



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

**Instituto de Investigaciones Químico Biológicas
Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal**

“Influencia de *Pseudomonas putida* sobre las vías de señalización que determinan la captación de hierro (Fe) y fosfato (Pi) en *Arabidopsis thaliana*”

Tesis que presenta:

Q. F. B. Juan Angel Ayala Rodríguez

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis:

D. C. José López Bucio

Co-director de tesis:

D. C. León Francisco Ruíz Herrera

Morelia, Mich., Septiembre 2019



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la dirección del D. en C. José López Bucio y co-dirección del D. en C. León Francisco Ruíz Herrera.

ÍNDICE

| | |
|--|-----|
| RESUMEN | i |
| ABSTRACT | iii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 2 |
| 2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> | 2 |
| 2.1.1. Sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 2 |
| 2.1.2. Raíces laterales | 5 |
| 2.2. Nutrición mineral | 6 |
| 2.2.1. Adquisición de nutrientes | 7 |
| 2.3. El fosfato como macronutriente | 10 |
| 2.3.1. Mecanismos moleculares de la señalización del Pi en las plantas | 11 |
| 2.3.2. Transportadores de fosfato y mecanismos de regulación | 12 |
| 2.3.3. Regulación transcripcional en la señalización de Pi | 14 |
| 2.3.4. Desarrollo de la raíz en respuesta a la disponibilidad de Pi | 17 |
| 2.4. El hierro | 19 |
| 2.4.1. Regulación de la expresión génica en respuesta a Fe | 21 |
| 2.5. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal | 23 |
| 2.5.1. Género <i>Pseudomonas</i> | 26 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 29 |
| 4. HIPOTESIS | 29 |
| 5. OBJETIVOS | 29 |
| 5.1. Objetivo general | 29 |
| 5.2. Objetivos particulares | 29 |
| 6. MATERIALES Y MÉTODOS | 30 |
| 6.1. Material biológico | 30 |
| 6.2. Condiciones de crecimiento | 30 |
| 6.3. Análisis del desarrollo vegetal <i>in vitro</i> | 31 |
| 6.4. Cuantificación de clorofila | 31 |
| 6.5. Actividad histoquímica de <i>GUS</i> y microscopía de campo claro | 32 |
| 6.6. Tinción de yoduro de propidio y microscopía confocal | 33 |
| 6.7. Tinción de callosa con azul de anilina | 33 |
| 6.8. Técnica de Perls/DAB | 33 |

| | |
|--|----|
| 6.9. Análisis de microfotografías | 34 |
| 7. RESULTADOS | 35 |
| 7.1. <i>Pseudomonas putida</i> modifica la arquitectura de la raíz | 35 |
| 7.2. <i>P. putida</i> regula elementos involucrados en la toma de fosfato | 37 |
| 7.3. <i>P. putida</i> regula programas relacionados en la modificación del meristemo apical de la raíz con un aumentando en la toma de Fe | 39 |
| 7.4. La expresión de factores de transcripción involucrados en la regulación de la toma de Fe cambia por la interacción con <i>P. putida</i> | 41 |
| 7.5. <i>P. putida</i> regula la arquitectura de la raíz a través de elementos de la señalización del Fe | 43 |
| 7.6. <i>P. putida</i> regula el crecimiento y la toma de Fe de manera independiente del factor de transcripción <i>fit</i> y del transportador <i>irt1</i> | 48 |
| 7.7. La expresión del transportador de hierro <i>irt1</i> se modifica en respuesta a la interacción con <i>P. putida</i> | 51 |
| 8. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES | 53 |
| 9. REFERENCIAS | 58 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Arquitectura y organización celular de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 3 |
| Figura 2. La raíz de la planta y su polaridad..... | 4 |
| Figura 3. Cambios morfológicos durante la formación y desarrollo de la raíz lateral. | 5 |
| Figura 4. Mecanismos involucrados en la disponibilidad y toma de nutrientes. | 7 |
| Figura 5. Transporte de nutrientes en la raíz..... | 9 |
| Figura 6. Alteraciones en la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> en respuesta a la disponibilidad de Pi. | 11 |
| Figura 7. Regulación de genes y proteínas en condiciones de suficiencia de Pi y deficiencia de Pi. | 17 |
| Figura 8. La señalización local de Pi controla el desarrollo de la raíz primaria..... | 18 |
| Figura 9. Regulación de la toma de hierro (Fe) en <i>Arabidopsis</i> | 21 |
| Figura 10. Regulación de los genes inducibles por la deficiencia de Fe en <i>Arabidopsis</i> | 22 |
| Figura 11. Impacto de la fitoestimulación por bacterias sobre el desarrollo radicular, la adquisición de nutrientes y las funciones de la raíz..... | 26 |
| Figura 12. Cambios del estatus de nitrógeno de <i>Arabidopsis</i> en respuesta a <i>Pseudomonas nitroreducens</i> IHB B 13561 (PnIHB)..... | 28 |
| Figura 13. Efecto de la interacción de <i>P. putida</i> sobre el crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> | 36 |
| Figura 14. Respuesta de las líneas transgénicas <i>AtPT1:GUS</i> , <i>AtPT2:GUS</i> , <i>miR399:GFP</i> y <i>PLDzZ2:GFP</i> a la co-inoculación con <i>P.putida</i> | 38 |
| Figura 15. Respuesta de la línea reportera <i>ALMT1:GFP</i> y la diferencia colorimétrica de las tinciones de Perls/DAB y callosa a la co-inoculación con <i>P. putida</i> | 40 |
| Figura 16. Efecto de la interacción con <i>P. putida</i> en la expresión de <i>BTS:GFP</i> , <i>PYE:GFP</i> y <i>ILR3:GUS</i> | 42 |
| Figura 17. Efecto de <i>P. putida</i> en la mutante que codifica a la ubiquitin ligasa E3 <i>bts</i> | 44 |
| Figura 18. Efecto de <i>P. putida</i> en la mutante que codifica al factor de transcripción bHLH del subgrupo IVb <i>pye</i> | 45 |
| Figura 19. Efecto de <i>P. putida</i> en la mutante que codifica al factor de transcripción bHLH del subgrupo IVc <i>ilr3-2</i> | 47 |
| Figura 20. Efecto de <i>P. putida</i> en la clorofila en las mutantes que codifican a elementos para la toma de Fe <i>fit</i> e <i>irt1</i> | 49 |
| Figura 21. Respuesta de las mutantes <i>fit</i> e <i>irt1</i> en la diferencia colorimétrica de la tinción de Perls/DAB en contacto con <i>P.putida</i> | 50 |
| Figura 22. Efecto de <i>P. putida</i> en la expresión de <i>IRT1:YFP</i> | 52 |
| Figura 23. <i>P. putida</i> promueve el desarrollo radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> a través de la toma de Fe..... | 57 |

RESUMEN

El crecimiento constante de la población ha llevado a la búsqueda de alternativas eficaces para optimizar la producción de granos, semillas y forraje. Sin embargo, el uso extensivo de insumos para mejorar los rendimientos antes mencionados ha conducido a la salinización del suelo y la contaminación de los cuerpos de agua, por esa razón se requiere implementar estrategias novedosas, efectivas y amigables con el ambiente. El uso de bioinoculantes con microorganismos benéficos, como las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Plant growth promoting rhizobacteria*, PGPR), por sus siglas en inglés, surge como una alternativa viable, y el género *Pseudomonas* destaca por sus propiedades benéficas, reportadas en diversas especies vegetales.

En los procesos de nutrición mineral, el fosfato (Pi) es un macronutriente indispensable para el desarrollo de las plantas, que está relacionado con el hierro (Fe). Ambos nutrientes son parte de los fertilizantes que se suministran para alcanzar una alta productividad en los cultivos. No obstante, el posible impacto de las bacterias en las vías de señalización que determinan la eficiencia de captación, movilización y aprovechamiento de los nutrientes ha sido escasamente estudiado.

En este trabajo se caracterizaron los efectos de *Pseudomonas putida* sobre el crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis thaliana*, empleando estrategias genéticas, histológicas y de microscopia confocal. Durante la interacción planta-bacteria se observó una inhibición en la elongación de la raíz primaria acompañada de un aumento en la formación de raíces laterales. En dicha interacción el análisis de expresión del gen reportero *pPLDZ:GFP* reveló la pérdida del meristemo y un cambio del programa de crecimiento de la raíz de indeterminado a determinado. Dichos efectos fueron similares al fenotipo de las plantas en deficiencia de Pi, por lo que se investigó si la bacterización activa los mecanismos de adquisición de fosfato, evaluando la expresión de los transportadores *AtPT1:GUS* (constitutivo) y *AtPT2:GUS* (inducible). Los resultados mostraron la inducción de la expresión de *AtPT1*. En los análisis con las líneas reporteras *miR399:GFP* y *ALMT1:GFP* cuyos genes actúan cascada abajo y participan en la exudación de malato, se observó

una inducción de ambos marcadores, sugiriendo que las bacterias promueven los mecanismos adaptativos para la captación de fosfato.

