



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**Programa Institucional de Doctorado en
Ciencias Biológicas**

**Caracterización de la respuesta del sistema radical de
Arabidopsis thaliana frente al estrés generado por plomo**

TESIS

Que presenta:

M. en C. RICARDO ORTIZ LUEVANO

Como requisito para obtener el título de
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directores de tesis:

DR. MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO

DR. LENIN SÁNCHEZ CALDERÓN

Morelia, Michoacán, julio de 2021



Agradecimientos

Agradezco la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por aceptarme como estudiante de la comunidad Nicolaíta, agradezco a la Facultad de Biología y al Programa de Doctorado Institucional de Ciencias Biológicas por permitirme trabajar en este programa, ser tesista y estudiante de este posgrado, así como permitirme hacer uso de sus instalaciones para el desarrollo de mi trabajo de tesis. Sin duda un gran apoyo fue la beca otorgada (331963) por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), la cual me permitió dedicar tiempo completo al trabajo en el laboratorio y en las aulas. Por lo que quiero agradecer a las autoridades correspondientes. Esta tesis se realizó con fondos provenientes del proyecto: Ciencia Básica CB-2010-01 000000000156851 “Búsqueda de componentes moleculares que participan en la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a la presencia de metales pesados”, por lo que quiero agradecer a las autoridades correspondientes por el recurso recibido, pues sin este apoyo el presente trabajo no se hubiera realizado

Agradezco a los miembros del comité tutorial Dr. Miguel Martínez Trujillo, Dr. Lenin Sánchez Calderón, Dr. José López Bucio, Dr. César Días Pérez y Dr. Eduardo Valencia Cantero por su tiempo, paciencia y consejos. Agradezco al Laboratorio de Microbiología y Genética de la Facultad de Biología y al Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, ambos laboratorios de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; también agradezco al Laboratorio de Genómica Evolutiva de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas, en los cuales pude desarrollar de manera experimental las técnicas requeridas para éste trabajo de tesis.

Agradezco a mi familia, mi papá, mi mamá y mi hermana de quien tanto he aprendido, quienes de manera incondicional me han apoyado y me han servido de ejemplo para hacer frente a los retos académicos y personales a los que me he enfrentado. A Aura, quien ha sido mi apoyo, confidente y compañera durante mi formación, gracias por todo. Agradezco a mis amigos de toda la vida: Gama, Chino, Moy, César y Toño; a mis amigos del laboratorio, Fátima, Aaron, Alex, Ángeles, Gloria, Bricia, Gustavo, Lupita, León, Kirán, Salvador, Alejandro, Javier, Ramón, Sandra, David, Renato, Natanahel, Fernando, Thalía, Denisse y Gabriel; a todos ellos por su apoyo, compañía, disposición y consejos. Agradezco a la Dra. Gloria Guerrero Manríquez por la disposición y permitirme hacer uso de los equipos de su laboratorio.

“Llegará una época en la que la investigación diligente y prolongada sacará a la luz cosas que hoy están ocultas...”

“Por lo tanto, este conocimiento solo se podrá desarrollar a lo largo de sucesivas edades; llegará el momento en el que nuestros descendientes se asombrarán de que ignoráramos cosas que para ellos son tan claras...”

“Nuestro universo sería una cosa muy limitada si no ofreciera, a cada época, algo que investigar...”

“¡La naturaleza no revela sus misterios de una sola vez y para siempre!”

Seneca, Cuestiones Naturales, Libro 7, Siglo I

Índice general

Agradecimientos	ii
Índice de Figuras	v
Índice de Tablas	vi
Listado de abreviaturas	vi
Resumen	viii
Palabras clave	viii
Abstract	ix
Key words.....	ix
1. Introducción	1
1.1 Plasticidad fenotípica	1
1.2 Plasticidad fenotípica del sistema radical	4
1.2.1 Cambios en la arquitectura del sistema radical	6
1.2.1.1 Regulación hormonal	6
1.2.1.2 Respuesta a factores abióticos del suelo	13
1.2.1.3 Respuesta a metales pesados	15
2 Antecedentes.....	18
3. Justificación	19
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivo general	22
5.1 Objetivos particulares	22
5. Materiales y métodos.....	22
5.1 Material vegetal	22
5.2 Condiciones de crecimiento	23
5.3 Análisis de la arquitectura del sistema radical	24
5.4 Análisis <i>in silico</i>	24
5.5 Análisis histológico	25
5.6 Análisis de acidificación del medio de cultivo	25
5.7 Cuantificación de fosfato en el tejido vegetal.....	26
5.8 Análisis estadístico.....	26
6. Resultados	26
6.1 Caracterización de la respuesta de <i>A. thaliana</i> en medio suplementado con Pb	26

6.1.1 El Pb modifica la ASR.....	27
6.1.2 El plomo regula negativamente la expresión de <i>AtPT2</i>	30
6.2 Cambios fisiológicos en el ápice de la raíz primaria respuesta a Pb.....	43
6.2.1 El Pi y el Pb regulan la actividad meristemática.....	43
6.2.2 Las auxinas regulan la LRP en presencia de Pb.....	45
6.2.3 El Pb evoca cambios en la distribución de citocininas.....	52
7. Discusión.....	52
7.1 El Pb induce cambios en la ASR regulados genéticamente por <i>lpi3</i> y <i>lpr1/254</i>	
7.2 El Pi y el Pb regulan la ASR.....	59
7.3 El Pb modifica la distribución de las auxinas y las citocininas.....	61
8. Conclusiones.....	63
9. Bibliografía.....	65
Anexo 1. Artículo de Investigación.....	76
Anexo 2. Artículo de Divulgación.....	94

Índice de Figuras

Figura 1. El plomo induce cambios en la arquitectura del sistema radical.....	29
Figura 2. Efecto del plomo en la ASR de algunos ecotipos de <i>A. thaliana</i>	311
Figura 3. El plomo y la carencia de fósforo inducen cambios similares en la arquitectura del sistema radical.....	32
Figura 4. La expresión de <i>AtPT2</i> es inducible por la carencia de Pi.	365
Figura 5. El plomo regula negativamente la expresión de <i>AtPT2</i>	356
Figura 6. La disminución en la longitud de la raíz primaria en respuesta a plomo es dependiente de <i>LPI3</i> y <i>LPR1/2</i>	38
Figura 7. El estrés por carencia de fósforo y por adición de plomo inducen acidificación del medio de cultivo.....	39
Figura 8. La disminución en la longitud de la raíz primaria en respuesta a plomo es dependiente del pH.....	40
Figura 9. El efecto del plomo en el sistema radical es dependiente de la concentración de fósforo en el medio de cultivo.....	42
Figura 10. El exceso de fósforo recupera la actividad meristemática.	44
Figura 11. El plomo modifica la distribución de auxinas en el ápice de la raíz.....	46
Figura 12. Las auxinas reducen el efecto del plomo en la LRP.....	48
Figura 13. El transporte polar de auxinas está relacionado con el desarrollo del SR frente a estrés por Pb.	49
Figura 14. El plomo modifica la distribución de citocininas en el ápice de la raíz..	51

Índice de Tablas

Tabla 1. Análisis <i>In silico</i> de la precipitación del plomo y el fosfato en medio MS 0.1 X	33
--	----

Listado de abreviaturas

ABA: Ácido abscísico

As: Arsénico

ASR: Arquitectura del sistema radical

BA: Benziladenina

Cd: Cadmio

Cr: Cromo

Cu: Cobre

DRL: Densidad de raíces laterales

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

Hg: Mercurio

HMs: Heavy metals

IAA: Ácido indolacético

LRP: Longitud de la raíz primaria

MES: Ácido morfolinoetanosulfónico

MPa: Metales pesados

MS: Murashige y Skoog

NAA: Ácido nafalenacético

Ni: Níquel

NPA: Ácido napftil-p-talámico

Pb: Plomo

PDPE: Programa de desarrollo postembrionario

Pi: Fosfato

QC: Centro quiescente

RS: Root system

RSA: Root system architecture

SR: Sistema radical

Zn: Zinc

Resumen

El sistema radical (SR) tiene como función principal proveer de recursos a la planta para su subsistencia. En el suelo, además de agua y nutrientes se encuentran los metales pesados (MPs) que se caracterizan por su alta toxicidad y por inducir cambios en la arquitectura del sistema radical (ASR) de las plantas. Uno de los metales pesados de mayor interés es el plomo (Pb) ya que este metal se ha acumulado en grandes cantidades en la superficie del suelo debido a las actividades antropogénicas.

En este trabajo se encontró que el Pb induce un cambio en la ASR similar al que se ha descrito en condiciones de carencia de fosfato (Pi), por lo cual comparamos ambas respuestas con la finalidad de encontrar similitudes y diferencias en la respuesta a estos factores estresantes. Encontramos que el Pb induce una disminución en la LRP donde están involucrados los genes *lpi3* y *lpr1/2*, que además son necesarios en los cambios de la ASR en carencia de Pi. También se encontró que el Pb regula negativamente la expresión de gen *AtPT2 (Pht 1;4)*, involucrado en la respuesta a carencia de Pi y con la acumulación de este macronutriente; además, el Pb regula negativamente la expresión de genes relacionados con el mantenimiento del meristemo, como son *WOX5*, *PIN1* y *PIN2*, lo cual ocasiona una desorganización del meristemo y su agotamiento. Se determinó que el transporte polar de auxinas, así como el suplemento con exceso de Pi ayudan a reestablecer el desarrollo de la raíz primaria.

En este trabajo se determinó que la inhibición de la longitud de la raíz primaria a causa del Pb está regulada genéticamente y que los cambios generados por este metal están en función de la concentración del Pb y del Pi presente en el medio de cultivo.

Palabras clave: Estrés abiótico, arquitectura del sistema radical, metales pesados, carencia de fosfato y ruta PDR2-LPR1/2.

Abstract

The root system (RS) has as its main function to provide resources to the plant for its subsistence. Due to soil is not heterogeneous, the RS shows phenotypic plasticity based on soil requirements, such as water or nutrients. In the soil, in addition to water and nutrients, there are heavy metals (HMs) that are characterized by being toxic elements for organisms, for which they induce changes in the root system architecture (RSA) of plants. One of the HMs of greatest interest is lead (Pb), since this metal has accumulated in large quantities on the soil surface due to anthropogenic activities.

We found that Pb induces a change in the RSA very similar to phosphate (Pi) starvation, for which we compared both responses with the aim to find similarities and differences in regulation responses. We found reduction of the of the primary root length (PRL) in response to Pb is genetically regulated by the genes *lpi3* and *lpr1/2* that are also involved in the changes of the Pi starvation RSA. We determined that Pb negatively regulates the expression of the *AtPT2* gene (*Phl 1;4*) involved in the response to Pi deficiency and with the accumulation of this macronutrient; in addition, Pb negatively regulates the expression of genes related to the maintenance of the meristem such as they are *WOX5*, *PIN1* and *PIN2*, which causes a disorganization of the meristem and depletion of the primary root. We also found that the polar transport of auxins, as well as supplementing with excess Pi help to retrieve the development of the primary root.

In this work, we found that the inhibition of the length of the primary root due to Pb is genetically regulated and that the changes generated by this metal are a function of Pb and Pi concentration.

Key words: Abiotic stress, root system architecture, heavy metals, phosphates starvation and PDR2-LPR1/2 pathway

1. Introducción

1.1 Plasticidad fenotípica

La supervivencia de la planta depende directamente de su capacidad de explorar eficientemente el suelo en busca de recursos, por lo que el desarrollo y la conformación de la ASR son extremadamente relevantes para la adaptación del individuo a su entorno (Lynch, 1995). La ASR está regulada por dos factores: i) el intrínseco, determinado por la carga genética de cada especie y que establece la base morfológica del sistema radical y, ii) el extrínseco, en el cual se integran las señales ambientales que a su vez modifican el programa de expresión genética intrínseca, de tal manera que genera cambios en el crecimiento y desarrollo del SR, lo que finalmente derivará en cambios en la ASR (Malamy, 2005; Gruber *et al.*, 2013).

Tanto los factores intrínsecos como los extrínsecos determinan la forma en que la planta enfrentará el estrés evocado por condiciones adversas. Un ejemplo, de que la carga genética (factor intrínseco) ayuda a las plantas a enfrentar condiciones hostiles, es que algunas variedades de *Oryza sativa* (arroz) que presentan mayor resistencia a la sequía desarrollan raíces más profundas que las variedades sensibles a sequía (Price *et al.*, 1997). La adaptación al estrés por carencia de fosfato entre los diferentes ecotipos de *Arabidopsis thaliana* es mejor entre aquellos que generan gran número de raíces laterales con relación a los que generan pocas raíces laterales (Narang *et al.*, 2000).

El cambio de la ASR (fenotipo) que está en función de los factores extrínsecos en un mismo genotipo es conocido como plasticidad fenotípica del sistema radical; es llamada plasticidad porque los factores ambientales modifican e influyen directamente sobre el desarrollo del SR mediante cambios en señales moleculares, cambios fisiológicos y cambios morfológicos (Schlichting y Smith, 2002).

La importancia de la plasticidad fenotípica de un individuo es que es un elemento fundamental en la adaptabilidad a distintos ambientes para un mismo genotipo. Sin embargo, para su estudio es necesario tener claro que el ambiente puede modificar al SR del individuo de dos formas: 1) plasticidad fenotípica adaptativa o activa. En este caso, planta cambia su morfología para compensar los efectos adversos del entorno; y 2) plasticidad fenotípica pasiva, donde se presentan cambios morfológicos debido a condiciones desfavorables del entorno, el cual limita su desarrollo, como puede ser carencia total de algún recurso indispensable para la supervivencia (luz, agua, algunos nutrientes); cuando esto sucede, se dice que el organismo presenta un cambio inevitable en el desarrollo y que no necesariamente ayuda al bienestar del individuo. Hacer distinción entre las respuestas de la planta que llevan a cambios de desarrollo es esencial para conocer cómo la plasticidad fenotípica influye en el desarrollo y también puede constituir un elemento importante para la supervivencia del individuo y a largo plazo para la adaptación de la especie ante un ambiente hostil. Ambas respuestas pueden estar influyendo al mismo tiempo en el individuo; por ejemplo, bajo condiciones de crecimiento con limitación de nitrógeno, un parche rico en nitrógeno puede estimular un desarrollo localizado de raíces laterales que permitiría a la planta aprovechar la fuente rica en este nutriente; sin embargo, si a la par se presentan condiciones de sequía extrema, la plasticidad fenotípica adaptativa se puede ver opacada por la plasticidad fenotípica pasiva y limitar la elongación y desarrollo de las raíces laterales (SULTAN, 1995; Van Kleunen y Fischer, 2005; Forde, 2014).

Un genotipo hipotético ideal debería ser capaz de presentar fenotipos adaptados a todas las condiciones ambientales, sin embargo, la plasticidad fenotípica de un individuo no es ilimitada sino que se encuentra restringida principalmente por costos metabólicos y límites propios del genotipo (DeWitt *et al.*, 1998).

La plasticidad fenotípica tiene un alto costo metabólico, principalmente porque en lugar de mantener un fenotipo fijo la planta deberá costear energéticamente los cambios fenotípicos evocados por el factor estresante. Para poder responder ante

los cambios ambientales, los individuos requieren percibir señales, mantener cascadas de señalización e interpretarlas constantemente para poder evocar respuestas plásticas, así como mantener las nuevas estructuras originadas como respuesta ambiental; lo anterior tiene como consecuencia un importante gasto energético. Los factores que limitan la plasticidad fenotípica pueden ser de distinta naturaleza; generalmente estos limitantes están relacionados con el genotipo del individuo, por ejemplo, un genotipo incapaz de inducir un fenotipo específico ante un ambiente particular no será capaz de responder ante la hostilidad ambiental; otra limitante es el tiempo de respuesta, ya que los cambios fenotípicos requieren desde horas hasta meses para desarrollarse y mientras se genera el cambio fenotípico el organismo se encuentra bajo estrés y si no se presenta una respuesta adecuada el individuo podría morir (DeWitt *et al.*, 1998; Van Kleunen y Fischer, 2005).

Como consecuencia de estas limitaciones en la plasticidad fenotípica las plantas se han separado en dos grupos: 1) las especies que tienen reducida plasticidad fenotípica y que tienen características especializadas para hacer frente a un entorno particular y 2) las especies generalistas o con gran plasticidad fenotípica que les permiten adaptarse a diversos entornos. Son justamente el costo metabólico y las limitantes las que restringen si un organismo generalista o especialista se desarrolla en cierto ambiente. Un organismo generalista es capaz de adaptarse a gran número de ambientes distintos, sin embargo, comparado con un organismo especialista, el organismo generalista invierte más energía en percibir, interpretar y responder continuamente ante la hostilidad ambiental, mientras que un organismo especializado se desarrolla en un ambiente particular sin un costo metabólico excesivo al presentar una plasticidad fenotípica reducida, pero con las adaptaciones particulares para el ambiente en que se desarrolla (Van Kleunen y Fischer, 2005).

Todas las señales intrínsecas y extrínsecas deben ser integradas para poder generar un cambio en el desarrollo vegetal; esto implica regulación de la expresión genética, metabolismo hormonal y regulación del ciclo celular.

1.2 Plasticidad fenotípica del sistema radical

Durante el proceso de embriogénesis se da origen a los órganos y tejidos que formarán a la planta. Una vez que la semilla germina, los órganos y tejidos preformados crecerán y continuarán su desarrollo, sin embargo, este se verá modificado dependiendo de las condiciones ambientales (Jürgens, 2003).

La parte aérea se encuentra por encima del suelo, su crecimiento y desarrollo está preestablecido por los meristemos axilares y meristemos apicales. Estos rigen la filotaxia, es decir, en qué plano, en qué ángulo y con qué orientación crecerán las hojas, las ramas y las flores de la planta. Este patrón, casi invariable, está fijado por la genética de cada especie, lo cual ha servido como uno de los criterios para la clasificación sistemática y taxonómica de las especies vegetales. Aunque la filotaxia no cambia, el patrón de crecimiento si lo hace en respuesta a estímulos ambientales como la luz, la humedad y la temperatura (Steeves y Sussex, 1989; Reinhardt y Kuhlemeier, 2002).

Por debajo del suelo se encuentra el sistema radical (SR), que le sirve a la planta para diferentes propósitos: obtener agua y nutrientes, mantenerse anclada al suelo, como reservorio de carbohidratos e incluso como plataforma de interacción con los microorganismos presentes en la rizosfera (Scheres *et al.*, 1996; Malamy y Benfey, 1997). El SR presenta una estructura predeterminada dependiendo de la especie, como lo es el sistema pivotante de la mayoría de las dicotiledóneas o el SR fibroso en las gramíneas. Sin embargo, el desarrollo de este órgano es muy sensible a los componentes del suelo, por lo que presenta gran plasticidad fenotípica, esto le permite modificar su desarrollo en respuesta a diferentes factores ambientales como son los nutrimentales, hídricos, salinidad, entre otros. Dicha plasticidad le ha permitido al sistema radical explorar el suelo y sobrellevar la inmovilidad vegetal para obtener recursos (Malamy y Benfey, 1997; López-Bucio *et al.*, 2003; Duan *et al.*, 2013; Bao *et al.*, 2014).

El sistema radical de *A. thaliana* y de la mayoría de las dicotiledóneas, se compone de una raíz primaria, la cual se forma durante la embriogénesis, y de raíces laterales o de segundo orden, las cuales emergen a partir de la raíz primaria y pueden dar origen a raíces de mayor orden (tercero, cuarto, etc.); además, algunas especies presentan raíces adventicias, las cuales se caracterizan por no originarse de una raíz preexistente. Aunque muy similares entre sí, las diferentes raíces tienen diferentes características, y responden y se desarrollan en diferentes situaciones y contextos fisiológicos. Al conjunto de estas estructuras anteriormente mencionadas y a la configuración espacial de estos componentes del SR se le llama arquitectura del sistema radical (ASR). La importancia del estudio de la ASR radica en que en el suelo los recursos están distribuidos de forma heterogénea, por lo que el desarrollo tridimensional del SR en el suelo determina la capacidad de la planta de asegurar el transporte de los recursos hacia el interior de esta (Lynch, 1995).

Para su estudio, el ápice de la raíz se ha dividido en tres zonas: la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de diferenciación (Schiefelbein y Benfey, 1991; Malamy y Benfey, 1997). La zona meristemática se compone de diferentes tipos celulares indiferenciados que darán origen a las capas celulares que forman a la raíz. En esta zona se encuentran un grupo de células iniciales que formarán al centro quiescente (QC del inglés Quiescent Center), las cuales tienen poca actividad mitótica, pero son esenciales para mantener la organización y división de las células iniciales de la columna, del haz vascular, del periciclo, de la endodermis, del córtex y de la epidermis. Cuando las células formadas en la zona meristemática se dividen, se desplazan y dan origen a la zona de elongación en donde acumulan mayor cantidad de citoplasma, lo que deriva en un crecimiento longitudinal de las células. Anterior a la zona de elongación se encuentra la zona de diferenciación, que se caracteriza porque las células de cada tejido adquieren su función específica. Es en esta zona donde se observan los pelos radicales, donde emergen las raíces laterales y donde la banda de Caspari se forma (Dolan y Davies, 2004; Verbelen *et al.*, 2006; Petricka *et al.*, 2012).

1.2.1 Cambios en la arquitectura del sistema radical

1.2.1.1 Regulación hormonal

Las fitohormonas son moléculas involucradas en percibir e interpretar señales ambientales y actúan en armonía para regir la configuración de la ASR en respuesta hacia los factores ambientales. Estas son reguladas a distintos niveles, como son la biosíntesis, el metabolismo, el transporte y la señalización, así como la interacción entre ellas. Las principales hormonas incluyen a las auxinas, las citocininas, el etileno, los jasmonatos y el ácido abscísico (Jones *et al.*, 2013).

Las auxinas son fitohormonas que se encuentran involucradas en casi todos los procesos de desarrollo y crecimiento vegetal. En el sistema radical, a esta hormona se le asocia con el incremento en la longitud de los pelos radicales, con la regulación del crecimiento de la raíz primaria, con el incremento en el número de raíces laterales y con la respuesta gravitrópica, todos estos parámetros dependen directamente de la concentración y distribución espacio-temporal de las auxinas (Overvoorde *et al.*, 2010).

Las auxinas son sintetizadas principalmente en hojas jóvenes y son transportadas hacia el sistema radical por el haz vascular hasta el ápice de la raíz, donde el transporte acropétalo pasa a ser basipétalo en las capas celulares externas. Este transporte es conocido como transporte polar de auxinas y es posible gracias a los transportadores transmembranales de influjo como AUX1 (del inglés Auxin Resistant 1) y LAX (del inglés Like-AUX 1) y los transportadores transmembranales de eflujo como PIN (del inglés PIN-Formed) (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2001; Petrášek *et al.*, 2006; Michniewicz *et al.*, 2007).

A nivel celular las auxinas interactúan con otras moléculas, lo cual permite regular la expresión de algunos genes. Los promotores de los genes regulados por esta hormona son llamados elementos de respuesta auxinas (ARE del inglés Auxin Response Element), a los cuales se une una familia de factores de transcripción llamados factores de respuesta a auxinas (ARF del inglés Auxin Response

Factor). En ausencia de auxinas, las proteínas represoras AUX/IAA (del inglés Auxin/Índole-3-Acetic Acid) se unen a los ARFs lo que ocasiona una inhibición de la actividad de estos factores de transcripción. En presencia de auxinas, el complejo SCF^{TIR1} E3 ubiquitin-ligasa (del inglés SKP1-cullin-F box Protein) unirá moléculas de ubiquitina a las proteínas represoras AUX/IAA promoviendo la degradación de estas por el proteosoma 26S. Lo anterior libera a los ARFs y permite que puedan regular directamente la actividad de genes de respuesta a auxinas (Jones *et al.*, 2013).

Las auxinas tienen un papel importante en el desarrollo del sistema radical. En el meristemo apical de la raíz estas hormonas se concentran en el QC, lo que promueve la expresión de los genes *Plethora (PLT)* que codifican para factores de transcripción de respuesta a auxinas ARF/ERF que son efectores clave para el desarrollo, división y mantenimiento de las células iniciales en el meristemo. Además, en el ápice de la raíz las auxinas regulan la expresión de los genes *SCR* (del inglés scarecrow) y *SHR* (del inglés short root) involucrados directamente con el desarrollo radial de la raíz, específicamente de la epidermis y el córtex (Sabatini *et al.*, 1999; Aida *et al.*, 2004). En experimentos con ácido naftílo-p-talámico (NPA), que es un inhibidor del transporte polar de auxinas, se demostró que la presencia de estas hormonas en el sistema radical es importante para la formación y la emergencia de raíces laterales, pues el uso de NPA redujo la formación de estas. Ahora se sabe que es en la zona de diferenciación donde la acumulación de auxinas en algunas células del periciclo induce la formación de primordios de raíces laterales, lo anterior debido a que las auxinas activan genes relacionados con el ciclo celular como los que codifican para ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDKs); de esta manera, se induce a las células a dividirse de manera organizada, por lo que darán origen a nuevas raíces laterales. Además, se sabe que la acumulación de auxinas en las capas celulares adyacentes al periciclo promueven la expresión de genes que remodelan la pared celular, lo cual es indispensable para la separación de capas celulares externas y permitir la emergencia de la nueva raíz lateral (Casimiro *et al.*, 2001; Dubrovsky *et al.*, 2006; Swarup *et al.*, 2008).

Las auxinas son mediadoras entre factores ambientales y la respuesta intrínseca de desarrollo del SR; por ejemplo, en un medio con exceso de nitrato y sacarosa las plantas de *A. thaliana* presentan poco número de raíces laterales. Utilizando la línea marcadora DR5 se observó que las auxinas se concentran en el hipocótilo, sugiriendo que el transporte desde las hojas hacia la raíz no se llevaba a cabo, lo que ocasiona que la formación de raíces laterales sea baja (Malamy y Ryan, 2001).

El desarrollo y formación de las raíces laterales ha sido ampliamente estudiado en la última década, y es sabido que las auxinas están involucradas en diferentes estadios de formación de este tipo de raíces.

Las raíces laterales se forman a partir de células del periciclo, llamadas células fundadoras de raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997). En estas células se ha observado que la concentración de auxinas es mayor que en las células adyacentes y que la presencia de estas hormonas dirige la polarización y división celular para dar origen al primordio de la raíz lateral (Dubrovsky *et al.*, 2008). En experimentos en los que se añadió IAA de manera puntual, en algunas células del periciclo de la raíz primaria se esperaba que se generara una raíz lateral, pero no fue así; esto llevó a varios experimentos en los que se descubrió que la formación de raíces laterales ya está preestablecida desde la zona meristemática donde se coordina la formación de “zonas de oscilación”, que son zonas donde se presentan pulsos de actividad de respuesta a auxinas haciendo uso del marcador *DR5::Luciferasa*; es en estas zonas donde se da origen a las zona de pre-bifurcación (pre-branching en inglés) donde se podrá dar origen a una nueva raíz lateral y no en otras regiones (Moreno-Risueno *et al.*, 2010). Se ha reportado que para “señalar” a las células que forman parte de la zona de oscilación es necesario que haya presencia de auxinas con oscilaciones de aproximadamente 6 h y que esta hormona regula a los genes *IAA28*, *IAA8*, *IAA9*, y a algunos como el *ARF5*, *6*, *7*, *8* y *19*, ya que se demostró que en plantas con mutaciones en estos genes se presentan defectos en la formación de raíces laterales (Tatematsu *et al.*, 2004; De Rybel *et al.*, 2010; Moreno-Risueno *et al.*, 2010; Arase *et al.*, 2012). Lo anterior

evidencia que la presencia de las auxinas debe estar regulada espacial y temporalmente para poder tener un efecto morfogénico adecuado y no solo depende de la concentración de estas hormonas.

Una vez que se forman las células iniciales, estas comienzan con divisiones anticlinales hasta formar un domo y emerger a través de la endodermis, córtex y epidermis, lo que finalmente dará una raíz lateral. Todo este proceso está regulado también por auxinas y por algunos elementos como SLR/IAA14, ARF7, ARF 19, y LBD/IAA12, principalmente (Fukaki *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2007).

Puesto que las auxinas son las hormonas que están directamente involucradas en el mantenimiento y modificación de la arquitectura del sistema radical, las demás hormonas que afectan la arquitectura del sistema radical lo hacen de forma indirecta al generar cambios en la distribución y actividad de las auxinas.

Las citocininas son moléculas que actúan como antagonistas de la actividad de las auxinas, pero ambas están coordinadas para dar forma a la arquitectura del sistema radical (Pernisová *et al.*, 2009).

Las citocininas regulan la transcripción de genes mediante un receptor similar al sistema de dos componentes histidina-cinasa presente en bacterias. Primeramente, estas hormonas se unen a su receptor (CRE1 del inglés Cytokinin Response 1, AHK2 del inglés Arabidopsis Histidin Kinase 2 o AHK3 del inglés Arabidopsis Histidin Kinase 3) presente en el retículo endoplásmico, lo cual activa al complejo histidin-cinasa de esta proteína y se auto fosforila; enseguida, el grupo fosfato se transfiere a una proteína fosfotransferasa (AHP del inglés Arabidopsis Histidine Phosphotransfer Protein) que se mueve hacia el núcleo celular donde transfiere el grupo fosfato a unas moléculas reguladoras de respuesta (ARR del inglés Arabidopsis Response Regulator); las ARRs son activadas y estabilizadas con la fosforilación, lo que permite que se lleve a cabo la regulación transcripcional de los genes de respuesta a citocininas. Existen dos tipos de ARRs: las del tipo A y B; las del tipo B están involucradas con el desarrollo de la parte aérea y del

sistema radical, la expansión celular y la senescencia, mientras que las del tipo A regulan negativamente la fosforilación de las ARRs, lo cual funciona como una retroalimentación negativa (Jones *et al.*, 2013).

Es mediante la activación de genes de respuesta a citocininas que estas hormonas modifican el desarrollo del SR. Por ejemplo, se ha descrito que la aplicación exógena de citocininas reduce el número de células meristemáticas y lleva a una disminución en el tamaño de las células de la región meristemática y de la raíz primaria (Dello Iorio *et al.*, 2007). Por el contrario, el uso de PI-55 (un derivado de las purinas que reduce la unión de las citocininas al receptor CRE1) genera un aumento en la longitud de la raíz primaria en la doble mutante *ahk2/ahk3* y un incremento en el número de raíces laterales, tanto en *A. thaliana* WT como en la doble mutante *ahk2/ahk3*, sugiriendo que esta hormona es importante en la regulación del desarrollo del SR (Spíchal *et al.*, 2009).

Por otro lado, las citocininas regulan el desarrollo del sistema radical no solo a través de la activación de ARRs, sino que también se ha demostrado que algunas moléculas relacionadas con las auxinas como el IAA3/SHY (una proteína inhibidora de la respuesta a auxinas) se encuentra río abajo del *ARR1*. En una mutante carente de función de *shy2* los meristemas son anormalmente grandes, mientras que en la sobreexpresante de SHY hay una disminución en el tamaño de este; se sabe que SHY es un represor de respuesta a auxinas que regula negativamente el transporte de estas hormonas a través de las proteínas tipo PIN. Lo anterior muestra que auxinas y citocininas regulan en conjunto el desarrollo del meristemo interactuando a través de SHY (Iorio *et al.*, 2008).

Además, las citocininas interrumpen la formación de las raíces laterales al inhibir la expresión de genes tipo *PIN* que codifican para transportadores de auxinas; lo anterior también impide la acumulación de auxinas en el meristemo, lo cual deriva en una pérdida en la división celular y en el mantenimiento del QC y las células iniciales. Aunque inhibe la formación de raíces laterales, las citocininas promueven la elongación de estas una vez que se han formado (Dello Iorio *et al.*, 2007; Laplaze *et al.*, 2008).

El etileno, una fitohormona gaseosa, regula varios procesos en el desarrollo vegetal: abscisión de las hojas, estimulación de la maduración de frutos, promueve la germinación y reduce la expansión celular. El receptor del etileno se encuentra en el retículo endoplásmico de la célula y es llamado ETR1 (del inglés Ethylene Response 1); este receptor tiene similitudes con el receptor de las citoncininas, con un dominio histidin-cinasa al igual que el sistema de dos componentes bacteriano; en ausencia de etileno el ETR1 activa una cascada de señalización de MAP cinasas que comienza con la fosforilación de la molécula CTR1 (del inglés Constitutive Triple Response 1); esta molécula regula negativamente el resto de la cascada de señalización, y al final de la cascada de fosforilación se encuentra una proteína transmembranal EIN2 (del inglés Ethylene Insensitive 2) que promueve la actividad de los factores de transcripción EIN3 (del inglés Ethylene Insensitive 3) y ERF1 (del inglés Ethylene Response Factor 1), los cuales regulan la actividad de genes de respuesta a etileno. De tal manera que, en presencia de esta hormona, la regulación del ETR1 se pierde y por lo tanto la inhibición de la cascada de señalización por parte de CTR1, derivando en la promoción de la transcripción de genes de respuesta a etileno (Stepanova y Alonso, 2009)..

La concentración de etileno regula la formación de raíces laterales. Se ha descrito que a bajas concentraciones ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), un precursor de la síntesis de etileno, se promueve el inicio de la formación de primordios de raíces laterales, mientras que en altas concentraciones de ACC se inhibe el inicio de la formación del primordio de raíces laterales, sin embargo, se promueve la emergencia de la raíz lateral. Se considera que la regulación del etileno sobre la formación de raíces laterales está mediada por la interacción con las auxinas. Lewis *et. al.* reportan que el etileno inhibe la formación de raíces laterales promoviendo la actividad de los transportadores de eflujo de auxinas PIN3 y PIN7, lo que evita la acumulación de auxinas en el periciclo (Rogers y Benfey, 2015; Street *et al.*, 2015).

Se ha descrito que las mutantes insensibles a etileno *etr1-3* y *ein2-1* presentan unas células más largas en la zona de elongación, mientras que la mutante de

respuesta constitutiva de etileno *ctr1-1* presenta células más cortas en la zona de elongación; esto lleva a la conclusión de que el etileno regula negativamente la elongación celular. Por otro lado, se ha descrito que también está involucrado en la regulación del mantenimiento del meristemo, afectando negativamente a la proliferación celular (Street *et al.*, 2015; Abel, 2017).

Además, el etileno genera cambios en la arquitectura del sistema radical al modificar la distribución de auxinas, como en los fenómenos de gravitropismo y ondulación de la raíz primaria (Buer *et al.*, 2003; Rogers y Benfey, 2015).

Algunas otras moléculas reguladoras que están involucradas en el desarrollo del SR actúan a través de la señalización de auxinas. Por ejemplo, el metil-jasmonato que es la molécula activa del grupo de los jasmonatos promueve la formación de raíces laterales al interactuar con la ruta de señalización de las auxinas y además puede inhibir el crecimiento de la raíz primaria (Xue y Zhang, 2007; Sun *et al.*, 2009). El ácido abscísico (ABA) regula la ASR principalmente controlando la elongación de las raíces. En *Zea mays* y en *Medicago truncatula* desarrollados en condiciones de estrés hídrico, ABA estimula el incremento en la longitud de las células de la raíz primaria de la zona de elongación; lo anterior se produce porque ABA genera reducción en la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En *A. thaliana*, cuando una raíz lateral se encuentra con un parche de altas concentraciones de nitrato la raíz detiene su desarrollo; sin embargo, en mutantes insensibles a ABA este arresto en la raíz no se presenta, lo cual indica que ABA también está relacionada con el desarrollo de las raíces laterales. El ácido abscísico genera que las raíces laterales emerjan de la raíz primaria y también mantiene la elongación de la raíz primaria, sobre todo en estrés por sequía (Signora *et al.*, 2001; Sharp *et al.*, 2004; De Smet *et al.*, 2006).

