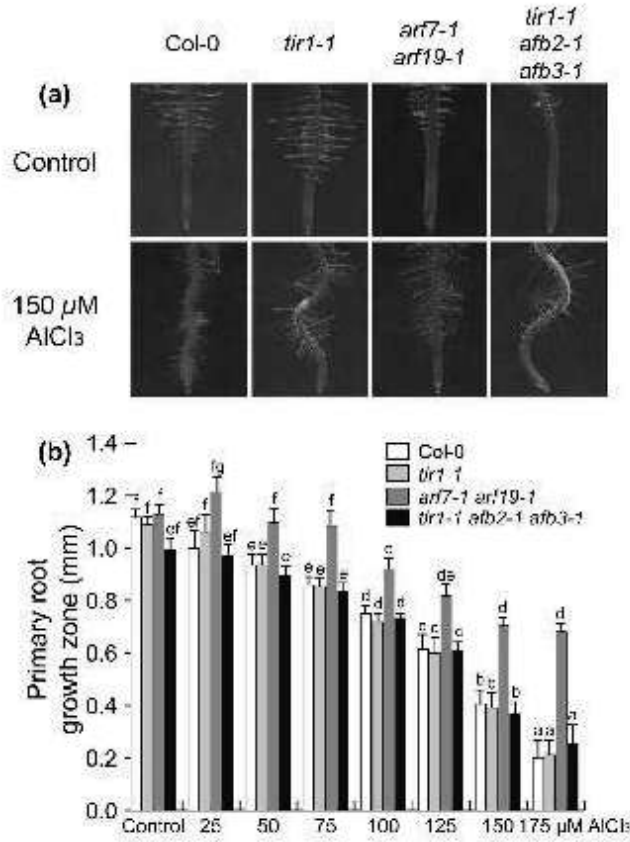


Figure 8
127x180mm (300 x 300 DPI)

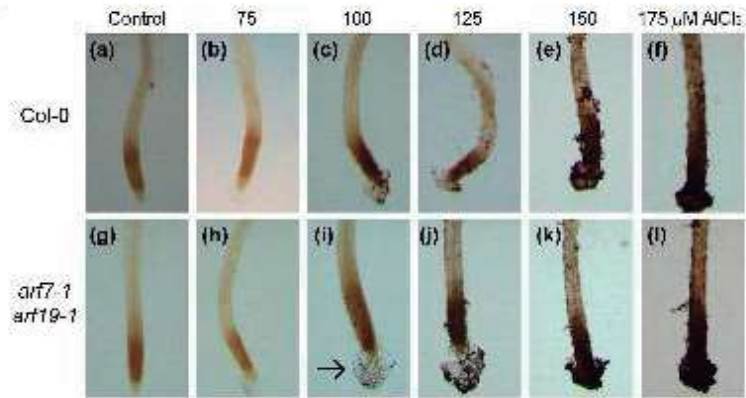


Figure 9
203x106mm (300 x 300 DPI)