Por otra parte, se ha reportado que el fenotipo de deficiencia de Pi en la raíz está causado por una captación y acumulación excesiva de Fe en el meristemo. Para corroborar lo anterior, se realizaron tinciones de la raíz primaria con DAB, que permitieron determinar los sitios de acumulación de Fe. En los resultados de este último análisis, se observó un incremento en las plántulas que fueron crecidas en co-cultivo con la bacteria, que correlaciona con la inducción de los genes *ilr3:GUS*, *PYE:GFP* y *BTS:GFP*, mientras que las mutantes *ilr3-2* (factor de transcripción), *pye* (factor de transcripción) y *bts* (ubiquitin ligasa) manifestaron respuestas alteradas. Los resultados antes mencionados sugieren que la interacción planta-microorganismo modifica la arquitectura de la raíz a través de la homeostasis Pi/Fe.

Palabras clave: *Pseudomonas putida*, transportadores, hierro, fosfato, factores de transcripción.

ABSTRACT

Population growth has led to the constant search for rapid and effective mechanisms to optimize the yield of grains, seeds and foliage. However, the extensive use of inputs to improve the aforementioned yields has led to soil salinization and contamination of water bodies, for that reason innovative, effective and environmentally friendly strategies are required. The use of bioinoculants with beneficial microorganisms, such as plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), has been considered a viable alternative, and the genus *Pseudomonas* stands out for its growth promoting effect in various species vegetables.

In mineral nutrition processes, phosphate (Pi) is an indispensable macronutrient for plant development, which is related to iron (Fe). Both nutrients are part of the fertilizers that are supplied to achieve high profitable productivity in crops. However, the possible impact of bacteria on signaling pathways that determine the efficiency of nutrient uptake, mobilization and utilization have been poorly studied.

In this work the effects of *Pseudomonas putida* on the growth and development of *Arabidopsis thaliana* were characterized, using genetic, histological and confocal microscopy strategies. During the plant-bacterium interaction an inhibition was observed in the elongation of the primary root accompanied by an increase in the formation of lateral roots. In this interaction, the expression analysis of the *pPLDZ:GFP* reporter gene revealed the loss of meristem and a change in the root growth program from indeterminate to determinated. These effects were similar to the phenotype of Pi-deficient plants, so it was investigated whether bacterization activates phosphate acquisition mechanisms, evaluating the expression of phosphate transporters *AtPT1:GUS* (constitutive) and *AtPT2:GUS* (inducible). The results showed the induction of the expression of *AtPT1*. In the analysis with the *miR399:GFP* and *ALMT1:GFP* reporters, encoding elements involved in malate exudation, an induction of both markers already occurred, suggesting that bacteria promote adaptive mechanisms for phosphate uptake.

On the other hand, it has been reported that the phenotype of Pi deficiency in the root is caused by an excessive uptake and accumulation of Fe in the meristem. To

corroborate the above, stains of the primary root were made with DAB, which allowed to determine the sites of Fe accumulation. In the results of this last analysis, an increase was observed in the seedlings that were grown in co-culture with the bacteria, which correlated with the induction of the *ilr3:GUS*, *PYE:GFP* and *BTS:GFP* genes, whereas the *ilr3-2* (transcription factor), *pye* (transcription factor) and *bts* (ubiquitin ligase) mutants showed altered responses. The above-mentioned results suggest that the plant-microorganism interaction modifies the architecture of the root through Pi / Fe homeostasis.

Keywords: *Pseudomonas putida*, transporters, iron, phosphate, transcription factors.

1. INTRODUCCIÓN

El fósforo (P) es un macronutriente indispensable para el crecimiento y desarrollo de los seres vivos. Las plantas lo adquieren del suelo en su forma inorgánica (fosfato, Pi), el cual se obtiene a partir de otros componentes mayoritarios como la hidroxipatita o fosfato tricálcico, y/o en forma orgánica como el fitato. El Pi es un nutriente con una baja disponibilidad, está estrechamente relacionada con los niveles de hierro (Fe) en el medio. Cuando la punta de la raíz hace contacto con una zona deficiente de Pi, se inhibe su crecimiento para favorecer los mecanismos que permiten un incremento en la captación de Fe, esto puede provocar eventualmente una intoxicación. Lo anterior plantea un enorme problema adaptativo que implica el control de la homeostasis Pi-Fe.

La interacción con las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (*Plant Growth promoting Rhizobacteria*, PGPR por sus siglas en inglés), estimula el crecimiento a través de mecanismos directos e indirectos. Se han realizado estudios para entender la interacción que existe entre plantas y bacterias, y por los efectos de bio-estimulación reportados se estima que las bacterias podrían promover la eficiencia de captación de nutrientes.

El género *Pseudomonas* incluye especies patógenas o benéficas. Algunas solubilizan el Pi a través de la producción de fosfatasas y/o acidificación del pH, además promueven la asimilación del Fe secretando sideróforos. Debido a estas características, las PGPRs se anticipan con gran potencial en la agricultura. En este estudio se investigó el efecto de *Pseudomonas putida* sobre el desarrollo de *A. thaliana* y la participación de las rutas de señalización que median la captación del Pi y Fe en la raíz de *Arabidopsis* en este proceso.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una dicotiledónea que pertenece a la familia *Brassicaceae*. Esta se ha utilizado como un organismo modelo en la investigación debido a su utilidad para estudios genómicos, metabolómicos y proteómicos, a que posee un ciclo de vida corto (6-8 semanas), un tamaño pequeño y una alta producción de semillas (Koorneef y Mainke, 2010; Toloti Carneiro *et al.*, 2015). Además, esta especie tiene un genoma pequeño, secuenciado, donde se han identificado a la fecha alrededor de 25,000 genes. Se han realizado esfuerzos para comprender en totalidad sus funciones a través del uso de mutantes y líneas reporteras (Berardini *et al.*, 2015).

Al menos tres décadas de intenso trabajo con *Arabidopsis*, no solo han permitido establecer la influencia de los genes sobre la fisiología y el desarrollo de las plantas, sino también nos proveen de información sobre cómo las poblaciones vegetales nativas se adaptan a ambientes diversos y reaccionan ante el estrés biótico y abiótico (Hancock *et al.*, 2011; Alonso-Blanco *et al.*, 2016).

2.1.1. Sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*

La raíz de *Arabidopsis* está conformado por una raíz primaria (RP), raíces laterales (RL) y pelos radiculares. Dicho sistema provee soporte estructural anclando la planta al suelo para adquirir nutrientes vitales para su crecimiento y agua. Además es esencial para la supervivencia y adaptación a los cambios en el ambiente y es el sitio principal donde se establece el microbioma (Berg y Smalla, 2009; Petricka *et al.*, 2012).

La raíz primaria está formada longitudinalmente por tres zonas, la más cercana al ápice de la raíz es conocida como zona meristemática (ZM) presentando una alta actividad mitótica, las células incrementan paulatinamente su tamaño en la zona de elongación (ZE) y comenzarán a diferenciarse en la zona de diferenciación (ZD). En ésta última, las células adquieren características y funciones

especializadas (Fig. 1) (Dolan *et al.*, 1993; Ishikawa y Evans, 1995; Beemster *et al.*, 2003; Verbelen *et al.*, 2006).