Si bien todas las hormonas están relacionadas con el desarrollo del sistema radical, es la concentración, distribución y temporalidad de cada una de estas, así como las interacciones mutuas, lo que determina los cambios en el desarrollo del SR y la disposición de la ASR.

1.2.1.2 Respuesta a factores abióticos del suelo

Las plantas utilizan macro y micronutrientes como base de su metabolismo, por lo que la carencia de estos induce cambios en la ASR, sobre todo la carencia de macronutrientes como el nitrógeno o el fósforo. En el suelo, algunos elementos como el nitrógeno y el cloro presentan una distribución vertical debido a que son muy solubles en agua y son arrastradas por el flujo de agua desde la superficie hasta las capas inferiores del suelo en donde se acumulan. Otros nutrientes como el fosfato y el potasio son poco móviles y estos se acumulan de manera horizontal sobre la capa más superficial del suelo. Además de la solubilidad propia de cada compuesto, el pH del suelo, la materia orgánica y la presencia de otros nutrientes, son factores que determinan la distribución y biodisponibilidad de los nutrientes en el suelo (Jobbágy y Jackson, 2004; Koevoets *et al.*, 2016). De tal manera que las plantas deben enfrentar el reto de explorar el suelo para poder acceder a los parches de nutrientes que se encuentran distribuidos heterogéneamente en el suelo, y la mejor manera de enfrentarlo es aumentar la tasa de exploración; esto lo hacen al modificar la ASR.

Los cambios en la ARS han sido ampliamente estudiados bajo estrés de algunos nutrientes. Se ha descrito que la biodisponibilidad de algunos elementos ocasiona un cambio drástico en el número, longitud, ángulo, diámetro de raíces y pelos radicales (Gruber *et al.*, 2013).

El efecto de la disponibilidad de fosfato sobre la ASR ha sido uno de los fenómenos que se ha descrito con mayor detalle en el SR. El fosfato es uno de los macronutrientes de mayor importancia en el metabolismo vegetal, ya que forma parte de los nucleótidos, fosfolípidos, y el ATP. Por esta razón, es indispensable que la planta eficiente su suministro de fosfato. Como consecuencia, las plantas presentan gran sensibilidad a la carencia de fosfato y responden modificando drásticamente su programa de desarrollo post embrionario del SR. En *Arabidopsis thaliana*, la raíz primaria presenta una inhibición en el crecimiento acompañado de un aumento en la densidad de las raíces laterales; además, el tamaño y el número de pelos radicales aumenta con la finalidad de incrementar la toma de fosfato, el

cual debido a su poca movilidad se acumula en las capas superiores del suelo (Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002). La reducción en el crecimiento desarrollo de la raíz primaria se debe a una prematura diferenciación del meristemo apical a consecuencia de un exceso en el depósito de callosa en el ápice de la raíz, lo que conlleva a la disminución en la movilidad de SHR afectando la expresión de *SCR* y *WOX5*, provocando la diferenciación del meristemo (Müller *et al.*, 2015). Por otro lado, el incremento de raíces laterales es dependiente de la señalización de auxinas, ya que la triple mutante *tir1afb2afb3* no genera aumento en la densidad de raíces laterales (Pérez-Torres *et al.*, 2008). La raíz primaria corta y abundantes raíces laterales también se han observado en otras especies como *Lupinus albus*, donde la carencia de fósforo ocasiona que se desarrollen raíces proteoides, caracterizadas por ser regiones muy densas de raíces cortas y con gran cantidad de pelos radicales que secretan fosfatasa y ácidos orgánicos; este cambio le ha permitido a esta especie desarrollarse en suelos pobres de fósforo (Keerthisinghe *et al.*, 1998).

El nitrógeno es otro macronutriente importante para el desarrollo vegetal ya que forma parte de los aminoácidos, las proteínas y las bases nitrogenadas. Este elemento ingresa a las plantas como amonio o nitrato. Se ha reportado que el amonio induce la inhibición en la elongación de las raíces mientras que el nitrato estimula la elongación. En regiones donde el suelo es pobre en nitrógeno el crecimiento de las raíces laterales se reduce debido a la actividad del transportador de nitrato NTR1.1 (del inglés Nitrate Transporter 1.1), el cual impide la acumulación de auxinas en los primordios de raíces laterales. Por el contrario, en las regiones donde el suelo es rico en nitrógeno se promueve la formación y elongación de raíces laterales y de la raíz primaria (Linkohr *et al.*, 2002; Zhan y Lynch, 2015).

El cambio en la ASR ocasionado por la carencia de otros nutrientes ha sido estudiado en menor proporción; sin embargo, se ha descrito que inducen cambios en el SR con fenotipos similares entre distintos factores ambientales. Por ejemplo, la deficiencia de magnesio, azufre o hierro genera una reducción de la densidad

de raíces laterales mientras que la deficiencia de potasio, calcio, zinc, manganeso o boro resulta en un aumento en la densidad de raíces laterales (Gruber *et al.*, 2013; Kellermeier *et al.*, 2013; Kellermeier *et al.*, 2014).

Además del estrés nutricional, en el suelo se puede encontrar el estrés salino, el cual también modifica la ASR, principalmente generando quiescencia en el crecimiento de las raíces laterales posterior a que han emergido desde la raíz primaria (Duan *et al.*, 2013).

Por otro lado, durante el estrés hídrico el desarrollo de las raíces laterales se inhibe, pero no la iniciación de estas, mientras que el desarrollo de la raíz primaria aumenta en dirección de la zona con mayor humedad (hidrotropismo). Por otro lado, el exceso de agua genera un aumento en la formación de raíces laterales y un aumento en el aerénquima y en el córtex de la raíz con la finalidad de aumentar la disponibilidad de oxígeno. Lo anterior se ha reportado principalmente en arroz y en maíz (Pedersen *et al.*, 2020).

Es evidente que la respuesta del sistema radical hacia los diversos factores estresantes es diferente dependiendo de la naturaleza del factor estresante, por lo que el cambio en el programa de desarrollo post embrionario tiene como objetivo incrementar la eficiencia, la toma de recursos desde el suelo y reducir el costo energético disminuyendo el crecimiento innecesario, ya que esto es indispensable para la supervivencia del individuo.

1.2.1.3 Respuesta a metales pesados

Los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares les han ayudado a las plantas a enfrentar la carencia de recursos, sin embargo, este tipo de respuestas también son ocasionados por compuestos tóxicos. Además de los nutrientes y el agua, en el suelo se pueden encontrar elementos tóxicos como son los metales pesados (MPs). Los MPs más comunes en la corteza terrestres son el As (arsénico), Cd (cadmio), Cr (cromo), Cu (cobre), Pb (plomo), Hg (mercurio), Ni (níquel) y Zn (zinc); estos son metales y metaloides que tienen densidad mayor a 5 g/cm³ y que a concentraciones del orden micromolar (μM) son altamente tóxicos para los organismos. Algunos de los MPs como el Cu y el Zn están incluidos en el grupo de

los micronutrientes, ya que son necesarios para el metabolismo de las plantas, sin embargo un ligero aumento en las concentraciones de estos causa toxicidad (Schützendübel y Polle, 2002).

Debido a que los cambios en la ASR le permiten a la planta obtener recursos, es de esperarse que su desarrollo esté estrechamente influenciado por la concentración y naturaleza de los componentes del suelo. Es por esta razón que el SR es susceptible a la presencia de MPs, los cuales ocasionan cambios en el desarrollo del SR de distintas maneras: como cambio en la expresión genética y cambios en la distribución de auxinas. Se ha observado que tratamientos tanto con Cu^{+2} como con Al^{+3} generan una disminución en la longitud de la raíz primaria, que puede deberse a la disminución en el tamaño de las células en la zona de elongación o en una disminución en la actividad mitótica en el meristemo (Sun *et al.*, 2010; Yuan *et al.*, 2013). En líneas de *A. thaliana* que portan la construcción *CycB1::GUS*, *QC25::GUS* o *SCR::GFP* tratadas con Cu^{+2} en concentraciones inhibitorias de la elongación de la raíz primaria, se evidenció que las células presentan menor índice mitótico en comparación con las raíces del grupo sin Cu^{+2} y que la identidad del QC y de las células iniciales no se pierden, indicando que el Cu^{+2} interrumpe únicamente la división celular en el meristemo (Yuan *et al.*, 2013). Además de generar disminución en la longitud de la raíz primaria, el Cu^{+2} también induce un aumento en el crecimiento de los pelos radicales; este fenotipo es característico de plantas suplementadas con ACC, un precursor de la síntesis de etileno (Pasternak *et al.*, 2005; Abel, 2017), lo cual hace pensar que el etileno está involucrado en dicha respuesta; sin embargo, plantas mutantes insensibles a la respuesta de etileno *ein2-1* responden al Cu^{+2} de manera similar a como lo hacen las plantas silvestres, por lo que, con estos resultados, se ha descartado la participación del etileno en la generación de una raíz primaria corta y en el aumento en el número pelos radicales en el SR. Las raíces de plantas que crecieron en medio de cultivo suplementado con Cu presentan una raíz primaria corta, esto es ocasionado a que el Cu disminuye la expresión de los genes PIN que codifican para proteínas transportadoras de auxinas (Yuan *et al.*, 2013). El Al^{+3} también genera inhibición en el crecimiento de la raíz primaria al modificar la

distribución de auxinas de manera indirecta, ya que genera el aumento en la transcripción de los genes *AtAUX1* y *AtPIN2*; además del cambio en el transporte de auxinas, también se sabe que el etileno está involucrado, pues las mutantes insensibles a etileno *ein2-1* y *etr1-3* son resistentes a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria por el Al^{+3} (Sun *et al.*, 2010).

En plantas de *A. thaliana* desarrolladas en medio suplementado con Cr (VI) la longitud de la raíz primaria aumenta a concentraciones bajas ($<100 \mu M$) respecto al grupo control y a concentraciones mayores a $200 \mu M$ la longitud de la raíz primaria disminuye y aumenta el número de raíces adventicias, y se sabe que la disminución en la longitud de la raíz primaria se debe a un bajo índice mitótico en el meristemo (Castro *et al.*, 2007). Se ha reportado que la expresión de *PIN1* y *PIN2* disminuyó en la raíz primaria, pero no en las raíces adventicias, sugiriendo que el transporte de las auxinas está relacionado con la resistencia de la raíz al Cr (VI). Las mutantes de *iaa14/slr1*, un represor de los ARFs (Auxin Responsive Factors), son resistentes a la inhibición de crecimiento de la raíz primaria, lo cual corrobora la participación de la auxinas en la sensibilidad de la raíz al Cr (VI) (López-Bucio *et al.*, 2015).

En *Medicago truncatula* expuesta a Hg^{+2} y a Al^{+3} se ha reportado una reducción en la transcripción del microRNA 390 (miRNA 390); este miRNA 390 induce la degradación de los transcritos de TAS3 (del inglés Trans-Acting Short Interference RNA3), que es un RNA de silenciamiento (siRNA del inglés small interfering RNA) que silencia la transcripción de RNA mensajero (mRNA) de algunos ARFs relacionados con el desarrollo de raíces laterales; y debido a que la formación de miRNA 390 disminuye con el Hg^{+2} y Al^{+3} , TAS3 se acumula en las células y los ARFs son degradados en mayor proporción, lo que conlleva a una inhibición en el desarrollo de raíces laterales ocasionado por estos metales (Marin *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2012).

El Cd produce disminución en la longitud de la raíz primaria, y se ha reportado que en *A. thaliana* el factor de transcripción GLABRA1 ENHANCER BINDING PROTEIN (GPL4) reduce el crecimiento de la raíz primaria cuando el medio de

cultivo es suplementado con Cd; y en plantas con el gen *GPL4* silenciado, la raíz primaria presenta una longitud similar al grupo control pero acumula mucho más Cd, sugiriendo que el *GPL4* puede ayudar a la planta a evitar la toxicidad por Cd (Khare *et al.*, 2017). Además, el Cd genera un aumento de tamaño y densidad de pelos radicales en *A. thaliana*, rábano, cebada y sorgo (Vitória *et al.*, 2003; Ďurčeková *et al.*, 2007; Kuriakose y Prasad, 2008; Bahmani *et al.*, 2016). En *A. thaliana* se ha observado que las plantas que son tratadas con Cd y As (III) presentan una regulación negativa en la expresión de los genes *TTG1* (del inglés Transparent Testa Glabra1) y *GL2* (del inglés Glabra2) los cuales regulan negativamente la formación de pelos radicales, y es debido a esto que se da un aumento en la densidad y tamaño de los pelos radicales en estas raíces (Bahmani *et al.*, 2016).

En *Lemna minor*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Pisum sativum* y *A. thaliana* la presencia de Pb^{+2} en el medio de cultivo genera una reducción en la longitud de la raíz primaria comparada con las plantas sin Pb^{+2} (Samardakiewicz y Woźny, 2005; Dey *et al.*, 2007; Kozhevnikova *et al.*, 2009; Malecka *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015); esto se debe al bajo índice mitótico debido a que el plomo interrumpe la polimerización de la tubulina durante la mitosis (Wierzbicka, 1999). El etileno juega un papel importante en la resistencia a Pb^{+2} pues en la mutante insensible a etileno *ein2-1* las raíces primarias de las plantas desarrolladas en medio con Pb^{+2} presentan mayor inhibición que las plantas silvestres (Cao *et al.*, 2009).

2 Antecedentes

Se considera que la principal causa por la que los MPs generan toxicidad es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS del inglés Reactive Oxygen Species) debido a la alta reactividad de estos contaminantes (Shahid *et al.*, 2014). Para hacer frente a dicha toxicidad las plantas requieren de una respuesta que involucre cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares. En el caso del sistema radical, este cambia su ASR en presencia de MPs, sin embargo, la respuesta que se presenta no es igual para cada MP, lo cual hace pensar que los mecanismos de respuesta son diferentes entre MPs. Por ejemplo, el crecimiento en medio

suplementado con As, Hg inducen un SR poco desarrollado con raíz primaria corta y sin raíces laterales (Shin *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2010), mientras que el crecimiento en medio suplementado con Al, Cu, Cr o Pb inducen un SR con raíz primaria corta y con un a alta DRL (Castro *et al.*, 2007; Lequeux *et al.*, 2010; Ruíz-Herrera y López-Bucio, 2013; Hattab *et al.*, 2016). Sin embargo, el desarrollo de raíz primaria corta y el incremento en la DRL no solo es un fenotipo que se observa en respuesta a MPs sino que también se ha descrito en carencia de Pi (Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002). Uno de los MPs con mayor acumulación en la corteza terrestre debido a las actividades antropogénicas es el Pb, los trabajos relacionados con la ASR de plantas frente al Pb indican que es altamente tóxico y que es debido a esta toxicidad que se generan cambios en la ASR. Se considera que cuando hay factores estresantes de diferente naturaleza (en este caso el Pi y el Pb) que generan cambios morfogénicos similares es muy probable que estén compartiendo mecanismos regulados por moléculas en común (Potters *et al.*, 2009). Por lo tanto, es de nuestro interés caracterizar la respuesta del SR de *A. thaliana* en medio suplementado con Pb y compararlo con la respuesta ante carencia de Pi con la finalidad de encontrar similitudes y diferencias en los mecanismos de respuesta entre estos dos factores estresantes.

3. Justificación

Las plantas han adquirido a través del proceso evolutivo distintos mecanismos para hacer frente a la toxicidad por MPs. El sistema radical es el órgano que está en contacto directo con los contaminantes en el suelo y el medio por el cual estos y los nutrientes ingresan en las plantas. Por lo que, estudiar los procesos orquestados en las raíces es de gran importancia para entender los mecanismos de respuesta de las plantas frente a la toxicidad por MPs.

Dentro de los MPs con mayor abundancia en la corteza se encuentra el Pb, ya que forma parte natural de la roca madre con una concentración promedio de 15 ppm a nivel mundial, sin embargo, la mayor parte de la acumulación se debe a la actividad antropogénica como la metalurgia, la minería, el uso de combustibles fósiles, el mal manejo de aguas residuales e incluso algunos fertilizantes (Cecchi

et al., 2008; Alloway, 2013). En el suelo el Pb no se encuentra de forma elemental, sino que se encuentra mayormente como sulfuro de plomo (galena), carbonato de plomo (cerusita) o sulfato de plomo (anglesita); las sales de Pb son insolubles en medio acuoso con excepción de nitratos y acetatos. Sin embargo, esta cualidad del Pb para formar sales insolubles ha generado un problema para evaluar la respuesta frente a este metal en condiciones *in vitro*, principalmente por la precipitación con el Pi. Por lo que los estudios a nivel de laboratorio con este metal pesado han sido pocos, y aunque algunas investigaciones han logrado solucionar el problema de la precipitación eliminando el Pi en el medio de cultivo, se genera que las plantas evaluadas estén bajo estrés por carencia de Pi y por la presencia de Pb, ocasionando que el fenotipo del sistema radical en presencia de Pb y en carencia de Pi sea con una raíz primaria corta y un aumento en la densidad de raíces laterales. Lo anterior nos hace pensar que la similitud en el fenotipo con raíz primaria corta y aumento de raíces laterales se pueda deber a que la coprecipitación entre el Pi y el Pb reduce la biodisponibilidad del macronutriente y esto genera estrés por carencia de Pi en la planta; por lo cual, antes de comenzar a trabajar con Pb en condiciones *in vitro* es necesario discernir si el cambio de fenotipo es debido a la carencia del fósforo evocada directamente por el Pb o una combinación de ambos factores estresantes.

Los trabajos en plantas bajo estrés por Pb se enfocan principalmente a la búsqueda de mecanismos y genes involucrados con la resistencia y/o la hiperacumulación de este metal. Lo poco que se ha reportado relacionado con el sistema radical incluyen experimentos en los que se evalúa la biomasa, la longitud de la raíz primaria y la cantidad de moléculas antioxidantes o quelantes presentes en la raíz, en plantas como *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Pisum sativum*, *Lupinus campestris* y *A. thaliana* (Dey *et al.*, 2007; Kozhevnikova *et al.*, 2009; Malecka *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2015; Ortiz-Luevano *et al.*, 2016). A nivel hormonal se han reportado que el etileno está involucrado en la resistencia a la inhibición por Pb en la longitud de la raíz en *A. thaliana* (Cao *et al.*, 2009); por lo tanto, describir los cambios en la distribución de hormonas como auxinas y citocininas es de gran

interés para poder comprender a nivel fisiológico y molecular el cambio en la arquitectura del sistema radical debido al Pb.

4. Hipótesis

Los cambios morfológicos, fisiológicos y moleculares del sistema radical de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a carencia de fosfato y al estrés generado por plomo comparten mecanismos moleculares.

5. Objetivo general

Caracterizar las respuestas morfológicas, fisiológicas y moleculares del sistema radical frente al estrés generado por el plomo y por la carencia de fosfato en *Arabidopsis thaliana*.

5.1 Objetivos particulares

- Caracterizar la respuesta morfológica de *A. thaliana* frente al estrés por plomo y en carencia de fosfato.
- Caracterizar los cambios del sistema radical relacionados con la respuesta hormonal, identidad celular y actividad mitótica ante el estrés generado por plomo y por carencia de fosfato en *A. thaliana*.

5. Materiales y métodos

5.1 Material vegetal

Se utilizaron semillas de *A. thaliana* de los ecotipos Columbia-0 (Col-0), Landsberg erecta (Ler), Wassilewskija (Ws) y Nossen (Nos). Además se utilizaron semillas de *A. thaliana* mutantes *stop1* (del inglés sensitive to proton rhizotoxicity1), *lpi3* (del inglés low phosphorus insensitive 3) y *lpr1/2* (del inglés low phosphate root 1/2); todas ellas se caracterizan por no presentar raíz primaria corta en estrés por carencia de Pi (Sánchez-Calderón *et al.*, 2006; Svistoonoff *et al.*, 2007; Balzergue

et al., 2017). Además, se utilizaron diferentes líneas marcadoras para evaluar distintos procesos fisiológicos, como son: estrés por carencia de fosfato *pAtPT2::GUS* (Karthikeyan *et al.*, 2002), paso de fase G2 a M en el ciclo celular *CycB1::GFP* (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009), identidad del centro quiescente *WOX5::GFP* (Sarkar *et al.*, 2007), distribución de auxinas *DR5::GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003), transporte polar de auxinas *PIN1::GFP* (Friml *et al.*, 2003) y *PIN2::GFP* (Xu y Scheres, 2005) y distribución de citocininas *TCS::GFP* (Zürcher *et al.*, 2013).

5.2 Condiciones de crecimiento

Las semillas de *A. thaliana* utilizadas se desinfectaron en etanol al 70% durante 5 minutos y después en una solución de cloro comercial al 20% durante 7 minutos; finalmente se enjuagaron 4 veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectadas, las semillas se estratificaron, para ello se colocaron en un tubo cónico de 1.5 mL con agua destilada estéril y se colocaron en oscuridad y frío (4°C) durante 48h.

Una vez estratificadas las semillas se sembraron en medio de cultivo Murashigue y Skoog (MS) 0.1 X, adicionado con 0.68 g/L de ácido morfolino etanosulfónico (MES) que es una sal amortiguadora de pH, y finalmente se ajustó el pH a 5.7. Como fuente de Pb se utilizó $Pb(NO_3)_2$, con excepción del experimento de sustitución de la fuente de Pb donde se utilizó $PbCl_2$. El medio de cultivo rico en nitrógeno (N) fue suplementado con 800 μM de KNO_3 ; para el medio carente de N se utilizó medio de cultivo sin ninguna fuente de nitrógeno. Para los experimentos de respuesta a la concentración de Pi (KH_2PO_4) el medio de cultivo se suplementó con distintas concentraciones de Pi: en los grupos control fue de 500 μM , en los tratamientos de carencia de Pi fue de 1 μM , mientras que en los tratamientos con exceso de Pi la concentración fue de 10 mM. Para evaluar cómo las hormonas están involucradas en la respuesta a Pb, el medio de cultivo fue suplementado con ácido naftalenacético (NAA) una auxina sintética; el ácido naftitalámico (NPA) se usó para reducir el transporte polar de auxinas; y la benziladenina (BA) para los

experimentos de respuesta a las citocininas exógenas. Las cajas petri fueron colocadas en una cámara de crecimiento con una inclinación aproximada de 60° con un fotoperiodo de 16/8 h luz/obscuridad a 20°C.

5.3 Análisis de la arquitectura del sistema radical

Las raíces primarias de las plantas fueron medidas cada tres días, para ello cada tres días se hizo una marca en la parte posterior de las cajas petri en el punto donde el ápice de la raíz se encontraba en ese momento. Pasados doce días post germinación las cajas petri con las plantas fueron fotografiadas. Con base en las marcas sobre la caja petri se midió la longitud de la raíz primaria para los días 0, 3, 6, 9 y 12 post germinación con el software Image J (desarrollado por U.S. National Institutes of Health el cual está disponible en línea <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

La biomasa del sistema radical se evaluó en plantas de doce días post germinación; cada una de las plantas fue separada en dos: la parte aérea y el sistema radical; cada sección se colocó en un tubo cónico de 1.5 mL y fue deshidratada a 60°C. Los tejidos fueron pesados cada 24 h hasta alcanzar un peso constante.

5.4 Análisis *in silico*

El software Geochem-EZ se utilizó con la finalidad de calcular si en el medio MS algunos iones, específicamente el Pi y el Pb, están interactuando entre ellos y formando compuestos insolubles en medio acuoso. En este software se ingresaron todos los iones presentes en el medio MS 0.1X, así como su concentración; se ajustó el pH del análisis a 5.7 y se calculó la formación de precipitados en la solución todo con una astringencia iónica inicial de 0.012 M/L. Finalmente, se programó el software para hacer 50 iteraciones del cálculo de interacción iónica. Una vez establecidas las condiciones se evaluó la interacción iónica entre los componentes del medio MS 0.1X en concentraciones crecientes de Pb (0-1000 µM).

5.5 Análisis histológico

Las plantas de *A. thaliana* de doce días post germinación que portaban al gen reportero GUS fueron incubadas a 37°C por 12 h en la solución de tinción GUS compuesta por buffer de fosfatos 50 mM, EDTA 10 mM, tritón X-100 0.1%, ferrocianuro de potasio y ferricianuro de potasio ambos a 5 mM, cloranfenicol 100 µg/mL y 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-β-D-glucuronido 1 mg/mL (Jefferson *et al.*, 1987). Una vez teñidas se clarearon con un protocolo basado en el descrito por Malamy y Benfey en 1997 cambiando algunos parámetros en las incubaciones (Malamy y Benfey, 1997). Las plantas se incubaron en HCl 0.24 N y metanol 20% a 55°C durante 15 minutos, enseguida se incubaron en una solución de NaOH 7% y etanol 60% a temperatura ambiente durante 20 minutos. Posteriormente las plantas fueron rehidratadas con soluciones de etanol en concentraciones decrecientes (40, 20 y 10%) a temperatura ambiente y con duración de 10 minutos para cada solución. Finalmente, las plantas se incubaron 12 h en una solución de glicerol 50% y se montaron en laminillas con glicerol 50%. Las laminillas se fotografiaron en un microscopio de campo claro Leica DM 1000.

Las plantas que portan el gen reportero GFP se fijaron en una laminilla con 1.0 mg/mL de yoduro de propidio y fotografiadas en un microscopio confocal Olympus FV1000. Para detectar la fluorescencia del yoduro de propidio se utilizó una longitud de onda de excitación de 568 nm y una ventana de emisión de 585-610 nm, mientras que para la detección de fluorescencia del GFP se utilizó una longitud de onda de emisión de 488 nm y una ventana de excitación de 500-523 nm.

5.6 Análisis de acidificación del medio de cultivo

Para evaluar si el sistema radical podía cambiar el pH de su entorno se modificó el protocolo de Römheld de 1984. Las plantas se colocaron plantas de 12 días postgerminación en cajas petri con medio MS 0.1 X sin MES (amortiguador de pH), se ajustó el pH a 7, el medio se suplementó con Pb o Pi según cada tratamiento y se agregó un indicador de pH, el púrpura de bromocresol, que se

preparó al 0.04% disuelto en NaOH 16 mM. Las plantas estuvieron en este medio de cultivo durante 24h y posteriormente fueron fotografiadas.

5.7 Cuantificación de fosfato en el tejido vegetal

Las plantas de 12 días post germinación fueron colectadas en tubos de polipropileno y deshidratadas a 60°C hasta alcanzar un peso constante. Las plantas fueron digeridas en HCl 2 M a 500°C, y posteriormente cada muestra fue mezclada con una solución cromogénica de vanadato-molibdato (Holford, 1997). El contenido total de Pi fue determinado en un espectrofotómetro Jenway 7305 a 420 nm de longitud de onda.

5.8 Análisis estadístico

Para cada grupo se calculó el error estándar de la media (SEM del inglés “Standard Error of the Mean”) y en las gráficas se muestra como barra de error. Tanto para los experimentos de cuantificación de LRP, DRL, biomasa y fluorescencia relativa, la diferencia significativa entre los grupos se evaluó mediante el análisis de varianzas de una vía (ANOVA) con un valor de significancia de 5% ($p=0.05$). Para los tratamientos en que hubo diferencia significativa entre uno o más grupos fue necesario analizar los datos con una prueba de Tukey.

6. Resultados

6.1 Caracterización de la respuesta de *A. thaliana* en medio suplementado con Pb

En el sistema radical, la plasticidad fenotípica confiere la capacidad de adaptarse a la hostilidad ambiental, ya sea por búsqueda de recursos o para evitar condiciones adversas (Lynch, 1995). El Pb es un elemento tóxico que se acumula con abundancia en el suelo (15-50 ppm) y que en sitios con actividad antropogénica se puede acumular hasta en 1000 ppm (Sharma y Dubey, 2005). La presencia de este contaminante afecta directamente la integridad de las plantas, y en zonas de cultivo genera reducción en la cosecha del 12 al 43% (Zulfiqar *et al.*,

2019). El Pb ocasiona cambios en la ASR, principalmente porque el SR es el órgano que está en contacto directo con el suelo. Por lo tanto, la caracterización a detalle de los cambios en la ASR frente a estrés por Pb es indispensable para poder establecer vínculos entre los cambios en el SR y la expresión genética.

6.1.1 El Pb modifica la ASR

Para evaluar el efecto del Pb sobre el SR se llevó a cabo una cinética en medio MS 0.1 X suplementado con concentraciones crecientes de Pb, desde 0 hasta 1000 μM (Figura 1). En el rango de 0 a 400 μM de Pb longitud de la raíz primaria (LRP) no disminuyó respecto al grupo control, pero en concentraciones superiores a 400 μM comenzó a disminuir de manera proporcional al incremento de la concentración de Pb, mientras que la densidad de las raíces laterales (DRL) aumentó en el tratamiento de 800 μM y tuvo su menor valor de LRP y DRL en 1000 μM (Figura 1 A y B). Además, en esta cinética se encontró que en concentraciones de 200 μM de Pb la raíz primaria era un poco más larga que el grupo control y para poder describir este fenómeno con mayor detalle se evaluó la LRP en una cinética con concentraciones crecientes de Pb con intervalos de 25 μM que van desde 0 hasta 200 μM (Figura 1 C). En esta cinética se evidenció que el Pb produce hormesis, un fenómeno en el cual a bajas concentraciones de una sustancia tóxica (en este caso el Pb) se induce el desarrollo en mayor proporción que el grupo control (Figura 1 C). Estos resultados nos muestran que el Pb induce una respuesta bifásica sobre la LRP: por un lado, la promoción de la longitud en concentraciones menores a 200 μM y, por otra parte, una reducción de la LRP en concentraciones mayores a 400 μM de Pb. Además, la DRL aumentó solo en 800 μM de Pb. Esta respuesta bifásica además de encontrarla en el ecotipo Col-0 también se presenta en los ecotipos Col-0, Ler, Noss y Ws (Figura 2). Si bien el fenómeno de hormesis es interesante, a nuestro equipo de trabajo le llamó la atención profundizar en el fenotipo desarrollado en el sistema radical (SR) de las plantas desarrolladas en medio de cultivo suplementado con 800 μM de Pb, ya que es en esta concentración que se presenta en un mismo SR inhibición del desarrollo en la raíz primaria y promoción en la formación de raíces laterales, lo

cual nos indica una diferencia en la sensibilidad hacia el Pb entre ambos tipos de raíces.

La fuente de Pb que se utilizó en los experimentos fue nitrato de plomo [Pb(NO₃)₂] por lo cual decidimos hacer algunos experimentos cambiando la fuente de Pb para asegurar que la adición al medio de cultivo del catión Pb⁺² es lo que modifica la arquitectura del sistema radical (ASR) y no la adición del anión NO₃⁻. Para ello se agregó al medio de cultivo 800 μM nitrógeno de una fuente diferente (KNO₃) para evaluar el efecto del anión NO₃⁻, la LRP no disminuyó en este tratamiento como se observó en el tratamiento con Pb(NO₃)₂; esto nos indica que el exceso de NO₃⁻ a la concentración utilizada no genera cambios en la ASR (Figura 1 D). También se evaluó la repuesta del SR en medio carente de nitrógeno, que posteriormente fue suplementado con dos fuentes de nitrógeno diferentes; Pb(NO₃)₂ 800 μM y nitrato de amonio (NH₄NO₃), de tal manera que la suma de la concentración de nitrógeno de ambas sales fuera idéntica a la concentración de nitrógeno del grupo control; en este caso la LRP disminuyó respecto al grupo control, lo que evidencia que el Pb es el componente efector en los cambios de la ASR. Finalmente, para evaluar directamente el efecto del catión Pb⁺² se comparó la respuesta entre 800 μM de Pb(NO₃)₂ y 800 μM de otra sal de Pb (PbCl₂), se obtuvieron resultados similares en los valores de la LRP (Figura 1 D). Lo anterior sustenta que el Pb es el componente responsable de los cambios en la ASR en *A. thaliana*.

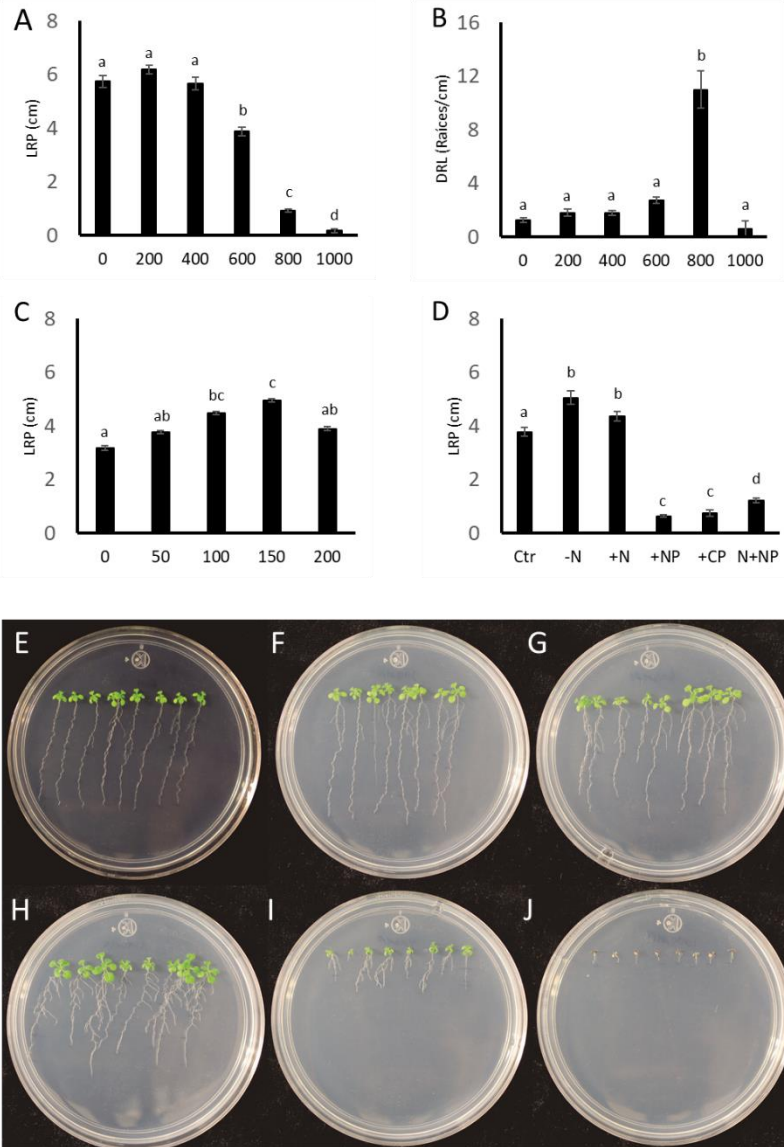


Figura 1. El plomo induce cambios en la arquitectura del sistema radical. Se evaluaron los cambios a los 12 días post germinación de plántulas de *A. thaliana*. (A) Longitud de la raíz primaria (LRP) en diferentes concentraciones de Pb. (B) Densidad de raíces laterales (DRL) en diferentes concentraciones de Pb. (C) Efecto de hormesis sobre la LRP en concentraciones menores a 200 μM de Pb. (D) Efecto del ion Pb sobre la LRP, tratamiento control (Ctr), tratamiento en carencia de nitrógeno (-N), tratamiento con 800 μM de nitrato de potasio (+N), tratamiento con 800 μM de nitrato de plomo (+NP), tratamiento con 800 μM de cloruro de plomo (+CP) y tratamiento con nitrato de amonio más nitrato de plomo (N+NP). Imágenes representativas con diferentes concentraciones de Pb (E) 0, (F) 200, (G) 400, (G) 600 (H), (I) 800 y (J) 1000 μM. Los experimentos se hicieron por triplicado, n=12. ± error estándar.