Review Only

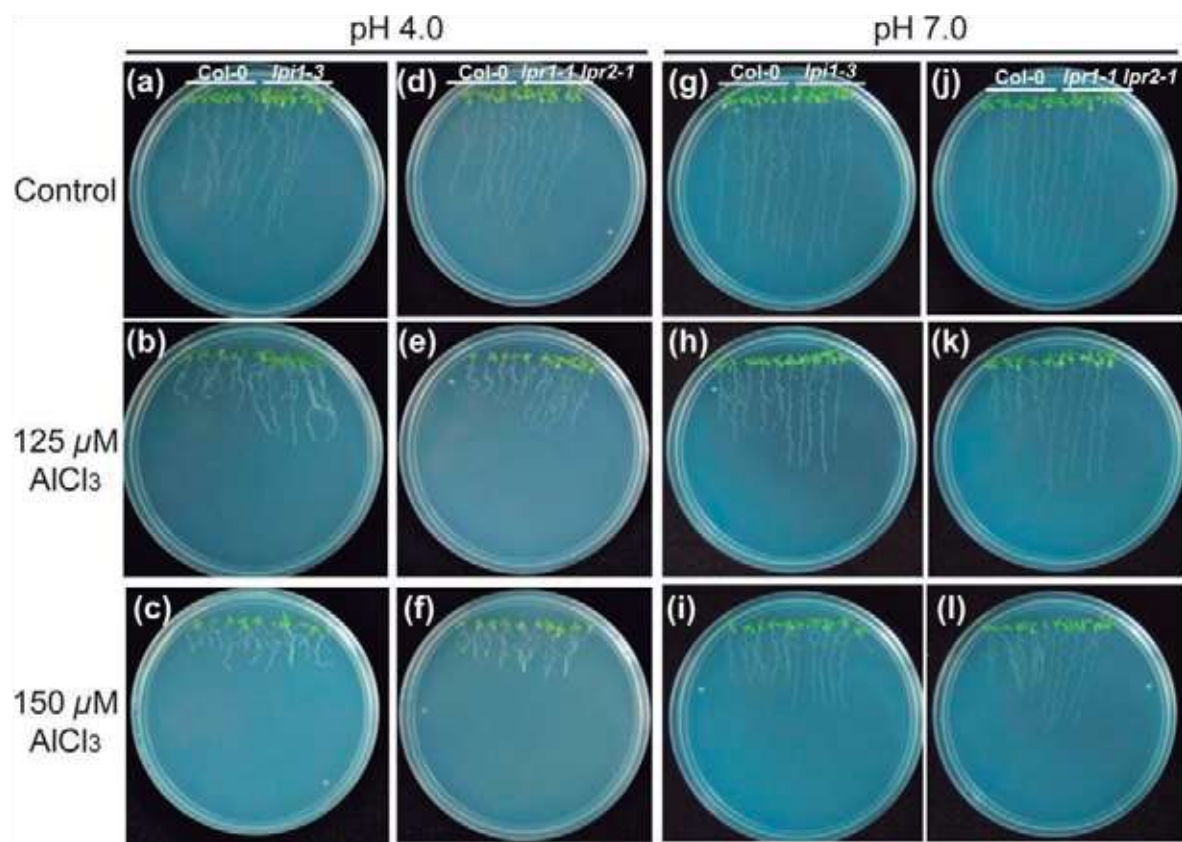


Figure S1

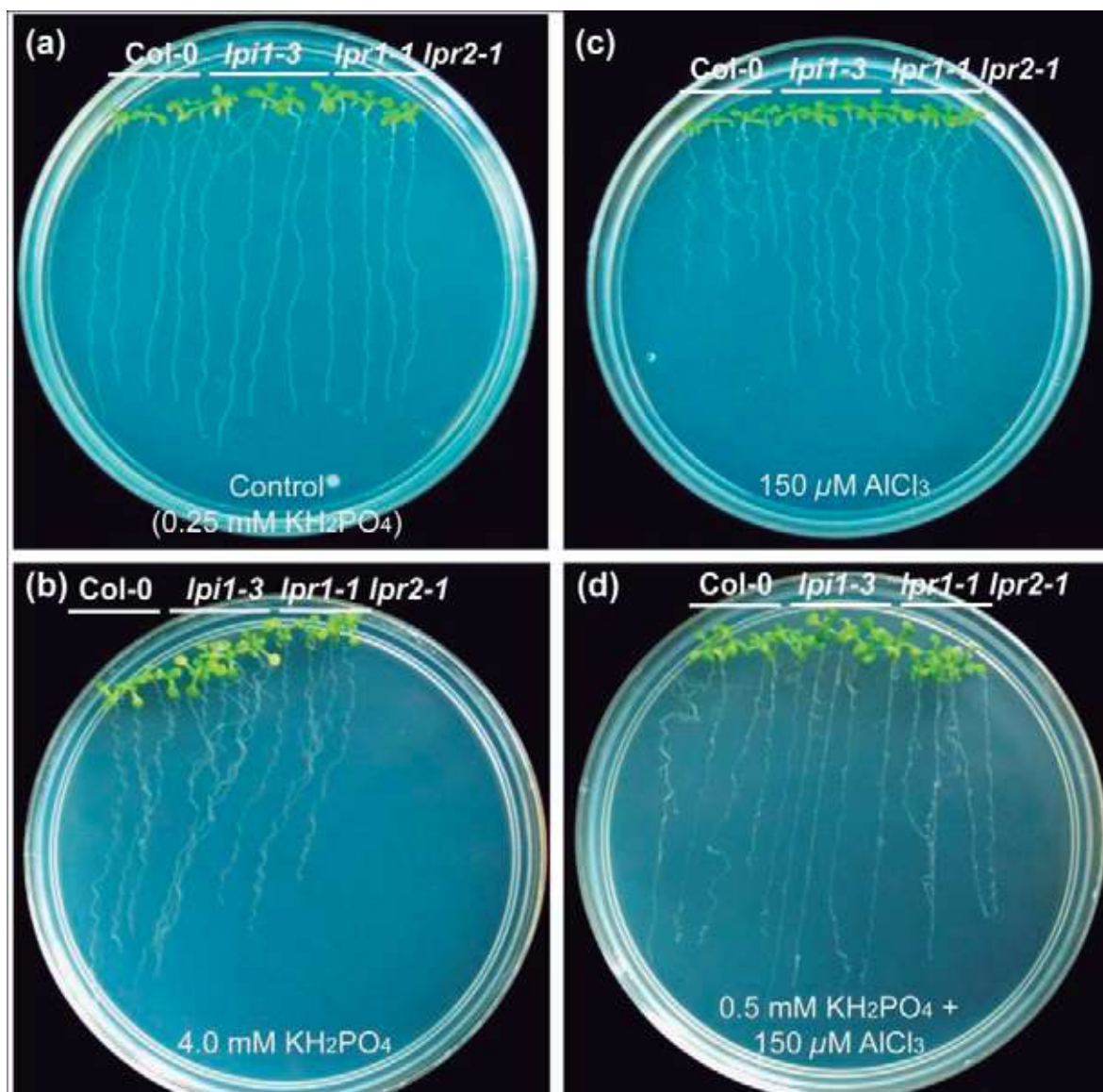


Figure S2

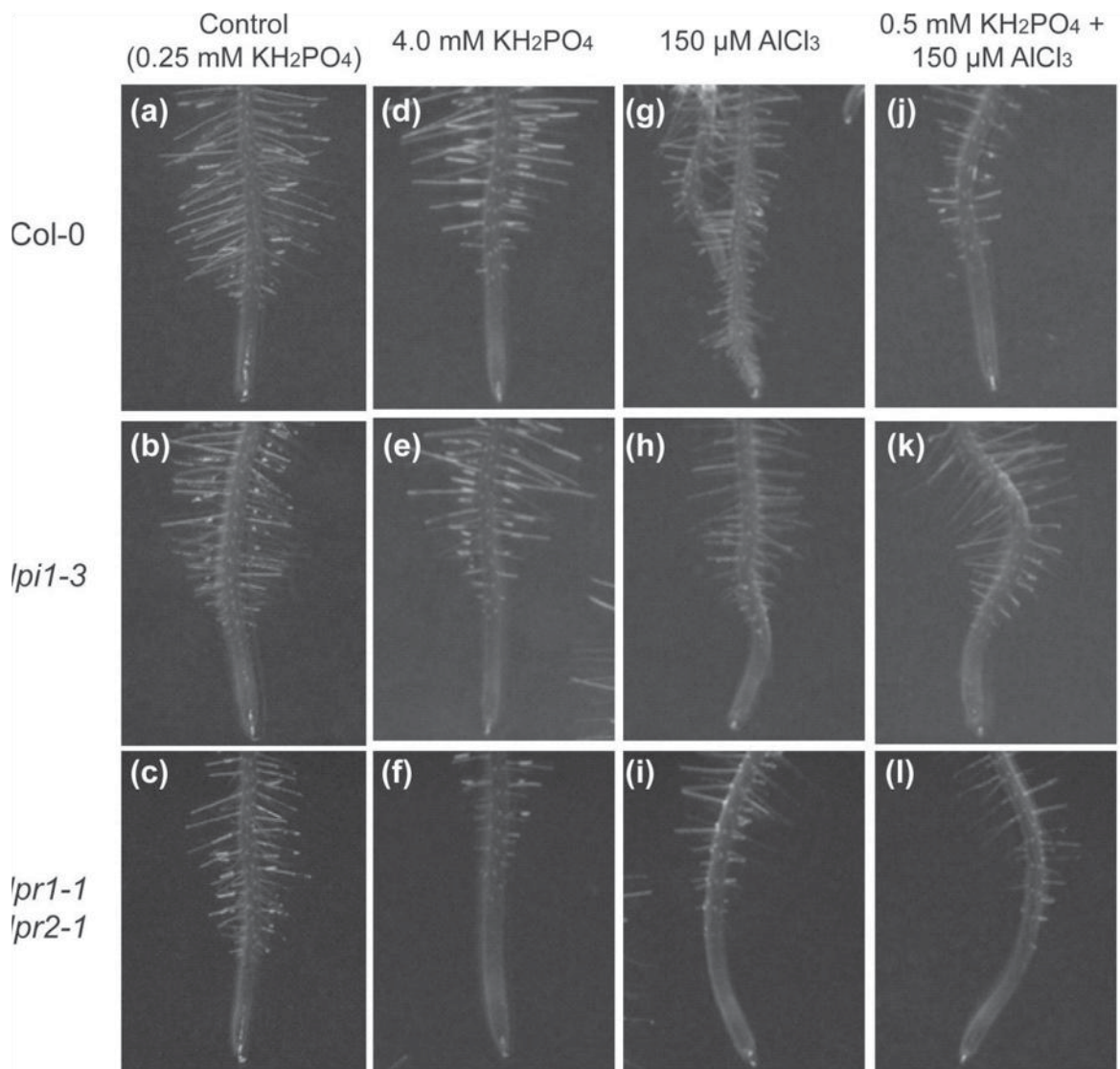


Figure S3

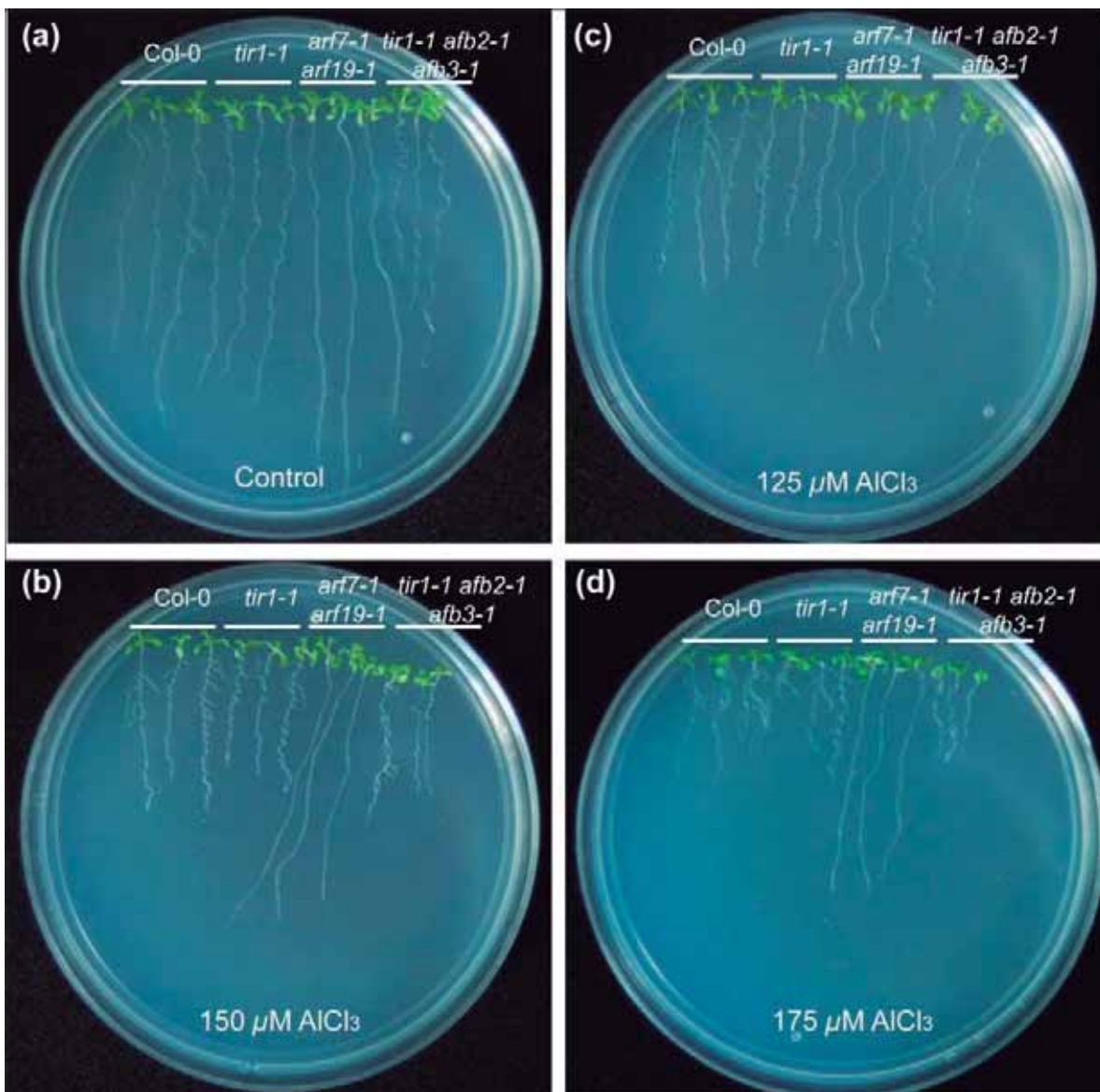


Figure S4

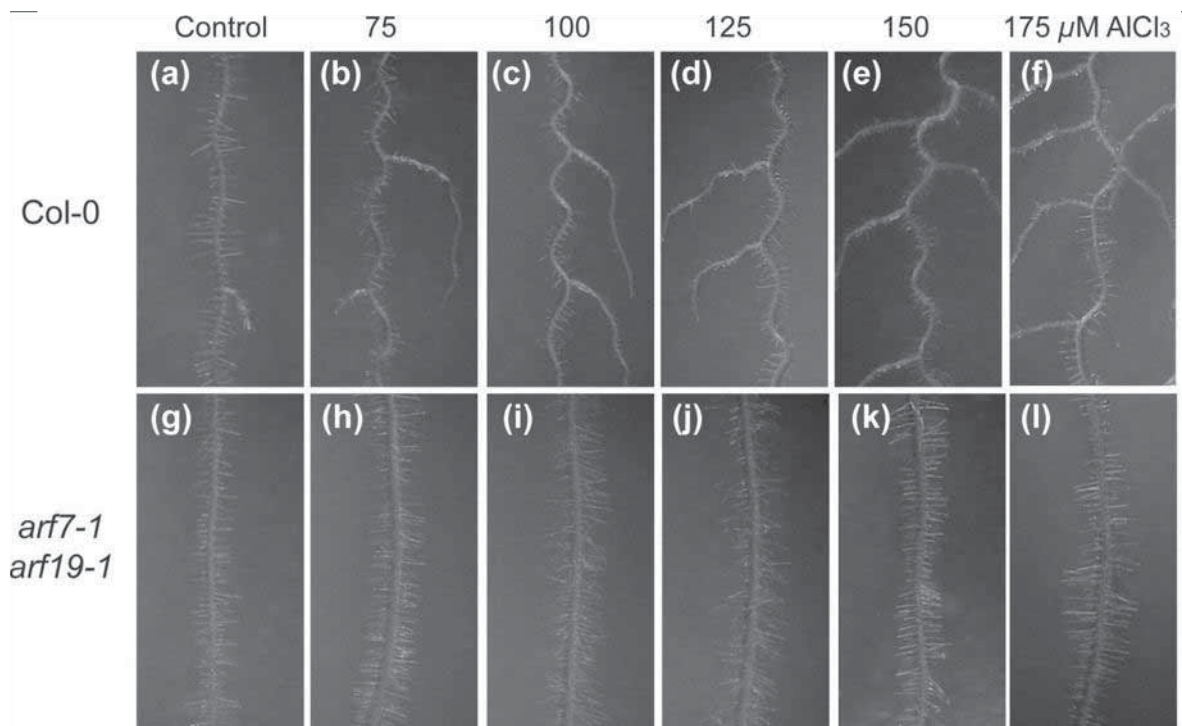


Figure S5

VII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La disponibilidad de fósforo (P) es uno de los principales factores limitantes de la productividad vegetal, tanto en sistemas naturales como agrícolas. En algunos suelos, el P puede encontrarse formando minerales insolubles con lantánidos, como el fosfato de lantano (LaPO_4) y el fosfato de gadolinio (GdPO_4). Este tipo de minerales están ampliamente distribuidos en la naturaleza y en algunas regiones del mundo son la fuente principal de rocas de fosfato para fabricar fertilizantes. Ejemplo de ello son los suelos rojos de China, ricos en elementos de tierras raras (REEs), donde la extracción de fosfatos de lantánidos como materia prima de fertilizantes y otros productos representa una industria de 5,000 ton anuales, con un precio de \$40,000 dólares por tonelada (Bradsher, 2011). Aunque el principal uso de los REEs ocurre en la agricultura, muchas formas reactivas de lantánidos se liberan al ambiente debido a actividades industriales humanas, como la industria petroquímica, la fabricación de teléfonos celulares, la industria armamentista, etc. Así, la contaminación de los suelos con REEs es un problema creciente en algunas regiones del mundo. Los reportes de efectos de los REEs en las plantas, aunque se han estudiado durante décadas debido a su uso como fertilizantes, son todavía contradictorios y controvertidos (El-Ramady, 2010a,b).

Otro tipo de suelos en los que el Pi es un factor limitante son los suelos ácidos, los cuales están distribuidos principalmente en las regiones tropicales y subtropicales de países en vías de desarrollo, lo que representa un reto para la agronomía y la sustentabilidad alimentaría de dichos países. En climas tropicales, la meteorización física y las altas temperaturas liberan el aluminio de las arcillas, lo que acidifica el suelo y promueve la formación de iones Al^{3+} (von Uexküll y Mutert, 1995). El aluminio trivalente fácilmente precipita el Pi, insolubilizándolo y limitando su captación por las plantas. En dichos suelos se presenta el llamado “síndrome del aluminio”, que se caracteriza por una rápida inhibición del crecimiento de la raíz y del follaje (Ma, 2007).