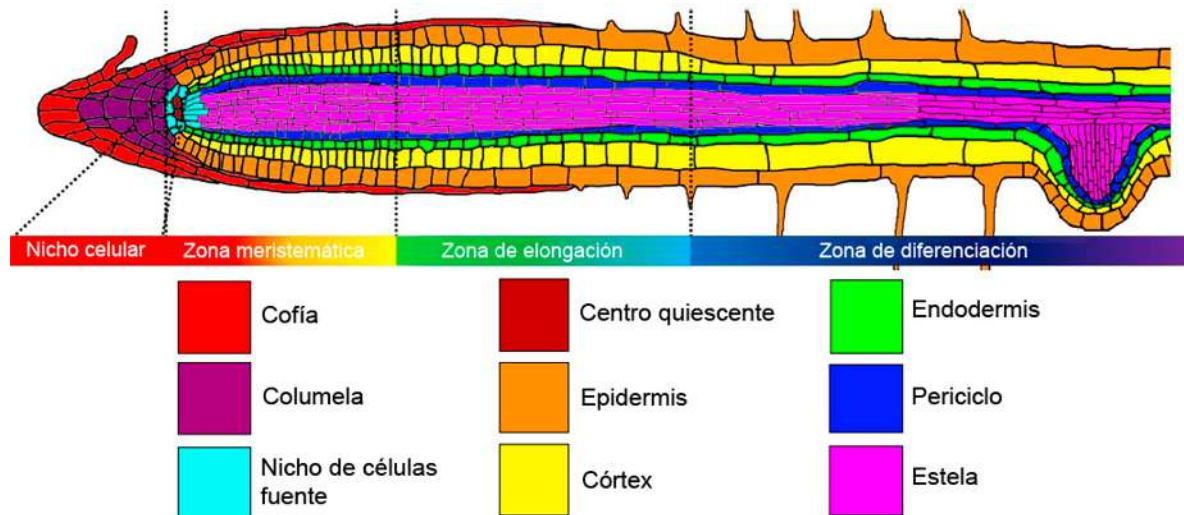


Figura 1. Arquitectura y organización celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Se distinguen diferentes zonas de desarrollo en la raíz primaria, en la parte de color más rojo se representa a la zona meristemática (ZM). Posteriormente, se distingue la zona de elongación (ZE) para culminar en la parte azul con la zona de diferenciación (ZD). En la parte apical de la raíz se distinguen las células de la cofia y columela, en el centro de la raíz se observa el nicho de células fuente que rodean al centro quiescente (CQ); posteriormente se encuentra el periciclo y la estela, estos están rodeados por las células de la endodermis, córtex y epidermis (Modificado de Somssich *et al.*, 2016).

En el ápice de la raíz se encuentran las células de la capa lateral y la columela, con funciones protectoras que continuamente se están sustituyendo. Además, tienen la función de percibir la gravedad y el crecimiento en profundidad (Petricka *et al.*, 2012). En la parte más interna de la raíz, están las células del haz vascular (estela) formando el centro de la raíz, constituido por el xilema que transportan agua y nutrientes hacia el follaje y los productos que se obtienen por la fotosíntesis hacia la raíz se movilizan a través del floema (Dolan *et al.*, 1993). La endodermis forma una barrera que protege al haz vascular y a su vez está rodeada por las células del córtex y en la capa más externa se encuentra la epidermis, la cual funciona en las interacciones con el ambiente (Fig. 1) (Dolan *et al.*, 1993, Feldman 1994, Morita y Nemoto, 1995).

Funcionalmente, la raíz absorbe de manera selectiva los nutrientes por una vía simplástica (a través de las células) formando una barrera para la difusión apoplastica (entre las células) (Barberon y Geldner, 2014). Las células de la epidermis, el córtex y la endodermis están polarizadas con una membrana plasmática con un dominio externo y otro interno (Fig. 2). Debido a que la epidermis y los pelos radiculares están en la parte más externa de la raíz, estas tienen un contacto directo con el suelo y son un mediador para la toma selectiva de nutrientes. Además, la endodermis que es la capa más interna rodea el haz vascular, forma una barrera para la difusión apoplastica de solutos que provienen del suelo (Fig. 2) (Clarkson., 1993, Alassimone *et al.*, 2012, Geldner, 2013).

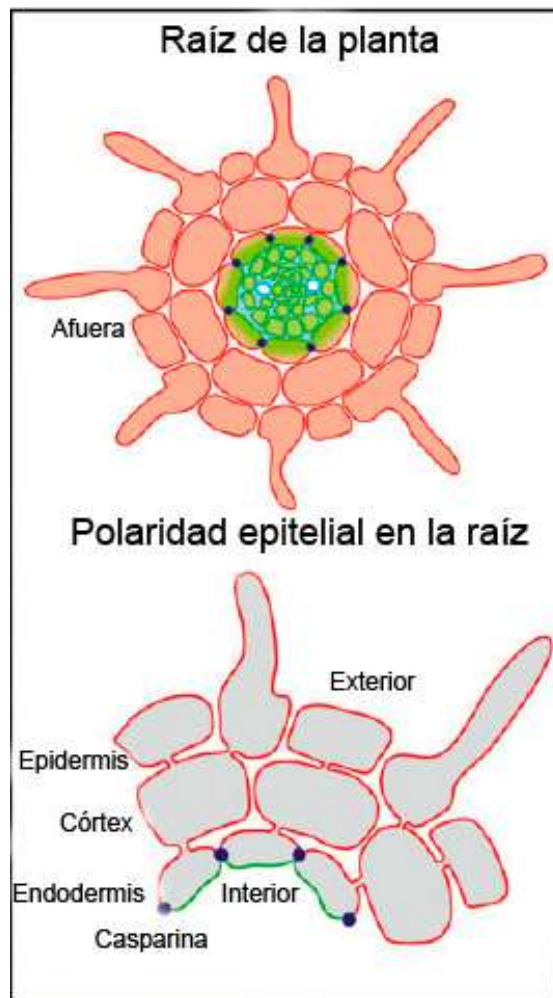


Figura 2. La raíz de la planta y su polaridad. Se muestran las diferentes filas de células y su distribución desde el eje central hacia el exterior. Modificada de Barberon y Geldner (2014).

2.1.2. Raíces laterales

Las raíces laterales (RL) tienen una función vital para el funcionamiento de la planta, debido a que aumentan el área de exploración del suelo para obtener agua y nutrientes (Veermer y Geldner, 2015).

La formación de las RL consiste en cuatro procesos: i) Iniciación: ocurre en el periciclo a través de la activación de las células fundadoras para especificar la distribución espacial de los primordios (Malamy y Benfey, 1997; Lavenus *et al.*, 2013). ii) Activación del primordio: el ciclo celular se activa y las células se dividen de forma asimétrica formando un domo entre las etapas I a III (De Rybel *et al.*, 2010). iii) Elongación del primordio: el proceso avanza mediante divisiones anticlinales y periclinales entre los estadios III a VII (Malamy y Benfey, 1997). iv) Emergencia: después de la formación del primordio, éste eventualmente romperá las capas de la endodermis, córtex y epidermis, hacia un crecimiento autónomo (Fig. 3) (Vermeer *et al.*, 2014, 2015).

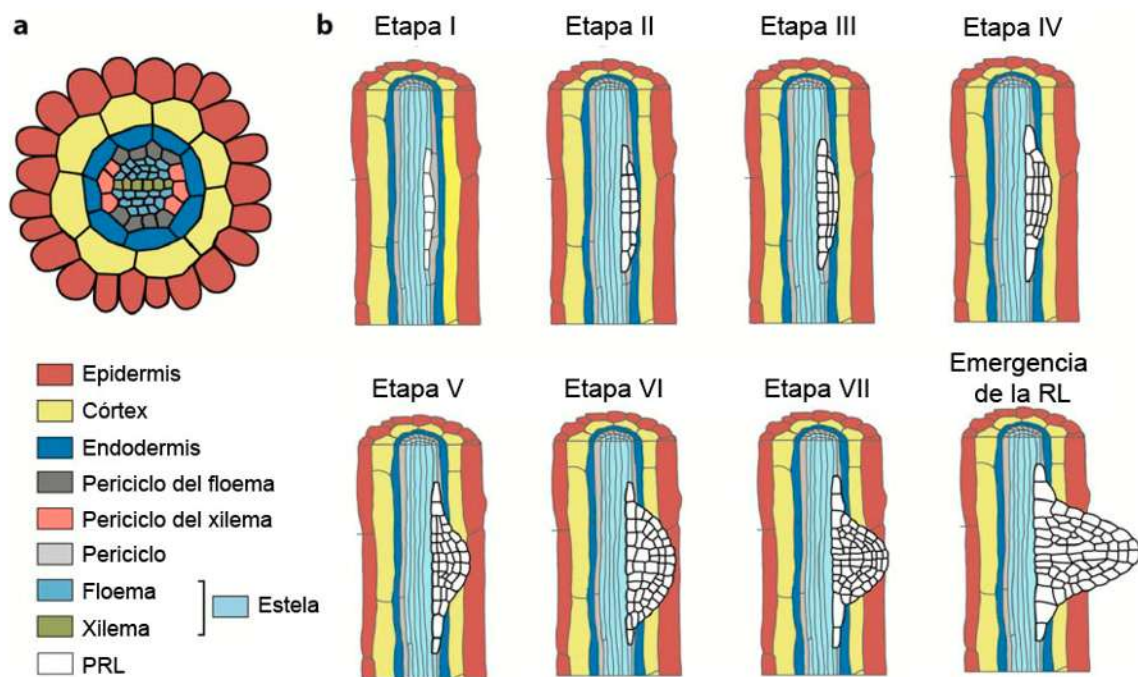


Figura 3. Cambios morfológicos durante la formación y desarrollo de la raíz lateral. a) Representación esquemática de la sección transversal de las células que conforman la raíz de *Arabidopsis*. b) Representación de las siete etapas del desarrollo de las raíces laterales incluyendo su emergencia. Modificado de Jing y Strader (2019).