6.1.2 El plomo regula negativamente la expresión de *AtPT2*

El fenotipo evocado por el Pb en el SR de *A. thaliana* también se presenta en otras condiciones de estrés, por ejemplo algunos MPs como el Cr, Cu y Al, pero también por otras condiciones nutrimentales como la carencia de Pi (Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2007; Ruíz-Herrera y López-Bucio, 2013; Yuan *et al.*, 2013). La similitud en el fenotipo entre la respuesta de Pb y otros MPs se puede deber a que tienen naturaleza similar y podrían estar regulados por algunos mecanismos moleculares en común. Sin embargo, llama la atención la similitud entre el fenotipo del SR en presencia de Pb y la carencia de Pi, porque en principio son factores estresantes de distinta naturaleza. No obstante, se ha descrito que el exceso de Pi ayuda a disminuir la toxicidad del Pb en suelos agrícolas debido a la coprecipitación de ambos compuestos (Zeng *et al.*, 2017). Lo anterior nos hace suponer que puede existir una interacción entre el Pb añadido al medio de cultivo y el Pi presente en el medio MS, de tal manera que el Pb precipite junto con el Pi y reduzca la biodisponibilidad de este nutriente, generando un cambio en la ASR en respuesta a la carencia del Pi y no por la actividad del Pb.

Con el objetivo de diferenciar la respuesta a la carencia de Pi o a la presencia de Pb, nos propusimos caracterizar el fenotipo de *A. thaliana* en condiciones de carencia de Pi y suplementado con Pb para reportar las diferencias o similitudes en el fenotipo evocado en cada una de estas condiciones estresantes; primeramente, se caracterizaron la LRP y la DRL (Figura 3). Encontramos que en ambas condiciones la disminución de la LRP y la promoción de la DRL son similares entre ambos factores estresantes, por lo que con estos parámetros evaluados es difícil concluir si el Pb y la carencia de Pi son factores estresantes diferentes que convergen en una misma respuesta o si el Pb está evocando una respuesta clásica de carencia de Pi (Figura 3).

Para resolver la incógnita de la interacción entre el Pb y el Pi en el medio de cultivo se hizo un análisis *in silico* que nos permitió calcular la interacción entre todos los iones presentes en el medio MS 0.1X.

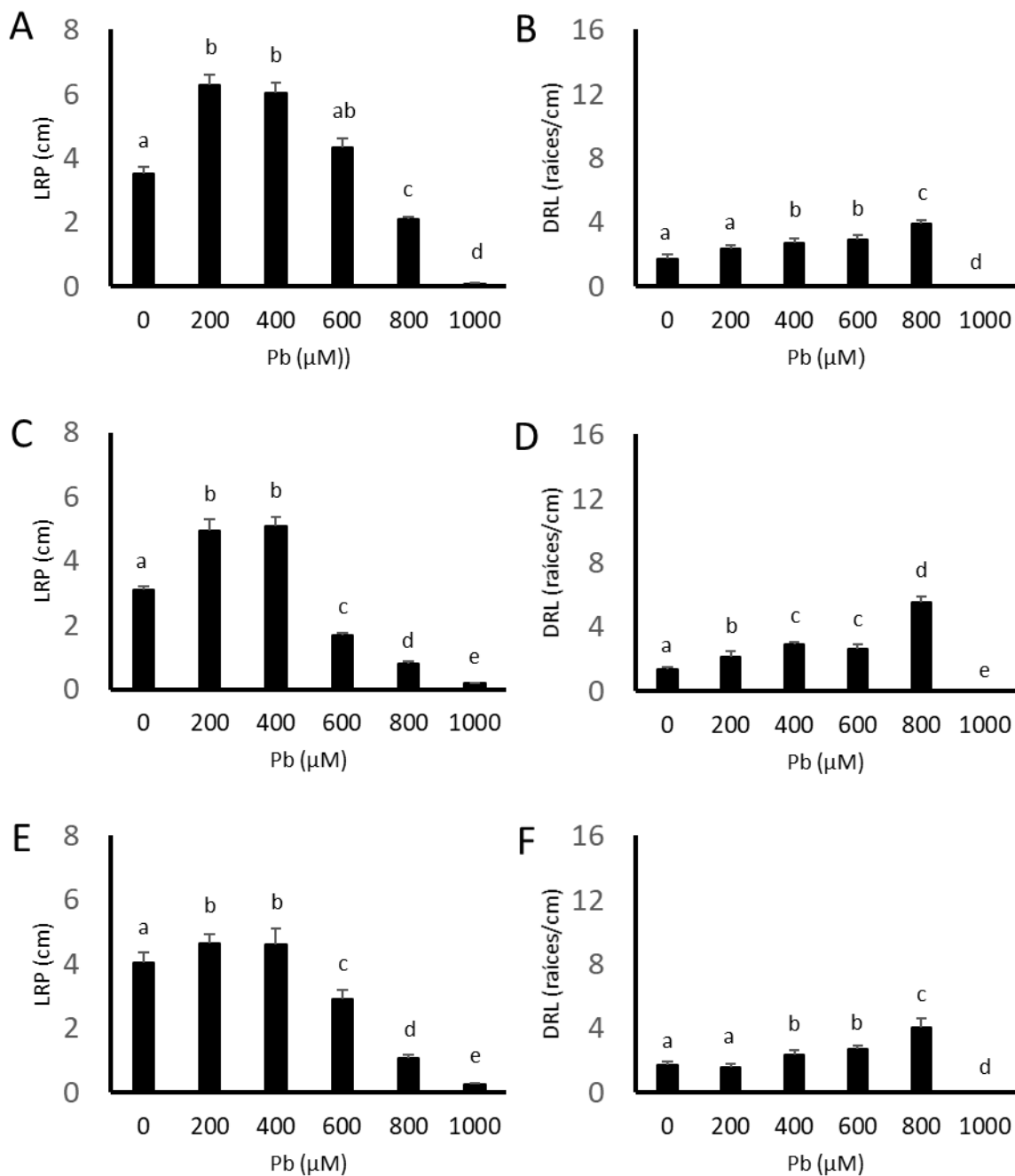


Figura 2. Efecto del plomo en la ASR de algunos ecotipos de *A. thaliana*. Se evaluaron los cambios morfológicos a los 12 días post germinación de plántulas de *A. thaliana*. (A, C y E) Longitud de la raíz primaria (LRP) en diferentes concentraciones de Pb. (B, D y F) Densidad de raíces laterales (DRL) en diferentes concentraciones de Pb. Se evaluaron diferentes ecotipos de *A. thaliana*, (A y B) Landsberg erecta, (C y D) Nossen y (E y F) Wassilewskija. Los experimentos se hicieron por triplicado, n=12. \pm error estándar.

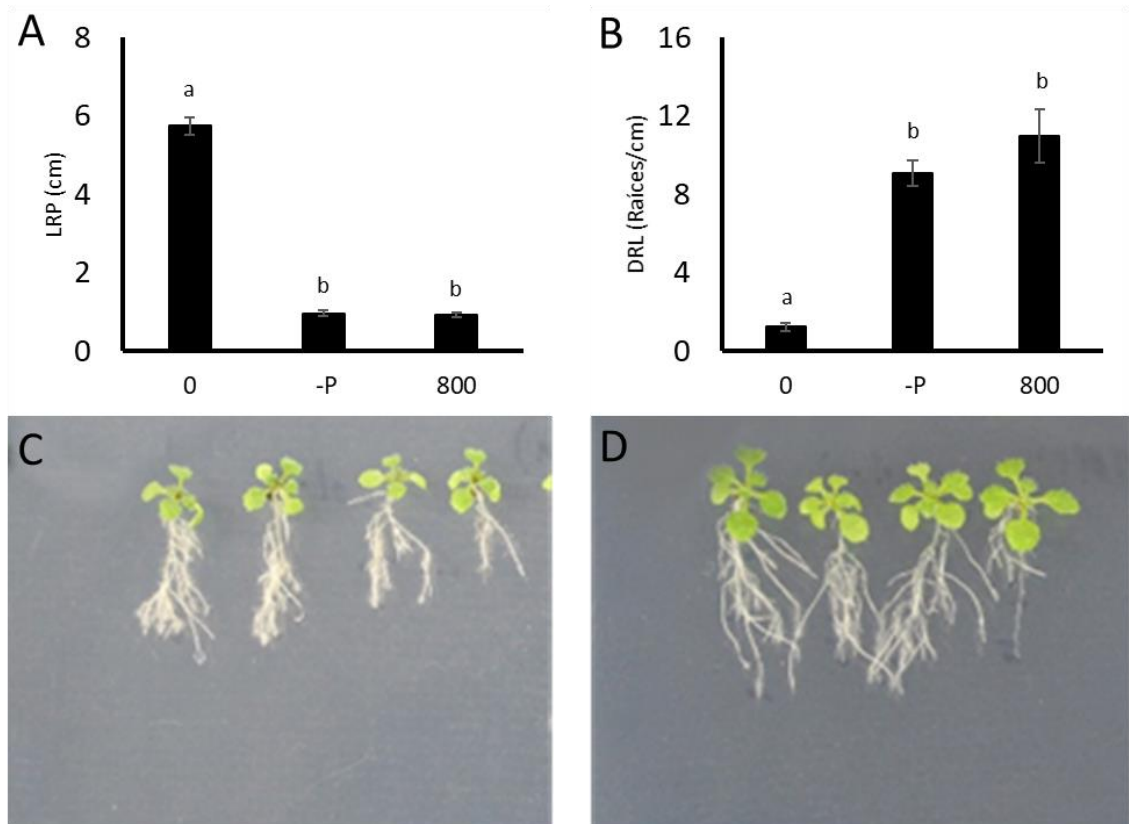


Figura 3. El plomo y la carencia de fosfato inducen cambios similares en la arquitectura del sistema radical. Se evaluaron los cambios morfológicos en el sistema radical de *A. thaliana*. (A) Longitud de la raíz primaria (LRP) en carencia de fosfato (-Pi) y con 800 μM de plomo (Pb). (B) Densidad de raíces laterales (DRL) en carencia de fosfato (-Pi) y con 800 μM de plomo (Pb). (C) Imagen representativa de plántulas en carencia de fosfato. (D) Imagen representativa de plántulas en medio suplementado con 800 μM de plomo. Los experimentos se hicieron por triplicado, $n=12$. \pm error estándar.

Como resultado del análisis se encontró que la biodisponibilidad del Pi disminuye de manera directamente proporcional a la adición de Pb en el medio de cultivo, hasta llegar a 0.8 μM de Pi disponible en el tratamiento de 500 μM de Pb añadido (Tabla 1). En los tratamientos de 600 a 1000 μM de Pb, la concentración de Pi soluble se presenta poca variación y se mantiene entre 2.2 y 0.6 μM , mientras que la solubilidad del Pb aumenta drásticamente desde 102 hasta 341.7 μM . En el tratamiento donde el medio de cultivo fue suplementado con 800 μM de Pb la biodisponibilidad del Pi era poca (0.8 μM) y el Pb soluble fue de 201.4 μM , lo que nos sugiere que efectivamente el Pb y el Pi pueden precipitar en el medio de cultivo (Figura 5 A). Por lo tanto, de acuerdo con el análisis *in silico* (Tabla I y

Figura 5 A) el tratamiento con Pb está generando estrés en el SR por la presencia del Pb soluble (201.4 μM) y por la carencia de Pi (0.8 μM).

Tabla 1. Análisis *In silico* de la precipitación del plomo y el fosfato en medio MS 0.1 X

Pb en el medio de cultivo (μM)	Pi soluble (μM)	Pb Soluble (μM)
0	500.0	0
100	407.0	9.2
200	309.5	9.5
300	210.1	10.1
400	111.25	11.2
500	20.05	19.9
600	2.2	102.1
700	1.1	171.8
800	0.85	201.04
900	0.75	264.8
1000	0.60	341.7

GeoChem-EZ, pH=5.7, 50 iteraciones

Las plantas tienen la capacidad de modificar el ambiente circundante al SR para hacer más eficiente la toma de algunos nutrientes. En el caso de carencia de Pi, se ha descrito que a través de las raíces se exudan ácidos orgánicos, fosfatasas y nucleasas que permiten solubilizar el Pi del entorno y además aumentar la transcripción de los genes que codifican para transportadores de fosfato de alta afinidad (*AtPHTs*) que permiten a la raíz tomar de manera más eficiente el Pi de la rizósfera (Raghothama, 1999; Karthikeyan *et al.*, 2002). Debido a lo anterior utilizamos plantas que portan la construcción *pAtPT2::GUS* y evaluamos el patrón de distribución e intensidad de la tinción de GUS en el ápice de la raíz a diferentes concentraciones de Pi con el objetivo de determinar la concentración de Pi

suficiente para inducir la expresión del gen *AtPT2* (*AtPHT1;4*), encontramos que la actividad de *AtPT2* es mayor en las concentraciones menores a 20 μM de Pi mientras que en concentraciones mayores a 70 μM de Pi la expresión disminuye drásticamente limitándose a solo algunas regiones en la zona apical del meristemo y perdiendo la expresión al ser suplementado con 100 μM de Pi (Figura 4).

Por lo anterior, evaluamos si en condiciones con medio suplementado con 800 μM de Pb las plantas presentaban signos de estrés por carencia de Pi; para ello hicimos uso de la línea marcadora *pAtPT2::GUS* (Karthikeyan *et al.*, 2002). Evaluamos el grupo con Pi óptimo (500 μM de Pi), el grupo con carencia de Pi (1 μM de Pi) y el grupo con Pb (800 μM de Pb y 500 μM de Pi). Como era de esperarse, en el medio Pi óptimo la expresión del gen reportero *GUS* fue mínima (Figura 5 C) y en el grupo con carencia de Pi la actividad del gen reportero *GUS* fue evidente (coloración azul intensa) en todo el ápice de la raíz lo que nos indica que el valor de 1 μM de Pi fue suficiente para inducir una respuesta clásica por estrés en carencia de Pi (Figura 5 D). En el tratamiento con 800 μM de Pb la expresión del gen reportero *GUS* fue menor respecto al grupo con carencia de Pi (Figura 5 E). Lo que nos sugirió que el ápice de la raíz no está respondiendo a la carencia de Pi. Para evidenciar si esta disminución en la expresión de *pAtPT2::GUS* en los ápices de las raíces de las plantas creciendo en el medio adicionado con Pb se debe a que no se induce la respuesta fisiológica a la carencia de fósforo se cuantificó el porcentaje de Pi en el tejido vegetal en el grupo control (500 μM de Pi y 0 μM de Pb), carencia de Pi y 800 μM de Pb (Figura 5 B). Encontramos que la mayor concentración de Pi fue en el grupo control con 2.49 % mientras que el tratamiento con carencia de Pi y presencia de Pb el valor fue bajo (0.42 y 0.14 % respectivamente), lo anterior nos indica que las plantas no están tomando el Pi en tratamientos con 800 μM de Pb probablemente debido a la coprecipitación entre Pb y Pi tal como se había mostrado en la predicción *in silico*. Aunque las plantas en tratamiento con 800 μM de Pb se encuentran en estrés por carencia de Pi, la expresión de *pAtPT2::GUS* fue mucho menor que el tratamiento con carencia de Pi, lo cual nos indica que el Pb presente en el medio regula

negativamente la expresión de *AtPT2* lo cual reduce aún más la acumulación de Pi en la planta.

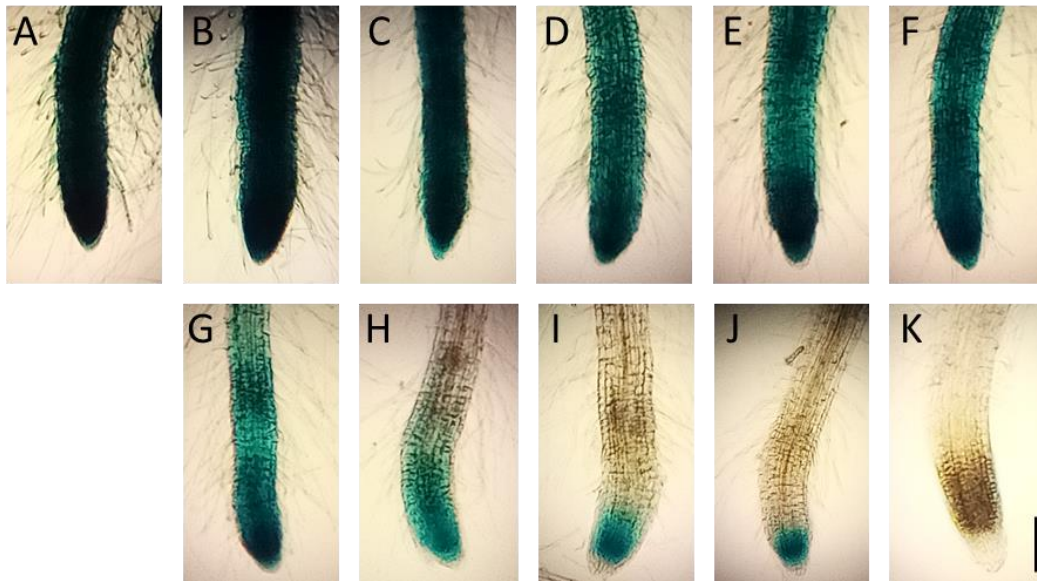


Figura 4. La expresión de *AtPT2* es inducible por la carencia de Pi. Para evidenciar la expresión del gen *AtPT2* se utilizaron plántulas con la construcción *pAtPT2::GUS* (A-K) en medio suplementado con diferentes concentraciones de Pi 1 (A), 10 (B), 20 (C), 30 (D), 40 (E), 50 (F), 60 (G), 70 (H), 80 (I), 90 (J) y 100 (K) μ M de Pi. La barra de escala representa 100 μ m. Los experimentos se hicieron por triplicado, n=8.

6.1.3 El estrés por Pb y por carencia de Pi comparten una vía de señalización dependiente de los genes *LPR1/2* y *LPI3*

La similitud en la ASR evocada por el estrés por Pb y por carencia de Pi, así como la coprecipitación que limita la biodisponibilidad de ambos compuestos, dificulta separar la respuesta de la planta al estrés por este MP y por este macronutriente, lo cual hace suponer que ambos factores estresantes podrían compartir algunos mecanismos de señalización que derivan en un fenotipo similar.

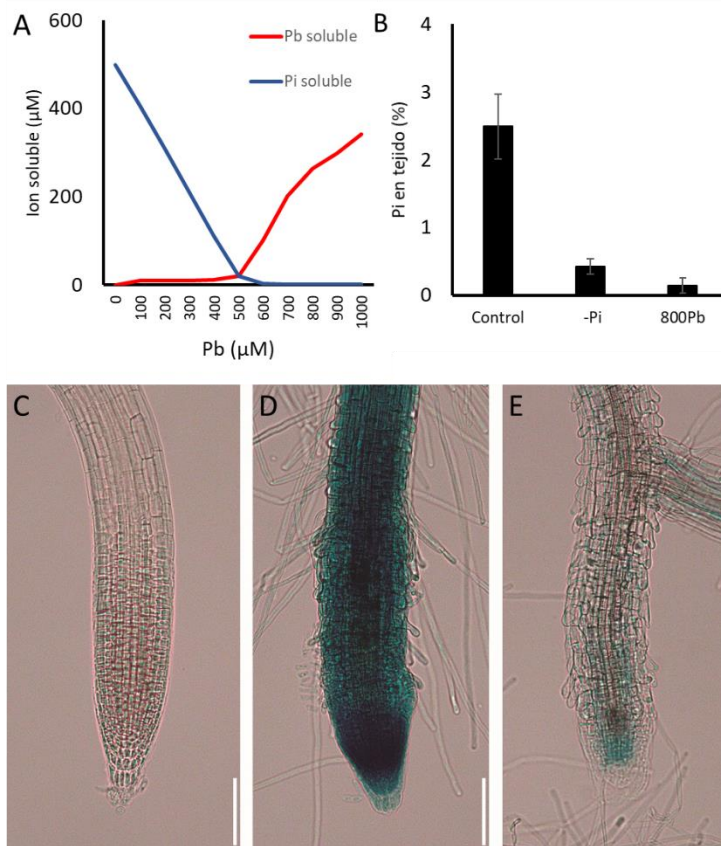


Figura 5. El plomo regula negativamente la expresión de *AtPT2*. Se evaluaron los cambios morfológicos en el sistema radical de *A. thaliana*. (A) Análisis *in silico* de solubilidad de fosfato (Pi) y plomo (Pb) en medio MS 0.1X es adicionado con distintas concentraciones de Pb. (B) Concentración de Pi en tejido vegetal en tratamiento control (0 μM de Pb y 500 μM de Pi) , carencia de fosfato (-Pi) y 800 μM de plomo (800 Pb). (C-D) Imágenes representativas de plántulas con la construcción *pAtPT2::GUS*. (C) grupo control, (D) carencia de fosfato y (E) 800 μM de plomo. Los experimentos se hicieron por triplicado, n=12 ± error estándar.

Con la finalidad de obtener mayor información y describir si la respuesta evocada por el estrés en presencia de Pb y por carencia de Pi comparten alguna vía de señalización, utilizamos un grupo de mutantes que se caracterizan por ser insensibles a la carencia de Pi, en medio carente de Pi las raíces continúan su crecimiento similar al grupo control (plantas en medio con Pi suficiente). Estas mutantes presentan una mutación de carencia de función en genes relacionados con dos de las vías de señalización descritas ante la respuesta a Pi: ALMT1-STOP1 y PDR2-LPR1. El desarrollo del SR de estas mutantes (*lpi3*, *lpr1/2* y *stop1*) fue evaluado en medio con concentraciones suficientes de Pi (control 500 μM de

Pi), carencia de Pi (1 μ M de Pi) y en presencia de Pb (800 μ M de Pb y 500 μ M de Pi). Cuando las mutantes crecieron en medio de cultivo con Pi suficiente y carencia de Pi presentaron un SR pivotante con pocas raíces laterales mientras que en el tratamiento con Pb se obtuvieron dos diferentes respuestas: las mutantes *lpi3* y *lpr1/2* presentaron una raíz primaria larga y pocas raíces laterales, y aunque el Pb no redujo la LRP si evocó un cambio en el ángulo de crecimiento de las raíces primarias (Figura 6 B, E y H). Por otra parte, la mutante *stop1* presentó un SR ramificado con raíz primaria corta y aumento en la DRL similar al tipo silvestre (Figura 6 B y K). Lo anterior indica que la disminución en la LRP y el aumento en la DRL en respuesta al Pb está regulada genéticamente por *lpi3* y *lpr1/2* mientras que es independiente de *stop1*. En este contexto, el estrés por Pb y el estrés por carencia de Pi comparten una de las dos rutas descritas para el estrés por Pi que ocasionan la disminución en la LRP (la vía PDR2-LPR1).

El Pi insoluble puede ser solubilizado por un cambio en el pH de la rizosfera, los cambios en la ASR junto con la secreción de ácidos orgánicos son una de las respuestas ante la carencia de Pi y también frente a la presencia de Pb. . Para evidenciar la secreción de ácidos orgánicos, se colocaron las plantas de 12 días postgerminación en medio MS control, con carencia de Pi y con Pb adicionado con un indicador de pH (púrpura de bromocresol) que en un pH por debajo de 5.7 el color es amarillo y un pH superior de 6.7 el color es púrpura: se encontró que tanto el tipo silvestre como las mutantes insensibles a Pi (*lpi3*, *lpr1/2* y *stop1*) mostraron acidificación del entorno del SR en medios con carencia de Pi y en presencia de Pb. Lo anterior nos sugiere que el estrés por Pb y por la carencia de Pi inducen acidificación del entorno del SR lo que puede abonar a la solubilización de Pi y Pb. Además, se destaca que en diferentes sistemas radicales como el ramificado (WT y *stop1*) y el pivotante (*lpi3* y *lpr1/2*) la acidificación del entorno se lleva a cabo, lo que nos indica que la respuesta de acidificación es independiente al tipo de sistema radical (Figura 7).

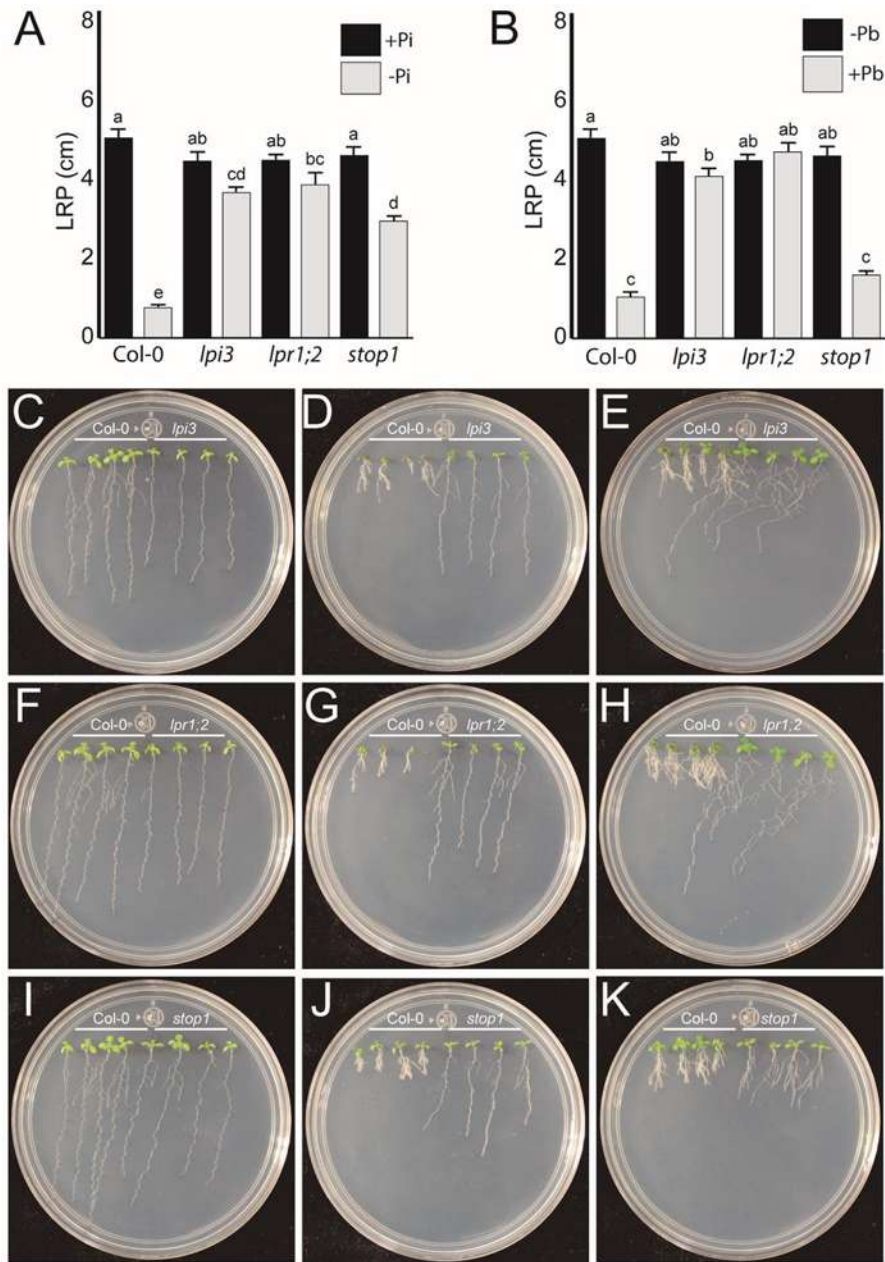


Figura 6. La disminución en la longitud de la raíz primaria en respuesta a plomo es dependiente de *LPI3* y *LPR1/2*. Se evaluaron plántulas a los 12 dpv en medio mes con o sin Pi o Pb. (A) Longitud e la raíz primaria de las mutantes *lpi3*, *lpr1/2* y *stop1* y tipo silvestre Col-0 en medio de cultivo con Pi suficiente (500 μ M) color negro y en carencia de Pi (1 μ M) color gris. (B) Longitud e la raíz primaria de las mutantes *lpi3*, *lpr1/2* y *stop1* y tipo silvestre Col-0 en medio de cultivo sin Pb (0 μ M) color negro y suplementado con Pb (800 μ M) color gris. (C-K) Imágenes representativas de los tratamientos, en las cajas petri las cuatro plantas del lado izquierdo son Col-0 y las cuatro plantas del lado derecho son mutantes insensibles a carencia de Pi. (C, D y E) *lpi3*, (F, G y H) *lpr1/2* y *stop1* (I, J y K). Tratamiento control (C, F, I), carencia de fosfato (D, G, J) y 800 μ M de Pb (E, H, K). Los experimentos se hicieron por triplicado, n=12 \pm error estándar.

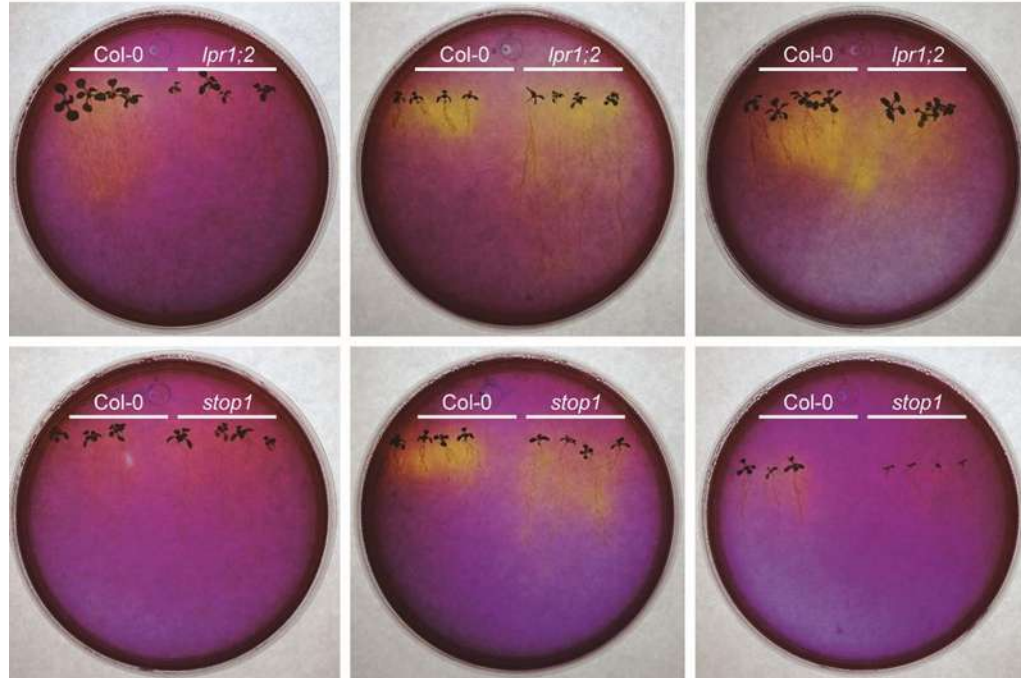


Figura 7. El estrés por carencia de fosfato y por adición de plomo inducen acidificación del medio de cultivo. Se evaluó la acidificación del medio de cultivo en plantas de 12 dpg desarrolladas en medio MS 0.1X (A y D), en carencia de Pi (B y E) y en medio suplementado con Pb (C y F). Se evaluó el ecotipo silvestre Col-0 en todas las cajas petri y las mutantes *lpr1/2* (A, B y C) y *stop1* (D, E y F). Los experimentos se hicieron por triplicado, n=12.

Se ha descrito que la disminución en la LRP en respuesta a la carencia de Pi es dependiente del pH del medio, es necesario tener un pH inferior a 6.2 para que la respuesta a carencia de fosfato se vea reflejada en la ASR, mientras que a pH por encima de 6.2 la respuesta del SR a la carencia de Pi no se presenta, principalmente porque a este pH la enzima LPR1/2 no está activa (Svistoonoff *et al.*, 2007). Esta característica nos permite regular bioquímicamente la actividad de la enzima LPR1/2, por lo cual decidimos evaluar a diferentes pH la LRP frente a estrés por Pb, esto con la finalidad de completar la información molecular obtenida de la participación de el gen *lpr1/2* en la respuesta a Pb. Para ello además del estrés por carencia de Pi evaluamos el estrés en el medio suplementado con 800 μ M de Pb a pH de 4, 5, 5.7, 6 y 7. Encontramos que la disminución en la LRP no se presenta en pH de 6 y 7 a pesar de la presencia de Pb (Figura 8 A y J) lo cual indica que el Pb no reduce la LRP por toxicidad, sino que esta regulada por la actividad de la enzima LPR1/2.

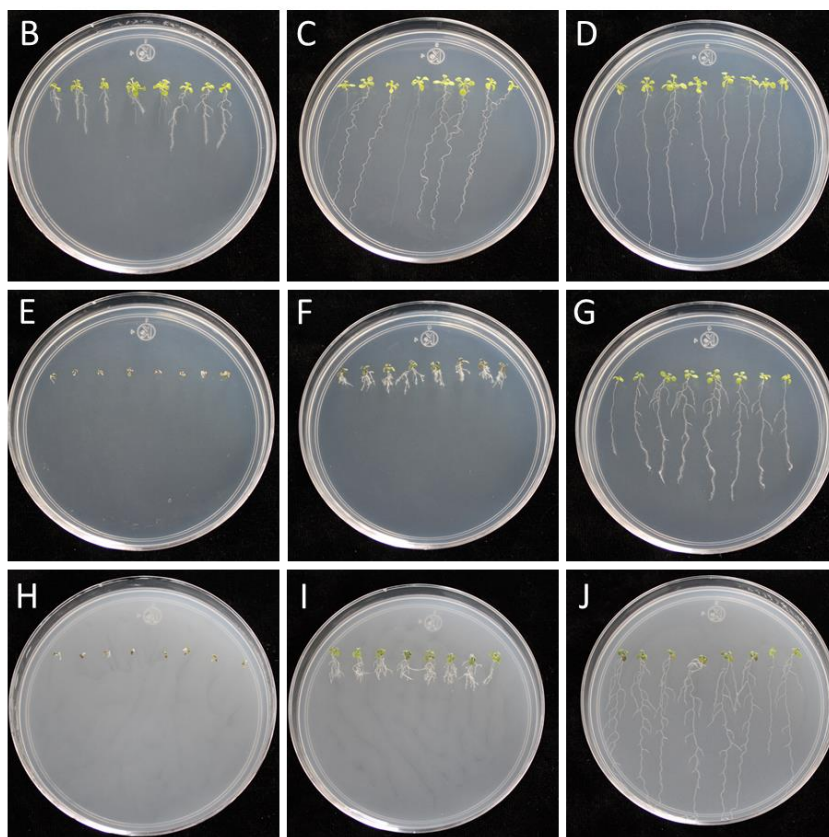
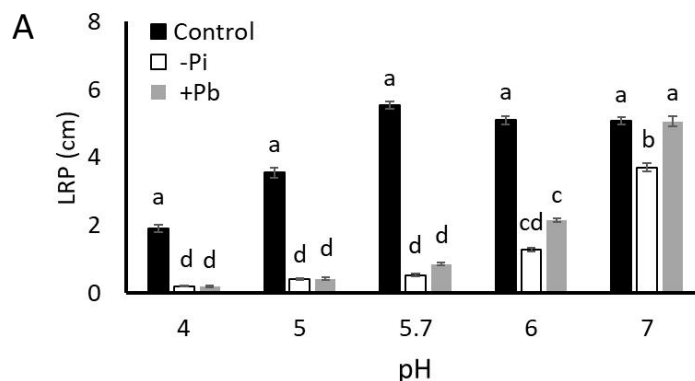


Figura 8. La disminución en la longitud de la raíz primaria en respuesta a plomo es dependiente del pH. Se evaluaron plántulas a los 12 dpv en medio mes con o sin Pi o Pb. (A) Longitud e la raíz primaria a diferente pH 4, 5, 5.7, 6 y 7 en medio de cultivo con Pi suficiente (500 μ M) color negro, en carencia de Pi (1 μ M) color blanco y en presencia de Pb (800 μ M). Imágenes representativas (B-J), Control (B, C y D), en carencia de Pi (E, F y G) y suplementado con Pb (H, I y J). Evaluados a diferente pH 4 (B, E y H), pH 5.7 (C, F y I) y pH 7 (D, G y J). Los experimentos se hicieron por triplicado, $n=12 \pm$ error estándar.