Es importante destacar que la escasez de ortofosfatos solubles ($\text{H}_2\text{PO}_4^{-1}$ y HPO_4^{-2}) esta asociada con la presencia de cationes trivalentes, ya sean lantánidos (La^{3+} o Gd^{3+}) o aluminio (Al^{3+}). Las plantas han desarrollado una serie de adaptaciones bioquímicas, fisiológicas y morfológicas para hacer frente a la deficiencia de Pi (López-Bucio *et al.*, 2003). Entre las estrategias bioquímicas podemos destacar la exudación de ácidos orgánicos por la raíz, respuesta que también se ha caracterizado como una adaptación a la presencia de lantánidos (La^{3+} y Gd^{3+}) y Al^{3+} (Kataoka *et al.*, 2002).

La modificación de la arquitectura de la raíz en respuesta a la deficiencia de Pi ha sido estudiada ampliamente en *Arabidopsis thaliana*. Debido a que en la naturaleza la deficiencia de Pi en el suelo suele estar asociada con la presencia de cationes trivalentes (La^{3+} , Gd^{3+} o Al^{3+}), nuestra hipótesis de trabajo fue que la raíz de *Arabidopsis thaliana*, al estar expuesta a cationes trivalentes, presentaría adaptaciones similares en su sistema radicular a lo observado bajo condiciones de limitación de P y efectivamente, el efecto de los lantánidos sobre la arquitectura de la raíz de plantas silvestres (Col-0) de *A. thaliana*, mimetiza los cambios en plantas observados por deficiencia de Pi específicamente (Fig. 3a). La raíz cambia de un sistema radicular con crecimiento continuo o indeterminado a uno determinado exploratorio con la concomitante pérdida de estructura del meristemo de la raíz primaria (López-Bucio *et al.*, 2005). Efectos similares se observaron con el Al en pH ácido, el cual por sí mismo tiene un efecto deletéreo sobre el crecimiento de la raíz primaria, el cambio en la arquitectura de la raíz en presencia de Al fue similar al de la deficiencia de Pi (Fig. 3a). Por otro lado, en plantas crecidas en medio con pH neutro, el efecto del Al fue menos acentuado; aunque también acorta la raíz primaria e induce la formación de raíces laterales y pelos radiculares. Así, la conclusión de esta serie de experimentos es que los diferentes cationes trivalentes, ya sean lantánidos (La^{3+} o Gd^{3+}) o Al en condiciones de pH ácido o neutro, modifica la arquitectura de la raíz de manera similar a lo observado en la deficiencia de Pi.