2.2. Nutrición mineral

El crecimiento óptimo de las plantas depende de elementos como la temperatura, la intensidad de luz, además de la disponibilidad de agua y nutrimentos. Los nutrientes minerales están involucrados en el crecimiento y desarrollo de la planta; su clasificación depende de las cantidades presentes en los tejidos vegetales. Los que son necesarios en grandes cantidades se conocen como macronutrientes, se destacan el nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. Por otro lado, los elementos que se requieren en cantidades pequeñas se denominan micronutrientes, como el hierro, manganeso, boro, zinc, cobre, molibdeno y níquel (Pilon-Smits *et al.*, 2009; Fageria *et al.*, 2011; Marschner y Marschner 2012). Los macronutrientes forman parte de elementos estructurales para las células como las proteínas y los ácidos nucleicos, o moléculas energéticas como el ATP, en tanto los micronutrientes son usualmente metales, que actúan como componentes de enzimas (cofactores) u otras proteínas (Hänsch y Mendel, 2009; Maathuis, 2009).

La disponibilidad de los nutrientes está afectada por varios factores como la composición del suelo y el pH, por las características de la planta y la interacción con los microorganismos (Jones *et al.*, 2004). Debido a estas circunstancias, diversos programas moleculares y celulares permiten una gran flexibilidad para la adquisición de nutrientes a través de controles transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales (Fig. 4) (Maathuis y Diatloff 2013; Che *et al.*, 2018).

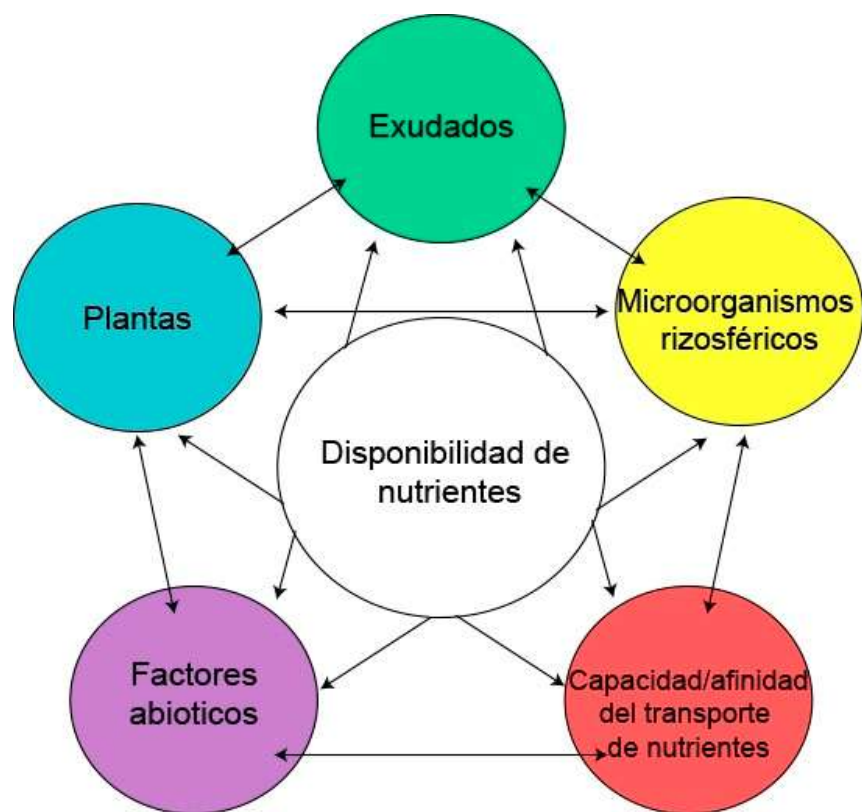


Figura 4. Mecanismos involucrados en la disponibilidad y toma de nutrientes. Tanto las plantas como los microorganismos exudan sustancias orgánicas e inorgánicas que pueden alterar el pH del suelo, así como influir en la disponibilidad de nutrientes a través de la solubilización y asimilación. Los exudados de la raíz atraen a los microorganismos hacia la rizósfera. Por otro lado, la mayoría de las especies pueden aumentar su capacidad para acceder a los nutrientes a través de alteraciones en la morfología de la raíz. Las flechas indican las interacciones que modifican la disponibilidad de los nutrientes. Modificado de Rengel y Marchner (2005).

2.2.1. Adquisición de nutrientes

Los nutrientes ingresan a través de las capas externas de la raíz y se movilizan al follaje. Las plantas difieren en los mecanismos que utilizan para la adquisición de nutrientes que dependen de la capacidad exploratoria de la raíz; la conversión de compuestos insolubles a formas disponibles y su transporte a través de la membrana plasmática (Rangel, 2001; Barberon y Geldner, 2014).

La captación de macronutrientes con carga negativa (NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-}) requiere de energía, la cual depende de un gradiente de protones (H^+) hacia la rizosfera. Así mismo, en la toma de micronutrientes en la mayoría de los casos está involucrado el transporte de protones (H^+). Por otro lado, los macronutrientes con

carga positiva (K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} , NH_4^+) generalmente entran a la planta a través de un transporte pasivo, que involucra a los canales de iones. La capacidad exploratoria de la raíz muestra adaptaciones morfológicas, por lo cual su desarrollo va a depender de la deficiencia o abundancia del nutriente, lo que va acompañado de una proliferación de raíces laterales (Maathius y Diatloff, 2013).

Para la adquisición de los nutrientes se han descrito tres vías: apoplástica, simplástica y trans-celular acoplada (Barberon y Geldner, 2014). Estos tres mecanismos pueden ocurrir de forma combinada, y se describen a continuación:

Vía apoplástica: Involucra la difusión del agua y nutrientes hacia el cilindro vascular a través del espacio libre entre la pared celular de la epidermis y el córtex (Fig. 5). La velocidad de difusión depende de un gradiente de iones entre la solución externa y el espacio libre del apoplasto. Debido a que la pared celular de las capas más externas consiste de una red de celulosa, hemicelulosa y glicoproteínas; estas moléculas actúan sólo en el intercambio de cationes, mientras que los aniones son repelidos. La capacidad de transporte de los cationes a través del apoplasto contribuye significativamente en el contenido de nutrientes minerales en la raíz (Lobreaux *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 2004)

Vía simplástica: en esta ruta participa un transporte de célula a célula a través de los plasmodesmos y canales membranales que proporciona una continuidad citoplasmática (Fig. 5) (Burch-Smith y Zambryski, 2012). El transporte simplástico depender de factores como la permeabilidad del plasmodesmo, así como del límite de exclusión que permite el paso de moléculas de cierto tamaño (Schulz, 1995; Zavaliev *et al.*, 2011). La membrana plasmática actúa como estructura selectiva para la distribución intracelular de los nutrientes que puede ser modulada por la quelación con otros iones e incluso con macromoléculas (Marschner, 2011, Olsen y Palmgren, 2014).

Vía trans-celular acoplada: Ocurre por transportadores de eflujo e influjo que movilizan nutrientes de una célula a otra de manera vectorial (Fig. 5). Los transportadores se distribuyen de forma diferencial en los tejidos, por lo tanto se pueden encontrar en la endodermis, así como en las células corticales y

epidérmicas. Por esta vía los nutrientes pasan de una célula a otra y se combinan con el transporte simplástico y apoplastico (Löfke *et al.*, 2013; Barberon *et al.*, 2014). Estos mecanismos permiten el transporte direccional, de larga distancia hacia el cilindro vascular a través de múltiples capas celulares (Takano *et al.*, 2010).