6.1.4 La concentración de Pi regula ASR en estrés por Pb

Puesto que el estrés por carencia de Pi y el estrés por Pb comparten al menos dos rutas de señalización que son dependientes de *lpi3* y *lpr1/2*, decidimos describir cómo la concentración del Pi influye en el efecto del Pb sobre el SR. Para ello se colocaron plantas de *A. thaliana* en medio de cultivo con carencia de Pi y con exceso de Pi que fueron suplementados con Pb.

Las plantas que crecieron en medio de cultivo con carencia de Pi (1 μM) y 800 μM de Pb no germinaron sugiriendo que el Pb fue más tóxico en carencia de Pi. Por lo tanto, la concentración de Pb se redujo y las plantas se colocaron en medio con carencia de Pi suplementado con Pb (0-200 μM) en concentraciones crecientes en intervalos de 25 μM : encontramos que la LRP disminuyó proporcionalmente al incremento en la concentración de Pb en el medio de cultivo, hasta llegar a una inhibición de 100% en concentraciones mayores a 125 μM de Pb (Figura 9 A). Los resultados anteriores nos indican que la toxicidad del Pb es dependiente de la concentración del Pi que se encuentra en el medio de cultivo, de tal manera que entre menos Pi presente el Pb es más tóxico. Sin embargo, el comportamiento dosis-dependiente de la concentración de Pb y la reducción de la LRP se mantiene con la misma tendencia, y solamente la concentración letal de Pb cambia en función del Pi presente en el medio de cultivo.

Con los resultados anteriores, se evidenció que el Pi es un macronutriente involucrado directamente en el efecto que tiene el Pb sobre el SR. Para poder complementar la descripción de la relación entre la concentración de Pi y la toxicidad por Pb, decidimos ahora suplementar el medio de cultivo con exceso de Pi (0.5 – 10 mM) y con Pb (800 μM) para evaluar los cambios del SR.

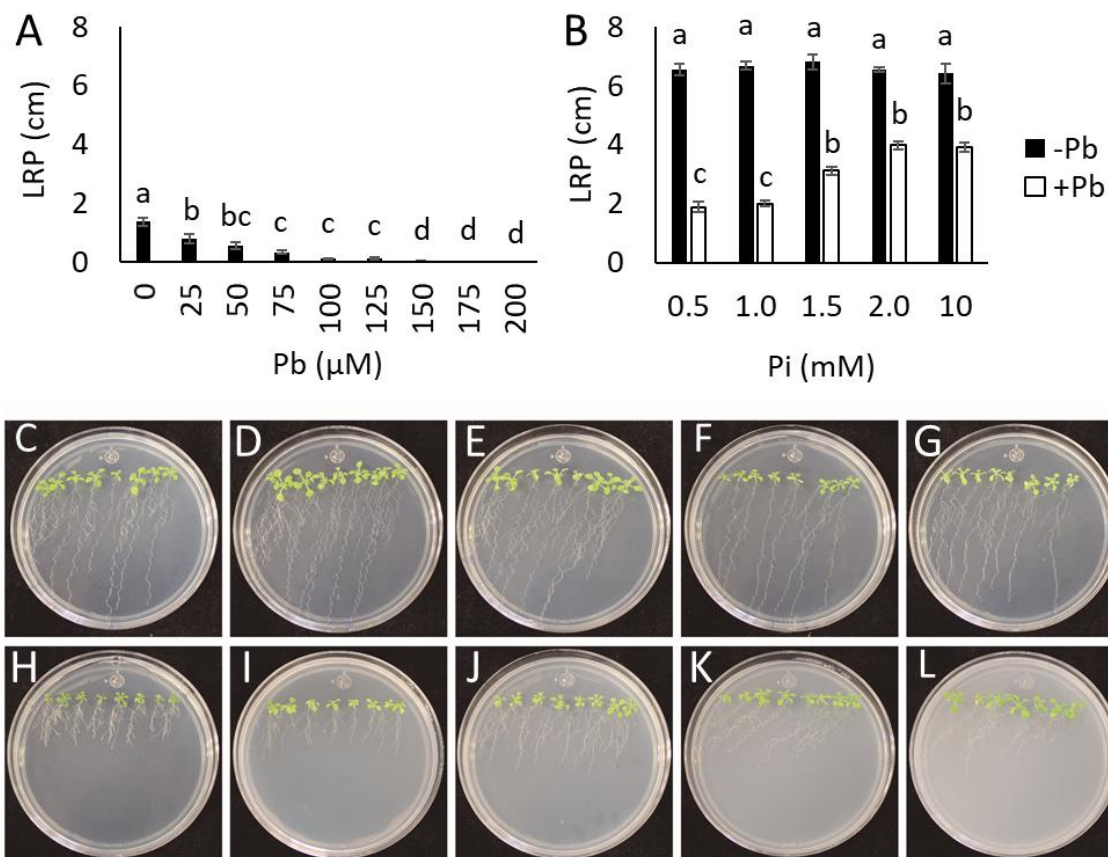


Figura 9. El efecto del plomo en el sistema radical es dependiente de la concentración de fósforo en el medio de cultivo. Se evaluaron plántulas a los 12 dpv en medio MS 0.1 X con o sin Pi o Pb. (A) Longitud de la raíz primaria de plantas desarrolladas en medio con carencia de fósforo (1 µM) y en concentraciones crecientes de Pb desde 0 hasta 200 µM. (B) Longitud de la raíz primaria de plantas desarrolladas en medio con exceso de fósforo (0.5 – 10 mM) suplementado con Pb (800 µM). (C-L) Imágenes representativas de las plantas desarrolladas en exceso de fósforo. (C – G) Sin Pb, (H – L) Con Pb. (C y H) 0.5 mM de Pi, (D y I) 1.0 mM de Pi, (E y J) 1.5 mM de Pi, (F y K) 2.0 mM de Pi y (G y L) 10 mM de Pi. Los experimentos se hicieron por triplicado, n=12 ± error estándar.

Encontramos que el Pi reduce el efecto que el Pb tiene en el SR. Anteriormente habíamos descrito que la LRP en presencia de Pb (800 µM) se reduce aproximadamente a 1 cm a los 12 dpv; sin embargo, al aumentar la concentración de Pi en el medio de cultivo la LRP no se disminuyó en la medida que lo hacía con solo 0.5 mM de Pi (Figura 9 B). A pesar de que la concentración de Pi es casi 10 veces mayor que la concentración de Pb, el efecto de este metal sobre la LRP no

fue eliminado del todo, pues aún en la máxima concentración de Pi (10mM) la LRP fue 60% del valor del grupo control (sin Pb). Además del efecto sobre la LRP, se encontró que en medio suplementado con Pb y exceso de Pi el eje gravitrópico de la raíz primaria cambió y todas las plantas dirigieron el crecimiento de la raíz primaria 31° hacia la izquierda de la caja petri (Figura 9 K y L).

En conjunto, los datos obtenidos nos indican que el Pi puede regular el efecto que el Pb genera sobre el SR. A bajas concentraciones de Pi el Pb es más tóxico, mientras que en altas concentraciones de Pi el Pb tiene menos efectos sobre el SR, pero aún en la concentración máxima el Pb puede seguir generando cambios en el SR.

6.2 Cambios fisiológicos en el ápice de la raíz primaria respuesta a Pb

Los cambios en el SR en respuesta al ambiente tienen como intermediarios a las hormonas, las cuales funcionan como señalizadoras y reguladoras de la expresión genética que induce cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos en el SR. Con el objetivo de profundizar en la respuesta fisiológica a Pb, evaluamos la identidad celular del QC, la tasa de división celular, la actividad de las auxinas y las citocininas en respuesta a Pb.

6.2.1 El Pi y el Pb regulan la actividad meristemática

El incremento en la longitud de una raíz se debe principalmente a la división celular en la zona meristemática y al crecimiento longitudinal en la zona de elongación. En el caso del estrés por Pi se ha reportado que la disminución en la LRP se debe a que en el meristemo las células del QC se diferencian y generan un crecimiento determinado. Para evaluar si el Pb está generando crecimiento determinado en la raíz primaria, evaluamos si había o no pérdida de identidad del QC. Haciendo uso de la línea marcadora *pWOX5::GFP* encontramos que en presencia de Pb (800 μ M) se pierde la identidad del QC lo que lleva a una desorganización en el meristemo y a un crecimiento determinado. Sin embargo, cuando se agrega al medio de cultivo exceso de Pi (10 mM) la actividad del QC no se pierde (Figura 10 A, C-G). Esto puede explicar porque en medio con exceso de

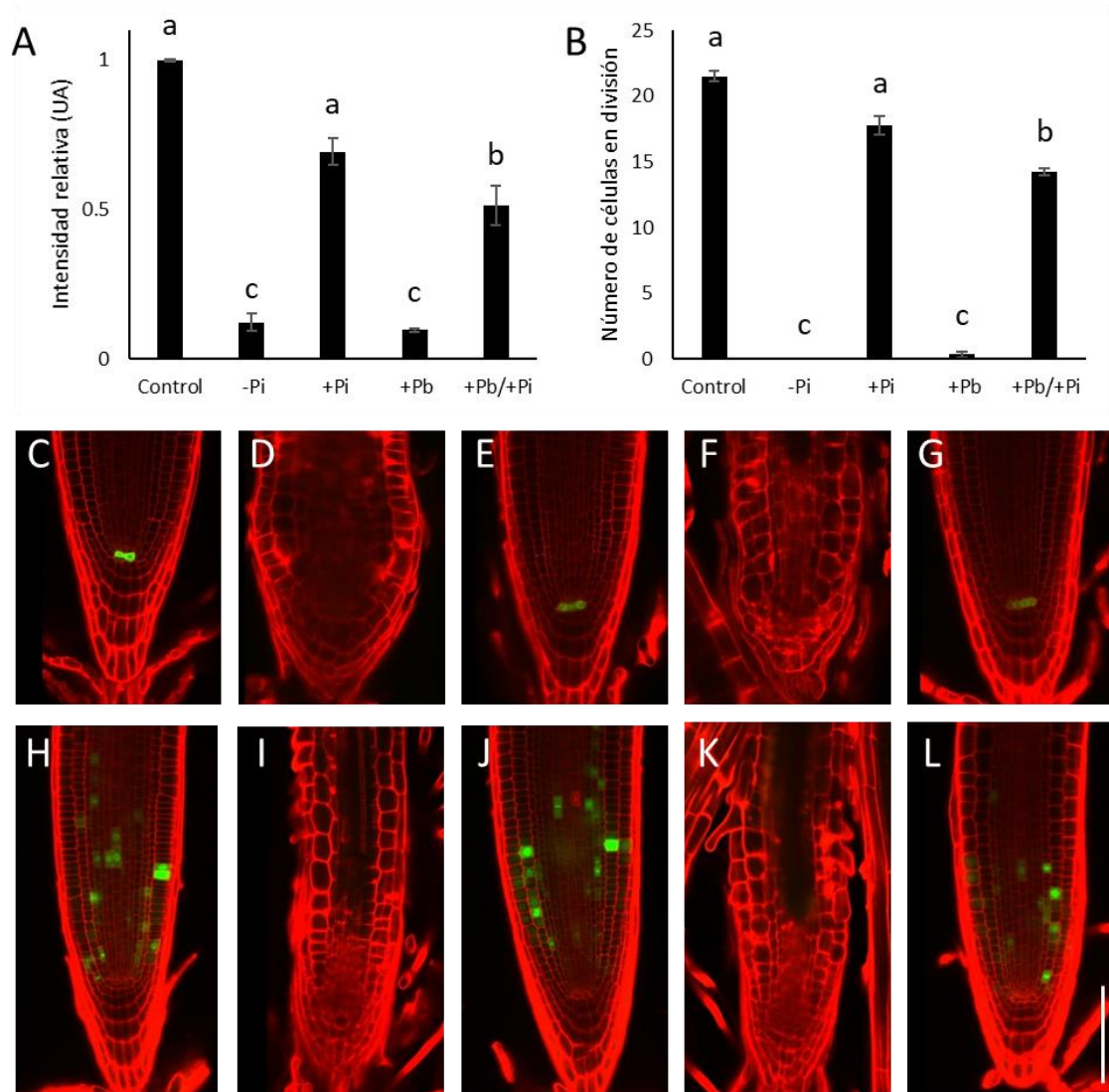


Figura 10. El exceso de fosfato recupera la actividad meristemática. Se evaluó actividad de *WOX5::GFP* en el centro quiescente (A). La actividad motórica usando el marcador *CyCB1::GFP* (B). Imágenes tomadas a los 6 días post germinación en microscopio confocal del ápice de la raíz primaria las plántulas portaban la construcción *WOX5::GFP* (C-G) o la construcción *CycB1::GFP* (H-L). La plantas crecieron en medio control MS 0.1 X (C y H), en carencia de fosfato, (-Pi) 1 μ M (D y I), en exceso de fosfato (+Pi) 10 mM (C y H), en presencia de plomo 800 μ M (+Pb) (D y I), y en presencia de plomo y exceso de fosfato (+Pb/+Pi) 0.8 y 10 mM respectivamente (E y J). La barra de escala representa 100 μ m Los experimentos se hicieron por triplicado, n=6 \pm error estándar.

Pi y presencia de Pb la LRP no disminuye tanto como en medio de cultivo que no fue suplementado con Pi. Además, utilizando la línea marcadora *CyCB1::GFP* se

evaluó el número de células que están por entrar en mitosis en tratamiento con Pb. La reducción en la señal fluorescente de *CyCB1::GFP* nos indicó que la tasa de división celular se redujo en el tratamiento con Pb y cuando se agregó exceso de Pi al medio de cultivo, la actividad mitótica se recuperó (Figura 10 B, H-L).

Los datos anteriores nos indican que la disminución en la LRP en presencia de Pb está relacionada con la identidad del QC y la pérdida de identidad de estas células puede afectar directamente a la tasa de división celular; lo que al final resulta en la disminución de la LRP. Sin embargo, la pérdida de identidad del QC y de la división celular puede ser recuperado totalmente al agregar exceso de Pi, pero la LRP no se recupera al 100% sino que solo se recupera un 60%, lo que nos indica que otro mecanismo como la elongación celular también pueden estar afectados por la presencia de Pb en el medio de cultivo.

6.2.2 Las auxinas regulan la LRP en presencia de Pb

La mayoría de los procesos fisiológicos están orquestados de manera directa o indirecta por la actividad de las auxinas, sobre todo en el SR, por lo que se evaluó si el Pb generaba cambios en la localización de estas hormonas en el SR. Se utilizó la línea reportera *DR5::GFP* a los seis días post germinación para evaluar una repuesta temprana, ya que es justo en el día seis post germinación cuando la LRP en los tratamientos con Pb comienza a ser menor respecto al grupo control (sin Pb). Se encontró que en presencia de Pb (800 μ M) la localización de auxinas se limitaba al QC y a la columnela con muy poca intensidad respecto al grupo control (sin Pb), lo que sugiere que la actividad de esta hormona en los demás tejidos del meristemo es nula y que en el centro QC y la columnela se está perdiendo esta actividad hormonal (que en el meristemo está involucrada principalmente con el mantenimiento del QC y la proliferación celular), lo que explica por qué se pierde la actividad del QC, la división celular y por qué en días posteriores se presenta un meristemo con crecimiento determinado y totalmente diferenciado. Además, hemos descrito que si al medio suplementado con Pb (800 μ M) adicionamos exceso de Pi (10 mM) se recupera parcialmente la LRP y se

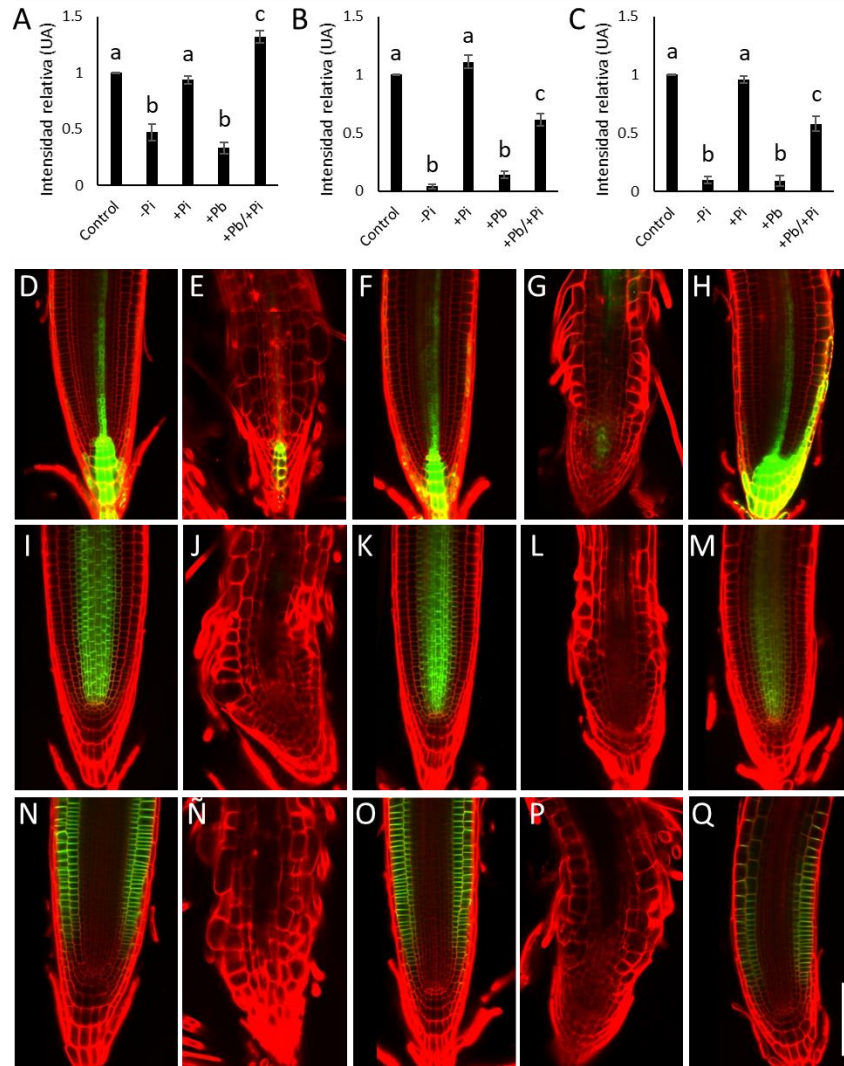


Figura 11. El plomo modifica la distribución de auxinas en el ápice de la raíz. Se evaluaron plantas de 6 dpv. Para evidenciar la localización de auxinas se utilizaron plantas con la construcción *DR5::GFP* (A, D-H), y para evidenciar la localización de transportadores se utilizó la línea marcadora *PIN1::GUS* (B, I-M) y la línea *PIN2::GFP* (C, N-Q). (D-Q). Imágenes del ápice de la raíz primaria las plantas crecieron en medio control MS 0.1 X (D, I y N), en carencia de fósforo, (-Pi) 1 μ M (E, J y Ñ), en exceso de fósforo (+Pi) 10 mM (F, K y O), en presencia de plomo 800 μ M (+Pb) (G, L y P), y en presencia de plomo y exceso de fósforo (+Pb/+Pi) 0.8 y 10 mM respectivamente (H, M y Q), la imágenes fueron tomada con un microscopio confocal. La barra de escala representa 100 μ m Los experimentos se hicieron por triplicado, $n=6 \pm$ error estándar.

recupera la actividad del QC y la actividad mitótica. Para corroborar si esto está relacionado con la distribución de auxinas en el meristemo, evaluamos la distribución de auxinas en las condiciones anteriormente mencionadas y

obtuvimos que la intensidad de la señal fluorescente de la línea *DR5::GFP* fue mayor (30%) en el tratamiento con Pb/Pi (0.8/10 mM) respecto a su grupo control (Pi 10mM); la localización cambió, y además de estar en el haz vascular, QC y columnela, como en el grupo control, también se encontró fluorescencia en la epidermis del lado derecho (Figura 11 A, D-H), lo cual sugiere que este cambio y asimetría en la distribución de auxinas pudiera estar estrechamente relacionado con el cambio en la orientación de las raíces primarias en el tratamiento con exceso de Pi y Pb, ya que las auxinas están involucradas con el gravitropismo.

Con el objetivo de complementar los experimentos anteriores respecto al papel de las auxinas, se evaluó la respuesta frente a Pb con auxinas exógenas; para ello se utilizó el ácido naftalenacético (NAA) a concentraciones crecientes desde 0 - 0.1 μ M (Figura 12 A). Se observó que en el grupo control, en el grupo con exceso de Pi y en el grupo con Pb/Pi el efecto de la adición de auxinas generó una disminución en la LRP conforme aumentó la concentración de NAA añadido al medio de cultivo. Mientras que, en el grupo con Pb, la LRP aumentó al agregar NAA hasta un máximo en 0.1 μ M de NAA, donde incrementó un 195 % comparado con el grupo sin NAA (Figura 12 A y H).

Una desventaja que presenta el agregar NAA de manera exógena al medio de cultivo es que esta molécula difundirá en todos los tejidos de manera homogénea, por lo cual propusimos evaluar el efecto de las auxinas con una línea sobreexpresante del gen *yucca4* (*Oxyucca4*), el cual forma parte de la ruta de síntesis de auxinas endógenas, lo cual nos permite contrastar con la respuesta que presenta el SR ante la adición de auxina exógenas. Encontramos que la diferencia en la LRP entre el tipo silvestre y *Oxyucca4* era similar en el tratamiento control, con Pb y con exceso de Pi, pero con Pb/Pi la LRP de *Oxyucca4* fue mayor que el tipo silvestre. Además, la orientación hacia la izquierda de las raíces primarias se muestra con mayor desviación respecto al eje gravitropico en la línea *Oxyucca4*, incluso en tratamientos sin Pb (Figura 12 B, K-N). Lo anterior respalda que las auxinas están involucradas en este crecimiento agravitropico. En cuanto a

la DRL, se presentó un incremento drástico en el tratamiento con Pb en la línea *Oxyucca4* respecto al tipo silvestre.

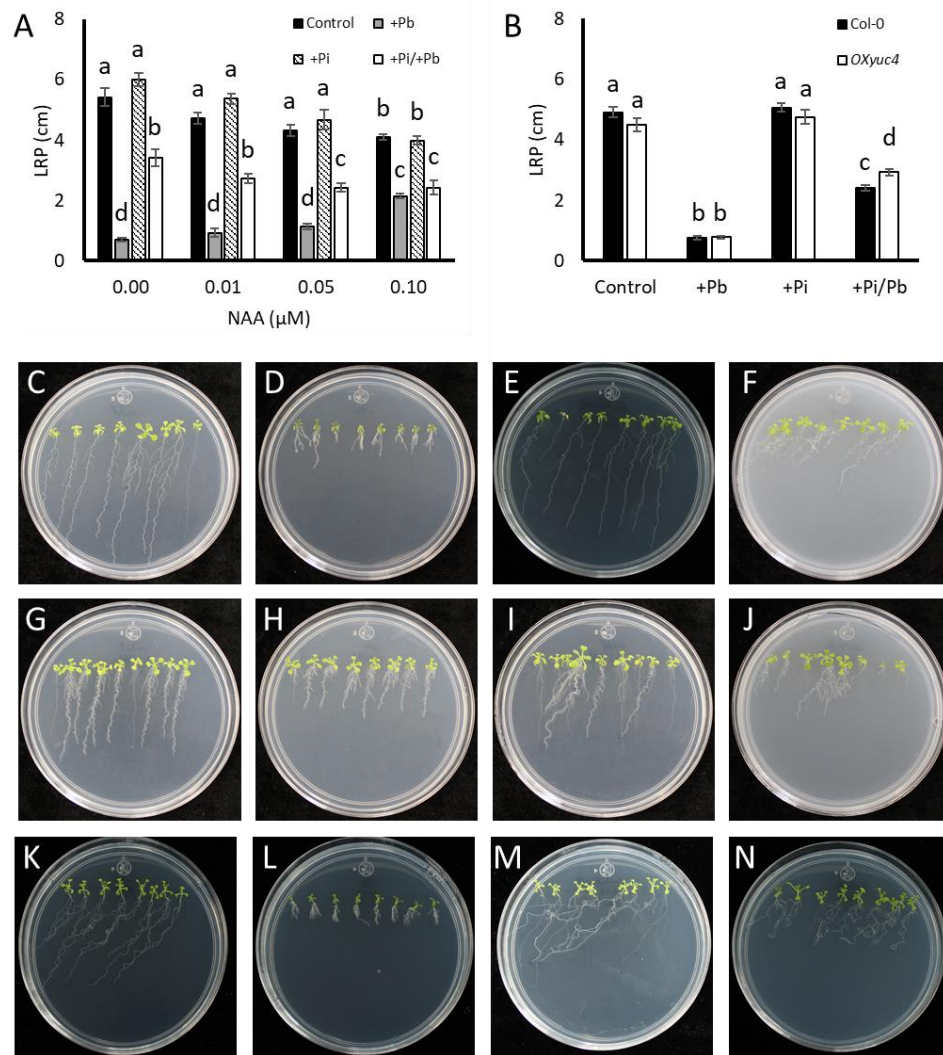


Figura 12. Las auxinas reducen el efecto del plomo en la LRP Se evaluó el efecto del plomo sobre la LRP en diferentes concentraciones de auxinas, tanto exógenas como endógenas. Para evaluar el efecto de las auxinas exógenas se suplementó el medio de cultivo con concentraciones crecientes de ácido naftalenacético (A). Mientras que, para evaluar el efecto en la LRP con incremento endógeno de auxinas se utilizó la línea sobreexpresante de *Yucca4* (*Oxyucc4*) (B). Imágenes representativas de los diferentes tratamientos (C-N). Plantas Col-0 (C-J), sobreexpresantes de *Yucca4* (K-N), medio sin auxinas exógenas (C-F y K-N), medio suplementado con 0.1 μM de NAA (G-J). Medio MS 0.1 X (C, G, K), medio suplementado con 800 de Pb (D, H, L), Medio con 10 mM de Pi (E, I, M) y medio suplementado con 0.8 mM de Pb más 10 mM de Pi (F, J, N). Los experimentos se hicieron por triplicado, n=8 ± error estándar.

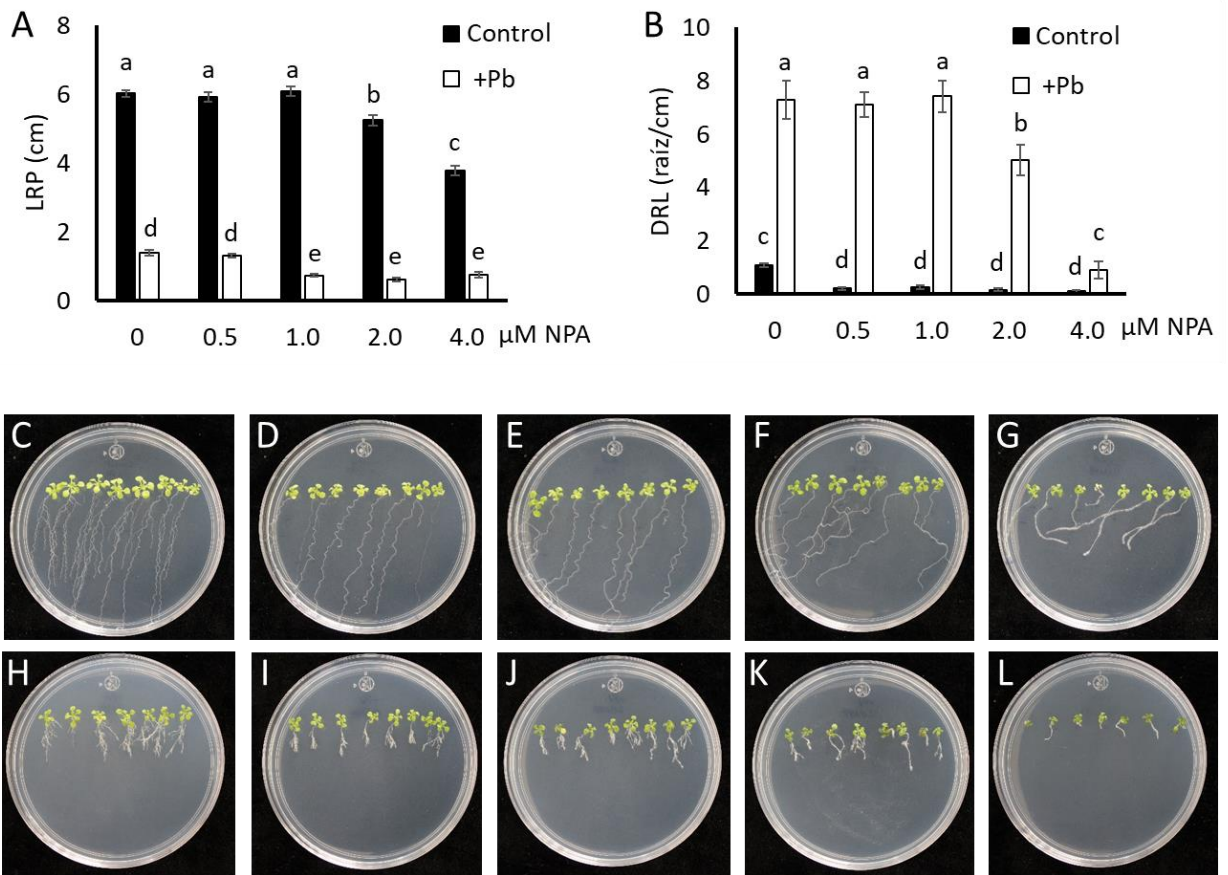


Figura 43. El transporte polar de auxinas está relacionado con el desarrollo del SR frente a estrés por Pb. Las plantas se desarrollaron en medio con o sin ácido naftilptalámico con la finalidad de interrumpir el transporte polar de auxinas. Se evaluó el cambio en la longitud de la raíz primaria (A) y en la densidad de raíces laterales (B) suplementado con NPA con o sin Pb. Imágenes representativas (C-L). Plantas sin Pb (C-G), plantas con medio suplementado con 800 μM de Pb (H-L), 0 μM de NPA (C y H), 0.5 μM de NPA (D y I), 1 μM de NPA (E y J), 2 μM de NPA (F y K) y 4 V de NPA (G y L). Los experimentos se hicieron por triplicado, $n=8 \pm$ error estándar.

La diferencia entre la respuesta ante exceso de auxinas endógenas contra las exógenas es que las auxinas exógenas pueden llegar hasta el ápice de la raíz por difusión mientras que en la línea *OXYucca4* las auxinas necesitan un transporte polar eficaz. En experimentos anteriores con la línea *DR5::GFP*, se evidenció que la presencia de auxinas en el meristemo era casi nula en tratamientos con Pb; al

agregarlas de manera exógena la LRP se recuperó parcialmente, pero no lo hizo cuando hubo exceso de auxinas endógenas; esto nos sugirió que, probablemente, el transporte polar de auxinas estuviera afectado en presencia de Pb. Para lo cual evaluamos la actividad de dos transportadores tipo PIN involucrados en el transporte polar de auxinas en el meristemo.

Se utilizaron las líneas *PIN1::GFP* y *PIN2::GFP*, las cuales crecieron en medio suplementado con Pb y con Pb/Pi, con sus respectivos controles. Encontramos que en presencia de Pb la expresión de *PIN1* y *PIN2* se pierde totalmente, mientras que al adicionar exceso de Pi al medio con Pb la actividad de *PIN1* y *PIN2* se restaura parcialmente respecto al grupo control (Figura 11 B, C, I-Q). Además, haciendo uso de un inhibidor del transporte polar de auxinas, el NPA, en el medio de cultivo, encontramos que la LRP en presencia de Pb y este inhibidor es más corta, y la DRL disminuyó drásticamente, indicando la importancia del transporte polar de auxinas en la respuesta del SR frente a estrés por Pb (Figura 13).

En conjunto, lo anterior nos muestra que las auxinas son fundamentales para el continuo desarrollo del meristemo y que en presencia de Pb el meristemo no continúa con su crecimiento indeterminado, ya que el transporte de estas hormonas hacia el meristemo se limita al interrumpirse el transporte polar de auxinas debido a la pérdida de actividad de *PIN1* y *PIN2*, generando pérdida de identidad del QC, disminución en el índice de división celular y finalmente la disminución de la LRP. Este fenómeno se revierte parcialmente al suplementar con 20 veces más de Pi (10 mM); en estas condiciones, la actividad de los transportadores *PIN1* y *PIN2* se recupera al igual el transporte de auxinas, y con ello la identidad del QC y la tasa de división celular. Sin embargo, aún se presentan efectos en el gravitropismo de la raíz primaria, por lo que se necesitan más experimentos que ayuden a profundizar en las causas de dicho fenómeno evocado por el Pb.

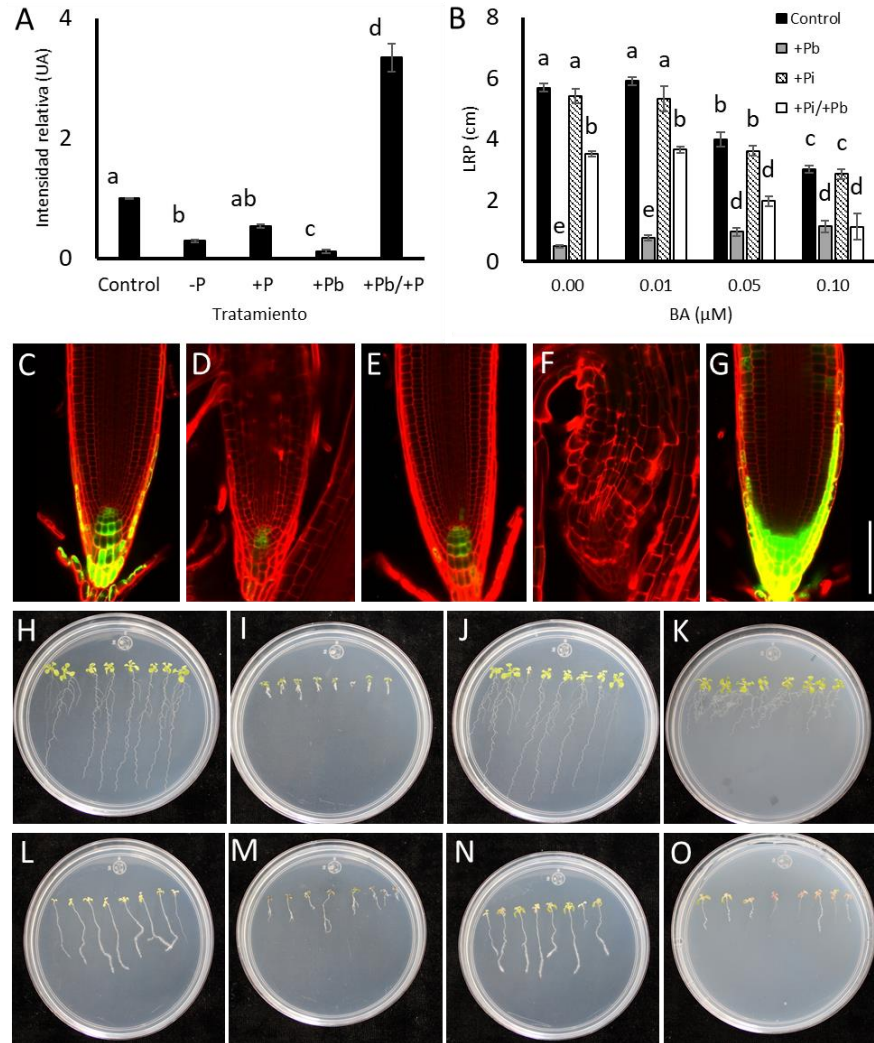


Figura 14. El plomo modifica la distribución de citocininas en el ápice de la raíz. Se evaluaron plantas de 6 dpv. Para evidenciar la localización de citocininas se utilizaron plántulas con la construcción *TCS::GFP* (A, C-G). Se suplementó el medio de cultivo con benzil adenina (BA) en concentraciones de 0 a 0.1 μM y se evaluó la ASR a los 12 dpv (B, H-O). En las imágenes representativas se observan microfografías tomadas en microscopio confocal del ápice de la raíz primaria las plantas crecieron en medio control MS 0.1 X (C), en carencia de fósforo, (-Pi) 1 μM (D), en exceso de fósforo (+Pi) 10 mM (E), en presencia de plomo 800 μM (+Pb) (F) y en exceso de fósforo suplementado con plomo (G). Además, se observan en caja petrí las plantas evaluadas en 0 μM de BA (H-K) y suplementados con 0.1 μM de BA (L-O) y en presencia de plomo y exceso de fósforo (+Pb/+Pi) 0.8 y 10 mM respectivamente (H, M y Q). Estas plantas crecieron en medio control MS 0.1 X (H y L), en presencia de plomo 800 μM (+Pb) (I y M), en exceso de fósforo (+Pi) 10 mM (J y N) y en exceso de fósforo suplementado con plomo (K y O). La barra de escala representa 100 μm . Los experimentos se hicieron por triplicado, $n=6 \pm$ error estándar.