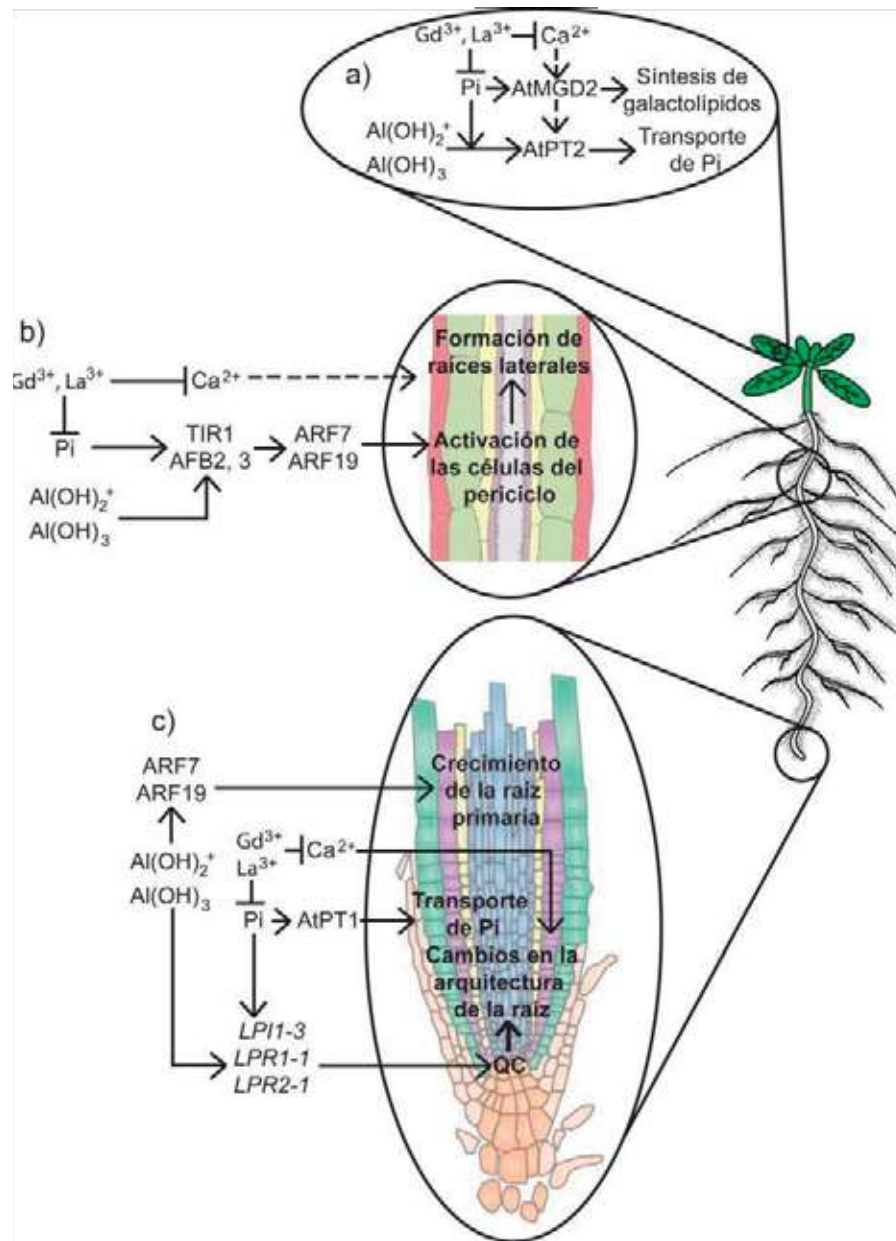


Figura 3. Modelo de señalización propuesto para la toxicidad de lantánidos como cationes trivalentes (La^{3+} y Gd^{3+}) y de hidróxidos de aluminio [$Al(OH)_2^+$ y $Al(OH)_3$]. En los tres paneles se propone que el efecto de los lantánidos ocurre a través de la precipitación del Pi y del bloqueo de canales de Ca^{2+} . Las líneas continuas representan rutas estudiadas en el presente trabajo, las punteadas denotan rutas que todavía necesitan ser comprobadas. (a) Los lantánidos precipitan el Pi , cuya deficiencia ocasiona la expresión de genes de respuesta a deficiencia de Pi , $AtPT2$ y $MGD2$, tanto en el follaje como en el sistema radicular; los hidróxidos de aluminio solo activan la expresión de $AtPT2$. (b) De manera similar, los lantánidos al precipitar el Pi , o los hidróxidos de aluminio de manera directa, activan las células de periciclo promoviendo la formación de raíces laterales a través de una ruta auxínica. (c) El Gd^{3+} y el La^{3+} activan una ruta de señalización mediada por los genes $LPI1$, $LPR1$ y $LPR2$, que promueve el crecimiento determinado de la raíz. $ARF7$ y $ARF19$ regulan de manera negativa el crecimiento de la raíz primaria en respuesta al aluminio.

El siguiente aspecto que se analizó fue establecer si los efectos de los cationes ocurren a su vez por precipitar al fosfato o porque activan cascadas de señalización que activan respuestas comunes a las observadas bajo deficiencia de P. Entre los genes identificados que participan en las respuestas a la deficiencia de Pi se encuentran los genes *LPI* y *LPR*, por lo tanto evaluamos el efecto de los cationes en la mutante sencilla *lpi1-3* y en la doble mutante *lpr1-1 lpr2-1*. (Sánchez-Calderón *et al.*, 2006; Svitoonoff *et al.*, 2008). Ambas mutantes mostraron resistencia parcial a los tratamientos con los cationes trivalentes, lo que indica que tanto la deficiencia de Pi como la resistencia a Gd^{3+} , La^{3+} y a las diversos iones poliatómicos del Al comparten mecanismos de señalización en común mediados en parte por los genes *LPI* y *LPR* (Fig. 3a). También se realizaron simulaciones de la especiación de La y del Al con el P en el medio de cultivo (medio MS 0.2X), además de competencia entre los cationes y diferentes concentraciones de P. Es importante destacar que pequeñas cantidades de KH_2PO_4 restauran por completo la arquitectura de la raíz en plantas crecidas en medio suplementado con cada uno de los tres cationes analizados, lo que sugiere que aunque pueden estar actuando a través de otras vías independientes a la de la señalización de Pi, la abundancia de fosfato tiene un efecto jerárquico sobre cualquier otro efecto de los cationes trivalentes.

Utilizando el programa de computadora GEOCHEM-EZ (Shaff *et al.*, 2010) se determinó que el La precipita equimolarmente al Pi, lo que explica en parte los efectos tóxicos de los lantánidos. Sin embargo, el Gd resultó más activo que el La, es decir, bastan 180 μM de $GdCl_3$ en el medio de cultivo para inhibir casi por completo el crecimiento de la raíz, lo que deja disponibles más de 100 μM KH_2PO_4 (cantidad suficiente para ver un crecimiento normal de *A. thaliana*), tanto en plantas normales como en las mutantes *lpi1-3* y *lpr1-1 lpr2-1*. Por lo tanto los lantánidos, y en particular el Gd, parecen interferir con algún otro proceso además de precipitar el Pi. El efecto de los lantánidos como bloqueadores de canales de calcio está ampliamente estudiado y reportado en la literatura (Evans, 1990), no solo para *Arabidopsis* sino para otras plantas (Tyler, 2004; El-Ramady 2010a,b). Para comprobar la hipótesis de que los lantánidos (Ln) pudieran estar interfiriendo con la homeostasis de Ca^{2+} se realizaron estudios de competencia entre $GdCl_3$ (150 μM) y

LaCl₃ (250 μM) con concentraciones crecientes de CaCl₂. Aunque el calcio no restablece el crecimiento de la raíz a los niveles en que lo hace el Pi, si aminora los efectos de los lantánidos, lo que sugiere que el Ca²⁺ participa en la señalización en respuesta a la deficiencia de Pi. Lo anterior también explica porque es más activo el Gd que el La. Los lantánidos son bloqueadores de canales de calcio debido que su radio iónico efectivo es similar al del calcio, por lo que pueden ocupar su lugar en los dominio de unión de los canales. Las características de los Ln son similares; así el radio iónico del Gd³⁺ es flexible (Evans, 1990), sustituyendo al Ca²⁺ en sus dominios de unión de manera más eficiente de lo que lo hace el La³⁺. Por lo tanto, el efecto del Gd³⁺ en la arquitectura de la raíz, probablemente se debe tanto a la precipitación del Pi como al bloqueo de canales de Ca²⁺, interfiriendo con la función de este segundo mensajero sobre sus blancos celulares.

En el medio MS 0.2X el Al se presenta como Al³⁺ solo en condiciones de pH ácido (4.0), mientras que en neutras (pH 7.0) forma principalmente hidróxidos (Kinraide, 1997). Independientemente de que analizamos tanto condiciones de pH ácido o básico, la concentración de Pi soluble en el medio es aparentemente suficiente para mantener un crecimiento normal de la raíz, por lo que el efecto inhibitorio del Al sobre el crecimiento de la raíz primaria parece depender de eventos de señalización en los que participan los genes *LPI* y *LPR*.

Los tres cationes evaluados indujeron la expresión de genes reporteros de respuesta a deficiencia de fosfato de manera dosis dependiente, incluyendo los transportadores de P *AtPT1:GUS* y *AtPT2:GUS* (Karthikeyan *et al.*, 2006) y la sintasa de galactolípidos *AtMGD2:GUS* (Kobayashi *et al.*, 2006) (Fig. 3c). La expresión de estos genes puede ser el resultado tanto de una carencia de Pi soluble dentro de la planta, así como de la posible participación del Ca²⁺ en la ruta que modula la expresión de dichos genes. Por otro lado el Al promovió la expresión ectópica de *AtPT2:GUS*, pero con un patrón de expresión diferente al observado en condiciones de deficiencia de Pi. Así, probablemente el Al disminuye la captación y/o translocación de Pi, al margen de su concentración en el medio.

La deficiencia de Pi promueve la formación de raíces laterales a través de una ruta auxínica modulada por la familia de receptores TIR1/ AFB1-5, así como por los

factores transcripcionales ARF7 ARF19 (Pérez-Torres *et al.*, 2008). Los lantánidos, al precipitar el Pi dejándolo inaccesible para la nutrición vegetal, promueven la formación de raíces laterales a través de la misma vía. Así, la triple mutante *tir1-1afb2-1afb3-1* y la doble mutante *arf7-1arf19-1* son resistentes a la formación de raíces laterales tanto con La^{3+} como con Gd^{3+} . Dichas mutantes también son insensibles a la formación de raíces laterales en presencia de Al, pero la doble mutante *arf7-1arf19-1* también es resistente a la reducción en la longitud de su raíz primaria y a la desestructuración del meristemo (Fig. 3b). Es importante recordar que los datos de especiación con el programa GEOCHEM.EZ mostraron que el Al a pH 7.0 no precipita al Pi, lo que confirma que la respuesta a Al y la deficiencia de Pi solo comparten mecanismos de señalización, aunque no son exactamente los mismos. Esta última conclusión se refuerza con las tinciones con hematoxilina (Spence, 2001), debido a que la doble mutante *arf7arf19* une el Al y secreta mucílago de manera similar a lo observado en plantas silvestres, lo que indica que dicha mutante une con la misma afinidad el Al que la planta silvestre. Por lo tanto, los factores transcripcionales ARF7 y ARF19 son reguladores negativos de la elongación de la raíz primaria en respuesta al aluminio (Fig. 3a).

Los resultados del presente estudio muestran que los mecanismos de respuesta a deficiencia de fósforo y ciertos cationes trivalentes como los lantánidos y el aluminio comparten vías de señalización mediadas por los genes *LPI* y *LPR*. En el caso de los lantánidos, se evidenció que éstos precipitan el Pi, aunque también parecen actuar como bloqueadores de canales de calcio. En el caso del Al, se propone la existencia de mecanismos de señalización compartidos con la deficiencia de P, que se traducen en un cambio en la respuesta a auxinas.