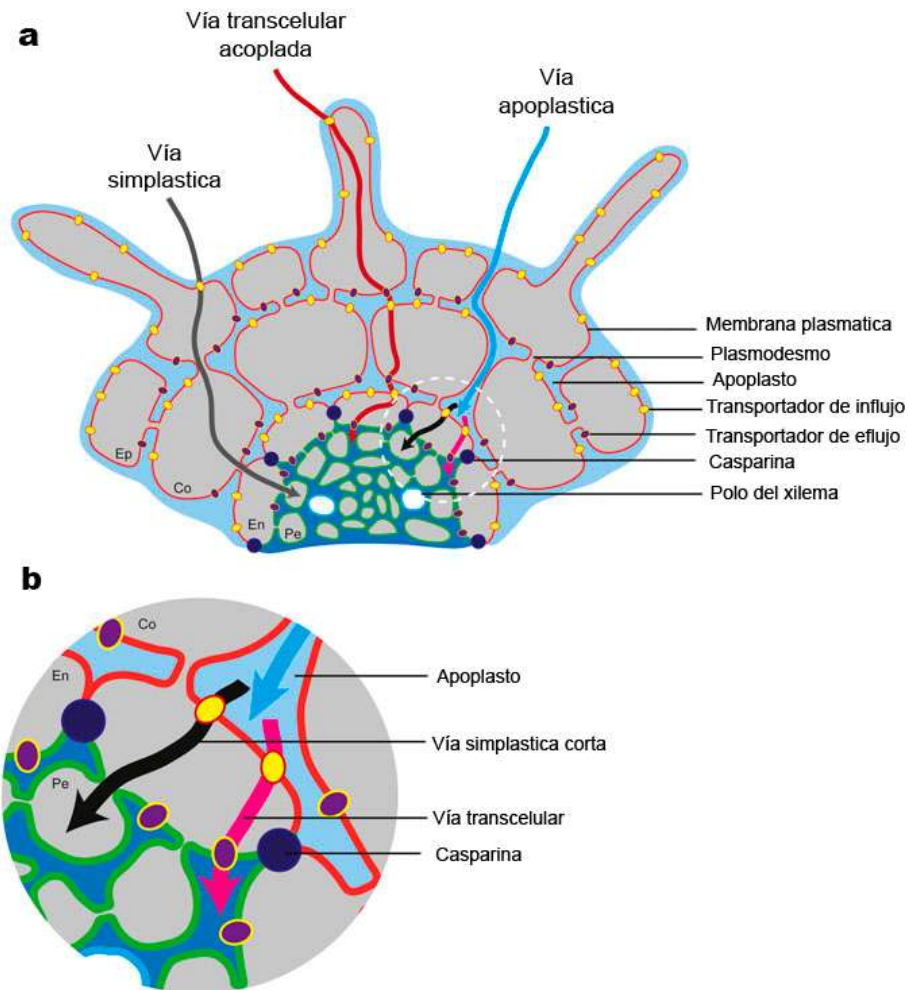


Figura 5. Transporte de nutrientes en la raíz. Se han descrito tres mecanismos de transporte de nutrientes. a. Vista esquemática de las tres diferentes vías involucradas en el transporte de nutrientes del suelo a la endodermis. La vía simplástica (gris) implica el transporte de una célula a otra a través del plasmodesmo. La vía transcelular acoplada (rojo) necesita de transportadores de influjo (amarillo) y eflujo (purpura). La vía apoplastica (azul) corresponde a un transporte pasivo en el espacio extracelular y es bloqueado por la casparina a nivel de endodermis. b. Magnificación del área del inciso a, resaltando el transporte de nutrientes del apoplasto a la endodermis. Las rutas de transporte a través de la endodermis involucran una vía simplástica corta (negro) y una vía transcelular (rosa), restringido a nivel de endodermis. Co: córtex; En: endodermis; Ep: epidermis; Pe: periciclo. Modificado de Barberon y Geldner (2014).

2.3. El fosfato como macronutriente

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para el desarrollo de las plantas. Este elemento es fundamental porque forma parte de moléculas como el DNA, RNA, y proteínas. Además está involucrado en la regulación del metabolismo energético, fotosíntesis y respiración (Schachtman *et al.*, 1998, Cakmak, 2002; Marschner, 2011). Por lo tanto, es importante contar con niveles óptimos de este nutriente en el suelo para que alcancen los cultivos un rendimiento apropiado (Ham *et al.*, 2018).

El P se encuentra en el suelo de dos formas: mineralizada en forma inorgánica (Pi), y orgánica (Po). Sin embargo, solo la forma inorgánica puede ser asimilada por las plantas (von Wandruzka, 2006). Además, existen aspectos importantes a considerar como su baja difusión y una alta fijación que depende del pH del suelo (Shen *et al.*, 2011). En suelos ácidos se forman compuestos insolubles con el aluminio y el hierro, mientras que en suelos alcalinos se une al calcio y magnesio, precipitándose (Holford, 1997).

La baja disponibilidad del Pi es frecuentemente un factor limitante para el crecimiento y desarrollo. Para hacer frente a esta deficiencia, la planta cambia sus programas de crecimiento, desarrollo y respuesta metabólica para reducir el uso del Pi e incrementar su captación (Fig. 6) (López-Bucio *et al.*, 2002; Ticconi y Abel, 2004; Desnos, 2008). En la raíz, la respuesta más evidente es la modificación de la arquitectura radicular, que implica un cambio en el programa de crecimiento indeterminado a determinado en la raíz primaria, acompañado por un incremento de la cantidad y la longitud de las raíces laterales y pelos radiculares (Fig. 6) (Fitter *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2003). Este cambio del fenotipo de la raíz le permite explorar las capas más superficiales del suelo, en donde el fosfato tiende a acumularse (Fig. 6) (Lynch y Brown, 2001). Además, se han descrito interacciones hormonales en dicho reajuste destacando un incremento de la sensibilidad a las auxinas ante la deficiencia del Pi (López- Bucio *et al.*, 2002; Nacry *et al.*, 2005).

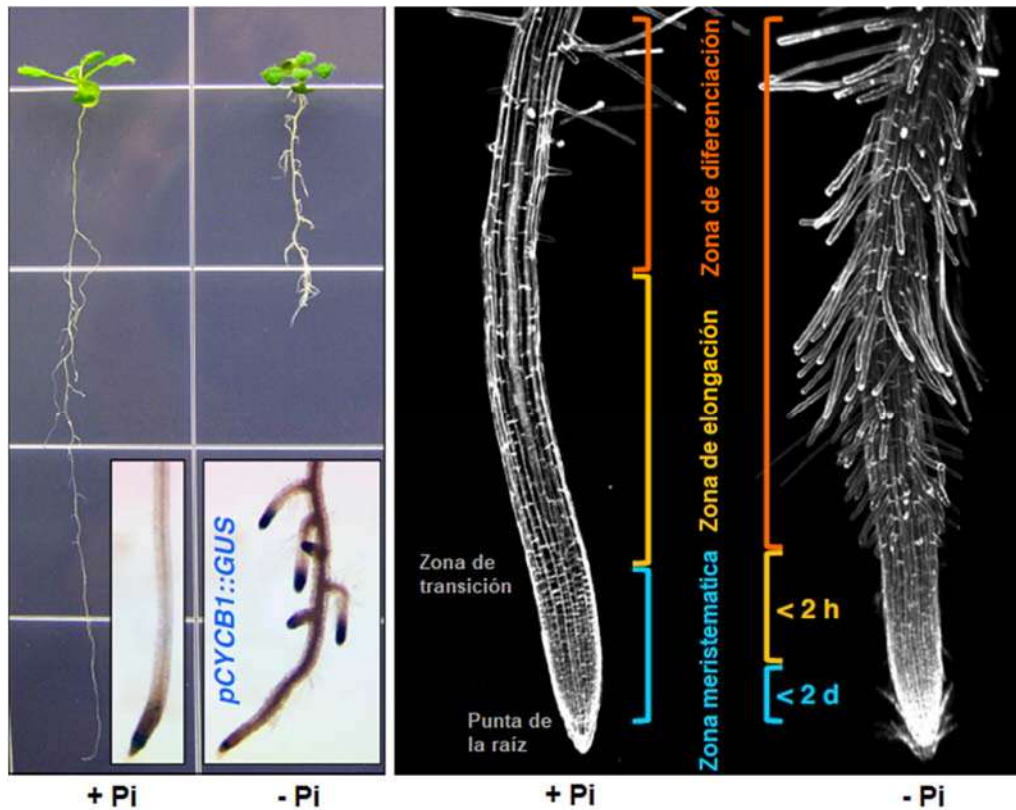


Figura 6. Alteraciones en la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a la disponibilidad de Pi. El panel de la izquierda compara plántulas de *Arabidopsis* de 12 días de edad cultivadas en medios con suficiencia y deficiencia de Pi. En los insertos mostrados en la parte inferior, se muestra el sistema radicular de las plántulas que expresan el gen reportero *pCYCB1::GUS*. La tinción histoquímica de GUS denota que en la punta de la raíz primaria hay una tinción más débil de las plántulas en deficiencia de Pi en comparación con la condición control, además de un incremento del número de las raíces laterales. En el panel de la derecha se comparan las imágenes de microscopía confocal de las puntas de la raíz en condiciones control y deficiencia de Pi, mostrando la inhibición de la zona de elongación (<2h), seguida de una inhibición de la división celular en la zona meristemática (<2 días) (Modificada de Abel 2017).