6.2.3 El Pb evoca cambios en la distribución de citocininas

Las citocininas son otro grupo de hormonas vegetales que toman parte en la ASR, generalmente como antagonistas de las auxinas. Con la finalidad de identificar cómo estas hormonas están regulando la ASR en presencia de Pb, utilizamos la línea marcadora *TCS::GFP*; con esta línea se evaluó el grupo control, -Pi, presencia de Pb y exceso de Pi y Pb/Pi. Se obtuvo que en presencia de Pb no hay citocininas presentes en el meristemo (Figura 12 A y F), sin embargo, cuando se suplementa el medio de cultivo con exceso de Pi, la fluorescencia correspondiente a las citocininas aumenta 3.5 veces más respecto al grupo control (Figura 12 A y G), lo cual nos sugirió que las citocininas están involucradas en gran medida en la respuesta ante Pi/Pb y la regulación de la ASR en respuesta en estas condiciones. Además, se destaca que, en uno de los controles, en exceso de Pi, la actividad de fluorescencia es reducida en comparación con el grupo de Pi en condiciones fisiológicas (Figura 14 A y E). Con la finalidad de indagar en la participación de las citocininas en la respuesta a Pb, se agregó Benzil adenina (BA), una citocinina exógena, en concentraciones crecientes (0 – 0.1 μ M) a cada uno de los tratamientos (control, +Pb, exceso de Pi, y +Pi/+Pb); en la mayoría de los grupos, la adición de BA en concentraciones mayores a 0.05 μ M ocasionó una reducción en la LRP mientras que en el tratamiento de Pb la LRP aumento ligeramente (Figura 14 B, H-O). Lo anterior nos indica que parte de la respuesta en la recuperación de la LRP está relacionada con la acumulación de citocininas en el SR.

7. Discusión

El SR provee a las plantas de recursos necesarios para su subsistencia, como son agua y nutrientes. Debido a la naturaleza heterogénea del suelo, el SR presenta un PDPE (programa de desarrollo postembrionario) que le permite explorar el suelo y obtener los recursos necesarios. La habilidad de cambiar el patrón de desarrollo de la ASR les otorga a las plantas la capacidad de hacer frente a gran variedad de condiciones adversas (Lynch, 1995; Malamy, 2005). Por ejemplo el desarrollo de las raíces laterales y una raíz primaria con crecimiento determinado

permite explorar de manera superficial el suelo, sin embargo, este cambio en la ASR puede ser respuesta a diferentes condiciones estresantes como pueden ser el incremento en la captación de agua en zonas con pocas precipitaciones, por ejemplo, las cactáceas (Dubrovsky, 1997) o para tomar Pi que debido a su baja movilidad en el suelo se encuentra principalmente en la superficie (Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005).

El desarrollo del SR es guiado por señales ambientales que son integradas y generan una respuesta que es evidenciada en los cambios de la ASR, como son cambios en el desarrollo de la raíz primaria, raíces laterales, pelos radiales, gravitropismo, entre otras (Malamy, 2005). Generalmente los cambios en la ASR contribuyen de manera sustancial a la supervivencia de la planta, sin embargo, en el suelo además de nutrientes y agua se encuentran elementos tóxicos para las plantas, como son los MPs.

Los MPs, a excepción del Cu, Zn y Fe, no son necesarios en el metabolismo vegetal, por lo que las plantas no tienen estructuras especializadas que les permitan bioacumularlos ni metabolizarlos, sino que los MPs se mimetizan con los nutrientes que tienen características fisicoquímicas similares a ellos y una vez dentro del tejido vegetal pueden ser altamente tóxicos al unirse a proteínas, aumentar las ROS, competir con otros iones metálicos, etc. (Schützendübel y Polle, 2002). Como respuesta a la presencia de MPs en el suelo, las plantas presentan cambios en la ASR, sin embargo, a diferencia de la respuesta a los nutrientes, la respuesta frente al estrés por MPs no es específica, sino que se hace uso de las rutas de señalización preexistentes ya que el límite de la plasticidad del SR es mediada por las rutas de señalización intrínseca que a su vez son gobernadas por el genotipo de cada especie (Schlichting y Smith, 2002; Potters *et al.*, 2009).

El Pb es uno de los contaminantes más abundantes en la corteza debido a las actividades antropogénicas como son el uso de baterías, fundición de metales, minería y quema de combustibles fósiles; además, presenta baja movilidad en el suelo por lo que se considera un elemento persistente en suelos contaminados

(Pourrut *et al.*, 2011). El Pb, al ser un MP, no tiene función metabólica en las plantas, sin embargo, se ha reportado que genera cambios en el desarrollo vegetal y disminución en la producción agrícola (Zulfiqar *et al.*, 2019). Comprender cómo el Pb induce cambios en el SR es de gran interés y ayuda a comprender como se van integrando distintas rutas de señalización en respuesta a diferentes factores estresantes. Por lo tanto, fue de nuestro interés caracterizar las respuestas morfológicas, fisiológicas y moleculares del SR frente a estrés generado por el Pb.

7.1 El Pb induce cambios en la ASR regulados genéticamente por *lpi3* y *lpr1/2*

En el suelo, el SR y el Pb están en contacto continuo, por lo que este órgano presenta cambios en la ASR en presencia de este MP. Se ha abordado en diversas investigaciones la afección del Pb en el SR, principalmente haciendo énfasis en plantas cultivables como *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Glycine max* (Aladesanmi *et al.*, 2019; Zulfiqar *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2021), evaluando la generación de ROS, bioacumulación o toxicidad, tomando como signo de la toxicidad la disminución de la biomasa vegetal; en varios trabajos las concentraciones de Pb son altas, del orden de mM, por lo que las plantas difícilmente pueden evocar respuestas fisiológicas ante tal ambiente. Nuestro equipo de trabajo caracterizó la respuesta del SR en concentraciones de Pb menores a las utilizadas en los trabajos anteriormente mencionados, que van desde 0 hasta 1000 μM de Pb, evaluando principalmente la relación entre la concentración de Pb y los cambios en la ASR (Figura 1).

En la mayoría de los trabajos con Pb se muestra que la inhibición en la LRP es lineal y directamente proporcional a la concentración de Pb. Sin embargo, en nuestro trabajo encontramos que la inhibición de la LRP no es lineal en las concentraciones de Pb que utilizamos, sino que en concentraciones por debajo de 200 μM de Pb la LRP pareciera ser mayor que el grupo control (Figura 1 C y 2). Este fenómeno es conocido como hormesis, en donde un elemento tóxico a bajas concentraciones genera un incremento en el desarrollo en mayor proporción que el tratamiento sin el elemento tóxico (Agathokleous *et al.*, 2019). El fenómeno de

hormesis no solo se presenta en el caso de tratamientos con Pb, sino que se ha reportado en tratamientos con otros MPs como el Cr (VI) en *A. thaliana* y *Allium cepa*, con Cd en *Solanum melongena*, Cd y Pb en *Zea mays*, e incluso, bajo el efecto de otros factores estresantes como herbicidas o radiación ionizante (Miller y Miller, 1987; Castro *et al.*, 2007; Siddhu *et al.*, 2008; Patnaik *et al.*, 2013; Belz y Duke, 2014; Małkowski *et al.*, 2020). Se considera que las respuestas como la hormesis a las bajas concentraciones de algún elemento tóxico pueden incrementar la tolerancia a condiciones estresantes e incrementar la capacidad de respuesta de los organismos ante un estímulo ambiental (Agathokleous *et al.*, 2019). Es de gran interés comprender los mecanismos que subyacen a la estimulación en la LRP ocasionada por las bajas concentraciones de Pb, ya que esto ayudará a incrementar el conocimiento respecto a la tolerancia de las plantas y su desarrollo.

En los tratamientos con Pb por encima de 200 μM hasta los 400 μM de Pb la LRP se mantiene invariable respecto al grupo control, mientras que en concentraciones desde 600 hasta 1000 μM de Pb la LRP disminuye proporcionalmente al incremento de Pb. Además de la disminución en la LRP en el tratamiento de 800 μM de Pb, se obtuvo un incremento en la DRL, lo que nos indica que en este punto el SR presenta cambios fisiológicos que al mismo tiempo promueven la formación de raíces laterales y la disminución de la LRP (Figura 1). Por lo anterior, es de gran interés para nuestro equipo de trabajo caracterizar la respuesta del SR en la concentración de 800 μM de Pb, ya que nos permite profundizar en los cambios moleculares, fisiológicos y morfológicos en el SR en general y comparar las diferencias en respuestas de promoción e inhibición del desarrollo entre las raíces primarias y las raíces laterales.

La disminución de la LRP y aumento en la DRL también se ha descrito en tratamientos con otros MPs como Cr (VI), Cu o Al (Castro *et al.*, 2007; Lequeux *et al.*, 2010; Ruíz-Herrera y López-Bucio, 2013). Cuando las plantas se encuentran en condiciones estresantes disminuyen el desarrollo del SR con la finalidad de conservar energía y recursos; esto se observa en el desarrollo de la raíz primaria

en 800 μM de Pb (Figura 1 A), sin embargo, la formación de raíces laterales es una estrategia del SR para explorar el suelo en busca de mejores condiciones de desarrollo; por ejemplo, se ha observado que en medio de cultivo heterogéneo con o sin Cd el desarrollo de la ASR es reorganizado de tal manera que se evita el desarrollo hacia las zonas contaminadas con Cd (Khare *et al.*, 2017). En el caso del estrés por Pb, se ha descrito que las variedades de *Oryza sativa* que presentan un sistema radical más ramificado (con más raíces laterales) son más tolerantes a la toxicidad por Pb (Yang *et al.*, 2000). Por otro lado, *Helianthus annuus* a las que le fueron cortadas las raíces adventicias o la raíz primaria mostraron que las plantas sin raíz primaria resistieron al tratamiento con Pb, lo que nos sugiere que las raíces laterales y adventicias tienen un papel importante en la respuesta de las plantas hacia el estrés por Pb (Strubińska y Hanaka, 2011).

Los cambios en la ASR evocados por el Pb recuerdan a los cambios evocados por la carencia de Pi (Williamson *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002), lo que nos sugiere que pueden compartir algunas respuestas en común (Figura 3). Se sabe que agregar exceso de Pi en suelos agrícolas contaminados con Pb reduce el efecto tóxico en las plantas, principalmente porque el Pi y el Pb coprecipitan formando compuestos insolubles, lo que reduce drásticamente la biodisponibilidad del Pb (Zeng *et al.*, 2017). Es posible que en nuestros experimentos el Pi y el Pb estuvieran interactuando y limitando la biodisponibilidad de ambos elementos, por lo cual la presencia de Pb pudiera estar evocando estrés por carencia de Pi. Para ello se hizo una estimación *in silico* de la interacción entre el Pi y el Pb en el medio de cultivo y se obtuvo como resultado que la biodisponibilidad del Pi se ve comprometida por la presencia de Pb (Figura 5 A). Sin embargo, fue necesario sustentar experimentalmente que el SR presentaba estrés por carencia de Pi a causa de la interacción Pb-Pi en el medio de cultivo.

Con la finalidad de evidenciar el estrés por carencia de Pi en el SR hicimos uso de la línea marcadora *pAtPT2::GUS*, que codifica para el transportador de fosfato de alta afinidad *Pht1;4*, el cual presenta una expresión inducible ante la carencia de Pi: encontramos que en carencia de Pi la expresión del gen *pAtPT2::GUS* es alta

mientras que en el grupo control y en tratamientos con Pb la expresión es muy baja (Figura 5 C, D y E). Lo anterior nos hizo suponer que, probablemente, a pesar de la coprecipitación Pi-Pb aún había Pi biodisponible, de tal manera que no se inducía la expresión de *pAtPT2::GUS*. Por lo tanto, se cuantificó el contenido de Pi en el tejido vegetal con el objetivo de averiguar si en el medio de cultivo el Pi estaba biodisponible después en los tratamientos con Pb suplementado. Encontramos que la concentración de Pi en los tratamientos en carencia de Pi y en presencia de Pb fue mucho más bajo que el grupo control (Figura 5 B). Los resultados anteriores nos sugieren que la planta sí presenta estrés por carencia de Pi y a la par el Pb está generando un efecto inhibitorio en la expresión de *pAtPT2::GUS*, de tal forma que el Pb reduce la acumulación de Pi debido a la coprecipitación y también a que regula negativamente la expresión de *AtPT2*. Se ha reportado que, a diferencia de lo encontrado por Pb, la expresión de *pAtPT2::GUS* se induce cuando se desarrollan plantas con otros MPs como Al, o Cr (VI), evocado principalmente por la competencia de entrada a la planta de estos MPs con el Pi (Ruíz-Herrera y López-Bucio, 2013; Martínez-Trujillo *et al.*, 2014). Se ha reportado que en un transcriptoma de *A. thaliana* desarrollada en medio suplementado con 1000 μ M de Pb en medio MS 0.5 X, el número de genes regulados negativamente es de 2419 respecto al grupo control (Zheng *et al.*, 2020); esto sucede en la primera hora, lo cual soporta nuestra observación de que el Pb en el medio de cultivo tiene la capacidad de regular negativamente la expresión de algunos genes, en este caso *AtPT2*.

La respuesta a Pb está estrechamente relacionada con las respuestas a carencia de Pi, por lo que decidimos averiguar si el estrés por Pb comparte alguna ruta de señalización con el estrés por carencia de Pi. El estrés por carencia de Pi es uno de los factores estresantes descritos con mayor detalle y se sabe que la inhibición en la LRP se lleva a cabo por dos rutas independientes: una dependiente de STOP1-ALMT1 y otra dependiente de LPR1/2-PDR2. Al evaluar mutantes relacionadas con estas dos rutas de señalización (*stop1* involucrada en la ruta STOP1-ALMT1, *lpr1/2* involucrada en la ruta LPR1/2-PDR2 y *lpi3* aun no caracterizada) encontramos dos respuestas diferentes: 1) con las mutantes *lpi3* y

lpr1/2, en donde la LRP no se redujo a pesar de la presencia de Pb, y 2) con la mutante *stop1*, en donde la LRP presentó disminución similar al grupo WT (Figura 6). Lo anterior nos indica que la disminución de la LRP depende de los genes *lpi3* y *lpr1/2*; es decir, que hay una regulación genética del efecto del Pb sobre la LRP.

Se sabe que esta enzima LPR1 pertenece al grupo de las oxidasas de multicobre involucradas en la oxidación del Cu y además está involucrada con la oxidación del Fe (Svistoonoff *et al.*, 2007; Gutiérrez-Alanís *et al.*, 2018). Se sabe que en carencia de Pi el Fe se encuentra en mayor proporción en la raíz, por lo que este metal es oxidado por la enzima LPR1/2, generando un incremento en las ROS, lo cual genera endurecimiento de la pared celular y, derivado de esto, una disminución en el crecimiento de la raíz primaria (Svistoonoff *et al.*, 2007). Con el objetivo de corroborar que la enzima LPR1/2 está involucrada en la inhibición de la LRP como respuesta al Pb en *A. thaliana*, decidimos cambiar el pH del medio de cultivo, con lo cual el Fe (sustrato de LPR1/2) no está biodisponible y de esta manera se inhibe la actividad en la enzima LPR1/2 en las plantas. Encontramos que, al igual que en estas condiciones a pesar de que el medio de cultivo estaba suplementado con Pb, no hubo inhibición en la LRP (Figura 8 A y J); este resultado nos indica que la actividad de la enzima LP1/2 es necesaria para que se lleve a cabo la inhibición de la LRP en respuesta al Pb.

En la mayoría de los trabajos de estrés por Pb en plantas, se considera que la disminución en la LRP y los cambios en la ASR ocasionados por el Pb se deben a que la toxicidad del Pb genera desorganización metabólica y estructural en las células del SR y genotoxicidad, de tal manera que esto reduce el desarrollo del SR (Kozhevnikova *et al.*, 2009; Kaur *et al.*, 2014; Lyu *et al.*, 2020). Sin embargo, en este trabajo hemos descrito que en medio suplementado con 800 μ M de Pb los cambios en la LRP son regulados genéticamente por *lpr1/2* y *lpi3* y no como consecuencia de una desorganización metabólica ocasionada por el Pb.

7.2 El Pi y el Pb regulan la ASR

Los cambios de la ASR como respuesta a condiciones estresantes se han estudiado haciendo cambios por separado de cada uno de los nutrientes, ya sea la respuesta a la carencia o al exceso de algún nutriente. Esto ha permitido disectar puntualmente la participación de cada nutriente en regular la ASR. Sin embargo, las respuestas no son monocausales sino que dependen de muchos factores, como son pH, salinidad, concentración de agua y, además, de la interacción con otros nutrimentos. Por ejemplo, la respuesta a carencia de Pi no solo depende de la concentración de este macronutriente, sino que también depende de la concentración de sacarosa, de Fe o el valor de pH (Karthikeyan *et al.*, 2007; Svistoonoff *et al.*, 2007).

Debido a la estrecha relación entre el Pi y el Pb, nuestro equipo de trabajo evaluó el efecto del Pb en la ASR cambiando las concentraciones de Pi en el medio de cultivo y encontramos que el efecto del Pb es dependiente de la concentración del Pi en el medio de cultivo (Figura 9 A y B).

Cuando la concentración de Pi se redujo de 500 a 1 μM el efecto inhibitorio se presentó a menor concentración de Pb y los efectos de inhibición en la LRP eran evidentes a partir de 25 μM de Pb; es decir, una concentración 24 veces menor que en medios de cultivo con 500 μM de Pi (Figura 9 A). Como se ha reportado en nuestros análisis *in silico* y en otros trabajos, el Pb y el Pi interactúan para formar precipitados insolubles reduciendo la biodisponibilidad de ambos compuestos (Zeng *et al.*, 2017). De tal manera que el Pi al coprecipitar con el Pb reduce su biodisponibilidad y sus efectos sobre el SR de las plantas, por lo tanto, el Pb inhibió en mayor proporción la LRP cuando se redujo la concentración de Pi en el medio de cultivo. Lo anterior nos sugiere que el Pi ayuda a reducir los efectos negativos del Pb, debido a que limita su biodisponibilidad. Este efecto protector del Pi se ha reportado en tratamientos con As (V), el cual compite con el Pi por la misma vía de entrada que es el transportador de fosfato de alta afinidad *PHT1;4* (*AtPT2*); de tal manera que al incrementar la concentración de Pi se reduce la

toma de As (V) y, por lo tanto, sus efectos en el SR (Esteban *et al.*, 2003; Vázquez Reina *et al.*, 2005).

Con el objetivo de averiguar si el Pi puede reducir totalmente la biodisponibilidad del Pb, se hicieron distintas cinéticas con 800 μM de Pb en las cuales se suplementó con concentraciones crecientes de Pi (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 10 mM).

Encontramos que al ir aumentando la concentración de Pi por encima de 1.5 mM, la disminución de la LRP fue menor (Figura 9 B). Acorde a nuestro análisis *in silico*, la concentración de Pi que interactúa con el Pb es equimolar, es decir que 800 μM de Pb coprecipitan con 800 μM de Pi, sin embargo, fue necesario que la concentración del Pi adicionada fuera 1.8 veces mayor a la concentración de Pb (800 μM) presente en el medio para que el efecto inhibitorio se reduzca (Figura 9 B). Por lo tanto, el medio de cultivo fue suplementado con una cantidad 12.5 veces mayor (10 mM) a la concentración de Pb presente en el medio de cultivo para asegurar que todo el Pb fuera coprecipitado con el Pi y, además, que exista un excedente de Pi en el medio de cultivo. Encontramos que, a pesar del exceso de Pi en el medio de cultivo, la LRP tuvo una inhibición del 33% respecto al grupo control, lo cual nos indica que el Pb continúa mediando el desarrollo del SR (Figura 9 B, K y L). También destaca el hecho de que a pesar de que el Pb esta coprecipitado con el Pi puede inducir cambios en la LRP.

Además, en concentraciones de 2.0 y 10.0 mM de Pi con 800 μM de Pb la raíz primaria mostró un cambio en el eje de crecimiento, desviándose 31 grados hacia la izquierda de la caja petri, sugiriendo que además de la LRP el Pb está generando efecto en la percepción gravitrópica de la raíz primaria (Figura 9 K y L).

Lo anterior nos indica que la proporción entre el Pi y el Pb determinará el efecto que tenga el Pb sobre el SR y, además, que los efectos que ocasiona el Pb en el SR en concentraciones altas de Pi (mayores a 2 mM) pueden ser atribuidas solo al Pb y no a la carencia de Pi ya que este macronutriente se encuentra en exceso, de tal forma que estudiar las repuestas que evoca el Pb en condiciones donde el Pi no sea limitado nos puede permitir disectar la repuesta específica de la planta hacia el Pb.

7.3 El Pb modifica la distribución de las auxinas y las citocininas

Los cambios morfológicos en la ASR están estrechamente coordinados por las hormonas, principalmente auxinas y citocininas, que son reguladores del crecimiento y forman parte importante en el desarrollo del SR.

Estos reguladores del crecimiento están involucrados en varios procesos de desarrollo del meristemo, ya que el balance en las concentraciones de estas dos hormonas mantiene la tasa de división y diferenciación celular en esta zona. Para mantener el meristemo es crucial el papel que tienen las células del QC, en donde el mantenimiento de las células indiferenciadas está regulado por la expresión de *WOX5* y *PLT* (Aida *et al.*, 2004; van der Graaff *et al.*, 2009). Debido a esto, evaluamos la actividad del centro quiescente utilizando la línea marcadora *WOX5::GFP* y encontramos que en presencia de Pb se pierde la actividad de *WOX5::GFP*, induciendo diferenciación y crecimiento determinado en el ápice de la raíz, sin embargo, al suplementar con exceso de Pi (10 mM) se recupera la actividad en el QC (Figura 10 A, C-G). Anteriormente observamos que al suplementar con exceso de Pi en tratamientos con Pb la inhibición en la LRP, ocasionada por el Pb era revertida. Además, se ha reportado que el Pb reduce la tasa de división en el meristemo de las raíces (Kaur *et al.*, 2014), por lo que, con la finalidad de saber si esta reducción estaba relacionada con la pérdida en la actividad del QC, evaluamos la actividad mitótica en el meristemo haciendo uso de la línea marcadora *CyCB1::GFP*: encontramos que efectivamente se había perdido la actividad del QC y la actividad mitótica en presencia de Pb, sin embargo, al suplementar con Pi la actividad se recuperó (Figura 10 B, H-L), sugiriendo que la pérdida en la actividad mitótica puede ser causada por la pérdida en la actividad del QC.

La expresión de *WOX5* está en función de la distribución de auxinas, lo que nos indicó que era probable que la pérdida en la identidad del QC estuviera relacionada con cambios en la distribución de las auxinas en el meristemo (Sabatini *et al.*, 1999; Ding y Friml, 2010). Debido a que las auxinas están relacionadas con el mantenimiento del meristemo, decidimos evaluar la

distribución de estas utilizando la línea marcadora *DR5::GFP*, así como la expresión de genes que codifican para algunas proteínas transportadoras tipo PIN (*PIN1* y *PIN2*) con las líneas marcadoras *PIN1::GFP* y *PIN2::GFP*. Encontramos que la expresión de los transportadores tipo *PIN* es nula en presencia de Pb, así como la señal fluorescente que nos indica la actividad de las auxinas (Figura 11). Sin embargo, de manera similar a lo encontrado con *pWOX5::GFP* y *CyCB1::GFP* al suplementar con exceso de Pi, la actividad se recupera. Además, en el caso de la distribución de auxinas estas no solo mostraron recuperación, sino que la fluorescencia de la construcción *DR5::GFP* fue mayor en el tratamiento de Pb suplementado con Pi que en el grupo control (Figura 11 A y H); también se encontró que la distribución de auxinas era asimétrica en el meristemo, indicándonos que esta puede ser una de las causas del crecimiento agravitrópico de la raíz primaria en el tratamiento con Pb y exceso de Pi (Figura 11 H).

En conjunto, los resultados anteriores nos indican que el Pb regula negativamente la expresión de los genes *PIN1* y *PIN2* y, como consecuencia de esto, se interrumpe el transporte polar de auxinas, el cual a su vez es indispensable para mantener el meristemo en desarrollo. Sin embargo, cuando se suplementa el medio de cultivo con exceso de Pi (10mM) no solo se recupera la actividad del centro quiescente y la división celular, sino que además se recupera la expresión de *PIN1* y *PIN2*, permitiendo un correcto transporte polar de auxinas en el ápice de la raíz primaria llevando a la recuperación en el mantenimiento del meristemo.

Para evaluar la importancia de las auxinas en el mantenimiento del meristemo en presencia de Pb se hicieron experimentos con medio de cultivo suplementado con 800 μ M Pb, al cual se le añadió el ácido naftalen acético (NAA) como fuente exógena de auxina. Encontramos que la LRP fue mayor cuando se añade NAA al grupo con Pb que cuando no hay auxinas. Se ha reportado que un incremento como fuente exógena de auxina por encima de las concentraciones fisiológicas genera una reducción en la LRP; esta respuesta la observamos en los tratamientos control, con exceso de Pi y con Pb suplementado con exceso de Pi. Sin embargo, en el tratamiento con 800 μ M de Pb que es suplementado con

0.01 μ M de NAA la LRP es mayor respecto al grupo sin NAA; esto se puede deber a que el NAA puede difundir en el SR, ayudando parcialmente al mantenimiento del meristemo. También se evaluó una planta sobreexpresante del gen *yucca 4* (*OXYuc4*) y no se encontraron diferencias en la LRP en presencia de Pb, lo que nos indica que no es por la concentración de NAA que la LRP incrementa cuando se agrega NAA al medio suplementado con Pb, sino al transporte polar de auxinas, ya que a diferencia del tratamiento con NAA suplementado, las auxinas no pueden llegar al meristemo por la regulación negativa de *PIN1* y *PIN2*.

El incremento en la actividad de citocininas nos sugirió que estas juegan un papel importante en la respuesta del SR frente al estrés por Pb, sin embargo, cuando agregamos BA al medio de cultivo la LRP disminuyó. Probablemente, el drástico incremento en la actividad de citocininas en el tratamiento con Pb y con exceso de Pb se deba a que las citocininas estuvieran contribuyendo a la reducción de la LRP, ya que se sabe que las citocininas regulan negativamente la expresión de los transportadores PIN en la zona de transición (entre la zona meristemática y de elongación) teniendo como intermediario a SHY (Dello Iorio *et al.*, 2007; Moubayidin *et al.*, 2009). De tal manera que este incremento puede estar más relacionado con una respuesta antagónica a la actividad de las auxinas, limitando su movilidad e induciendo una diferenciación celular prematura, siendo esta la razón por la cual se recupera la LRP solo en 60 % respecto al grupo control.

8. Conclusiones

- El ion Pb^{+2} induce cambios en la arquitectura del sistema radical.
- En medio de cultivo suplementado con Pb, la raíz presenta en conjunto estrés por Pb y por la carencia de Pi.
- El efecto que genera el Pb en la arquitectura de sistema radical es dependiente de la proporción de la concentración de Pi y de Pb en el medio de cultivo
- El Pb modifica la arquitectura del sistema radical al regular negativamente la expresión de algunos genes como son *AtPT2*, *WOX5*, *PIN1* y *PIN2*.

- La disminución de la longitud de la raíz primaria en respuesta al estrés por carencia de fósforo y al estrés por Pb se lleva a cabo por el mismo mecanismo dependiente de *PRD2-LPR1*.
- Bajo estrés por Pb, el exceso de Pi reestablece la expresión de *WOX5*, *PIN1* y *PIN2*, por lo que se recupera el desarrollo de la raíz primaria.
- El Pb inhibe el desarrollo de la raíz primaria al afectar la homeostasis de auxinas.
- El cambio en la arquitectura del sistema radical por estrés por Pb no se debe totalmente a la coprecipitación entre Pb y Pi, sino que ambos factores estresantes comparten mecanismos que derivan en un fenotipo similar.

9. Bibliografía

- Abel Steffen** (2017) Phosphate scouting by root tips. *Current Opinion in Plant Biology* **39**: 168-177
- Agathokleous Evgenios, Kitao Mitsutoshi y Calabrese Edward J** (2019) Hormesis: a compelling platform for sophisticated plant science. *Trends in plant science* **24**: 318-327
- Aida Mitsuhiro, Beis Dimitris, Heidstra Renze, Willemsen Viola, Blilou Ikram, Galinha Carla, Nussaume Laurent, Noh Yoo-Sun, Amasino Richard y Scheres Ben** (2004) The Plethora Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell* **119**: 109-120
- Aladesanmi Omolara Titilayo, Oroboade Jeremiah Gbenga, Osisiogu Chisom Peter y Osewole Afolabi Olutope** (2019) Bioaccumulation Factor of Selected Heavy Metals in *Zea mays*. *Journal of Health and Pollution* **9**
- Alloway Brian J.** (2013) Introduction. In Brian J. Alloway, ed, *Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 3-9
- Arase Fumi, Nishitani Hiroko, Egusa Mayumi, Nishimoto Nami, Sakurai Sumiko, Sakamoto Naho y Kaminaka Hironori** (2012) IAA8 Involved in Lateral Root Formation Interacts with the TIR1 Auxin Receptor and ARF Transcription Factors in Arabidopsis. *PLOS ONE* **7**: e43414
- Bahmani Ramin, Kim Dong G., Kim Jin A. y Hwang Seongbin** (2016) The Density and Length of Root Hairs Are Enhanced in Response to Cadmium and Arsenic by Modulating Gene Expressions Involved in Fate Determination and Morphogenesis of Root Hairs in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **7**
- Balzergue Coline, Dartevelle Thibault, Godon Christian, Laugier Edith, Meirimler Claudia, Teulon Jean-Marie, Creff Audrey, Bissler Marie, Brouchoud Corinne y Hagège Agnès** (2017) Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nature communications* **8**: 1-16
- Bao Yun, Aggarwal Pooja, Robbins Neil E., Sturrock Craig J., Thompson Mark C., Tan Han Qi, Tham Cliff, Duan Lina, Rodriguez Pedro L., Vernoux Teva, Mooney Sacha J., Bennett Malcolm J. y Dinneny José R.** (2014) Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 9319-9324
- Belz Regina G y Duke Stephen O** (2014) Herbicides and plant hormesis. *Pest Management Science* **70**: 698-707
- Bennett Malcolm J., Marchant Alan, Green Haydn G., May Sean T., Ward Sally P., Millner Paul A., Walker Amanda R., Schulz Burkhard y Feldmann Kenneth A.** (1996) Arabidopsis AUX1 gene: A Permease-Like Regulator of Root Gravitropism. *Science* **273**: 948
- Buer Charles S., Wasteneys Geoffrey O. y Masle Josette** (2003) Ethylene Modulates Root-Wave Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **132**: 1085

- Cao Shuqing, Chen Zhengyi, Liu Guoqing, Jiang Li, Yuan Huaibo, Ren Guang, Bian Xiaohui, Jian Hongyong y Ma Xinliang** (2009) The Arabidopsis Ethylene-Insensitive 2 gene is required for lead resistance. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 308-312
- Casimiro Ilda, Marchant Alan, Bhalerao Rishikesh P., Beeckman Tom, Dhooge Sandra, Swarup Ranjan, Graham Neil, Inzé Dirk, Sandberg Goran, Casero Pedro J. y Bennett Malcolm** (2001) Auxin Transport Promotes Arabidopsis Lateral Root Initiation. *The Plant Cell* **13**: 843
- Castro Randy Ortiz, Trujillo Miguel Martínez, López Bucio José, Cervantes Carlos y Dubrovsky Joseph** (2007) Effects of dichromate on growth and root system architecture of Arabidopsis thaliana seedlings. *Plant Science* **172**: 684-691
- Cecchi M., Dumat C., Alric A., Felix-Faure B., Pradere P. y Guisresse M.** (2008) Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma* **144**: 287-298
- Chen Lei, Wang Tianzuo, Zhao Mingui, Tian Qiuying y Zhang Wen-Hao** (2012) Identification of aluminum-responsive microRNAs in *Medicago truncatula* by genome-wide high-throughput sequencing. *Planta* **235**: 375-386
- De Rybel Bert, Vassileva Valya, Parizot Boris, Demeulenaere Marlies, Grunewald Wim, Audenaert Dominique, Van Campenhout Jelle, Overvoorde Paul, Jansen Leentje, Vanneste Steffen, Möller Barbara, Wilson Michael, Holman Tara, Van Isterdael Gert, Brunoud Géraldine, Vuylsteke Marnik, Vernoux Teva, De Veylder Lieven, Inzé Dirk, Weijers Dolf, Bennett Malcolm J. y Beeckman Tom** (2010) A Novel Aux/IAA28 Signaling Cascade Activates GATA23-Dependent Specification of Lateral Root Founder Cell Identity. *Current Biology* **20**: 1697-1706
- De Smet Ive, Zhang Hanma, Inzé Dirk y Beeckman Tom** (2006) A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science* **11**: 434-439
- Dello Ioio Raffaele, Linhares Francisco Scaglia, Scacchi Emanuele, Casamitjana-Martinez Eva, Heidstra Renze, Costantino Paolo y Sabatini Sabrina** (2007) Cytokinins Determine Arabidopsis Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Current Biology* **17**: 678-682
- DeWitt Thomas J., Sih Andrew y Wilson David Sloan** (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology & Evolution* **13**: 77-81
- Dey Surjendu K., Dey Jayashree, Patra Sanjukta y Pothal Debasmita** (2007) Changes in the antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in wheat seedlings exposed to cadmium and lead stress. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **19**: 53-60
- Ding Zhaojun y Friml Jiří** (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 12046
- Dolan Liam y Davies Julia** (2004) Cell expansion in roots. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 33-39
- Duan Lina, Dietrich Daniela, Ng Chong Han, Chan Penny Mei Yeen, Bhalerao Rishikesh, Bennett Malcolm J. y Dinneny José R.** (2013) Endodermal