IX. REFERENCIAS

- Abel, S, Ticconi CA, De la Torre CA** (2002) Phosphate sensing in higher plants. *Physiol Plant* 115:1-8.
- Abelson PH** (1999) A potential phosphate crisis. *Science* 283: 2015-2020.
- Alex P, Suri AK, Gupta CK** (1998) Processing of xenotime concentrate. *Hydrometallurgy* 50: 331-338.
- Al-Ghazi Y, Muller B, Pinloche S, Tranbarger TG, Nacry P, Rossignol M, Tardieu F, Doumas P** (2003) Temporal responses of *Arabidopsis* root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signaling. *Plant Cell Environ* 26: 1053-1066.
- Amann BT, Mulqueen P, Horrocks WD** (1992) A continuous spectrophotometric assay for the activation of plant NAD kinase by calmodulin, calcium(II) and europium(III) ions. *J Biochem Biophys Meth* 25: 207-217.
- Amtmann A, Hammond JP, Armengaud P, White PJ** (2006) Nutrient sensing and signaling in plants: potassium and phosphorus. *Adv Bot Res* 43: 209-257.
- Andersson MX, Larsson KE, Tjellstrom H, Lijenberg C, Sandelius AS** (2005) The plasma membrane and the tonoplast as major targets for phospholipid-to-glycolipid replacement and stimulation of phospholipases in the plasma membrane. *J Biol Chem* 280: 27578-27586.
- Andersson MX, Stridh MH, Larsson KE, Lijenberg C, Sandelius AS** (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett* 537: 128-132.
- Anon J** (1998) Rare earth fertilizer production. En: McCallum IRW, Geschneider KA, Calhoun J (eds) *Rare-earth information center news XXXIII*. Rare-Earth Information Center: Ames, Beijing, IA: 1.
- Aung K, Lin S-I, Wu C-C, Huang Y-T, Su C-I, Chiou T-J** (2006) *pho2*, a phosphate over-accumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol* 141: 1000-1011.

- Bakou A, Buser C, Dandulakis G, Brudvig G, Ghanotakis DF** (1992) Calcium binding sites of photosystem II as probed by lanthanides. *Biochim Biophys Acta* 1099: 131-136.
- Bakou A, Ghanotakis DF** (1993) Substitution of lanthanides at the calcium site(s) in Photosystem II affects electron transport from tyrosine Z to P680 positive. *Biochem Biophys Acta* 1141: 303-308.
- Bari R, Pant B, Stitt M, Scheible W-R** (2006) PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol* 141: 988-999.
- Bariola PA, Howard C, Taylor C, Verburg M, Jaglan V, Green P** (1994) The Arabidopsis ribonuclease gene RNS1 is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J* 6: 673-685.
- Bar-Yosef O** (1991) Root excretions and their environmental effects. Influence of availability of phosphorus. En: Waisel Y, Eshel A (eds) *Plant roots: the hidden half*. Marcel Dekker, New York, U.S.A. 944: 529-557.
- Bates TR, Lynch JP** (2001) Root hairs confer a competitive advantage under low phosphorus availability. *Plant Soil* 236: 243-250.
- Bauluz B, Mayayo MJ, Fernandez-Nieto C, López JMG** (2000) Geochemistry of Precambrian and Paleozoic siliciclastic rocks from the Iberian Range (NE Spain): implications for source-area weathering, sorting, provenance, and tectonic setting. *Chem Geol* 168: 135-150.
- Benning C, Ohta H** (2005) Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J Biol Chem* 280: 2397-2400
- Benton JJ** (2012) Plant nutrition and soil fertility manual. CRC press, second edition, New York.
- Bielecki RL** (1973) Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu Rev Plant Physiol* 24: 225-252.
- Borch K, Bouma TJ, Lynch JP, Brown KM** (1999) Ethylene: a regulator of root architectural responses to soil phosphorus availability. *Plant Cell Environ* 22: 425-431.

- Bozzo GG, Dunn EL, Plaxton WC** (2006) Differential synthesis of phosphate-starvation inducible purple acid phosphatase isozymes in tomato (*Lycopersicon esculentum*) suspension cells and seedlings. *Plant Cell Environ* 29: 303-313.
- Bradsher K** (2011) Taking a risk for rare earths. The New York Times. http://www.nytimes.com/2011/03/09/business/energy-environment/09rare.html?_r=1&ref=science. Accessed 08 March 2011.
- Braun JJ, Pagel M, Herbillon A, Rosi C** (1993) Mobilization and redistribution of REEs and thorium in a syenitic lateritic profile – a mass-balance study. *Cosmochim Acta* 57: 4419-4434.
- Brown PH, Rathjien AH, Graham RD, Tribe DE** (1990) Rare earth elements in biological systems. En: Geschneider KA, Eyring LJ (eds) *Handbook on the physics and chemistry of rare earths, vol 13*. Elsevier Science Publisher, New York. 474: 423-453.
- Bumb BL, Baanante CA** (1996) The role of fertilizer in sustaining food security and protecting the environment to 2020. En: International Food policy Research Institute, IFPRI (ed) *2020 Vision discussion papers 17*. Washington, DC.
- Burda K, Strzalka K, Schmid GH** (1995) Europium- and dysprosium-ions as probes for the study of calcium binding sites in photosystem II. *Z Naturforsch C* 50: 220-230.
- Byrnes BH, Bumb BL** (1998) Population growth, food production and nutrient requirements. En: Rengel Z (ed) *Nutrient use in crop production*. The Haworth Press, New York, 288: 1-27.
- Cakmak I** (2002) Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable ways. *Plant Soil* 247: 3-24.
- Chacón-López A, Ibarra-Laclette E, Sánchez-Calderón L, Gutiérrez-Alanís D, Herrera-Estrella L** (2011) Global expression pattern comparison between *low phosphorus insensitive 4* and WT Arabidopsis reveals an important role of reactive oxygen species and jasmonic acid in the root tip response to phosphate starvation. *Plant Signal Behav* 6: 382-392.
- Chen WJ, Gu YH, Zhao GW, Tao Y, Luo JP, Hu TD** (2000) Effects of rare earth ions on activity of RuBPCase in tobacco. *Plant Sci* 152: 145-151.

- Chen Y, Wang Y, Wu W** (2008) Membrane transporters for nitrogen, phosphate and potassium uptake in plants. *J Integr Plant Biol* 50: 835-848.
- Chiou TJ** (2007) The role of microRNAs in sensing nutrient stress. *Plant Cell Environ* 30: 323-332.
- Chiou T-J, Aung K, Lin S-I, Wu C-C, Chiang S-F, Su C-I** (2006) Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 412-421.
- Chu H, Zhu J, Lin X, Yin R, Xie Z, Cao Z, Fujii T** (2007) Short-term decomposition of ¹⁴C-labelled glucose in a fluvo-aquic soil as affected by lanthanum amendment. *Biol Fertil Soils* 43: 811-814.
- Chu H, Zhu JG, Xie ZB, Zhang HY, Cao ZH, Li ZG** (2003) Effects of lanthanum on dehydrogenase activity and carbon dioxide evolution in a Haplic Acrisol. *Aust J Soil Res* 41: 731-739.
- Chu HY, Zhu JG, Xie ZB, Li ZG, Cao ZH, Zeng Q** (2001) Effects of lanthanum on soil microbial biomass carbon and nitrogen in red soil. *J Rare Earths* 19: 63-66.
- Cisse L, Mrabet T** (2004) World phosphate production: overview and prospects. *Phos Res Bull* 15: 21-25.
- Cruz-Ramírez A, Oropeza-Aburto A, Razo-Hernandez F, Ramirez-Chavez E, Herrera-Estrella L** (2006) Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplastidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 103: 6765-6770.
- 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.
- Delhaize E, Randall PJ** (1995) Characterization of a phosphate-accumulator mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 107: 207-213.
- Diatloff E, Smith FW, Asher CJ** (1995) Rare-earth elements and plant growth. 2. Responses of corn and mungbean to low concentrations of lanthanum in dilute, continuously flowing nutrient solutions. *J Plant Nutr* 18: 1977-1989.
- Dinkelaker B, Hengeler C, Marschner H** (2005) distribution and function of proteoid roots and other root clusters. *Bot Acta* 108: 183-200.

- Doerner P** (2008) Phosphate starvation signaling: a threesome controls systemic Pi homeostasis. *Curr Opin Plant Biol* 11:536-540.
- Dolan L** (2001) Plant development: the benefits of a change of scene. *Curr Biol* 17: 702-704.
- Dörmann P, Benning C** (2002) Galactolipids rule in seed plants. *Trends Plant Sci* 7: 112-118.
- Duan K, Yi K, Dang Lei, Huang H, Wu W, Ping Wu P** (2008) Characterization of a sub-family of Arabidopsis genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. *Plant J* 58: 965-975.
- El-Ramady H** (2010a) Ecotoxicology of REEs. VDM Verlag Dr. Müller, Lexinton.
- El-Ramady H** (2010b) Ecotoxicology of rare earth elements. Ecotoxicology of rare earth elements within soil and plant environments. VDM Verlag Dr. Müller, Lexinton.
- Essigmann B, Güler S, Narang RA, Linke D, Benning C** (1998) Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of SQD1, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1950-1955.
- Eswaran H, Reich P, Beinroth F** (1997) Global distribution of soils with acidity. En: Moniz AC, Furnali AMC, Schaffert RE, Ageria NKF, Rosolem CA, Cantarella H (eds) *Plant Soil Interactions at low pH: sustainable agriculture and forestry production : proceedings of the fourth International Symposium on Plant-Soil*. Brazilian Society of Soil Science, Campinas, Brazil. 314: 9-24.
- Evans CH** (1990) Biochemistry of the lanthanides. Plenum Press, New York.
- FAO** (2000) Fertilizer requirements in 2015 and 2020. FAO, Rome.
- Foster HJ** (1998) The chemical composition of REE-Y-Th-U-rich accessory minerals in peraluminous granites of Erzgebirge-Fichtelgebirge region, Germany. Part II: xenotime. *Am Mineral* 83: 1302-1315.
- Franco-Zorrilla JM, Gonzalez E, Bustos R, Linhares F, Leyva A, Paz-Ares J** (2004) The transcriptional control of plant responses to phosphate limitations. *J Exp Bot* 55: 285-293.