2.3.1. Mecanismos moleculares de la señalización del Pi en las plantas

Para adquirir el Pi del suelo se requiere de la actividad de los transportadores de fosfato (TPs), que posibilitan la entrada a la raíz a través del simplasto. Posteriormente, el Pi puede ser transportado a las células vecinas, y/o dependiendo de las condiciones de crecimiento, acumulado en la vacuola (Liu *et al.*, 2015; López-Arredondo *et al.*, 2014; Lambers y Plaxton, 2015).

La raíz de la planta percibe los cambios de los niveles del Pi en el suelo, y se han identificado mecanismos y vías de señalización que regulan la adquisición y removilización del Pi, para mantener una homeostasis intracelular. Estos mecanismos son regulados por la expresión de genes que se coordinan a través de la función de los transportadores de Pi (TPs) y los genes inducidos por la escasez del Pi (IIP) (Wang *et al.*, 2018).

2.3.2. Transportadores de fosfato y mecanismos de regulación

El Pi ingresa a las células epidérmicas a través de un complejo de TP que implica a las proteínas PHT (PHOSPHATE TRANSPORTER) y PHO1 (PHOSPHATE 1) (Wang *et al.*, 2018). La familia de proteínas PHT está conformada por cuatro subgrupos: PHT1, PHT2, PHT3 y PHT4. Se localizan en la membrana plasmática, el cloroplasto, la mitocondria y el aparato de Golgi, respectivamente (Liu *et al.*, 2011; Nussaume *et al.*, 2011). Uno de los miembros más estudiados de esta familia es el subgrupo PHT1, debido a su función indispensable para internalizar el Pi del suelo a la célula; en *Arabidopsis* se encuentran cinco miembros (AtPHT1; 1/4/5/8/9) (Munchhal *et al.*, 1996; Misson *et al.*, 2004). Una vez que el Pi se internaliza es transportado desde la raíz al follaje a través del xilema por un miembro de la subfamilia de SPX-EXS (SPX fue nombrado por la proteína SYG1y PHO81 de la levadura y XPR1 del humano, EXS fue nombrado después de la levadura ERD1, involucrada en la localización de la proteína del retículo endoplasmático endógeno la humana XPR1 y la levadura SYG1) llamado PHO1, que se localiza en la membrana de las células del periciclo, y su mutación afecta el flujo del Pi dentro del xilema; por lo tanto, PHO1 es indispensable para el transporte del Pi que va de la raíz hasta el follaje (Fig. 7) (Stefanovi *et al.*, 2011; Arpat *et al.*, 2012).

La regulación de los TP es indispensable para tener un balance del Pi en la célula, cuando hay suficiente Pi, el tráfico de la proteína PHT1 a la membrana plasmática es crucial para su función, esto involucra la salida del retículo endoplasmático de manera dependiente de COPII (Golgi-derived COP-coated vesicles). Este último

regula la exportación de las proteínas que parten del retículo endoplasmático y viajan hacia el aparato de Golgi (Phillipson *et al.*, 2001; Bayle *et al.*, 2011; Nussaume *et al.*, 2011). En *Arabidopsis* PHF1 (PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR 1) codifica para una proteína específica relacionada en la formación de COPII y es la responsable de la salida del retículo endoplasmático de tres de los miembros de la familia PHT1 (AtPHT1;1, AtPHT1;4 y AtPHT1;5). Sin embargo, cuando hay deficiencia de Pi PHF1 se sobreexpresa y se genera una mayor exportación de PHT1 hacia la membrana para tener una mayor captación de Pi (Bayle *et al.*, 2011; Nussaume *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha demostrado que PHO1 se encuentra en las membranas del aparato de Golgi y en el *trans*-Golgi (Apart *et al.*, 2012). La actividad de exportación de Pi y la correcta localización de esta proteína en el aparato de Golgi es dependiente del dominio EXS de AtPHO1 (Fig. 7) (Wege *et al.*, 2015).

La vida media de los TPs, es dependiente de la actividad de PHO2 (PHOSPHATE 2) que codifica a una ubiquitin conjugasa E2 y de NLA1 (NITROGEN LIMITATION ADAPTATION 1) que codifica a una ubiquitin ligasa E3 de la familia de proteínas con dominio SPX-RING (Huang *et al.*, 2013, Park *et al.*, 2014). La proteína PHO2 modula la degradación de varios TP, incluyendo PHO1 (Liu *et al.*, 2012). A su vez, PHO2 regula negativamente la abundancia de PHF1 en condiciones de suficiencia de Pi, en conjunto con NLA1 regulando los niveles de PHT1;1 y PHT1;4; siendo poliubiquitinado y luego degradado en el proteosoma 26S (Huang *et al.*, 2013, Park *et al.*, 2014). La movilización de PHT1;1 hacia la vacuola depende de la actividad de la proteína citosólica identificada como ALIX (ALG-2 INTERACTING PROTEIN-X), esta se asocia con los cuerpos multivesiculares (CMVs) a través de una interacción con ESCRT-III (EENDOSOMAL COMPLEX REQUIERED FOR TRANSPORT III) (Fig. 7) (Cardona-López *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018).

Cuando hay deficiencia de fósforo, la planta emplea otros mecanismos moleculares para promover una mayor internalización del nutriente. Esta vía emplea el uso de los RNA no codificantes (microRNA) identificándose en *Arabidopsis* los *miR399* y *miR827* (Sunkar y Zhu, 2004, Hsieh *et al.*, 2009, Pant *et*

al. 2009). El *miR399* se induce por la carencia de Pi y promueve la degradación del mRNA *PHO2*, con la subsecuente inducción de las proteínas PHO1, PHT1;1 y PHT1;4 (Bari *et al.*, 2006). Así mismo, el *miR827* actúa sobre el mRNA *NLA1*, impidiendo la actividad de poliubiquitinización de los TP PHT1;1 y PHT1;4 (Hsieh *et al.*, 2009, Lundmark *et al.*, 2010).

2.3.3. Regulación transcripcional en la señalización de Pi

El transporte y la homeostasis del Pi en la célula están coordinados por un grupo de factores de transcripción (FTs), en el que se destacan los miembros de las familias MYB, WRKY y bHLH. Estos regulan positivamente o negativamente la señalización del Pi en la célula (Wang *et al.*, 2018).

Dentro de la familia MYB se destaca PHR1 (*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1* por sus siglas en inglés), clave para la señalización del Pi en *Arabidopsis* (Rubio *et al.*, 2001). Al reconocer a los elementos *cis* denominados P1BS (PHR1 BINDING SITES). La actividad de PHR1 en condiciones suficientes de Pi depende de modificaciones post-traduccionales, como la sumolización por la proteína SIZ1, una proteína ligasa E3 de tipo ubiquitina (Miura *et al.*, 2005). Además de PHR1, se destacan AtMYB62 y AtMYB2, estos regulan la expresión del *miR399* (Fig.7) (Baek *et al.*, 2013). La sobreexpresión de *HHO2-MYB* promueve la formación de raíces laterales, lo que sugiere su participación directa en los programas de reajuste del crecimiento (Nagarajan *et al.*, 2016).

De la familia WRKY en *Arabidopsis* se involucran WRKY6, WRKY42, WRKY45 y WRKY75. Estas proteínas se unen a los promotores de los genes blanco de tipo W-box (Wang *et al.*, 2018). WRKY6 y WRKY42 se inducen en condiciones deficientes de Pi; teniendo como blanco a de *PHO1* (Chen *et al.*, 2009; Su *et al.*, 2015). Por otro lado, WRKY45 y WRKY75 regulan positivamente la expresión de *PHT1;1* (Deviah *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2014). En la familia de los FT que contienen el dominio de hélice-vuelta-hélice (*bHLH*), es importante la actividad de

AtbHLH32 como un regulador negativo que afecta varias vías bioquímicas y morfológicas (Chen *et al.*, 2007).