- ABA Signaling Promotes Lateral Root Quiescence during Salt Stress in *Arabidopsis* Seedlings. *The Plant Cell* **25**: 324
- Dubrovsky J. G., Gambetta G. A., Hernández-Barrera A., Shishkova S. y González I.** (2006) Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*: Developmental Window, Spatial Patterning, Density and Predictability. *Annals of Botany* **97**: 903-915
- Dubrovsky Joseph G.** (1997) Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae; its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* **203**: 85-92
- Dubrovsky Joseph G., Sauer Michael, Napsucialy-Mendivil Selene, Ivanchenko Maria G., Friml Jiří, Shishkova Svetlana, Celenza John y Benková Eva** (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 8790-8794
- Đurčeková Katarína, Huttová Jana, Mistrík Igor, Ollé Marta y Tamás Ladislav** (2007) Cadmium induces premature xylogenesis in barley roots. *Plant and Soil* **290**: 61-68
- Esteban Elvira, Carpena Ramón O. y Meharg Andrew A.** (2003) High-affinity phosphate/arsenate transport in white lupin (*Lupinus albus*) is relatively insensitive to phosphate status. *New Phytologist* **158**: 165-173
- Forde Brian G.** (2014) Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Current Opinion in Plant Biology* **21**: 30-36
- Friml Jiří, Vieten Anne, Sauer Michael, Weijers Dolf, Schwarz Heinz, Hamann Thorsten, Offringa Remko y Jürgens Gerd** (2003) Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147-153
- Fukaki Hidehiro, Nakao Yoko, Okushima Yoko, Theologis Athanasios y Tasaka Masao** (2005) Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **44**: 382-395
- Gruber Benjamin D., Giehl Ricardo F. H., Friedel Swetlana y von Wirén Nicolaus** (2013) Plasticity of the *Arabidopsis* Root System under Nutrient Deficiencies. *Plant Physiology* **163**: 161
- Gutiérrez-Alanís Dolores, Ojeda-Rivera Jonathan Odilón, Yong-Villalobos Lenin, Cárdenas-Torres Luis y Herrera-Estrella Luis** (2018) Adaptation to Phosphate Scarcity: Tips from *Arabidopsis* Roots. *Trends in Plant Science* **23**: 721-730
- Hattab Sara, Hattab Sabrine, Flores-Casseres Maria Laura, Boussetta Hamadi, Doumas Patrick, Hernandez Luis E. y Banni Mohamed** (2016) Characterisation of lead-induced stress molecular biomarkers in *Medicago sativa* plants. *Environmental and Experimental Botany* **123**: 1-12
- Holford ICR** (1997) Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Research* **35**: 227-240
- Ioio Raffaele Dello, Nakamura Kinu, Moubayidin Laila, Perilli Serena, Taniguchi Masatoshi, Morita Miyo T., Aoyama Takashi, Costantino Paolo y Sabatini Sabrina** (2008) A Genetic Framework for the Control of

- Cell Division and Differentiation in the Root Meristem. *Science* **322**: 1380-1384
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A. y Bevan M. W.** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal* **6**: 3901-3907
- Jobbágy Esteban G. y Jackson Robert B.** (2004) THE UPLIFT OF SOIL NUTRIENTS BY PLANTS: BIOGEOCHEMICAL CONSEQUENCES ACROSS SCALES. *Ecology* **85**: 2380-2389
- Jones Russell, Ougham Helen, Thomas Howard y Waaland** (2013) *The Molecular Life of Plants*, Malaysia
- Jones Russell Ougham, Thomas Helen, Waaland Howard y Jones Susan Russell** (2013) *The molecular life of plants*,
- Jürgens Gerd** (2003) Growing up green: cellular basis of plant development. *Mechanisms of Development* **120**: 1395-1406
- Karthikeyan Athikkattuvalasu S., Varadarajan Deepa K., Jain Ajay, Held Michael A., Carpita Nicholas C. y Raghothama Kashchandra G.** (2007) Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in Arabidopsis. *Planta* **225**: 907-918
- Karthikeyan Athikkattuvalasu S., Varadarajan Deepa K., Mukatira Uthappa T., D'Urzo Matilde Paino, Damsz Barbara y Raghothama Kashchandra G.** (2002) Regulated expression of Arabidopsis phosphate transporters. *Plant physiology* **130**: 221-233
- Kaur Gurpreet, Singh Harminder Pal, Batish Daizy Rani y Kohli Ravinder Kumar** (2014) Pb-inhibited mitotic activity in onion roots involves DNA damage and disruption of oxidative metabolism. *Ecotoxicology* **23**: 1292-1304
- Keerthisinghe G., Hocking P. J., Ryan P. R. y Delhaize E.** (1998) Effect of phosphorus supply on the formation and function of proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Plant, Cell & Environment* **21**: 467-478
- Kellermeier Fabian, Armengaud Patrick, Seditas Triona J., Danku John, Salt David E. y Amtmann Anna** (2014) Analysis of the Root System Architecture of Arabidopsis Provides a Quantitative Readout of Crosstalk between Nutritional Signals. *The Plant Cell* **26**: 1480-1496
- Kellermeier Fabian, Chardon Fabien y Amtmann Anna** (2013) Natural Variation of Arabidopsis Root Architecture Reveals Complementing Adaptive Strategies to Potassium Starvation. *Plant Physiology* **161**: 1421-1432
- Khan Murtaza, Rolly Nkulu K., Al Azzawi Tiba N., Imran Muhammad, Mun Bong-Gyu, Lee In-Jung y Yun Byung-Wook** (2021) Lead (Pb)-Induced Oxidative Stress Alters the Morphological and Physio-Biochemical Properties of Rice (*Oryzasativa* L.). *Agronomy* **11**
- Khare Deepa, Mitsuda Nobukata, Lee Seungchul, Song Won-Yong, Hwang Daehee, Ohme-Takagi Masaru, Martinoia Enrico, Lee Youngsook y Hwang Jae-Ung** (2017) Root avoidance of toxic metals requires the GeBP-LIKE 4 transcription factor in Arabidopsis thaliana. *New Phytologist* **213**: 1257-1273
- Koevoets Iko T., Venema Jan Henk, Elzenga J. Theo M. y Testerink Christa** (2016) *Roots Withstanding their Environment: Exploiting Root System*

- Architecture Responses to Abiotic Stress to Improve Crop Tolerance. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1335
- Kozhevnikova A. D., Seregin I. V., Bystrova E. I., Belyaeva A. I., Kataeva M. N. y Ivanov V. B.** (2009) The effects of lead, nickel, and strontium nitrates on cell division and elongation in maize roots. *Russian Journal of Plant Physiology* **56**: 242-250
- Kumar Amit, Kumar Amit, M.M.S. Cabral-Pinto, Chaturvedi Ashish K., Shabnam Aftab A., Subrahmanyam Gangavarapu, Mondal Raju, Gupta Dipak Kumar, Malyan Sandeep K., Kumar Smita S., A. Khan Shakeel y Yadav Krishna K.** (2020) Lead Toxicity: Health Hazards, Influence on Food Chain, and Sustainable Remediation Approaches. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**: 2179
- Kuriakose Saritha V. y Prasad M. N. V.** (2008) Cadmium stress affects seed germination and seedling growth in *Sorghum bicolor* (L.) Moench by changing the activities of hydrolyzing enzymes. *Plant Growth Regulation* **54**: 143-156
- Laplaze Laurent, Benkova Eva, Casimiro Ilda, Maes Lies, Vanneste Steffen, Swarup Ranjan, Weijers Dolf, Calvo Vanessa, Parizot Boris, Herrera-Rodriguez Maria Begoña, Offringa Remko, Graham Neil, Dumas Patrick, Friml Jiri, Bogusz Didier, Beeckman Tom y Bennett Malcolm** (2008) Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *The Plant Cell* **19**: 3889
- Lequeux Hélène, Hermans Christian, Lutts Stanley y Verbruggen Nathalie** (2010) Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiology and Biochemistry* **48**: 673-682
- Linkohr Birgit I., Williamson Lisa C., Fitter Alastair H. y Leyser H. M. Ottoline** (2002) Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **29**: 751-760
- López-Bucio José, Cruz-Ramírez Alfredo y Herrera-Estrella Luis** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 280-287
- López-Bucio José, Hernández-Abreu Esmeralda, Sánchez-Calderón Lenin, Nieto-Jacobo María Fernanda, Simpson June y Herrera-Estrella Luis** (2002) Phosphate Availability Alters Architecture and Causes Changes in Hormone Sensitivity in the *Arabidopsis* Root System. *Plant Physiology* **129**: 244-256
- López-Bucio José, Ortiz-Castro Randy, Ruíz-Herrera León Francisco, Ju rez Consuelo Vargas, Hernández-Madrigal Fátima, Carre on-Abud Yazm n y Martínez-Trujillo Miguel** (2015) Chromate induces adventitious root formation via auxin signalling and SOLITARY-ROOT/IAA14 gene function in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* **28**: 353-365
- Lynch J.** (1995) Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology* **109**: 7-13

- Lyu Guizhen, Li Dongbing, Li Shaoshan, Ning Chanjuan y Qin Rong** (2020) Genotoxic effects and proteomic analysis on *Allium cepa* var. *agrogarum* L. root cells under Pb stress. *Ecotoxicology*
- Malamy J. E.** (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment* **28**: 67-77
- Malamy Jocelyn E. y Benfey Philip N.** (1997) Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends in Plant Science* **2**: 390-396
- Malamy Jocelyn E. y Ryan Katherine S.** (2001) Environmental Regulation of Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**: 899
- Malecka Arleta, Piechalak Aneta y Tomaszewska Barbara** (2009) Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: the whole roots level. *Acta Physiologiae Plantarum* **31**: 1053-1063
- Małkowski Eugeniusz, Sitko Krzysztof, Szopiński Michał, Gieroń Żaneta, Pogrzeba Marta, Kalaji Hazem M y Zieleźnik-Rusinowska Paulina** (2020) Hormesis in plants: the role of oxidative stress, auxins and photosynthesis in corn treated with Cd or Pb. *International journal of molecular sciences* **21**: 2099
- Marin Elena, Jouannet Virginie, Herz Aurélie, Lokerse Annemarie S., Weijers Dolf, Vaucheret Herve, Nussaume Laurent, Crespi Martin D. y Maizel Alexis** (2010) miR390, *Arabidopsis* TAS3 tasiRNAs, and Their AUXIN RESPONSE FACTOR Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. *The Plant Cell* **22**: 1104-1117
- Martínez-Trujillo Miguel, Méndez-Bravo Alfonso, Ortiz-Castro Randy, Hernández-Madrigal Fátima, Ibarra-Laclette Enrique, Ruiz-Herrera León Francisco, Long Terri A., Cervantes Carlos, Herrera-Estrella Luis y López-Bucio José** (2014) Chromate alters root system architecture and activates expression of genes involved in iron homeostasis and signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **86**: 35-50
- Michniewicz Marta, Brewer Philip B. y Friml Jiří** (2007) Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **5**: e0108
- Miller Morton W y Miller W Marcus** (1987) Radiation hormesis in plants. *Health physics* **52**: 607-616
- Moreno-Risueno Miguel A., Van Norman Jaimie M., Moreno Antonio, Zhang Jingyuan, Ahnert Sebastian E. y Benfey Philip N.** (2010) Oscillating Gene Expression Determines Competence for Periodic *Arabidopsis* Root Branching. *Science (New York, N.Y.)* **329**: 1306-1311
- Moubayidin Laila, Di Mambro Riccardo y Sabatini Sabrina** (2009) Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* **14**: 557-562
- Müller Jens, Toev Theresa, Heisters Marcus, Teller Janine, Moore Katie L, Hause Gerd, Dinesh Dhurvas Chandrasekaran, Bürstenbinder Katharina y Abel Steffen** (2015) Iron-Dependent Callose Deposition Adjusts Root Meristem Maintenance to Phosphate Availability. *Developmental Cell* **33**: 216-230

- Narang Ram A., Bruene Asja y Altmann Thomas** (2000) Analysis of Phosphate Acquisition Efficiency in Different Arabidopsis Accessions. *Plant Physiology* **124**: 1786
- Okushima Yoko, Fukaki Hidehiro, Onoda Makoto, Theologis Athanasios y Tasaka Masao** (2007) ARF7 and ARF19 Regulate Lateral Root Formation via Direct Activation of LBD/ASL Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**: 118
- Ortiz-Luevano, Rodríguez-Zapata y Sánchez-Calderón** (2016) *Lupinus campestris* Cham. & Schltld. como un modelo de estudio frente a estrés por metales pesados. Universidad Autónoma de Zacatecas
- Ottenschläger Iris, Wolff Patricia, Wolverson Chris, Bhalerao Rishikesh P., Sandberg Göran, Ishikawa Hideo, Evans Mike y Palme Klaus** (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**: 2987-2991
- Overvoorde Paul, Fukaki Hidehiro y Beeckman Tom** (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**: a001537
- Pasternak Taras, Rudas Volodymir, Potters Geert y Jansen Marcel A. K.** (2005) Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in Arabidopsis thaliana seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **53**: 299-314
- Patnaik Anita R., Achary V. Mohan M. y Panda Brahma B.** (2013) Chromium (VI)-induced hormesis and genotoxicity are mediated through oxidative stress in root cells of Allium cepa L. *Plant Growth Regulation* **71**: 157-170
- Pedersen Ole, Sauter Margret, Colmer Timothy David y Nakazono Mikio** (2020) Regulation of root adaptive anatomical and morphological traits during low soil oxygen. *New Phytologist*
- Pérez-Torres Claudia-Anahí, López-Bucio José, Cruz-Ramírez Alfredo, Ibarra-Laclette Enrique, Dharmasiri Sunethra, Estelle Mark y Herrera-Estrella Luis** (2008) Phosphate availability alters lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *The Plant cell* **20**: 3258-3272
- Pernisová Markéta, Klíma Petr, Horák Jakub, Válková Martina, Malbeck Jiří, Souček Přemysl, Reichman Pavel, Hoyerová Klára, Dubová Jaroslava, Friml Jiří, Za, žímalová Eva y Hejátko Jan** (2009) Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 3609-3614
- Petrášek Jan, Mravec Jozef, Bouchard Rodolphe, Blakeslee Joshua J., Abas Melinda, Seifertová Daniela, Wiśniewska Justyna, Tadele Zerihun, Kubeš Martin, Čovanová Milada, Dhonukshe Pankaj, Skúpa Petr, Benková Eva, Perry Lucie, Křeček Pavel, Lee Ok Ran, Fink Gerald R., Geisler Markus, Murphy Angus S., Luschnig Christian, Zažímalová Eva y Friml Jiří** (2006) PIN Proteins Perform a Rate-Limiting Function in Cellular Auxin Efflux. *Science* **312**: 914
- Petricka J. J., Winter C. M. y Benfey P. N.** (2012) Control of Arabidopsis Root Development. *In. ANNUAL REVIEWS*, pp 563-590

- Potters Geert, Pasternak Taras P., Guisez Yves y Jansen Marcel A. K.** (2009) Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell & Environment* **32**: 158-169
- Pourrut Bertrand, Shahid Muhammad, Dumat Camille, Winterton Peter y Pinelli Eric** (2011) Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. *In* *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 213. Springer, pp 113-136
- Price A. H., Tomos A. D. y Virk D. S.** (1997) Genetic dissection of root growth in rice (*Oryza sativa* L.): a hydroponic screen. *Theoretical and Applied Genetics* **95**: 132-142
- Raghothama KG** (1999) Phosphate acquisition. *Annual review of plant biology* **50**: 665-693
- Reinhardt Didier y Kuhlemeier Cris** (2002) Plant architecture. *EMBO reports* **3**: 846
- Rogers Eric D. y Benfey Philip N.** (2015) Regulation of plant root system architecture: implications for crop advancement. *Current Opinion in Biotechnology* **32**: 93-98
- Ruíz-Herrera León Francisco y López-Bucio José** (2013) Aluminum induces low phosphate adaptive responses and modulates primary and lateral root growth by differentially affecting auxin signaling in *Arabidopsis* seedlings. *Plant and Soil* **371**: 593-609
- Sabatini Sabrina, Beis Dimitris, Wolkenfelt Harald, Murfett Jane, Guilfoyle Tom, Malamy Jocelyn, Benfey Philip, Leyser Ottoline, Bechtold Nicole, Weisbeek Peter y Scheres Ben** (1999) An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. *Cell* **99**: 463-472
- Samardakiewicz S. y Woźny A.** (2005) Cell division in *Lemna* minor roots treated with lead. *Aquatic Botany* **83**: 289-295
- Sánchez-Calderón Lenin, López-Bucio José, Chacón-López Alejandra, Cruz-Ramírez Alfredo, Nieto-Jacobo Fernanda, Dubrovsky Joseph G y Herrera-Estrella Luis** (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **46**: 174-184
- Sánchez-Calderón Lenin, López-Bucio José, Chacón-López Alejandra, Gutiérrez-Ortega Abel, Hernández-Abreu Esmeralda y Herrera-Estrella Luis** (2006) Characterization 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 Physiology* **140**: 879
- Sarkar Ananda K., Luijten Marijn, Miyashima Shunsuke, Lenhard Michael, Hashimoto Takashi, Nakajima Keiji, Scheres Ben, Heidstra Renze y Laux Thomas** (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**: 811-814
- Scheres B., McKhann H. I. y van den Berg C.** (1996) Roots Redefined: Anatomical and Genetic Analysis of Root Development. *Plant Physiology* **111**: 959-964

- Schiefelbein J. W. y Benfey P. N.** (1991) The development of plant roots: new approaches to underground problems. *The Plant Cell* **3**: 1147-1154
- Schlichting Carl D. y Smith Harry** (2002) Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evolutionary Ecology* **16**: 189-211
- Schützendübel Andres y Polle Andrea** (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**: 1351-1365
- Shahid Muhammad, Pourrut Bertrand, Dumat Camille, Nadeem Muhammad, Aslam Muhammad y Pinelli Eric** (2014) Heavy Metal Induced Reactive Oxygen Species: Phytotoxicity and Physicochemical Changes in Plants. *In* David M. Whitacre, ed, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 232. Springer International Publishing, Cham, pp 1-44
- Sharma Pallavi y Dubey Rama Shanker** (2005) Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **17**: 35-52
- Sharp Robert E, Poroyko Valeriy, Hejlek Lindsey G, Spollen William G, Springer Gordon K, Bohnert Hans J y Nguyen Henry T** (2004) Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. *Journal of experimental botany* **55**: 2343-2351
- Shin Heungsop, Shin Hwa-Soo, Dewbre Gary R. y Harrison Maria J.** (2004) Phosphate transport in *Arabidopsis*: *Pht1;1* and *Pht1;4* play a major role in phosphate acquisition from both low- and high-phosphate environments. *The Plant Journal* **39**: 629-642
- Siddhu Geeta, Sirohi Devpal Singh, Kashyap Kavita, Khan Iftikhar Ali y Khan MA** (2008) Toxicity of cadmium on the growth and yield of *Solanum melongena* L. *Journal of environmental biology* **29**: 853-857
- Signora Laurent, De Smet Ive, Foyer Christine H y Zhang Hanma** (2001) ABA plays a central role in mediating the regulatory effects of nitrate on root branching in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **28**: 655-662
- Spíchal Lukáš, Werner Tomáš, Popa Igor, Riefler Michael, Schmülling Thomas y Strnad Miroslav** (2009) The purine derivative PI-55 blocks cytokinin action via receptor inhibition. *The FEBS Journal* **276**: 244-253
- Steeves Taylor A y Sussex Ian M** (1989) *Patterns in plant development*. Cambridge University Press
- Stepanova Anna N. y Alonso Jose M.** (2009) Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 548-555
- Street Ian H., Aman Sitwat, Zubo Yan, Ramzan Aleena, Wang Xiaomin, Shakeel Samina N., Kieber Joseph J. y Schaller G. Eric** (2015) Ethylene Inhibits Cell Proliferation of the *Arabidopsis* Root Meristem. *Plant Physiology* **169**: 338-350
- Strubińska J. y Hanaka A.** (2011) Adventitious root system reduces lead uptake and oxidative stress in sunflower seedlings. *Biologia Plantarum* **55**: 771-774
- SULTAN S. E.** (1995) Phenotypic plasticity and plant adaptation. *Acta Botanica Neerlandica* **44**: 363-383
- Sun Jiaqiang, Xu Yingxiu, Ye Songqing, Jiang Hongling, Chen Qian, Liu Fang, Zhou Wenkun, Chen Rong, Li Xugang, Tietz Olaf, Wu Xiaoyan, Cohen Jerry D., Palme Klaus y Li Chuanyou** (2009) *Arabidopsis* ASA1 Is

- Important for Jasmonate-Mediated Regulation of Auxin Biosynthesis and Transport during Lateral Root Formation. *The Plant Cell* **21**: 1495-1511
- Sun Pei, Tian Qiu-Ying, Chen Jie y Zhang Wen-Hao** (2010) Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany* **61**: 347-356
- Svistoonoff Sergio, Creff Audrey, Reymond Matthieu, Sigoillot-Claude Cécile, Ricaud Lilian, Blanchet Aline, Nussaume Laurent y Desnos Thierry** (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* **39**: 792-796
- Swarup Kamal, Benková Eva, Swarup Ranjan, Casimiro Ilda, Péret Benjamin, Yang Yaodong, Parry Geraint, Nielsen Erik, De Smet Ive, Vanneste Steffen, Levesque Mitch P., Carrier David, James Nicholas, Calvo Vanessa, Ljung Karin, Kramer Eric, Roberts Rebecca, Graham Neil, Marillonnet Sylvestre, Patel Kanu, Jones Jonathan D. G., Taylor Christopher G., Schachtman Daniel P., May Sean, Sandberg Goran, Benfey Philip, Friml Jiri, Kerr Ian, Beeckman Tom, Laplaze Laurent y Bennett Malcolm J.** (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* **10**: 946-954
- Swarup Ranjan, Friml Jirí, Marchant Alan, Ljung Karin, Sandberg Goran, Palme Klaus y Bennett Malcolm** (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes & Development* **15**: 2648-2653
- Tatematsu Kiyoshi, Kumagai Satoshi, Muto Hideki, Sato Atsuko, Watahiki Masaaki K., Harper René M., Liscum Emmanuel y Yamamoto Kotaro T.** (2004) MASSUGU2 Encodes Aux/IAA19, an Auxin-Regulated Protein That Functions Together with the Transcriptional Activator NPH4/ARF7 to Regulate Differential Growth Responses of Hypocotyl and Formation of Lateral Roots in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **16**: 379
- Ubeda-Tomás Susana, Federici Fernán, Casimiro Ilda, Beemster Gerrit TS, Bhalerao Rishikesh, Swarup Ranjan, Doerner Peter, Haseloff Jim y Bennett Malcolm J** (2009) Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Current Biology* **19**: 1194-1199
- van der Graaff Eric, Laux Thomas y Rensing Stefan A.** (2009) The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biology* **10**: 248
- Van Kleunen Mark y Fischer Markus** (2005) Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist* **166**: 49-60
- Vázquez Reina Saúl, Esteban Elvira y Goldsbrough Peter** (2005) Arsenate-induced phytochelatin in white lupin: influence of phosphate status. *Physiologia Plantarum* **124**: 41-49
- Verbelen Jean-Pierre, De Cnodder Tinne, Le Jie, Vissenberg Kris y Baluška František** (2006) The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signaling & Behavior* **1**: 296-304

- Vitória A. P., Rodriguez A. P. M., Cunha M., Lea P. J. y Azevedo R. A.** (2003) Structural Changes in Radish Seedlings Exposed to Cadmium. *Biologia Plantarum* **47**: 561-568
- Wang Rui, Wang Jiehua, Zhao Lin, Yang Shaohui y Song Yingjin** (2015) Impact of heavy metal stresses on the growth and auxin homeostasis of Arabidopsis seedlings. *BioMetals* **28**: 123-132
- Wierzbicka M.** (1999) The effect of lead on the cell cycle in the root meristem of *Allium cepa* L. *Protoplasma* **207**: 186-194
- Williamson Lisa C., Ribrioux Sebastien P. C. P., Fitter Alastair H. y Leyser H. M. Ottoline** (2001) Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiology* **126**: 875
- Xu Jian y Scheres Ben** (2005) Dissection of Arabidopsis ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity. *The Plant Cell* **17**: 525-536
- Xue Rengao y Zhang Biao** (2007) Increased Endogenous Methyl Jasmonate Altered Leaf and Root Development in Transgenic Soybean Plants. *Journal of Genetics and Genomics* **34**: 339-346
- Yang Y. Y., Jung J. Y., Song W. Y., Suh H. S. y Lee Y.** (2000) Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant physiology* **124**: 1019-1026
- Yuan Hong-Mei, Xu Heng-Hao, Liu Wen-Cheng y Lu Ying-Tang** (2013) Copper Regulates Primary Root Elongation Through PIN1-Mediated Auxin Redistribution. *Plant and Cell Physiology* **54**: 766-778
- Zeng Guangming, Wan Jia, Huang Danlian, Hu Liang, Huang Chao, Cheng Min, Xue Wenjing, Gong Xiaomin, Wang Rongzhong y Jiang Danni** (2017) Precipitation, adsorption and rhizosphere effect: the mechanisms for phosphate-induced Pb immobilization in soils—a review. *Journal of hazardous materials* **339**: 354-367
- Zhan Ai y Lynch Jonathan P** (2015) Reduced frequency of lateral root branching improves N capture from low-N soils in maize. *Journal of Experimental Botany* **66**: 2055-2065
- Zheng Shuangshuang, Ren Panrong, Zhai Mingtong, Li Chuanyou y Chen Qian** (2020) Identification of Genes Involved in Root Growth Inhibition Under Lead Stress by Transcriptome Profiling in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology Reporter*
- Zhou Zhao Sheng, Zeng Hou Qing, Liu Zhao Pu y Yang Zhi Min** (2012) Genome-wide identification of *Medicago truncatula* microRNAs and their targets reveals their differential regulation by heavy metal. *Plant, Cell & Environment* **35**: 86-99
- Zulfiqar Usman, Farooq Muhammad, Hussain Saddam, Maqsood Muhammad, Hussain Mubshar, Ishfaq Muhammad, Ahmad Muhammad y Anjum Muhammad Zohaib** (2019) Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *Journal of Environmental Management* **250**: 109557
- Zürcher Evelyne, Tavor-Deslex Deborah, Lituiev Dmytro, Enkerli Katalin, Tarr Paul T. y Müller Bruno** (2013) A Robust and Sensitive Synthetic Sensor to Monitor the Transcriptional Output of the Cytokinin Signaling Network in *Planta*. *Plant Physiology* **161**: 1066

Anexo 1. Artículo de Investigación

Biometals
<https://doi.org/10.1007/s10534-021-00299-9>



Changes induced by lead in root system architecture of *Arabidopsis* seedlings are mediated by PDR2-LPR1/2 phosphate dependent way

Ricardo Ortiz-Luevano · José López-Bucio · Miguel Martínez-Trujillo · Lenin Sánchez-Calderón

Received: 13 August 2020 / Accepted: 7 March 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Abstract As sessile organisms, plants respond to changing environments modulating their genetic expression, metabolism and postembryonic developmental program (PDP) to adapt. Among environmental stressor, lead (Pb) is one of the most hazardous pollutants which limits crop productivity. Here, we describe in detail the effects of a wide range of concentrations of Pb on growth and development and a possible convergence with phosphate (Pi) starvation response. We found that the response to Pb presents a biphasic curve dose response in biomass accumulation: below 400 μM show a stimulatory effect

meanwhile at Pb doses up to 600 μM effects are inhibitory. We found that +Pb (800 μM) modifies root system architecture (RSA) and induces acidification media, according to *in silico* ion interaction, in the growing medium Pb and Pi coprecipitate and plants grow in both Pi deficiency and Pb stress at the same time, however in spite of seedlings are under Pi starvation *AtPT2* expression are Pb downregulated indicating that in addition to Pi starvation stress, Pb regulates physiological responses in root system. Using the mutants *stop1*, *lpr1/2* and *lpi3*, which are affected in Pi starvation response, we found that changes in RSA by +Pb is genetically regulated and there are shared pathways with Pi starvation response mediated by PDR2-LPR1/2 and LPI3 pathways since *lpr1/2* and *lpi3* mutants are insensitive to +Pb and Pi starvation. Taking together, these results indicate that similar changes in RSA induced by independent environmental stimuli +Pb and Pi starvation are due to similar mediated response by PDR2-LPR1/2 pathway.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s10534-021-00299-9>.

R. Ortiz-Luevano · M. Martínez-Trujillo
Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio R, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, México

R. Ortiz-Luevano · L. Sánchez-Calderón
Laboratorio de Genómica Evolutiva, Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas, Campus II, 98066 Zacatecas, Zacatecas, México
e-mail: leninsanc@uaz.edu.mx

J. López-Bucio
Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, 58030 Morelia, Michoacán, México

Keywords Lead · Phosphate starvation · Abiotic stress · PDR2-LPR1/2 pathway

Published online: 27 March 2021



Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

Introduction

Through their evolutionary process, plants have acquired a myriad of mechanisms to cope with ever changing environmental conditions. These coordinated and highly regulated mechanisms operate at the morphological, physiological, molecular and biochemical levels, which provide a broad phenotypic plasticity, an indispensable feature for sessile organisms to cope with environmental challenges. Phenotypic plasticity allows plants to respond to stressful environment, modulating their genetic expression, metabolism and postembryonic developmental program (PDP), to maintain their homeostasis (Genoud and Métraux 1999; Schlichting and Smith 2002; Žádníková et al. 2015; Koevoets et al. 2016). A clear example of this phenotypic plasticity is the capacity that plants have to modify their PDP to bend the organs in the direction of light, water, nutrients and other resources needed to support their growth and development (Gruber et al. 2013; Sánchez-Calderón et al. 2013; Tian et al. 2018; Oldroyd and Leyser 2020).

The root system is the underground organ in contact with the soil and is formed by primary root (PR), lateral roots (LRs), and adventitious root (ARs). In *Arabidopsis thaliana*, as well as in other plants with a taproot root system, during germination PR is the first root to emerge from seed which will become the main axis of growth. Along this axis from internal layers (pericycle), the LRs are formed postembryonically generating a branching root system. The shape and spatial configuration of the root system within the soil are called root system architecture (RSA). RSA is shaped by a genetic postembryonic root developmental program (PRDP) which is modulated by environmental components (López-Bucio et al. 2003; Gruber et al. 2013; Rogers and Benfey 2015). Due to physical and chemical factors are heterogeneously distributed into the soil, the plasticity of genetic PRDP is pivotal adaptive strategy for plants to cope with abiotic stresses and contributes substantially to their capacity to explore the soil for water and nutrients or to avoid toxic compounds such as heavy metals (HMs) (Lynch 1995; Malamy 2005; Khare et al. 2017).

In biology, HMs are defined as metals and metalloids with high density ($> 5 \text{ g/cm}^3$) which at low concentrations (μM) cause toxicity to organisms (Hawkes 1997; Duffus 2002). Some HMs such as copper (Cu) and Zinc (Zn) are essentials to plant

metabolism, but become toxic only when the limit concentration is exceeded, unlike aluminum (Al), arsenic (As), chromium (Cr), mercury (Hg), nickel (Ni) and lead (Pb), which have no known function in organisms; in fact, they are toxic even at low concentrations (Schützendübel and Polle 2002). HMs disturb homeostasis of organisms due to its high reactivity that causes an increase in reactive oxygen species (ROS); HMs also can substitute some metals in key biomolecules and oxides sulfhydryl groups (-SH) of amino acids such as cysteine, causing denaturation of proteins (Maksymiec 2007).

Although Pb is considered one of the most hazardous pollutants, is among the most common HMs found in daily life. Pb can be found as a part of electronic components, batteries, paint, fossil fuels combustion, fertilizers, pesticides, smelting industry, and mining. As Pb has been used widely in many industrial and agricultural processes, it has been accumulated and contaminating air, water and soil (Küpper 2017; Agency-for-Substances-and-Disease-Registry 2019; World-Health-Organization 2019). Soil and water Pb pollution is considered as one of the major problems for plants and ecosystems. It has become one of the most important limiting factors to crop productivity and quality. Some crops accumulate Pb in edible organs incorporating it to the trophic chain, becoming a potential public health problem (Kumar et al. 1995; Arif et al. 2019).

Pb induces a wide range of toxic effects on plants at morphological, physiological and biochemical levels. Pb affects seed germination, seedlings development and impairs the growth of plant shoot and root system; also, it disturbs mineral nutrition, transpiration and hormonal balances. At cellular level, inhibits enzyme activity, water balance, chlorophyll production and cell division (Küpper 2017; Zulfiqar et al. 2019). The toxicity of Pb on plants depends on bioavailability, concentration and exposure time. It also depends on the plant species, the stage of development and the specific organ exposed (Pourrut et al. 2011; Fahr et al. 2013; Xu et al. 2017; Zulfiqar et al. 2019).

It has been reported that Pb modifies drastically the PRDP. When plants, with a taproot root system, grow in a media with relatively high concentration of Pb, the primary root length (PRL) is reduced as well as number of LRs and lateral root density (LRD; number of lateral root per unit length centimetre of the primary root) are increased (Lee et al. 2005; Gichner et al.

2008; Morel et al. 2009; Arias et al. 2010; Hattab et al. 2016; Arif et al. 2019). Similar phenotypes have been observed in *A. thaliana* seedlings growing in media supplemented with some others HMs, such as Cr, Cu or Al (Castro et al. 2007; Lequeux et al. 2010; Ruíz-Herrera and López-Bucio 2013), and also other abiotic stressors such phosphate starvation (Williamson et al. 2001; López-Bucio et al. 2002).

Phosphate is one of the most important macronutrients involved in the synthesis of nucleic acids and phospholipids, in energetic store (ATP) and in molecular signaling (phosphorylation). When *A. thaliana* grows on a Pi (inorganic phosphate)-free medium, the RSA is modified drastically, its root system became shorter and highly ramified (Williamson et al. 2001; López-Bucio et al. 2002). Remodeling RSA under Pi starvation is coordinated through sensing and signaling network, from biochemical root responses in order to increase the mobility and availability of the anion (Pi) in the soil, until growth and developmental responses. Among components of Pi starvation response, highlights STOP1–ALMT1 and PDR2–LPR1/2 pathways, which determine two ways that take part on sensing Pi in the rhizosphere and regulation of cell elongation or cell proliferation, respectively, to guide root growth and development (Svistoonoff et al. 2007; Abel 2017; Balzergue et al. 2017). In soil, Pi availability is compromised by Pb presence due to formation of Pb–Pi insoluble compounds (Zeng et al. 2017).

The similar phenotypes in response to relatively high concentration Pb and Pi starvation makes us suppose that is due to a generation of Pi-starvation due to the addition of Pb (Pb stress) to the medium and these parallel stresses, use the same genetic and signaling networks involved in perception of stress and coordinated response in terms PRDP. Thus, it is of interest to describe the effects of Pb stress on plant growth and development and investigate if use the same genetic pathway of Pi starvation response. Here, we used *A. thaliana* to describe in detail the effects wide range of concentrations of Pb on RSA and some biochemical and expression of phosphate transporter high-affinity *AtPHT1;4* (*pAtPT2::GUS*). In order to determinate if Pb stress and Pi starvation share common genetic compounds we tested tree mutants that fail to reduce PRL in Pi starvation stress. We chose one affected on STOP1–ALMT1 pathway (*stop1*), one affected on PDR2–LPR1/2 pathway

(*lpr1/2*) and LPI3 undescribed pathways (*lpi3*). Our results demonstrate that changes in RSA by Pb (800 μ M) are genetically regulated and despite the fact that Pb stress generates Pi deficiency in the culture medium, only one of the two reported pathways (PDR2–LPR1/2 pathway) is necessary for changes in RSA to occur. Taking together these results indicate that changes generated on RSA induced by Pb stress (Pi starvation induced by Pb) and Pi starvation are similar and PDR2–LPR1/2 pathway are necessary.