- Franco-Zorrilla JM, Martin AC, Leyva A, Paz-Ares J** (2002) Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant J* 32: 353-360.
- Franco-Zorrilla JM, Martin AC, Leyva A, Paz-Ares J** (2005) Interaction between phosphate-starvation, sugar, and cytokinin signaling in *Arabidopsis* and the roles of cytokinin receptors CRE1/AHK4 and AHK3. *Plant Physiol* 138: 847-857.
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J** (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* 39: 1033-1037.
- Fujii H, Chiou TJ, Lin S, Aung K, Zhu JK** (2005) A miRNA involved in phosphate-starvation response in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 15: 2038-2043.
- Gahoonia TS, Asmar F, Giese H, Nielsen GG, Nielsen NE** (2000) Root released organic acids and phosphorus uptake of two barley cultivars in laboratory and field experiments. *Eur J Agron* 12: 281-289.
- Gaude N, Nakamura Y, Scheible W, Ohta H, Dörmann P** (2008) Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of *Arabidopsis*. *Plant J* 56: 28-39.
- Ghanotakis DF, Babcock GT, Yocum CF** (1985) Structure of oxygen-evolving complex of photosystem II Calcium and lanthanum compete for sites on the oxidizing side of photosystem II which control the binding of water-soluble polypeptides and regulate the activity of the manganese complex. *Biochim Biophys Acta* 809: 173-180.
- Gilbert GA, Knight JD, Vance CP, Allan DL** (2000) Proteoid root development of phosphorus deficient lupin is mimicked by auxin and phosphonate. *Ann Bot* 85: 921-928.
- Goldstein AH** (1992) Phosphate starvation inducible enzymes and proteins in higher plants. En: Wray JL (ed) *Inducible plant proteins: their biochemistry and molecular biology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 325: 25-44.
- Gorbunov AV, Frontasyeva MV, Gundorina SF, Onischenko TL, Maksjuta BB, Pal CS** (1992) Effects of agricultural use of phosphogypsum on trace elements in soils and vegetation. *Sci Total Environ* 122: 337-346.

- Greenwood NN, Earnshaw A** (1984) Chemistry of the elements. Pergamon Press, Oxford.
- Grossman AR, Gonzalez-Ballesteros D, Shibagaki N, Pootakham W, Moseley J** (2010) Responses to macronutrient deprivation. En: Pareek A, Sopory SK, Bohnert HJ, Govindjee HJ (eds) *Abiotic stress adaptation in plants. Physiological, molecular and genomic foundation*. Springer, The Netherlands, 526: 307-348.
- Guo B, Jin Y, Wussler C, Blancaflor EB, Motes CM, Versaw WK** (2008) Functional analysis of the *Arabidopsis* PHT4 family of intracellular phosphate transporters. *New Phytol* 177: 889-898.
- Hamburger D, Rezzonico E, MacDonald-Comber P, Etéot J, Somerville C, Poirier Y** (2002) Identification and characterization of *Arabidopsis* PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* 14: 889-902.
- Hammond JP, Bennett MJ, Bowen HC, Broadley MR, Eastwood DC, May ST, Rahn C, Swarup R, Woolaway KE, White PJ** (2003) Changes in gene expression in *Arabidopsis* shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants. *Plant Physiol* 132: 578-596.
- Hammond JP, Broadley MR, Craigon DJ, Higgins J, Emmerson Z, Townsed H, White PJ, May ST** (2005) Using genomic DNA-based probe-selection to improve the sensitivity of high-density oligonucleotide arrays when applied to heterologous species. *Plant Met* 1: 10.
- Hammond JP, White PJ** (2008) Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *J Exp Bot* 59: 93-109
- Härtel H, Dörmann P, Benning C** (2000) DGD1-independent biosynthesis of extraplastidic galactolipids after phosphate deprivation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10649-10654.
- He YW, Loh CS** (2000) Cerium and lanthanum promote floral initiation and reproductive growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 159: 117-124.
- Hinsinger P** (2001) Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* 237: 173-195.

- Hoisington D, Khairallah M, Timothy R, Ribaut J-M, Skovmand B, Taba S, Warburton M** (1999) Plant genetic resources: What can they contribute toward increased crop productivity? *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 5937-5943.
- Holford ICR** (1997) Soil phosphorus: its measurement and its uptake by plants. *Aust J Soil Res* 35: 227-239.
- Hong FS, Wei ZG, Tao Y, Wan SK, Yang YT, Cao XD, Zhao GW** (1999) Distribution of rare earth elements and structure characterization of chlorophyll-lanthanum in natural plant fern *Dicranopteris dichotoma*. *Acta Bot Sin* 41: 851-854.
- Hong FS, Wei ZG, Zhao GW** (2001) Studies of bound form on rare earths in a natural plant fern *Dicranopteris dichotoma* by spectroscopy. *Chem J Chinese U* 22: 1790-1794.
- Hong FS, Wang L, Meng XX, Wei Z, Zhao GW** (2002) The effect of cerium (III) on the chlorophyll formation in spinach. *Biol Trace Elem Res* 89: 263-276.
- Horst WJ, Kollmeiner M, Schmohl N, Sivaguru M, Wang Y, Felle HH, Hedrich R, Schöder W, Stab A** (2007) En: Sattelmacher B, Horst WJ (eds) *The apoplaste of higher plants: compartment of storage, transport and reactions*. Springer-Verlag, Dordrecht, 457: 49-66.
- Hu X, Ding ZH, Chen YJ, Wang XR, Dai LM** (2002) Bioaccumulation of lanthanum and cerium and their effects on the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *Chemosphere* 48: 621-629.
- Jain A, Poling MD, Karthikeyan AS, Blakeslee JJ, Peer WA, Titapiwatanakun B, Murphy AS, Raghothama KG** (2007) Differential effects of sucrose and auxin on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144: 232-247.
- Jescheke WD, Peuke AD, Pate JS, Hartung W** (1997) Transport, synthesis and catabolism of abscisic acid (ABA) in intact plants of castor bean (*Ricinus communis* L.) under phosphate deficiency and moderate salinity. *J Exp Bot* 48: 1737-1747.
- Johannes E, Brosnan JM, Sanders D** (1992) Calcium channels in the vacuolar membrane of plants – multiple pathways for intracellular calcium mobilization. *Philos T Roy Soc B* 338: 105-112.

- Jones DL** (1998) Organic acids in the rhizosphere – a critical review. *Plant Soil* 205: 25-44.
- Jones DL, Darrah PR** (1994) Role of root derived organic-acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. *Plant Soil* 166: 247-257.
- Jouhet J, Maréchal E, Baldan B, Bligny R, Joyard J, Block MA** (2004) Phosphate deprivation induces transfer of DGDG galactolipid from chloroplast to mitochondria. *J Cell Biol* 167: 863-874.
- Kai M, Takazumi K, Adachi H, Wasaki J, Shinano T, Osaki M** (2002) Cloning and characterization of four phosphate transporter cDNAs in tobacco. *Plant Sci* 163: 837-846.
- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Jain A, Held AM, Carpita NC, Raghothama KG** (2006) Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in *Arabidopsis*. *Planta* 225: 907-918.
- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, Panio DUM, Damsz B, Raghothama KG** (2002) Regulated expression of *Arabidopsis* transporters. *Plant Physiol* 130: 221-233.
- Karukstis KK, Gruber SM** (1986) Effect of trivalent lanthanide cations on chlorophyll fluorescence and thylakoid membrane staking. *Biochem Biophys Acta* 851: 322-326.
- Kataoka T, Stekelenburg A, Nakanishi TM, Delhaizer E, Ryan PR** (2002) Several lanthanides activate malate efflux from roots of aluminum-tolerant wheat. *Plant Cell Environ* 25: 453-460.
- Kinraide TB** (1991) Identity of the rhizotoxic aluminum species. *Plant Soil* 134: 167-178.
- Kinraide TB** (1997) Reconsidering the rhizotoxicity of hydroxyl, sulphate, and fluoride complexes of aluminum. *J Exp Bot* 48: 1115-1124.
- Kirk GJ, Santos E, Findenegg GR** (1999) Phosphate solubilization by organic anion secretion from rice (*Oryza sativa* L.) growing in aerobic soil. *Plant Soil* 211: 11-18.
- Kirkby EA, Johnston AE** (2008) Soil and fertilizer phosphorus in relation to crop nutrition. En: White PJH (ed) *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions*. Springer, Netherlands, 298: 177-224.