Una vez que el Pi se internaliza, es percibido por los receptores en las células de la punta de la raíz (Zhang *et al.*, 2014). Las proteínas que contienen el dominio SPX controlan la actividad de los factores de transcripción para regular la homeostasis de Pi (Secco *et al.*, 2012; Puga *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Las investigaciones en los últimos años han concluido que SPX1 y SPX2 localizadas en el núcleo interactúan con PHR1 evitando su unión con los promotores de los genes (Puga *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Se ha sugerido que este mecanismo se establece a través de una señal que permite la unión de la molécula de pirofosfato de inositol a la superficie de las proteínas con dominios SPX (Fig. 7) (Wild *et al.*, 2016; Bustos *et al.*, 2010).

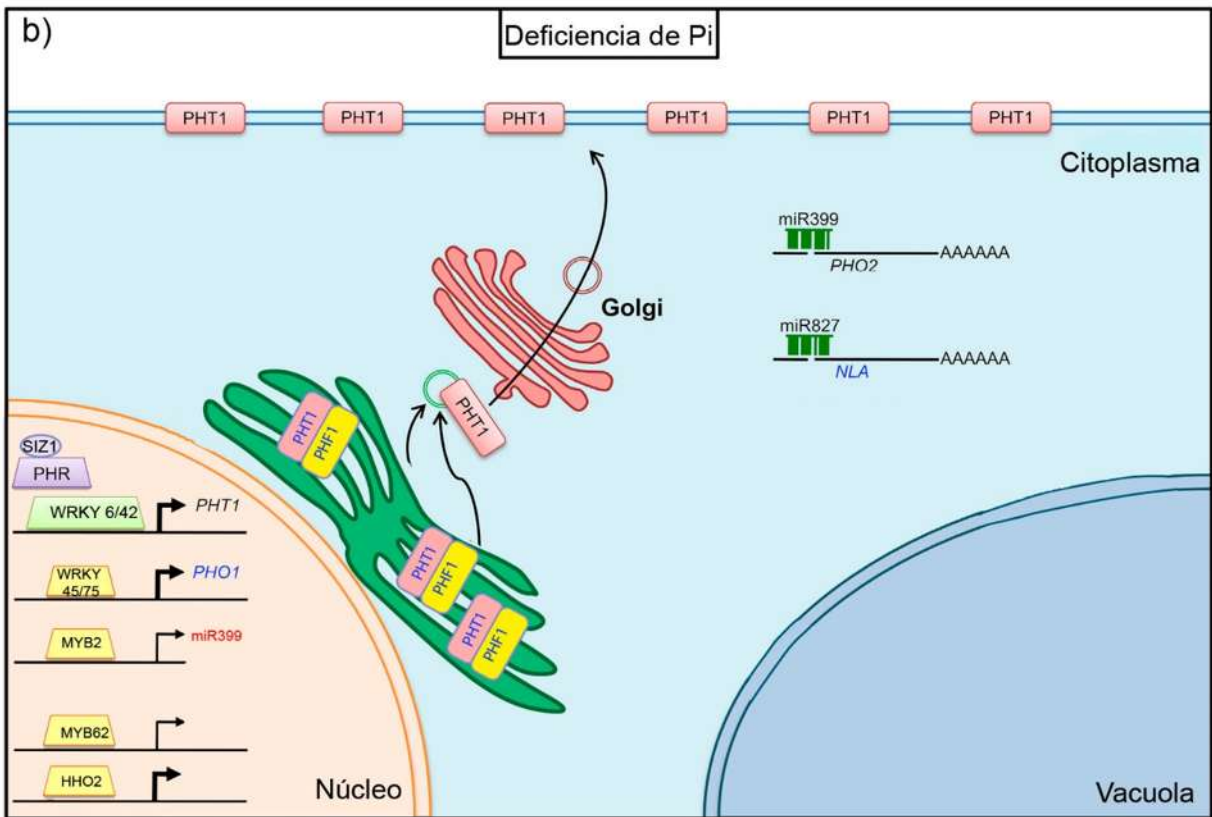
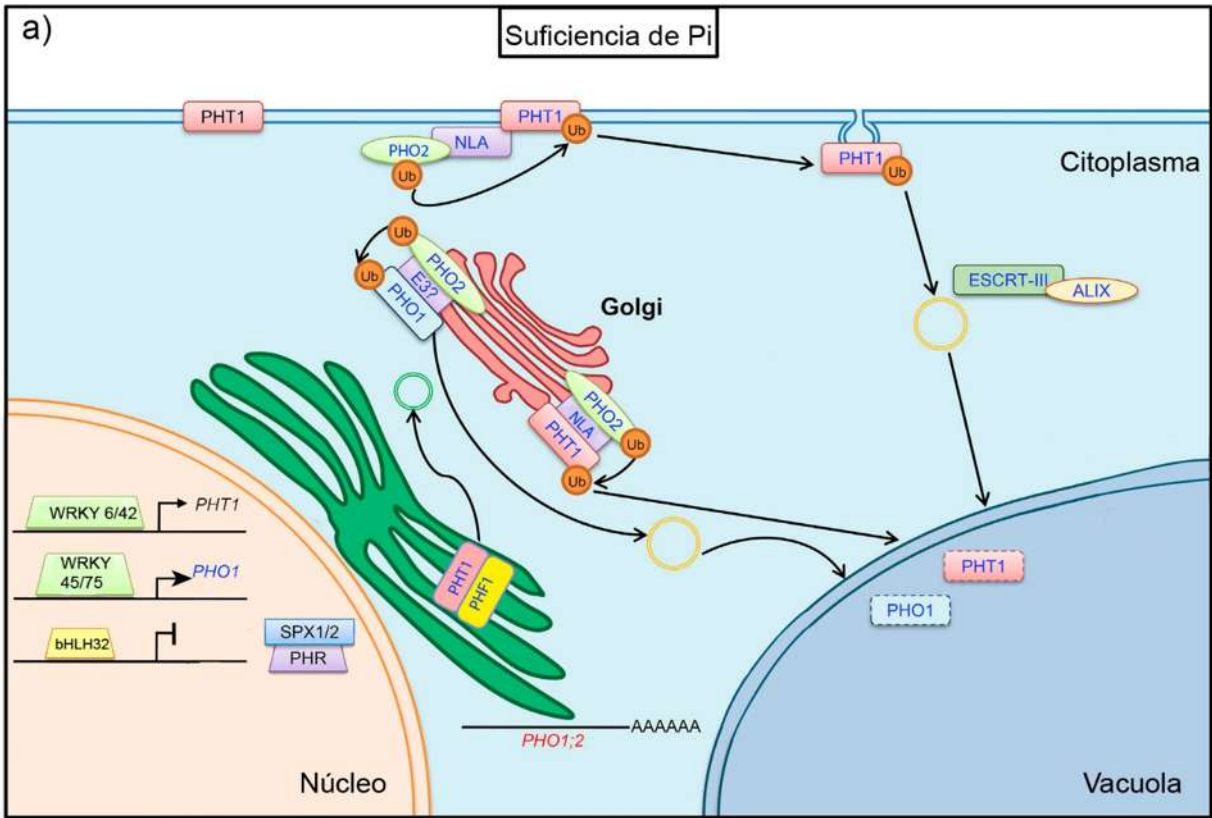


Figura 7. Regulación de genes y proteínas en condiciones de suficiencia (a) y deficiencia de Pi (b). a) En condiciones de suficiencia de Pi, PHR1 es inactivado por las proteínas nucleares SPX1/2. Así mismo, WRKY 6/42 modulan la transcripción basal de PHT1 y WRKY 45/75 la transcripción del *PHO1*. En tanto que bHLH 32 regula negativamente la respuesta de Pi en condiciones de suficiencia. Una vez que es sintetizado PHT1, su salida del retículo endoplasmico ocurre a través de la actividad de PHF1, dirigiéndolo hacia la membrana plasmática. PHO1 y PHT1 se degradan por la vía de la ubiquitinación a través de PHO2 y la conjugasa de ubiquitina NLA. Además, para facilitar la internalización a la vacuola de PHT1 se necesita la actividad de la proteína ALIX la cual se asocia con el complejo ESCRT-III. b) Bajo deficiencia de Pi la inducción de WRKY 6/42/45/75 regula la transcripción *PHR1* y *PHO1* y sus efectores *PHO2* y *NLA*, regulados post-transcripcionalmente por los *miR399* y *827*, respectivamente. Modificado de Gu *et al.* (2016).