Materials and methods

A. thaliana seedling and growth condition

Arabidopsis thaliana Columbia-0 (Col-0), Wasilewskija (Ws), Landsberg erecta (Ler) and Nossen (Nos) ecotypes, transgenic line *pAtPT2::GUS* (Karthikeyan et al. 2002), *CycB1;1::GFP* (Ubeda-Tomás et al. 2009) and phosphate insensitive mutants *lpi3*, *lpr1/2* and *stop1* (Reymond et al. 2006; Sánchez-Calderón et al. 2006; Iuchi et al. 2007), were used in the experiments. Seeds were surface sterilized with ethanol 70% for 5 min and bleach 20% (v/v; equivalent to 0.13 M of sodium hypochlorite) and rinsed five times with sterile distilled water and stratified in darkness for 48 h at 4°C (López-Bucio et al. 2002). Then, seeds were germinated and grown on agar petri dishes which contain modified Murashige and Skoog (MS) 0.1X salts, pH 5.7, sucrose 0.5% (w/v), buffer MES (2-N-morpholinoethanesulfonic acid) 0.68 g/L and agar TC (micropropagation grade, PhytoTechnology Laboratories) 10 g/L (Murashige and Skoog 1962). Petri dishes were placed vertically at an angle of 65° in a growth chamber (Percival Scientific, AR41L3) with a photoperiod of 16 h light, 8 h darkness at 20 °C \pm 1 °C. In all experiments, excepting salt substitution assay, lead nitrate Pb(NO₃)₂ was used as a source of Pb. In salt substitution assay, to prepare medium with alternative source of Pb, Pb(NO₃)₂ was replaced by an equimolar concentration of its chloride salt (PbCl₂). N-rich medium was prepared adding 800 μ M of KNO₃ to MS 0.1X salts. The N-free medium was made by omitting NH₄NO₃ and KNO₃ from the nutrient solution. Finally, Pb(NO₃)₂ and NH₄NO₃ were used as source of N to match with N concentration used in 0.1X MS medium. In the supplied phosphate (Pi)

assay, Pi sufficient was 500 μM ; in Pi starvation (-Pi) was 1 μM of KH_2PO_4 .

In silico precipitation analysis

All salts concentration of 0.1 X MS medium and pH 5.7 were entered in GeoChem-EZ software (Shaff et al. 2010), software automatically calculates ionic strength of the solution. Default settings were modified to allow solids precipitation into solution and to carry out 50 iterations of predictive analysis.

Total Pi determination

Seedlings were collected in polypropylene tubes and dried at 60 °C until reaching constant weight. Samples were digested with HCl 2 M, then were mixed with chromogenic solution of vanadate-molybdate (Holford 1997). Total Pi was quantified using a spectrophotometer Jenway 7305 at 420 nm wave length.

Root system data analysis and biomass quantification

Every three days, along 12 days that experiments were carried out, photographs of the agar plates and primary root apex and foliar area of plants were taken and analysed using the public domain NIH ImageJ software (developed at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). The PRL, length from quiescent centre (QC) to first root hair (LARH) or to first lateral root (LALR) were measured; also, lateral root number (LRN) and lateral root density (LRD) were quantified. For biomass quantification, shoot and root system were separated and dehydrated at 60 °C until reaching constant weight, then biomass was quantified for each treatment. Data obtained from each experiment were analysed in Minitab 16 Statistical Software (Minitab, Incorporation). One-way ANOVA with a Tukey's Post Hoc analysis was used to test differences from each group. Different letters indicate means are statistically distinct ($P < 0.05$).

Histochemical analysis and microscopy

A. thaliana seedlings harbouring GUS reporter gene were incubated overnight at 37 °C in a GUS reaction buffer (phosphate buffer 50 mM, EDTA 10 mM,

Triton X-100 0.1%, potassium ferrocyanide and potassium ferricyanide both 5 mM, chloramphenicol 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide) (Jefferson et al. 1987). Once stained seedlings were cleared using the protocol modified of Malamy and Benfey (1997). Seedlings were incubated in HCl 0.24 N in 20% methanol (v/v) at 55 °C for 15 min. The solution was substituted for 7% NaOH (w/v) in 60% ethanol (v/v) incubated 20 minutes at room temperature. Plants were rehydrated with ethanol decreasing concentration 40, 20 and 10% incubated at room temperature for 10 min in each concentration. Plants were incubated overnight in glycerol 50% solution and were mounted on microscope slide with 100 μL of 50% glycerol and sealed with coverslips, then photographed in bright field microscope (Leica DM1000). For confocal microscopy analysis, six days after germination seedlings harbouring *CyCB1;1::GFP* with or without 800 μM of Pb treatments were mounted on microscope slide with 1.0 mg/mL propidium iodide (PI) solution, and tissue fluorescence was detected in a confocal microscope Olympus FV1000. For PI detection, wavelength of 568 nm excitation line and emission window of 585–610 nm were used; for GFP detection, were used 488 nm emission wavelength excitation line and 500 to 523 nm emission filter.

Root acidification assay

To evaluate the acidification of the medium by the root system, some modifications to the work of Römheld (1984) were made (Römheld et al. 1984); seedlings of 12 days old were transferred to MS 0.1 X MES free, pH 7 and supplemented with bromocresol purple 0.04 % (w/v) dissolved in NaOH 16 mM. Plates were depleted or supplemented with lead or phosphate according to each assay. Seedling remained in this medium for 24 h and was photographed.

Results

Lead modify *A. thaliana* growth and root system architecture similar to phosphate starvation

Previous work reported that the presence of Pb in the medium affects plant growth (Awan et al. 2015; Ashraf et al. 2017; Alaboudi et al. 2018). In order to

characterize the effect of Pb on *A. thaliana* growth, ecotype Col-0 seedlings were germinated and grown over the surface of MS 0.1 X agar plates supplemented with increasing concentrations of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, and dry weight of shoot and root, and foliar area, were determined. Pb caused an increase in shoot dry weight and foliar area up to 400 μM (39.1 and 13.0% respectively), but when Pb concentration increased at 800 μM both were reduced drastically (54.1 and 50.3 % respectively; Fig. 1a, b, e–i). Meanwhile, from 0 to 800 μM of Pb, root dry weight remained lightly oscillating in relation to the control (Fig. 1a, e–i). At 1000 μM of Pb, the shoot and root system growth of *A. thaliana* seedlings were almost abolished and presented typical symptoms of Pb acute toxicity (Fig. 1a–d and j). Our results show that *A. thaliana* presents a biphasic dose-response to Pb: at relatively low concentrations (200 and 400 μM), the biomass increased and as the concentrations of Pb increase the biomass decreases (600 and 800 μM) until it is no longer produced (1000 μM).

As our results and previous reports pointed out Pb can affect the development of root system (Awan et al. 2015; Ashraf et al. 2017; Alaboudi et al. 2018), the effect of Pb on RSA of *A. thaliana*, was described in detail. The RSA components PRL, LRs and LRD were quantified. When *A. thaliana* seedlings grew up on plates supplemented with Pb, we found that relatively low concentrations of Pb (200 μM) induced a slight increase on the PRL (2.6 %), followed by a reduction of 32.6, and 83.9% respect to control in 600 and 800 μM of Pb (Fig. 1c, e–j and Online Resource 1); similar tendency was observed in biomass accumulation. Regarding to LRD, it remained similar to the control in concentrations up to 600 μM , but in 800 μM it showed a 7.9-fold increase (Fig. 1d, e–j). When the effect of increasing concentrations of Pb on RSA of *A. thaliana* ecotypes (Col-0, Ws, Ler and Nos) was analyzed, it was found that biphasic dose-response to Pb is conserved among them. At relatively low concentration ($\leq 400 \mu\text{M}$) an increase in PRL was shown (Online Resource 2); in Col-0 the increase happened from concentrations as low as 50 μM (Online Resource 1) with a slight increase in LRD. Interestingly, at 800 μM , a concentration prior to the onset of acute Pb toxicity symptoms, the inhibition of primary root growth was accompanied by a 2.2–6.2 fold increase in lateral root density (Fig. 1c, d, e–j and Online Resource 2), and a similar phenotype observed

on *A. thaliana* grown on -Pi medium (Online Resource 3).

Due to $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ was used as a source of Pb, was necessary to test if anion nitrate (NO_3^-) is responsible for or is having an additive effect on the changes on RSA of *A. thaliana* at 800 μM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, salt substitution assay was performed. When the excess of NO_3^- (800 μM of KNO_3) was added to MS 0.1 X medium, there was no decrease in PRL and no increase in LRD compared to those plants that grew on medium supplemented with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. The substitution of NO_3^- by chloride (Cl^-) using 800 μM of lead chloride (PbCl_2) resulted in a similar PRL and LRD response that observed in $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ treatment. Furthermore, plants that were grown in MS 0.1 X modified (ammonium nitrate (NH_4NO_3) and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ with the same concentration of nitrogen present in MS 0.1 X) maintained a similar Pb response (Fig. 2). These results indicate that NO_3^- has no additive effect on RSA when *A. thaliana* grows at 800 μM of $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, and RSA modification is maintained regardless of the source of the Pb.

Up to this point, our results indicate that changes generated in the RSA of *A. thaliana* when it grows in culture medium added with 800 μM of Pb appear to be the same as those reported in Pi starvation response: root system highly branched with abundant lateral roots and a short primary root (Williamson et al. 2001; López-Bucio et al. 2002). It has been reported that primary root growth inhibition by Pi starvation is due to a reduction of cell elongation followed by the progressive loss of meristematic cells (Sánchez-Calderón et al. 2005). In order to determine if those processes are affected in *A. thaliana* primary roots when grown on 800 μM of Pb, we analyze the primary root apex of *A. thaliana* in order to study the changes on cell differentiation, cell elongation, and mitotic activity. We quantified the length from apex to first root hair (LARH) and length from apex to first lateral root (LALR), as an indicator of cell elongation and differentiation, as well as *CyCB1;1::GFP* signal as mitotic activity marker. We found that at 800 μM of Pb the LARH and LALR reduce drastically (84.4 and 91.3 % respectively) comparing to the control (Fig. 3a and b), indicating that cell elongation was lost, and cell differentiation process initiated close to meristematic area. Also, a loss of mitotic activity, evidenced by loss of *CyCB1;1::GFP* activity, and a loss of meristem anatomy, were observed (Fig. 3c and d), indicating that

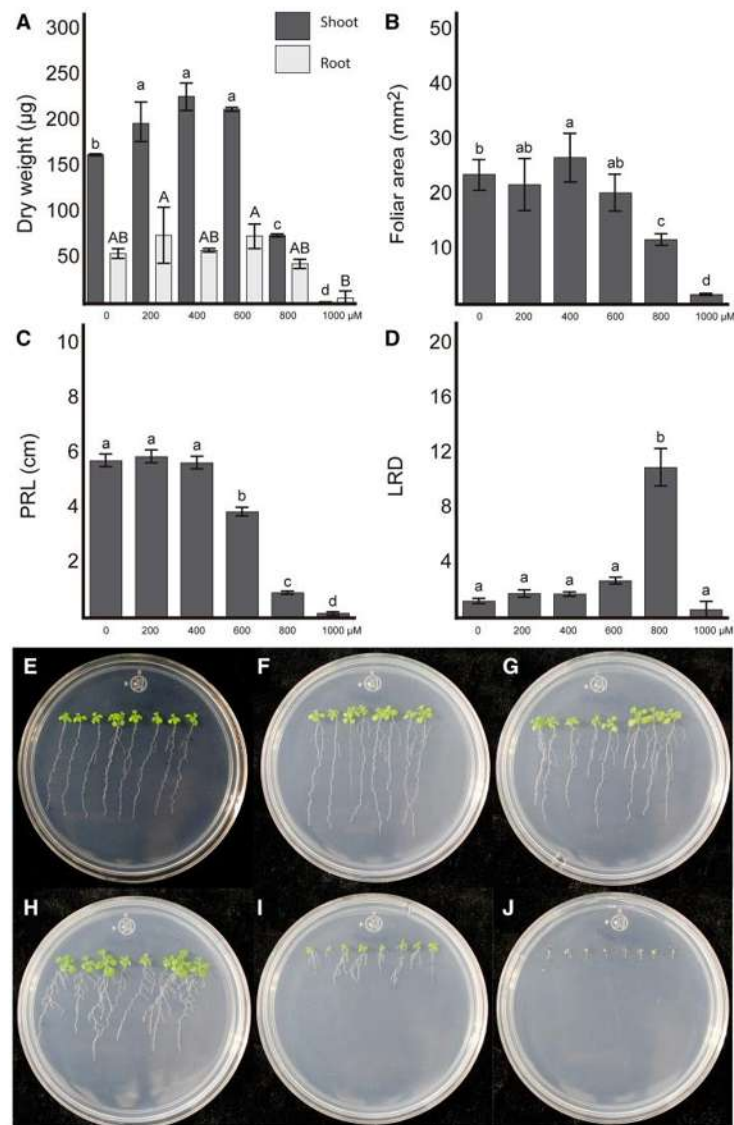


Fig. 1 Lead stress modifies *A. thaliana* growth. Seedlings were germinated and grown in MS 0.1 X medium supplied with lead. Biomass of shoot and root (a), foliar area (b), primary root length (c) and lateral root density (d) were evaluated at 12 days after germination. Representative images (e–j). 0 (e), 200 (f),

400 (g), 600 (h), 800 (i) and 1000 (j) µM of Pb. Primary root length (PRL), lateral root density (LRD). n = 12, graphs and images representative of 3 biological replicas, ± standard error. Different letters indicate statistically different groups. P < 0.05

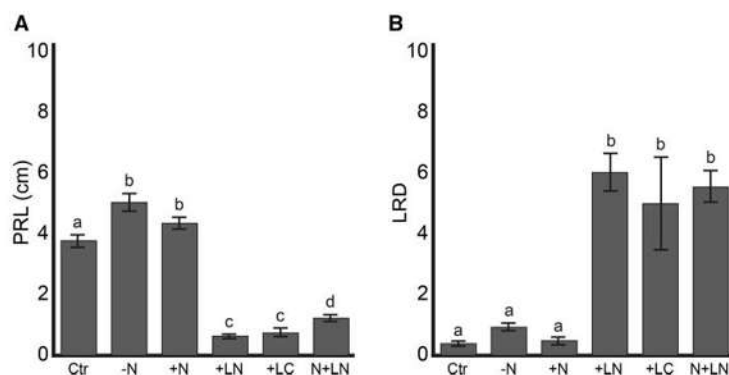


Fig. 2 Ion lead modifies root system architecture. Plants were germinated and grown on MS 0.1 X medium (Ctrl), without nitrogen (-N), supplemented with 800 μM of potassium nitrate (+N; KNO_3), 800 μM of lead as lead nitrate (+LN; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) and lead chloride (+LC; PbCl_2), or ammonium nitrate plus lead

nitrate (N+LN); both salts together sum the same nitrogen concentration than control. Primary root length (PRL; a) lateral root density (LRD; b), $n = 12$, graphs are representative of 2 biological replicas, \pm standard error. Different letters indicate statistically different groups. $P < 0.05$

differentiation occurred in the meristematic zone having as a consequence loss of their proliferative activity. All changes on PRL, LRD and loss of meristematic activity on root apex of *A. thaliana* when is grown on 800 μM of Pb, seem to be similar as those reported during Pi starvation, suggesting that in some point of its regulation network both Pi starvation and Pb signals converge.

In silico analysis show chemical interaction between lead and phosphate

It has been reported that in soil, Pi and Pb interacts to form an insoluble compound, making Pb and Pi insoluble in soil-aqueous interface (Zeng et al. 2017), suggesting that Pb added to MS medium could be interacting with Pi, having as a consequence the decrease Pi availability to be taken by *A. thaliana*. With the aim of increase information about that a possible Pi-Pb interaction is involved in similitude in responses to Pb and to Pi starvation, we predict the solubility profile of Pi and Pb in the culture medium. To this, we made an *in silico* analysis using GeoChemEZ software in which pH was adjusted at 5.7 and all salts of MS medium were included according to our experimental conditions. The analysis showed that in the 0.1 X MS medium at pH 5.7, Pi solubility diminishes as Pb addition increases. Soluble Pb remains below 20 μM until 500 μM , and increases

drastically in treatment with 600, 700 and 800 μM Pb added (Fig. 4 and Table 1). It is interesting that in treatments where Pb solubility is increasing (600, 700, and 800 μM), PRL diminishes respect to control treatment (32.6, 66.5 and 83.9 %) suggesting that changes on RSA correlate with an increase Pb availability and a decrease in Pi solubility (Fig. 4b). According to *in silico* prediction, when 0.1 X MS medium pH 5.7 is supplied with 800 μM of Pb only 0.85 μM of Pi and 201.04 μM of Pb are soluble; then, plants growing in the culture medium added with 800 μM of Pb, are stressed by Pb (201.04 μM) and Pi starvation. Then the Pi-starvation generated by the supplementation of 800 μM of Pb and the toxicity generated by 201.04 μM of Pb could be the cause of the changes in the RSA and root apex.

Pb causes downregulation of *AtPT2* expression and limits Pi accumulation in seedlings.

In addition to changes in the RSA, it has been reported that Pi starvation triggers a low Pi rescue system that includes biochemical, genetic and physiological responses (Raghothama 1999). One of the most studied responses is the induction of expression of genes encoding high-affinity phosphate transporters (PHT) such as *AtPHT1;1* (*AtPT1*) and *AtPHT1;4* (*AtPT2*). These PHTs enhance Pi uptake from the rhizosphere when Pi is unavailable. With the aim of

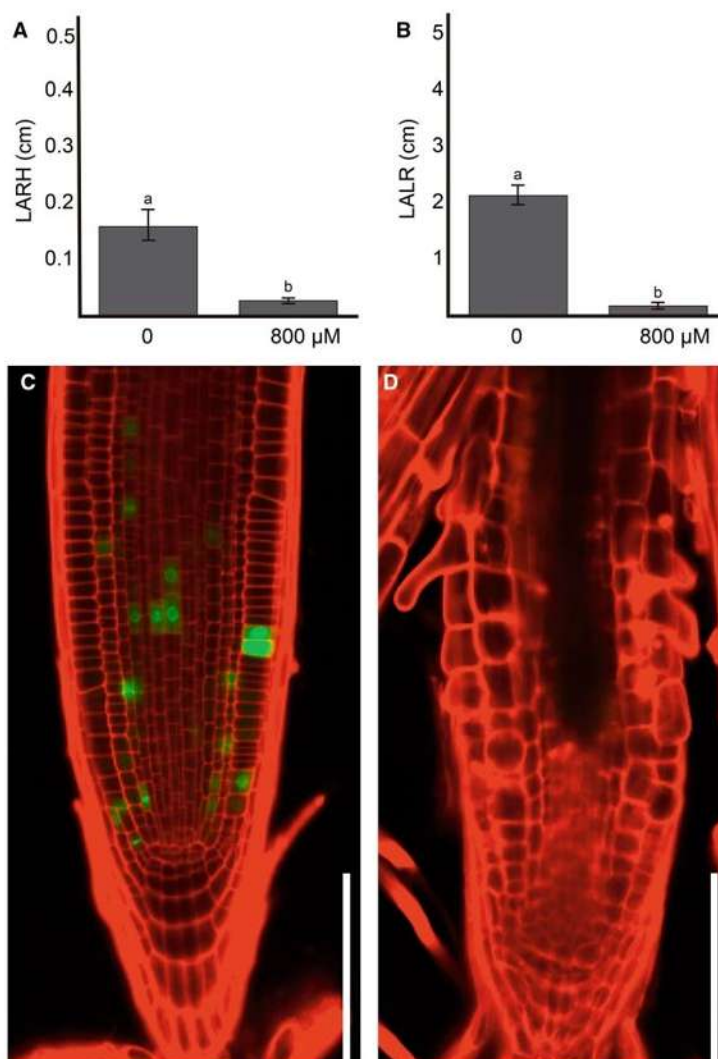


Fig. 3 Lead modify root growth and development process in root apex. Length from apex to first root hair (LARH) is shown in (a), length from apex to first lateral root (LALR) is shown in (b). Confocal microscopy images of root apex seedling of *A. thaliana* *CyCB1::GFP* supplemented with 0 and 800 μM of Pb

(c and d respectively). Seedlings were evaluated at 12 days after germination (a and b) and 6 days after germination (c and d). Scale bar represent 100 μm. n = 12, ± standard error, different letters indicate statistically different groups. P < 0.05

validating the *in silico* prediction above mentioned, we use *A. thaliana* line *pAtPT2::GUS* which increases expression of GUS reporter gene when plants are Pi

starved. *A. thaliana* *pAtPT2::GUS* were grown on 0.1 X MS medium (control), -Pi (1 μM; similar to predicted *in silico*) and supplied with 800 μM of Pb

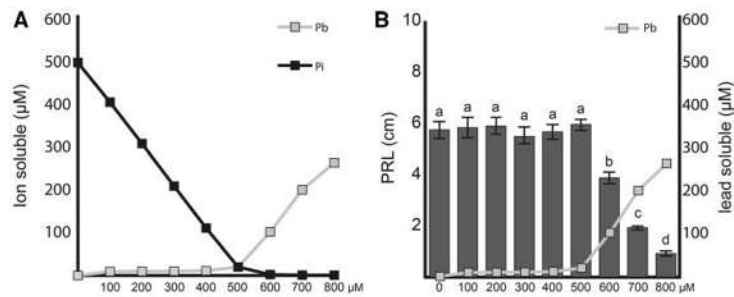


Fig. 4 Phosphate solubility depends on lead concentration. *In silico* analysis of ionic interaction. Solubility status of Pi and Pb change as lead is added to medium (a). Comparison of primary root length (PRL) and Pb ion soluble in MS 0.1 X media (b). n =

12, graph is representative of 3 biological replicas, ± standard error. Different letters indicate statistically different groups. P < 0.05

Table 1 *In silico* analysis of phosphate and lead precipitation

Pb added (µM)	Soluble Pi (µM)	Soluble Pb (µM)
0	500.0	0
100	407.0	9.2
200	309.5	9.5
300	210.1	10.1
400	111.25	11.2
500	20.05	19.9
600	2.2	102.1
700	1.1	171.8
800	0.85	201.04

GeoChem-EZ, pH = 5.7, 50 iterations

(+Pb). As previously reported (Sánchez-Calderón et al. 2005), the *A. thaliana pAtPT2::GUS* seedlings that grew under -Pi presented a short PRL (Fig. 5a) and their root apex are differentiated; it is not possible to distinguish the meristem and in that region it is intensely coloured in blue, due to strong induction of expression of *pAtPT2::GUS* these responses are typical of Pi starvation (Fig. 5d), unlike those that grow under control conditions (Fig. 5c). Interestingly, *A. thaliana pAtPT2::GUS* seedling that grew under +Pb conditions only presented the anatomical changes of the root apex such as short PRL (Fig 5a) and meristem disorganization, but not the induction of expression of *pAtPT2::GUS*, indicated by blue coloration as intense as Pi starvation conditions (Fig. 5e). When we measured Pi content in *A. thaliana Col-0* seedlings (genetic background of *pAtPT2::GUS* line)

growing in the same treatments (control, - Pi and + Pb). we found that seedlings that grew under control conditions presented higher Pi content (2.49% of plant tissue) meanwhile -Pi and +Pb were 0.42 and 0.14 % respectively (Fig 5b). The fact that +Pb treated seedlings showed similar content of Pi that those Pi starved (-Pi), indicate us that Pi is not up taken by seedlings growing under Pb stress. Taking into account that Pi content in *A. thaliana* seedlings during Pb stress is as low as Pi content of those growing under Pi starvation, this show that Pb stress induce Pi starvation by Pb-Pi precipitation in medium and also downregulation of *AtPT2*, one of the most important Pi transporters when Pi is unavailable in media.

Primary root length decrease in lead supplemented medium is dependent of PDR2-LPR1/2 and LPI3 pathway

It has been reported that during Pi-starvation, there are at least two sensing and signalling pathways (STOP1-ALMT1 and PDR2-LPR1/2), both operate in a parallel way affecting cell elongation or cell proliferation processes, respectively (Svistonoff et al. 2007; Balzergue et al. 2017). The effect on such cellular processes results in the loss of growth and development processes at the root apex and, therefore, the typical changes in RSA previously reported (short and branched root system) (Gutiérrez-Alanís et al. 2018). Both pathways are necessary for changes in RSA to occur during Pi stress and the lack of a single one of them is sufficient to make the plant insensitive to Pi deficiency, at least with respect to RSA. With the

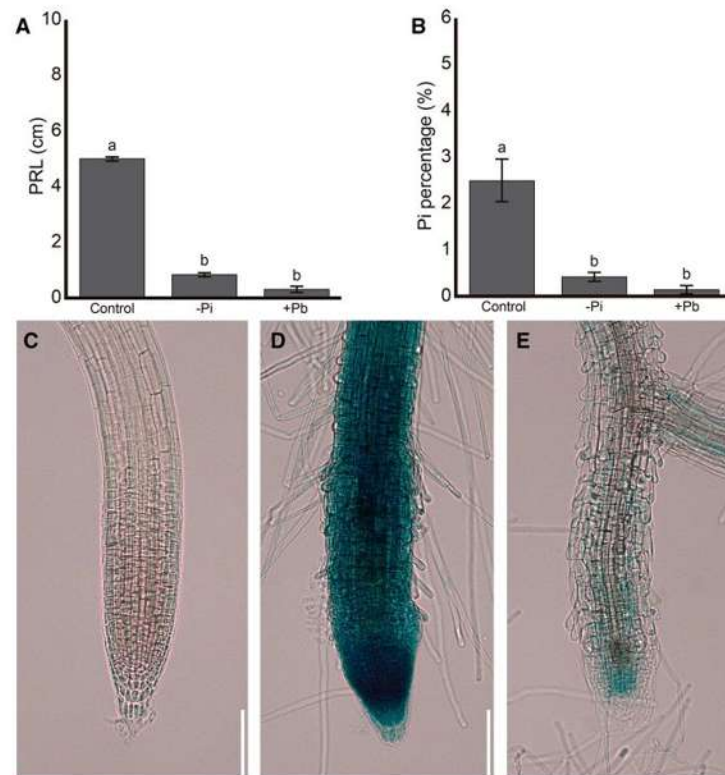


Fig. 5 Pb stress induce *AtPT2* downregulation and limits Pi accumulation. Primary root length (a), percentage of Pi content in seedling tissue (b). Bright field microscopy of primary root apex of transgenic line *pAtPT2::GUS* (c–e); seedlings were

grown in Control, MS 0.1 X (c), -Pi, 1 μ M of Pi (d) and +Pb, 800 μ M of Pb (e). Scale bar represents 100 μ m. n = 12, images are representative of 3 biological replicas

purpose of determine if Pb stress and Pi starvation share the same pathways that modify RSA, we used the mutants *stop1* (affected on STOP1-ALMT1 pathway) *lpr1/2* (affected on PDR2-LPR1/2 pathway) and *lpi3* (uncharacterized yet). Seedlings were grown on -Pi (1 μ M), +Pb (800 μ M) and control. As previously reported (Sánchez-Calderón et al. 2006; Svistoonoff et al. 2007; Balzergue et al. 2017), in our experiments, the mutants *stop1*, *lpr1/2* and *lpi3* were insensitive to Pi starvation when they grow on -Pi, their root system remains as if it grew in optimal conditions of Pi (Fig. 6a, c, f, i compared to d, g, j). Unlike, when media were supplemented with Pb, we found two different responses: (i) mutant *stop1* had similar growth than WT (Col-0; Fig. 6b and k), demonstrating that the

STOP1-ALMT1 pathway is not necessary for + Pb response, and (ii) mutants *lpr1/2* and *lpi3* grew as if they were in media without Pb; they were insensitive to +Pb, demonstrating that changes in the RSA of plants growing at medium +Pb are dependent on the PDR2-LPR1/2 pathway and the uncharacterized pathway where *lpi3* is involved (Fig. 6b, e, and h). Thus, those RSA changes are genetically regulated and despite the fact that Pb stress generates Pi deficiency in the culture medium, only one of the two reported pathways (PDR2-LPR1/2 pathway) is necessary for changes in RSA to occur. Interestingly, the angle of growth of PR of *lpr1/2* and *lpi3* were modified 30.1 and 31.0 degrees respect to gravity axis (Fig. 6e and h) and dry weight increased (shoot 32.2 and 22.3%; root

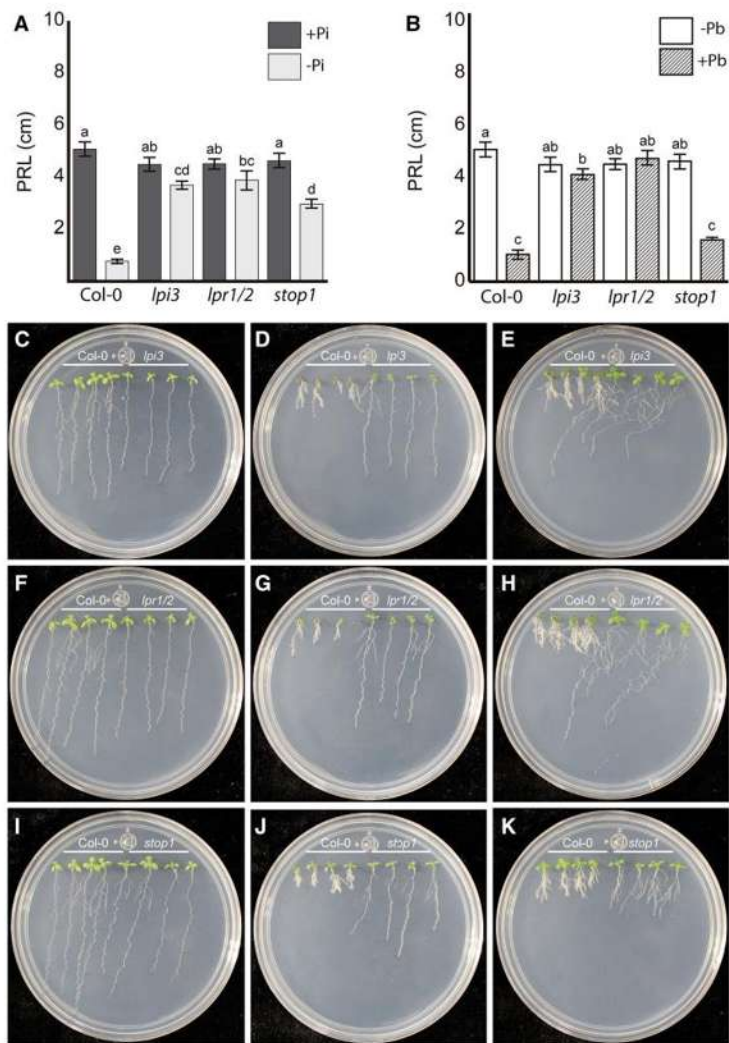


Fig. 6 *LPR1/2* and *LPI3* genes are necessary for RSA response to lead. *A. thaliana* Col-0 and mutants *stop1*, *lpr1/2* and *lpi3* were germinated and grown in control conditions, low Pi (-P; 1 μ M) and lead (+Pb; 800 μ M) media. Mutants grown with or without phosphate (a), and with and without Pb (b). Representative images of Col-0 (four left seedlings) and mutants (four

right seedlings) grown on control (c, f and i), -Pi (d, g and j) and +Pb (e, h and k). *lpi3* (c, d and e), *lpr1/2* (f, g and h) and *stop1* (i, j and k). n = 12, graphs and images are representative of 3 biological replicas, \pm standard error. Different letters indicate statistically different groups. P < 0.05

157.2 and 50.2% for *lpi3* and *lpr1/2* respectively) when mutants grew on +Pb media compared to plants

grown in the control media (Fig. 6 and Online Resource 4).

Lead induce root acid exudates

It has been reported that, some plants have the capacity to change the physical-chemical properties of rhizosphere through secretion of organic acids and release of protons. This acidification increases the bioavailability of nutrients, the solubilization of Pb (Fig. 7a), and tolerance to heavy metals (Meyer et al. 2010; Osmolovskaya et al. 2018). We used *A. thaliana* Col-0, a mutant sensitive to Pb (*stop1*) and a mutant insensitive to Pb (*lpr1/2*); twelve days old seedlings grown on $-Pi$ (1 μ M), $+Pb$ (800 μ M) and control, were transplanted to MS media pH 7 without MES buffer and added bromocresol purple (pH indicator; purple indicates pH 7 and yellow pH 5); after 24 h, the pH changes were registered. The results show that in $+Pb$ supplemented medium acidification was as intense as $-Pi$ in Col-0, *stop1* and *lpr1/2* mutants (Fig. 7 b to g), suggesting that the addition of lead induces changes in pH generated by the root system. Also, it is shown that acidification and changes in RSA induced by Pb are regulated by independent pathways.

Discussion

Pb induces a biphasic dose response curve in *A. thaliana* seedlings

Pb is a persistent pollutant in soil and accumulates mainly as a result of anthropogenic activities. This

HM severely limits plant growth and crop productivity. Pb toxicity has been reported as stunted root growth, due to inhibition in cell division and cellular death (Küpper 2017; Zulfiqar et al. 2019). In the majority of previous studies, Pb toxic effects show a linear dose response curve, where evaluated parameters such as mitotic index, biomass, or root length show a linear inhibition with increase Pb concentration (Verma and Dubey 2003; Hussain et al. 2013; Kaur et al. 2014; Kanwal et al. 2020; Xue et al. 2020).

In contrast with previously reported, our results show that in *A. thaliana* Pb evokes a biphasic dose-response curve. These biphasic responses exhibit a stimulatory effect at low Pb concentrations, meanwhile at high concentrations the effect is inhibitory. This response is evident in shoot dry weight and foliar area in concentrations up to 400 μ M of Pb (Fig. 1 a, b, e-g) and in PRL in concentrations below 200 μ M (Online Resource 1); root system shows the stimulatory effect at lower concentration than shoot, first because root system is in direct contact with Pb supplemented medium and second because translocation of Pb to shoot is poor; therefore, is necessary higher Pb concentration to evoke stimulatory effect in shoot (Chen et al. 1997; Kumar and Prasad 2018). Meanwhile, at high Pb concentration (over 600 μ M) an inhibitory effect is shown by decreasing in PRL. The biphasic curve is conserved among different *A. thaliana* ecotypes such as Columbia-0, Wassilewskija, Landsberg erecta and Nossen (Online Resource 2).