- Klusener B, Boheim G, Liss H, Engelberth J, Weiler EW** (1995) Gadolinium sensitive, voltage-dependent calcium-release channels in the endoplasmatic reticulum of a higher-plant mechanoreceptor organ. *Embo J* 14: 2708-2714.
- Kobayashi K, Awai K, Nakamura M, Nagatani A, Masuda T, Ohta H** (2009) Type-B monogalactosyldiacylglycerol synthases are involved in phosphate starvation-induced lipid remodeling, and are crucial for low-phosphate adaptation. *Plant J* 57: 322-331.
- Kobayashi K, Masuda T, Takamiya K, Ohta H** (2006) Membrane lipid alteration during phosphate starvation is regulated by phosphate signaling and auxin/cytokinin cross-talk. *Plant J* 47: 238-248.
- Kochian LV, Hoekenga OA, Piñeiros MA** (2004) How do plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 55: 459-493.
- Köck M, Löffler A, Abel S, Glund K** (1995) cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Mol Biol* 27: 477-485.
- Köck M, Theierl K, Stenzel I, Glund K** (1998) Extracellular administration of phosphate sequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. *Planta* 204: 404-407.
- Lan M, Comerford NB, Fox TR** (1995) Organic anions effect on phosphorus release from spodic horizons. *Soil Sci Soc Am J* 59: 1745-1749.
- Lenburg M, O'Shea E** (1996) Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem Sci* 21: 383-387.
- Lewis BD, Spalding EP** (1998) Nonselective block by La^{3+} of *Arabidopsis* ion channels involved in signal transduction. *J Membrane Biol* 162: 81-90.
- Li MY, Welti R, Wang XM** (2006) Quantitative profiling of *Arabidopsis* polar glycerolipids in response to phosphorus starvation. Roles of phospholipases Df1 and Df2 in phosphatidylcholine hydrolysis and digalactosyldiacylglycerol accumulation in phosphorus-starved plants. *Plant Physiol* 142: 750-761.
- Liao H, Wan H, Shaff J, Wang X, Yan X, Kochian LV** (2006) Phosphorus and aluminum interactions in soybean in relation to aluminum tolerance. Exudation of

- specific organic acids from different regions of the interact root system. *Plant Physiol* 141: 674-684.
- Lin S-I, Chiang S-F, Lin W-Y, Chen J-W, Tseng C-Y, Wu P-C, Chiou T-J** (2008) Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol* 147: 732-746.
- Linkohr BI, Williamson LC, Fitter AH, Leyser O** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J* 29: 751-746.
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6: 280-287.
- López-Bucio J, de la Vega O, Guevara-Garcia A, Herrera-Estrella L** (2000) Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat Biotechnol* 18: 450-453.
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Pérez-Torres A, Rampey RA, Bartel B, Herrera-Estrella L** (2005) An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress-induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin pericycle cell activation. *Plant Physiol* 137: 681-691.
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Caldrón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol* 129: 244-256.
- Lu Y-P, Zhen R-G, Rea PA** (1997) *AtPT4*: a fourth member of the *Arabidopsis* phosphate transporter gene family. *Plant Physiol* 114: 747.
- Lynch J, van Beem J** (1993) Growth and architecture of seedling roots of common bean genotypes. *Crop Sci* 33: 1253-1257.
- Ma JF** (2007) Syndrome of aluminum toxicity and diversity of aluminum resistance in higher plants. *Inter Rev Cytol* 264: 225-252.
- Ma Z, Baskin TI, Brown KM, Lynch JP** (2003) Regulation of root elongation under phosphorus stress involves changes in ethylene responsiveness. *Plant Physiol* 131: 1381-1390.

- Ma Z, Bielenberg DG, Brown KM, Lynch JP** (2001) Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 24: 459-467.
- Manske G, Ortíz-Monasterio J, Van Grinkel M, González R, Rajaram S, Molina E, Vlek P** (2000) Traits associated with improved P-uptake efficiency in CIMMYT's semidwarf spring bread wheat grown on an acid Andisol in Mexico. *Plant Soil* 221: 189-204.
- Marscher H** (2011) Marscher' mineral nutrition in higher plants, Academic Press, third edition, London.
- Masau M, Cerny P, Chapman R** (2000) Dysprosian xenotime-(Y) from the Annie Claim no. 3 granitic pegmatite, southeastern Manitoba, Canada: evidence of the tetrad effect? *Can Mineral* 38: 899-905.
- Matín AC, del Pozo J, Iglesias J, Rubio V, Solano R, de la Peña A, Leyva A, Paz-Ares J** (2000) Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J* 24: 559-567.
- Mengel K** (1997) Agronomic measures for better utilization of soil and fertilizer phosphates. *Eur. J. Agron.* 7: 221-233.
- Meyer JA, Rodrigues DM** (2011) Rare earth elements in the U.S. and China (Earth science in the 21st century). Nova Sci Pub Inc., New Delhi.
- Milles JD, Hind G** (1978) Use of the fluorescent lanthanide terbium ion as a probe for cation binding sites associated with isolated chloroplast thylakoid membranes. *Photochem Photobiol* 28: 67-74.
- 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 M-C** (2005) A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11934-11939.
- Mitsukawa N, Okumura S, Shirano Y, Sato S, Kato T, Harashima S, Shibata D** (1997a) Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. *Proc Nat Acad Sci USA* 94: 7098-7102.

- Mitsukawa N, Okumura S, Shibata D** (1997b) High-affinity phosphate transporter genes of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10519-10523.
- Miura K, Rus A, Sharkhuu A, Yokoi S, Karthikeyan AS, Raghothama KG, Baek D, Koo YD, Jin JB, Bressan RA, Yun D-J, Hasegawa PM** (2005) The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 11934-11939
- Morcunde R, Bari R, Gibon Y, Zheng W, Pant BD, Blasing O, Usadel B, Czechowski T, Udvardi MK, Stitt M, Scheible W** (2007) Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus. *Plant Cell Environ* 30: 85-112.
- Morishima I, Kurono M, Shiro Y** (1986) Presence of endogenous calcium ion in horseradish peroxidase. Elucidation of metal-binding site by substitutions of divalent and lanthanide ions for calcium and use of metal-induced NMR proton and calcium-113 resonances. *J Biol Chem* 261: 9391-9399.
- Muchhal US, Pardo JM, Raghothama KG** (1996) Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10519-10523.
- Mudge SR, Rea 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 R, Morant M, Jarmer H, Nisson L, Nielsen TH** (2007) Genome-wide analysis of the *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiol* 143: 156-171.
- Nacry P, Canivenc G, Muller B, Azmi A, Van Onckelen H, Rossignol M, Dumas P** (2005) A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 2061-2074.
- Nagy R, Vasconcelos MJ, Zhao S, McElver J, Bruce W, Amrhein N** (2006) Differential regulation of five Pht1 phosphate transporters from maize (*Zea mays* L.). *Plant Biol* 8:186-197.
- Navarro G** (2003) Química agrícola. Mundi-Prensa. Segunda edición. Madrid.

- Oberson A, Friesen DK, Rao IM, Bühler S, Frossard E** (2001) Phosphorus transformations in an oxisol under contrasting land-use systems: the role of the soil microbial biomass. *Plant Soil* 237: 197-210.
- Okumura S, Mitsukawa N, Shirano Y, Shibata D** (1998) Phosphate transporter gene family of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res* 5: 261-269.
- Olmez I, Sholkovitz ER, Hermann D, Eganhouse RP** (1991) Rare-earth elements in sediments off southern California – a new anthropogenic indicator. *Environ Sci Technol* 25: 310-316.
- Ono T** (2000) Effects of lanthanide substitution at Ca²⁺-site on the properties of the oxygen evolving center of Photosystem II. *J Inorg Biochem* 82: 85-91.
- Otani T, Ae N, Tanaka H** (1996) Uptake mechanisms of crops grown in soils with low P status. II. Significance of organic acids in root exudates of pigeon pea. *Soil Sci Plant Nutr* 42: 553-560.
- Paciorek T, Friml J** (2006) Auxin signaling. *J Cell Sci* 119: 1199-1202.
- Pang X, Li D, Peng A** (2002) Application of rare earth elements in the agriculture of China and its environmental behavior in soil. *Environ Sci Pollut Res Int* 9: 143-320.
- Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Wolf-Rüdiger S** (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J* 53: 731-738.
- Paszkowski U, Kroken S, Roux C, Briggs SP** (2002) Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13324-13329.
- Paterson E, Goodman BA, Farmer VC** (1991) The chemistry of aluminum, iron and manganese oxides in acid soils. En: Ulrich B, Sumner ME (Eds.). *Soil acidity*. Springer-Verlag. Dordrecht, 224: 97-120.
- Pérez-Torres C, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Estelle M, Herrera-Estrella L** (2008) Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* 20: 3258-3272.
- Pierik R, Sasidharan R, Voeselek L** (2007) Growth control by ethylene: adjusting phenotypes to the environment. *J Plant Growth Regul* 26: 188-200.

- Plaxton WC** (2004) Plant response to stress: biochemical adaptations to phosphate deficiency. En: Goodman RM (ed) *Encyclopedia of plant and crop science*. Taylor & Francis, UK, 1360: 976-980.
- Plaxton WC, Tran HT** (2011) Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiol* 156: 1006-1015.
- Poirier Y, Thoma S, Somerville C, Schiefelbein J** (1991) A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol* 97: 1087-1093.
- Porta J, López-Acevedo M, Roquero C** (2003) Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Mundi-Prensa. Tercera edición. Madrid.
- Raghothama KG** (1999) Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665-693.
- Rausch C, Bucher M** (2002) Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216: 23-37.
- Rosegrant MW, Cline S** (2003) Global food security: Challenge and policies. *Science* 302: 1917-1918.
- Rosegrant MW, Paisner MS, Meijer S, Witcover J** (2001) 2020 Global food outlook; trends, alternatives, and choices. A 2020 vision for food, agriculture, and the environment initiative. International Food Policy Research Institute, Washington, DC, 18.
- Rosegrant MW, Ringler C, Msangi S, Sulser TB, Zhu T, Cline SA** (2008) International model for policy analysis of agricultural commodities and trade (IMPACT): model description. International Food Policy Research Institute, Washington, DC, 42.
- Rubio V, Linhares F, Solano R, Martín AC, Iglesias J, Leyva A, Javier P-A** (2001) A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* 15: 2122-2133.
- Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhroska R, Beekman T, Friml J, Benkova E** (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* 19: 2197-2212.
- Sabourdy G, Sagon JP, Pastier P** (1997) The chemical composition of xenotime from the Limousin region, Massif-Central, France. *Can Mineral* 35: 937-946.

- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Cruz-Ramírez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovsky JG, Herrera-Estrella L** (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46:174-184.
- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacon-López A, Gutierrez-Ortega A, Hernandez-Abreu E, Herrera-Estrella L** (2006) Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency. *Plant Physiol* 140: 879-889.
- Sanda S, Leustek T, Theisen MJ, Garavito RM, Benning C** (2001) Recombinant *Arabidopsis* SQD1 converts UDP-glucose and sulfite to the sulfolipid head group precursor UDP-sulfoquinovose in vitro. *J Biol Chem* 276: 3941-3946.
- Schachtman DP, Reid RJ, Ayling SM** (1998) Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol* 116: 447-453.
- Scherr SJ** (1999) Soil degradation. A threat to developing-country food security by 2020? Food, agriculture, and the environment discussion paper 27. International Food Policy Research Institute, Washington, DC.
- Schunmann PH, Richardson AE, Smith FW, Delhaize E** (2004) Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* 55: 855-865.
- Schwenke H, Wagner E** (1992) A new concept of root exudation. *Plant Cell Environ* 15: 289-299.
- Shenoy VV, Kalagudi GM** (2005) Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. *Biotechnol Adv* 23: 501-513.
- Shin H, Shin H, Chen R, Harrison M** (2006) Loss of At4 function impacts phosphate distribution between the roots and the shoots during phosphate starvation. *Plant J* 45: 712-726.
- Smith FW, Ealing PM, Dong B, Delhaize E** (1997) The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant J* 11: 83-92.
- Stals H, Inzé D** (2001) When plant cells decide to divide. *Trend Plant Sci* 6: 359-364.

- Stepanova AN, Yun J, Likhacheva AV, Alonso JM** (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* tpc.107.052068.
- Svistoonoff S, Creff a, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T** (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat Genet* 39: 792-796.
- Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beemster GTS, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ** (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19: 2186-2196.
- Syers JK, Johnston AE, Curtis D** (2008) Efficiency of soil and fertilizer phosphorus use: reconciling changing concepts of soil phosphorus behavior with agronomic information. FAO Press, Vienna.
- Tang XY, Sun YY, Wen CQ, Gan XH, Zhang ZL** (2004) Survival of *Pseudomonas fluorescens* X16 (luxAB) strains in soils accumulated with mixed rare earth elements. *J Rare Earths* 22: 904-908.
- Ticconi CA, Abel S** (2004) Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trens Plant Sci* 9: 548-555.
- Ticconi CA, Delatorre CA, Lahner B, Salt DE, Abel S** (2004) *Arabidopsis pdr2* reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development. *Plant J* 37: 801-814.
- Tiessen H** (2008) Phosphorus in the global environment. En: White PJ, Hammond JP (eds) *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions*, vol 7, Springer, Netherlands, 289: 1-7.
- Timsina J, Connor DJ** (2001) Productivity and management of rice-wheat cropping systems: issues and challenges. *Field Crop Res* 69: 93-132.
- Todorovsky DS, Minkova NL, Bakalova DP** (1997) Effect of the application of superphosphate on rare earths' content in the soil. *Sci Total Environ* 203: 13-16.
- Tyler G** (2004) Rare earth elements in soil and plant system – A review. *Plant Soil* 267: 191-206.
- Ulker B, Somssich IE** (2004) WRKY transcription factors: From DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol* 7: 491-498.

- Valdés-López O, Hernández G** (2008) Transcriptional regulation and signaling in phosphorus starvation: what about legumes? *J Integr Plant Biol* 10: 1213-1222.
- Vance CP, Uhde-Stone C, Allan DL** (2003) Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytol* 157: 423-447.
- Versaw WK, Harrison MJ** (2002) A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *Plant Cell* 14: 1751-1766.
- Volokh AA, Gorbunov AV, Gundorina SF, Revich BA, Frontasyeva MV, Pal CS** (1990) Phosphorus fertilizer production as a source of rare-earth elements pollution of the environment. *Sci Total Environ* 95: 141-148.
- von Uexküll HR, Mutert E** (1995) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* 171, 1-15.
- Wang X, Yi K, Tao Y, Wang F, Wu F, Jiang D, Chen X, Zhu L, Wu P** (2006) Cytokinin represses phosphate-starvation response through increasing of intracellular phosphate level. *Plant Cell Environ* 29: 1924-1935.
- Wang Z, Wang C, Lu P, Zhu W** (2001) Concentrations and flux of rare earth elements in a semifield plot as influence by their agricultural application. *Biol Trace Elem Res.* 84: 213-226.
- Wei YZ, Zhou XB** (2000) Effect of neodymium on physiological activities in oilseed rape during calcium starvation. *J Environ Qual* 30: 37-45.
- White PJ, Hammond JP** (2008) Phosphorus nutrition of terrestrial plant. In White PJ, Hammond JP (eds) *The ecophysiology of plant-phosphorus interactions, vol 7*, Springer, Netherlands, 289: 51-81.
- Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH, Layser HMO** (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 875-882.
- Wu P, Ma L, Hou X, Wang M, Wu Y, Liu F, Deng XW** (2003) Phosphate starvation triggers distinct alterations of genome expression in *Arabidopsis* roots and leaves. *Plant Physiol* 132: 1260-1271.

- Xiong B** (1995) Application of the rare earths in Chinese agriculture and their perspective development. En: Academy of Technology, Science and Engineering (ed) *Proceedings of rare earths in agriculture seminar, Australia*. Academy of Technol Sci and Eng Prees, Victoria. 300: 5-9.
- Xu D, Liu GS, Xu H, Liu WP** (2004) Effects of lanthanum and cerium on acid phosphatase activities in two soils. *J Rare Earths* 22: 725-728.
- Xu X, Wang Z** (2001) Effects of lanthanum and mixtures on rare earths on ammonium oxidation and mineralization of nitrogen in soil. *Eur J Soil Sci* 52: 323-329.
- Xu XK, Zhu WZ, Wang ZJ, Jwikamp G** (2002) Distribution of rare earths and heavy metals in field-grown maize after application of rare earth-containing fertilizer. *Sci Total Environ* 293: 97-105.
- Yadav RL, Dwivedi BS, Pandey PS** (2000) Rice-wheat cropping system: assessment of sustainability under green manuring and chemical fertilizer inputs. *Field Crop Res* 65: 15-30.
- Yan J** (1999) China rare earths; the brilliant fifty years. En: China Rare-Earth Information Center: Baotou, Inner Mongolia, China (ed) *I. China rare information* 5. Beijing, China.
- Yu B, Xu C, Benning C** (2002) *Arabidopsis* disrupted in SQD2 encoding sulfolipid synthase is impaired in phosphate-limited growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5732-5737.
- Zhang F, Ma J, Cao YP** (1997) Phosphorus deficiency enhances root exudation of low molecular weight organic acids and utilization of sparingly soluble inorganic phosphates by radish (*Raphanus sativa* L.) and rape (*Brassica napus* L.) plants. *Plant Soil* 196: 261-264.
- Zhang YJ, Lynch JP, Brown KM** (2003) Ethylene and phosphorus availability have interacting yet distinct effects on root hair development. *J Exp Bot* 54: 2351-2361.
- Zhou J, Jiao FC, Wu ZC, Li Y, Wang X, He X, Zhong W, Wu P** (2008) OsPHR2 is involved in phosphate-starvation signaling and excessive phosphate accumulation in shoots of plants. *Plant Physiol* 146: 1673-1686.

- Zhu J, Lynch JP** (2004) The contribution of lateral rooting to phosphorus acquisition efficiency in maize (*Zea mays*) seedlings. *Funct Plant Biol* 31: 949-158.
- Zhu JG, Chu HY, Xie ZB, Yagi K** (2002) Effects of rare earth elements on the nitrification and ammonification in three Chinese soils. *Nutr Cycl Agroecosyst.* 63: 309-314.
- Zimmermann P, Regierer B, Kossmann J, Frossard E, Amrhein N, Bucher M** (2004) Differential synthesis of three purple acid phosphatases from potato. *Plant Biol* 6: 519-528.