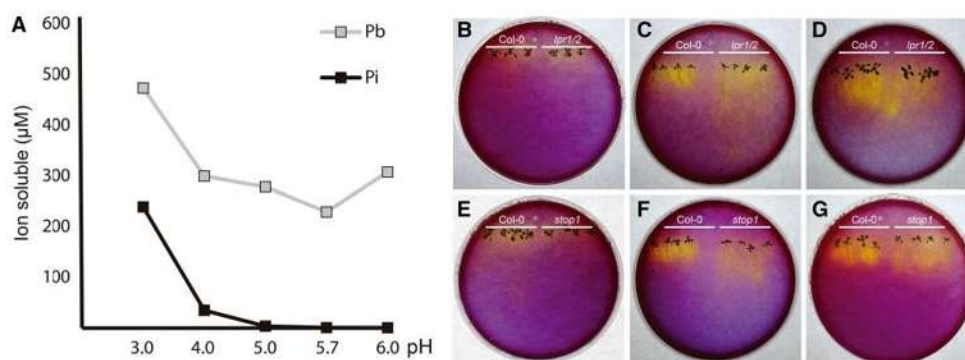


Fig. 7 Lead and phosphate induce acid exudation. Solubility of lead and phosphate at different pH (3 to 6) were predicted *in silico* (a). Acid exudation by radical system were evaluated, seedlings were grown on MS 0.1 X media (b and e), $-Pi$ (1 μ M; c and f) and $+Pb$ (800 μ M; d and g). Two mutants insensitive to

phosphate starvation were evaluated *lpr1/2* (b–d) and *stop1* (e–g). $n = 16$, images are representative of 3 biological replicas. In culture media yellow colour correspond to pH = 5 and purple pH = 7. (Color figure online)

The biphasic dose response curve has been observed in response to Cr (VI) in *A. thaliana* and *Allium cepa* (Castro et al. 2007; Patnaik et al. 2013); with Cd in *Solanum melongena* (Siddhu et al. 2008), and Cd and Pb in *Zea mays* (Malkowski et al. 2020); also, other stresses such as herbicides (Belz and Duke 2014) and ionizing radiation (Miller and Miller 1987), evoke a biphasic dose response curve. Biphasic dose response curves phenomenon are known as hormesis (Agathokleous et al. 2019) and are conserved among stress condition, suggesting that hormetic effects are likely to operate via genetic, physiological and morphological responses that are regulated by similar genetic pathways under different environmental stress condition (Costantini et al. 2010).

Pb regulates root system architecture

Our results show that different Pb doses induce different effects in PRL: at Pb doses prior to 400 μM show no diminution (nontoxic), from 600 to 800 μM show a gradual decrease (subacute toxicity) and at 1000 μM is toxic (Fig. 1c, g, h, i and j). It is interesting that at subacute toxic Pb doses increases LRD despite PRL decrease, LRD gradually increases until a maximum (800 μM); once reached acute toxic Pb dose (1000 μM), LRD value decay severely (Fig. 1c-j). The above suggests that 800 μM is the threshold concentration before to reach acute toxicity and that RSA below this threshold (800 μM) shows morphogenic responses, meanwhile up to this threshold root system development is lost. It is known that under stress conditions one of the strategies that plants have adopted is to slow down growth in order to conserve energy; here, we show that reduction in growth was present in primary root under Pb 800 μM (herein referred as subacute toxic dose), such as decrease in differentiation zone length or cell division (Fig. 3); however, under stress, an array of genetical, physiological and morphological responses occur, resulting in a mixture of root growth inhibition and activation that allows seedlings to tolerate or avoid stress (May et al. 1998; Potters et al. 2007; Remans et al. 2012). Under subacute toxicity (800 μM Pb), RSA shows at same time reduction in PRL and an increase in LRD; this phenotype has been observed in other HMs such as Cr (VI), Cu or Al (Castro et al. 2007; Lequeux et al. 2010; Ruíz-Herrera and López-Bucio 2013).

In heterogeneous soil, root system plasticity allows plant to survive acquiring resources or avoiding noxious environments; it has been reported under Cd stress conditions that RSA was reorganized to avoid growth into unfavourable regions, when transcription factor (GPL4) is involved in sensing non-contaminated region (Khare et al. 2017). Here, we show that Pb induces changes in RSA which could take part in Pb avoidant responses in heterogeneous environments such as soil; in our results, seedlings show a decrease in PRL by a determinate development program. It has been reported that cessation of meristematic activity in the apical meristem is directly related to the promotion of the formation of lateral roots; thus, it leads to an increase in LRD which could allow the plant to enhance the exploratory capacity to reach a non-contaminated zone (Dubrovsky 1997; Khare et al. 2017). Here, we show that 800 μM of Pb root system responds by increasing LRD which enhances horizontal exploratory capacity, meanwhile deep exploratory capacity is drastically reduced. Lateral roots are implicated in Pb tolerance in some plants: *Oryza sativa* varieties with root system highly branched show less Pb toxicity symptoms than varieties with root system low branched (Yang et al. 2000). Also, in assays with *Helianthus annuus* with primary root system (in which adventitious roots were cut off) or with adventitious root (in which primary root were cut off), seedlings with only adventitious roots were more tolerant to Pb than seedlings with only primary root (Strubińska and Hanaka 2011). The before highlights that lateral roots take part as important RSA components to cope with Pb stress. To support whether a decrease in PRL and an increase in LRD are implicated in Pb tolerance, further assays in non-homogeneous media are needed. In soil, Pb accumulates in upper soil layers due to low solubility and exhibit a patchy distribution (Cecchi et al. 2008). Adjusting of RSA by promoting LRD increase horizontal exploratory capacity, and this adaptation allows the seedling to avoid Pb patch in soil.

Subacute toxic Pb doses share morphophysiological responses with Pi starvation

When *A. thaliana* grows on subacute toxic Pb doses, their RSA resembles those that grow on Pi starvation (Williamson et al. 2001; López-Bucio et al. 2002), where PRL decrease and LRD increase both in

subacute toxic Pb doses or Pi starvation, in similar proportions (Online Resource 3). Environmental stress induces RSA changes as part of acclimatization: similarities in RSA changes induced by distinct environments stresses reflect common molecular process (Potters et al. 2007), which suggests the possibility of using similar pathways between stress by subacute toxic Pb doses and Pi starvation. It has been reported that Pi starvation morphogenic response (decrease PRL and LRD increase) enhance Pi uptake by increasing superficial soil layers exploration where Pi accumulates (Sánchez-Calderón et al. 2005). However, Pb also accumulates at superficial layers due to low mobility by interacting with sulphate, carbonate, and Pi (Zeng et al. 2017; Zulfiqar et al. 2019). The above suggest us that, phenotype in MS media, subacute toxic Pb doses was due to reduction of Pi availability by Pb-Pi interaction. The *in silico* analysis using GeoChem-EZ software indicate that Pi availability could be compromised by Pb-Pi interaction, which could evoke a Pi starvation response (Table 1 and Fig. 4). Therefore, seedling grown in 800 µM of Pb are under Pb and Pi starvation stress at the same time.

In order to compare Pi starvation stress and Pb stress, was necessary to characterize responses in the root system induced by subacute toxic Pb doses. A shared morphogenic response between Pi starvation and subacute toxic Pb doses is decrease in PRL; it is known that under Pi starvation stress PRL decreases by reduced cell elongation and premature cell differentiation (Sánchez-Calderón et al. 2005). We found that similar to reported in Pi starvation, in subacute toxic Pb doses, disorganization is related with a decrease in elongation zone (LARH), differentiation zone (LALR) and cell division (*CyCB1;1::GFP*) (Fig. 3). It has been reported that in response to Pb, root cell wall increases callose accumulation to avoid Pb entrance (Samardakiewicz et al. 2012). Under some HMs stress (Cd, Cu, Fe) and Pi starvation stress, callose accumulation reduces plasmodesma permeability, cell to cell communication and depletion of stem cell population in meristem, which reduces growth (O'Leary et al. 2018). It is possible that callose takes part in reduction of growth PR due to Pb stress similar to other HMs and Pi stress. Under Pb stress, accumulation of callose is attributed to avoid Pb entrance as a protection response, meanwhile under Pi starvation stress is a consequence of metabolic redox

disturbance in meristem cells (Tyburski et al. 2009; Tsukagoshi et al. 2010); in both stress the effect induces determinate growth to avoid PR growth into unfavourable soil condition.

In addition to decrease in PRL, classical response to Pi starvation involves expression of high-affinity phosphate transporter genes for enhancing Pi uptake from soil (Sánchez-Calderón et al. 2005). To validate the *in silico* prediction, we evaluate expression of Pi starvation inducible gene *AtPHT1;4* (*AtPT2*), transcriptionally fused to GUS reporter gene. The results show that in subacute toxic Pb dose and in Pi starvation media, apical meristem of primary root has similar morphology but in Pb treatment expression of *AtPT2* is poor (Fig. 5). Pb does not induce *AtPT2* expression as strong as Pi starvation does; however, seedlings Pi content in media supplemented with Pb were low indicating that Pi is not uptaken under this condition. The before indicating that Pb presence downregulate *AtPT2* expression, which restricts Pi tissue accumulation, suggesting that there is a mechanism that limits Pi accumulation beyond Pi-Pb coprecipitation. Other HMs, such as Cr (VI) or Al, evoke diminution in PRL but conversely to shown with Pb, Cr (VI) and Al induces *AtPT2* expression. In Cr (VI), assays *AtPT2* expression was caused by competition for cell entry between Pi and Cr (VI), meanwhile in Al treatments could be due to an Al-Pi complex formation, reducing Pi mobilization (Ruíz-Herrera and López-Bucio 2013; Lopez-Bucio et al. 2014).

PDR2-LPR1/2 pathway is shared between subacute toxic Pb dose and Pi starvation stress

Due to similarity in both phenotypes (subacute toxic Pb doses and Pi starvation), we suppose similarities in mechanisms that regulate such responses. Pi starvation stress on root system is the abiotic stress more described; it has been reported that under Pi starvation, PRL is reduced due to regulation of local responses at root apex by two pathways STOP1-ALMT1 and PDR2-LPR1/2 (Svistoonoff et al. 2007; Balzergue et al. 2017). With the aim to know whether subacute toxic Pb doses share genetic mechanisms with Pi starvation, we growth mutants *stop1* (STOP1-ALMT1 pathway), *lpr1/2* (PDR2-LPR1/2 pathway) and *lpi3* (uncharacterized yet) on low Pi and subacute toxic Pb

doses. As previously reported, mutants are unable to respond to Pi starvation and their PRL were as long as those growing on physiological conditions, meanwhile when they grew on subacute toxic Pb doses, two different responses were shown: i) as WT, *stop1* showed a PR short and ii) *lpi3* and *lpr1/2*, their PRL were similar as if they were grown on medium without Pb. The above indicate that decrease in PRL is under genetic regulation by PDR2-LPR1/2 and LPI3 pathway, and *LPI3* and *LPR1/2* are necessary for changes in PRL induced by subacute toxic Pb doses. Unlike our results, in previous studies reported that decrease in PRL under Pb stress is caused by cytotoxicity and genotoxicity, which reduces cell division, chromosome aberrations, DNA damage and cell death (Kozhevnikova et al. 2009; Kaur et al. 2014; Lyu et al. 2020). Differences in decrease PRL (genetic regulated or cytotoxicity) could be due to Pb dose used in each assay, where decrease in PRL due to cytotoxicity are shown at acute toxic Pb dose, meanwhile at subacute toxic Pb doses the PDR2-LPR1/2 and LPI3 pathway are necessary to decrease PRL.

The shared pathway between subacute toxic Pb doses and Pi starvation mediated by PDR2-LPR1/2 pathway is useful to explain similarities in RSA under different abiotic stress. Therefore, is intriguing whether supplementation with Pi takes part in Pb amendment toxicity. Potters and coworkers hypothesize that similarities in morphogenic responses induced by distinct stresses reflect common molecular processes (Potters et al. 2007). Our results support a close relationship between similarities in morphogenic responses and shared molecular pathways. However, Pb is not the only HM that share pathways with Pi starvation stress, Al also shares *LPR1/2* regulation in PRL (Ruíz-Herrera and López-Bucio 2013); the above suggest that some HMs that decrease PRL and increase LRD, could be regulated genetically in a similar way as Pi, Al and Pb, does.

Insoluble Pi can be solubilized in rhizosphere by organic acids exudation, which mobilizes Pi from insoluble compounds in soil; this rhizosphere acidification is a Pi starvation classical response (Raghothama 1999). Rhizosphere acidification joint to changes in RSA are some responses under Pi starvation and Pb stress; here, we show that rhizosphere (media) acidification is independent of RSA: *lpr1/2*, *stop1* and Col-0 show rhizosphere acidification and different RSA (Fig. 7). Also, we show that some

responses in plants, such as rhizosphere (media) acidification, could be induced by two different stress factors (Pi starvation and subacute toxic Pb dose), although it has been considered that in each stress organic acid have a different function (solubilize or chelate); the strategy of organic acid is present in both stress conditions, which suggest a common regulatory mechanism shared between both stressors, that converge in a similar response.

Our results show that subacute toxic Pb doses and Pi starvation stress share a similar phenotype and genetic regulation where at least two genes are involved in modification of RSA (*LPI3* and *LPR1/2*). Under subacute toxic Pb doses stress, activity of *AtPT2* is downregulated avoiding Pi accumulation. We conclude that these two different stressors (subacute toxic Pb doses and Pi starvation stress) induce a similar effect on RSA due to both are mediated by PDR2-LPR1/2 pathway.

Acknowledgements We thank to Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal directed by José López Bucio for kindly providing us mutant seeds. We thank to León Francisco Ruíz-Herrera for confocal microscopy photography.

Funding Acknowledge to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for financial support with: Ciencia Básica CB-2010-01 00000000156851 "Búsqueda de los componentes moleculares que participan en la respuesta de *Arabidopsis thaliana* a la presencia de metales pesados" and scholarship 331963.

Declarations

Conflict of interest The author declares that they have no conflict to declare.

References

- Abel S (2017) Phosphate scouting by root tips. *Curr Opin Plant Biol* 39:168–177. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.016>
- Agathokleous E, Kitao M, Calabrese EJ (2019) Hormesis: a compelling platform for sophisticated plant science. *Trends Plant Sci* 24:318–327
- Agency-for-Substances-and-Disease-Registry (2019) Substance Priority List.
- Alaboudi KA, Ahmed B, Brodie G (2018) Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Ann Agricul Sci* 63:123–127. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2018.05.007>

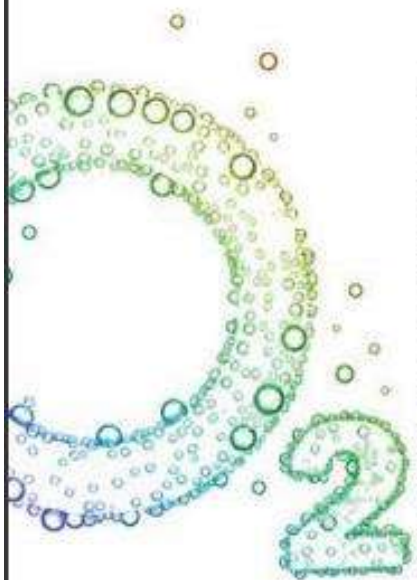
- Arias JA, Peralta-Videa JR, Ellzey JT, Ren M, Viveros MN, Gardea-Torresdey JL (2010) Effects of *Glomus deserticola* inoculation on *Prosopis*: enhancing chromium and lead uptake and translocation as confirmed by X-ray mapping, ICP-OES and TEM techniques. *Environ Exp Bot* 68:139–148. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.08.009>
- Arif N et al (2019) Understanding heavy metal stress in a rice crop: toxicity, tolerance mechanisms, and amelioration strategies. *J Plant Biol* 62:239–253. <https://doi.org/10.1007/s12374-019-0112-4>
- Ashraf U, Hussain S, Anjum SA, Abbas F, Tanveer M, Noor MA, Tang X (2017) Alterations in growth, oxidative damage, and metal uptake of five aromatic rice cultivars under lead toxicity. *Plant Physiol Biochem* 115:461–471. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.04.019>
- Awan S, Jabeen M, Imran QM, Ullah F, Mehmood Z, Jahngir M, Jamil M (2015) Effects of lead toxicity on plant growth and biochemical attributes of different rice (*Oryza Sativa* L.) varieties. *J Bio-Mol Sci* 3:44–55
- Balzergue C et al (2017) Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat Commun* 8:1–16
- Belz RG, Duke SO (2014) Herbicides and plant hormone pest management. *Science* 70:698–707. <https://doi.org/10.1002/ps.3726>
- Castro RO, Trujillo MM, López Bucio J, Cervantes C, Dubrovsky J (2007) Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Sci* 172:684–691. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.11.004>
- Cecchi M, Dumat C, Alric A, Felix-Faure B, Pradère P, Guisresse M (2008) Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma* 144:287–298
- Chen J, Huang JW, Caspar T, Cunningham SD (1997) *Arabidopsis thaliana* as a Model System for Studying Lead Accumulation and Tolerance in Plants. In: *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*. ACS Symposium Series, American Chemical Society, vol. 664, pp 264–273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bk-1997-0664.ch019>
- Costantini D, Metcalfe NB, Monaghan P (2010) Ecological processes in a hormetic framework. *Ecol Lett* 13:1435–1447
- Dubrovsky JG (1997) Determinate primary-root growth in seedlings of Sonoran Desert Cactaceae: its organization, cellular basis, and ecological significance. *Planta* 203:85–92. <https://doi.org/10.1007/s00050168>
- Duffus JH (2002) Heavy metals a meaningless term. *Pure Appl Chem* 74:793–807
- Fahr M, Laplaze L, Bendaou N, Hoche V, Mzibri ME, Bogusz D, Smouni A (2013) Effect of lead on root growth. *Frontiers in Plant Science* 4:175. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00175>
- Genoud T, Métraux J-P (1999) Crosstalk in plant cell signaling: structure and function of the genetic network. *Trends Plant Sci* 4:503–507. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(99\)01498-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(99)01498-3)
- Gichner T, Žnidar I, Száková J (2008) Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants mutation research/genetic toxicology and environmental. *Mutagenesis* 652:186–190. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.02.009>
- Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N (2013) Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol* 163:161. <https://doi.org/10.1104/pp.113.218453>
- Gutiérrez-Alanís D, Ojeda-Rivera JO, Yong-Villalobos L, Cárdenas-Torres L, Herrera-Estrella L (2018) Adaptation to phosphate scarcity: tips from *Arabidopsis* roots. *Trends Plant Sci* 23:721–730. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.006>
- Hattab S, Hattab S, Flores-Casseres ML, Boussetta H, Dumas P, Hernandez LE, Banni M (2016) Characterisation of lead-induced stress molecular biomarkers in *Medicago sativa* plants. *Environ Exp Bot* 123:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.10.005>
- Hawkes SJ (1997) What Is a “Heavy Metal”? *J Chem Educ* 74:1374. <https://doi.org/10.1021/ed074p1374>
- Holford I (1997) Soil phosphorus: its measurement, and its uptake by plants. *Soil Research* 35:227–240
- Hussain A et al. (2013) Effects of diverse doses of Lead (Pb) on different growth attributes of *Zea-Mays* L
- Iuchi S et al (2007) Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proceed Natl Acad Sci* 104:9900
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6:3901–3907
- Kanwal A, Farhan M, Sharif F, Hayyat MU, Shahzad L, Ghafoor GZ (2020) Effect of industrial wastewater on wheat germination, growth, yield, nutrients and bioaccumulation of lead. *Sci Rep* 10:11361. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68208-7>
- Karthikeyan AS, Varadarajan DK, Mukatira UT, Urzo MP, Damsz B, Raghobama KG (2002) Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol* 130:221
- Kaur G, Singh HP, Batish DR, Kohli RK (2014) Pb-inhibited mitotic activity in onion roots involves DNA damage and disruption of oxidative metabolism. *Ecotoxicology* 23:1292–1304
- Khare D et al (2017) Root avoidance of toxic metals requires the GeBP-LIKE 4 transcription factor in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 213:1257–1273. <https://doi.org/10.1111/nph.14242>
- Koevoets IT, Venema JH, Elzenga JTM, Testerink C (2016) Roots withstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. *Frontiers in Plant Science* 7:1335. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01335>
- Kozhevnikova AD, Seregin IV, Bystrova EI, Belyaeva AI, Kataeva MN, Ivanov VB (2009) The effects of lead, nickel, and strontium nitrates on cell division and elongation in maize roots. *Russian J Plant Physiol* 56:242–250. <https://doi.org/10.1134/S1021443709020137>
- Kumar A, Prasad MNV (2018) Plant-lead interactions: Transport, toxicity, tolerance, and detoxification mechanisms. *Ecotoxicol Environ Saf* 166:401–418. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.113>
- Kumar PBAN, Dushenkov V, Motto H, Raskin I (1995) Phytoremediation: the use of plants to remove heavy metals from

- soils. *Environ Sci Technol*. <https://doi.org/10.1021/es00005a014>
- Küpper H (2017) Lead toxicity in plants met ions. *Life Sci*. <https://doi.org/10.1515/9783110434330-015>
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y (2005) AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138:827–836. <https://doi.org/10.1104/pp.104.058107>
- Lequeux H, Hermans C, Lutts S, Verbruggen N (2010) Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol Biochem* 48:673–682. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.05.005>
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MAF, 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. <https://doi.org/10.1104/pp.010934>
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opin. Plant Biol* 6:280–287. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)
- Lopez-Bucio J, Hernandez-Madrigal F, Cervantes C, Ortiz-Castro R, Carreon-Abud Y, Martinez-Trujillo M (2014) Phosphate relieves chromium toxicity in *Arabidopsis thaliana* plants by interfering with chromate uptake. *Biometals* 27:363–370. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9718-7>
- Lynch J (1995) Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology* 109:7. <https://doi.org/10.1104/pp.109.1.7>
- Lyu G, Li D, Li S, Ning C, Qin R (2020) Genotoxic effects and proteomic analysis on *Allium cepa* var. *agrogarum* L. root cells under Pb stress. *Ecotoxicology*. <https://doi.org/10.1007/s10646-020-02236-x>
- Maksymiec W (2007) Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiol Plant* 29:177–187. <https://doi.org/10.1007/s11738-007-0036-3>
- Malamy JE (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environ* 28:67–77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01306.x>
- Malamy JE, Benfey PN (1997) Down and out in *Arabidopsis*: the formation of lateral roots. *Trends Plant Sci* 2(10):390–396
- Małkowski E, Sitko K, Szopiński M, Gieroni Ż, Pogrzeba M, Kalaji HM, Zieleźnik-Rusinowska P (2020) Hormesis in plants: the role of oxidative stress, auxins and photosynthesis in corn treated with Cd or Pb. *Int J Mol Sci* 21:2099
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Montagu MV, Inzé D (1998) Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany* 49:649–667
- Meyer S, De Angeli A, Fernie AR, Martinoia E (2010) Intra- and extra-cellular excretion of carboxylates. *Trends Plant Sci* 15:40–47. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.10.002>
- Miller MW, Miller WM (1987) Radiation hormesis in plants. *Health Phys* 52:607–616
- Morel M, Crouzet J, Gravot A, Auroy P, Leonhardt N, Vavasseur A, Richaud P (2009) AtHMA3, a PIB-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149:894. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130294>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- O'Lexy R, Kasai K, Clark N, Fujiwara T, Sozzani R, Gallagher KL (2018) Exposure to heavy metal stress triggers changes in plasmodesmal permeability via deposition and breakdown of callose. *J Exp Bot* 69:3715–3728. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery171>
- Oldroyd GED, Leyser O (2020) A plant's diet, surviving in a variable nutrient environment. *Science* 368:eaba0196. <https://doi.org/10.1126/science.aba0196>
- Osmolovskaya N, Dung VV, Kuchaeva L (2018) The role of organic acids in heavy metal tolerance in plants. *Biological Communications* 63
- Patnaik AR, Achary VMM, Panda BB (2013) Chromium (VI)-induced hormesis and genotoxicity are mediated through oxidative stress in root cells of *Allium cepa* L. *Plant Growth Regul* 71:157–170. <https://doi.org/10.1007/s10725-013-9816-5>
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MAK (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci* 12:98–105. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.01.004>
- Pourrut B, Shahid M, Dumat C, Winterton P, Pinelli E (2011) Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. In: *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 213. Springer, pp 113–136
- Raghothama K (1999) Phosphate acquisition. *Ann Rev Plant Biol* 50:665–693
- Remans T et al (2012) Understanding the development of roots exposed to contaminants and the potential of plant-associated bacteria for optimization of growth. *Ann Bot* 110:239–252
- Reymond M, Svistoonoff S, Loudet O, Nussaume L, Desnos T (2006) Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell Environ* 29:115–125. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2005.01405.x>
- Rogers ED, Benfey PN (2015) Regulation of plant root system architecture: implications for crop advancement. *Curr Opin Biotechnol* 32:93–98. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.015>
- Römheld V, Müller C, Marschner H (1984) Localization and capacity of proton pumps in roots of intact sunflower plants. *Plant Physiol* 76:603
- Ruiz-Herrera LF, López-Bucio J (2013) Aluminum induces low phosphate adaptive responses and modulates primary and lateral root growth by differentially affecting auxin signaling in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Soil* 371:593–609. <https://doi.org/10.1007/s11104-013-1722-0>
- Samardakiewicz S, Krzesłowska M, Bilski H, Bartosiewicz R, Woźny A (2012) Is callose a barrier for lead ions entering *Lemma minor* L. root cells? *Protoplasma* 249:347–351. <https://doi.org/10.1007/s00709-011-0285-2>
- 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. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci011>
- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Gutiérrez-Ortega A, Hernández-Abreu E, Herrera-Estrella L (2006) Characterization 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
- Sánchez-Calderón L, Ibarra-Cortés M, Zepeda-Jazo I (2013) Root development and abiotic stress adaptation. Abiotic stress—Plant responses and applications in agriculture. Rijeka, InTech, pp 135–168
- Schlichting CD, Smith H (2002) Phenotypic plasticity: linking molecular mechanisms with evolutionary outcomes. *Evol Ecol* 16:189–211. <https://doi.org/10.1023/A:1019624425971>
- Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot* 53:1351–1365. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1351>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0193-9>
- Siddhu G, Sirohi DS, Kashyap K, Khan IA, Khan M (2008) Toxicity of cadmium on the growth and yield of Solanum melongena L. *J Environ Biol* 29:853–857
- Strubińska J, Hanaka A (2011) Adventitious root system reduces lead uptake and oxidative stress in sunflower seedlings. *Biol Plant* 55:771–774. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0185-5>
- Svistoonoff S et al (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* 39:792–796. <https://doi.org/10.1038/ng2041>
- Tian H, Lv B, Ding T, Bai M, Ding Z (2018) Auxin-BR interaction regulates plant growth and development. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02256>
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 143:606–616
- Tyburski J, Dunajska K, Tretyn A (2009) Reactive oxygen species localization in roots of Arabidopsis thaliana seedlings grown under phosphate deficiency. *Plant Growth Regul* 59:27–36. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9385-9>
- Ubeda-Tomás S et al (2009) Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Curr Biol* 19:1194–1199
- Verma S, Dubey RS (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci* 164:645–655. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(03\)00022-0](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(03)00022-0)
- Williamson LC, Ribrioux SPCP, Fitter AH, Leyser HMO (2001) Phosphate availability regulates root system architecture in Arabidopsis. *Plant Physiol* 126:875. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.875>
- World-Health-Organization (2019) Lead poisoning and health.
- Xu B et al (2017) Transcriptomic and physiological analyses of Medicago sativa L. roots in response to lead stress. *PLoS One* 12:e0175307. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175307>
- Xue W, Jiang Y, Shang X, Zou J (2020) Characterisation of early responses in lead accumulation and localization of Salix babylonica L. roots. *BMC Plant Biol* 20:1–15
- Yang Y-Y, Jung J-Y, Song W-Y, Suh H-S, Lee Y (2000) Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism of tolerance. *Plant Physiol* 124:1019
- Žádníková P, Smet D, Zhu Q, Straeten DVD, Benková E (2015) Strategies of seedlings to overcome their sessile nature: auxin in mobility control. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00218>
- Zeng G et al (2017) Precipitation, adsorption and rhizosphere effect: the mechanisms for phosphate-induced Pb immobilization in soils—a review. *J Hazard Mater* 339:354–367
- Zulfiqar U et al (2019) Lead toxicity in plants: Impacts and remediation. *J Environ Manag* 250:109557. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109557>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Anexo 2. Artículo de Divulgación



MICRORGANISMOS

Las investigaciones científicas sugieren que la vida comenzó en la Tierra hace 3500 millones de años. En aquella época, el planeta y las formas de vida eran muy diferentes a las que conocemos hoy: la atmósfera del planeta estaba compuesta de gases como metano, amoníaco, vapor de agua, nitrógeno y dióxido de carbono. Los océanos eran ácidos, había gran actividad volcánica y el cielo era rojo.

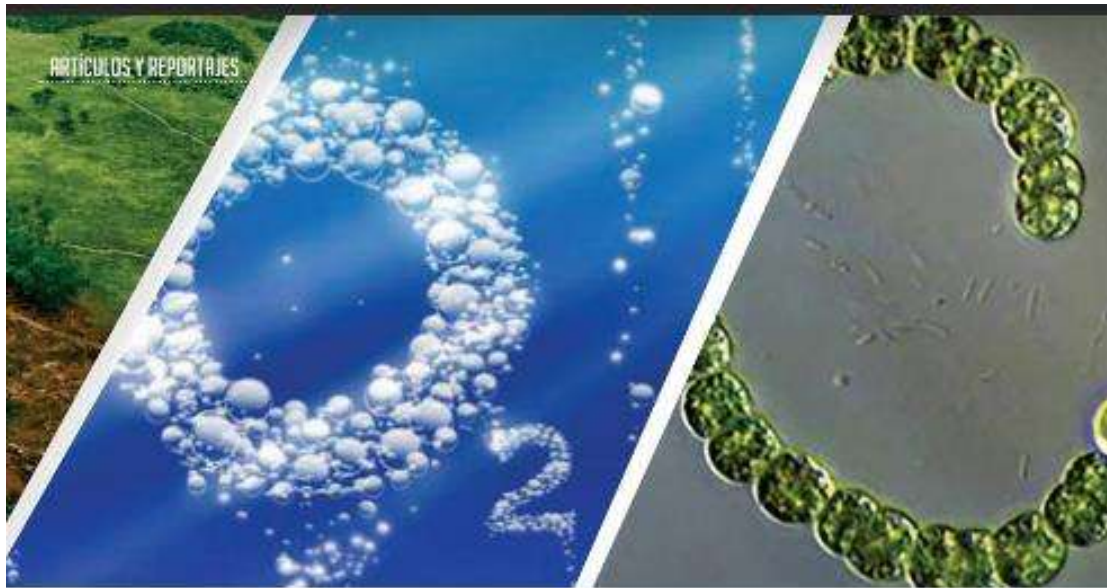
Los organismos que habitaban en esas condiciones, que para nosotros parecen hostiles, estaban adaptados a ese ambiente. Éstos eran organismos unicelulares, similares a las bacterias que hoy conocemos. Se alimentaban de minerales presentes en su entorno, de los cuales obtenían nutrientes para formar su propia estructura y obtenían un poco de energía para sus procesos vitales.

Un cambio evolutivo permitió a algunas células primitivas desarrollar pigmentos (clorofila) que sirvieron para utilizar la energía de la luz solar, y con esta energía fue posible obtener alimento (carbono) a partir de gases presentes en el aire (dióxido de carbono). Además de obtener el alimento del aire, estos microorganismos respiraban sulfuro y, como consecuencia, producían ácido sulfúrico derivado de su metabolismo.

Así continuó la vida durante algunos miles de años hasta que unos organismos conocidos como cianobacterias cambiaron su metabolismo, dejaron de respirar sulfuro y en su lugar utilizaron moléculas de agua. Esto implicó ventajas para las cianobacterias, ya que el agua era mucho más abundante en el planeta que el sulfuro. Sin embargo, este cambio provocó que las cianobacterias produjeran un desecho muy tóxico y letal que ahora conocemos como oxígeno [1].

Así es, el oxígeno es una molécula altamente corrosiva, reactiva y que puede generar muchos daños en los organismos. Basta con echar un vistazo a nuestro alrededor. Cada vez que partimos una manzana o un aguacate, estos comienzan a oscurecerse debido a la acción del oxígeno e incluso materiales tan fuertes como el hierro sucumben ante la reactividad de dicho elemento, desvaneciéndose en forma de un polvo anaranjado-rojizo llamado óxido de hierro.

Aquella atmósfera primitiva se fue llenando cada vez más de oxígeno y los organismos presentes fueron alcanzados por este elemento, al cual no estaban acostumbrados y que rápidamente oxidaba sus componentes celulares como las membranas, proteínas e incluso su material genético, haciéndolos disfuncionales y provocando la muerte de miles de individuos.



ARTÍCULOS Y REPORTAJES

Cuando el oxígeno aumentó a tal grado que ya formaba parte del 4% de la atmósfera, algunos organismos comenzaron a evolucionar para hacer frente a la toxicidad del oxígeno. Dichos organismos habían logrado disminuir la reactividad del oxígeno al aportarle electrones provenientes de moléculas orgánicas. Debido a que la transferencia de electrones desde moléculas orgánicas al oxígeno generaba cantidades enormes de energía, estos organismos aerobios (que respiran oxígeno) obtuvieron una ventaja energética sobre los anaerobios (que viven en ausencia de oxígeno). Esto generó que la población de organismos aerobios creciera de manera exponencial. Actualmente, el oxígeno compone cerca del 20% de los gases presentes en la atmósfera, por lo que la mayoría de los organismos son aerobios, incluyendo a los humanos.

Cuando respiramos, el oxígeno entra hasta nuestros pulmones, de ahí pasa a la sangre donde es transportado hacia cada tejido para que las células puedan producir energía. Sin embargo, una vez que el oxígeno es utilizado dentro de las células, además de energía, genera un grupo de moléculas llamadas especies reactivas de oxígeno las cuales en grandes concentraciones generan daño celular.

Todas las especies reactivas de oxígeno interactúan con otras moléculas del cuerpo y las oxidan. Una molécula perteneciente al grupo

de las especies reactivas de oxígeno es utilizada en medicina para desinfectar, su nombre es peróxido de hidrógeno o mejor conocida como agua oxigenada. Seguramente hemos visto que se utiliza en heridas y que reacciona de forma violenta, generando efervescencia, al entrar en contacto con la sangre debido al hierro presente en ésta. Precisamente, su actividad oxidativa es la que nos ayuda a matar a los microorganismos presentes en las heridas.

Dentro de nuestras células las especies reactivas de oxígeno pueden estropear membranas celulares, proteínas e incluso el ADN. Esto genera daño en las células, y cuando no es posible repararlo éstas mueren.

El estrés oxidativo es dañino a largo plazo provocando cambios en nuestro cuerpo principalmente relacionados con el envejecimiento ya que, literalmente, nos estamos oxidando con el paso del tiempo. Algunos de estos signos son arrugas en la piel, pérdida de la flexibilidad de tejidos que puede provocar aumento en la tensión arterial, insuficiencia cardíaca y debilidad muscular, incluso el daño directo al ADN puede hacernos más propensos a padecer algún tipo de cáncer [2].

Una vez más gracias al proceso evolutivo, los organismos aerobios hemos desarrollado unas moléculas que nos protegen del daño provocado por el oxígeno, estas son los llamados com-

puestos antioxidantes. Estos componentes reaccionan con las especies reactivas de oxígeno evitando que éstas reaccionen con moléculas funcionales de nuestras células, por lo que el daño en las células se produce cuando hay un exceso de especies reactivas de oxígeno y carencia de moléculas antioxidantes.

En ocasiones el cuerpo no puede proporcionar la cantidad suficiente de antioxidantes para hacer frente a las especies reactivas de oxígeno generadas por nuestro metabolismo, en este caso las células echan mano de algunas vitaminas como la A, C, y E además de algunos compuestos vegetales como son los carotenos encontrados principalmente en frutos rojos.

Sin duda alguna, el oxígeno forma parte importante de nuestra vida y es imposible prescindir de él pues nos permite obtener energía de los alimentos, mientras que es responsable de que nuestro cuerpo se vaya deteriorando con el paso del tiempo. Esto último es imposible de evitar sin embargo podemos aminorar los efectos de las especies reactivas de oxígeno consumiendo alimentos con alto contenido de antioxidantes.

Referencias

- [1] Patel, S. y Paul, K. (2012) Dimensiones: Un biológico de la separación de bacterias. *Water Research* 46: 1345-1351.
- [2] Samal, K., Basu, V. & Chandra, L. (2011) Evolution of oxygen utilization in multicellular organisms and implications for oil spillage in flow engineering. *Journal of Flow Engineering*.

ISSN 0013-1395