2.3.4. Desarrollo de la raíz en respuesta a la disponibilidad de Pi

La disponibilidad del Pi es un factor limitante para el desarrollo de la raíz, y su inanición provoca un reajuste en la actividad del meristemo (Müller *et al.*, 2015). El mecanismo involucrado en las señales locales para producir el cambio de un crecimiento indeterminado a determinado de la raíz primaria, es gracias a la participación de un grupo de proteínas y moléculas reguladoras (Zhang *et al.*, 2014). La respuesta de la punta de la raíz a la disponibilidad del Pi ocurre a través de la actividad de LPR1 (LOW PHOSPHATE ROOT 1) una oxidasa multicobre con actividad de ferroxidasa que se encuentra en el retículo endoplasmático, el cual es regulado por PDR2 (PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2) una ATPasa de tipo P5 (Svistonoff *et al.*, 2007; Ticconi *et al.*, 2009). En condiciones de suficiencia de Pi, PDR2 restringe la función de LPR1 permitiendo la comunicación simplástica y la movilización de factores de transcripción como SHR (Short Root) para activar los genes del desarrollo (Fig. 8) (Müller *et al.*, 2015). Sin embargo, en deficiencia de Pi, PDR2 deja de modular negativamente la expresión de LPR1, esto determina la acumulación de Fe^{+3} en el apoplasto de las células del ápice de la raíz y la zona de elongación (Fig. 8) (Müller *et al.*, 2015). Simultáneamente, se suma la actividad de STOP1 (SENSITIVE TO PROTEIN RHIZOTOXICITY 1) que regula la expresión de *ALMT1* (ALUMINUM ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1), un gen que codifica a una proteína transportadora que media la exudación de malato hacia la rizosfera (Müller *et al.*, 2015; Balzergue *et al.*, 2017). Una vez que el malato es liberado dentro del apoplasto se activa un sistema de ciclo redox de Fe, generando un compuesto malato- Fe^{+3} que induce la

producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Balzergue *et al.*, 2017; Mora-Macías *et al.*, 2017). El aumento de ERO en las células induce la deposición de callosa en el meristemo, lo que lleva a una ruptura de la comunicación por plasmodesmos ocasionando el agotamiento de la mitosis (Fig. 8) (Müller *et al.*, 2015; Hoehenwarter *et al.*, 2016; Mora-Macías *et al.*, 2017). En los últimos años, se ha propuesto que el fenotipo producido por la inanición del Pi no es por la ausencia de Pi *per se*, sino porque la célula pierde la homeostasis entre Fe y Pi (Ward *et al.*, 2008; Bournier *et al.*, 2013).

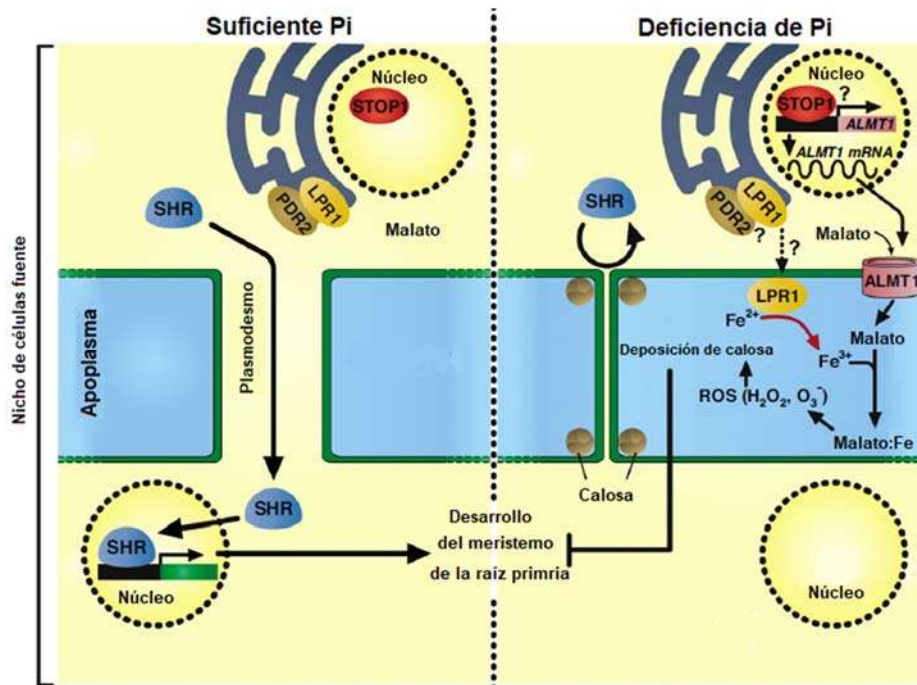


Figura 8. **La señalización local de Pi controla el desarrollo de la raíz primaria.** El nicho de células fuente en la raíz primaria requiere del movimiento de factores de transcripción como SHR a través del plasmodesmo, para su mantenimiento. En condiciones limitantes de Pi del suelo, se activan dos vías importantes. La vía STOP1 activa la expresión de *ALMT1* (canal de malato), el cual facilita la liberación de éste ácido orgánico. En paralelo, el tráfico intracelular de LPR1 del retículo endoplasmático hacia la membrana plasmática, donde sirve como una ferroxidasa asociada a la pared celular, permite la oxidación del Fe^{2+} a Fe^{3+} , y este forma un complejo con el malato, para después activar la producción de ERO desencadenando una deposición de callosa en la pared del nicho de células iniciales. Este proceso bloquea el tráfico de SHR y de otros factores de transcripción que viajan a través del plasmodesmo, ocasionando una disminución de la actividad del meristemo apical de la raíz primaria. Estas vías de señalización STOP1-ALMT1 y PDR2-LPR1 también desempeñan un papel en la rigidez de la pared celular en la zona de transición de la raíz, lo que conduce a la inhibición de la expansión celular (Modificado de Ham *et al.*, 2018).

2.4. El hierro

EL hierro (Fe) es un micronutriente vital para el crecimiento de las plantas ya que participa en la biosíntesis de la clorofila, en los cambios de estado redox, considerándose un cofactor responsable de la función en la cadena transportadora de electrones y de procesos catalíticos (Balk y Schaedler, 2014; Briat *et al.*, 2015). El Fe es un mineral abundante en el suelo, principalmente en su forma oxidada como hierro férrico (Fe III); sin embargo, en pH básico el Fe forma complejos insolubles e inaccesibles para su captación por la raíz (Guerinot y Yi, 1994). La sobreacumulación de Fe conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que resulta en un daño celular (Wedepohl, 1995). Los procesos de captación, internalización y homeostasis del Fe, están controlados a nivel molecular para optimizar el balance entre captación y distribución en los tejidos vegetales.

La mayoría de las plantas, excepto las gramíneas utilizan la Estrategia I para solubilizar y transportar el Fe dentro de la raíz (Römhel, 1987), la cual incluye la actividad de tres proteínas que se localizan en la membrana plasmática de las células de la raíz: i) una solubilización del Fe por una bomba de protones, 2) actividad de una férrico quelato reductasa para convertir el Fe^{+3} a Fe^{+2} y 3) un transportador de Fe para importarlo hacia el interior de la raíz (Walker y Connolly, 2008).

La solubilización del Fe ocurre mediante la actividad de AHA2, una ATPasa que excreta protones (H^+) a la rizosfera, lo que resulta en una acidificación (Fig. 9) (Santi y Schmidt, 2009). Una vez que el Fe ha sido solubilizado puede entrar libremente en el apoplasto; sin embargo, su forma quelada puede ser adquirida con mayor eficiencia. Se han reportado diferentes quelantes, entre los que se encuentran compuestos fenólicos, como la escopoletina y escopolina, y en menor cantidad se excretan esculina, la esculetina y la fracetina, que facilitan la toma de Fe en *Arabidopsis* (Fourcroy *et al.*, 2014; Schmid *et al.*, 2014). La escopoletina y sus derivados son liberados por un transportador de la familia ABC codificado por

el gen ABCG37/PDR9 (Fig. 9) (Rodríguez-Celma *et al.*, 2013; Fourcroy *et al.*, 2014).

Una vez solubilizado el Fe en la rizosfera, la forma férrica es reducida a ferrosa en la superficie de la raíz por la enzima FRO2 (FERRIC REDUCTASE OXIDASE 2), siendo un paso limitante para la adquisición del Fe (Robinson *et al.*, 1999). Una vez que el Fe ferroso se encuentra en la rizosfera es importado por IRT1 (IRON-REGULATED TRANSPORTER 1), un transportador de Fe de alta afinidad (Eide *et al.*, 1996; Vert *et al.*, 2002). IRT1 se localiza en compartimentos endosomales y la membrana plasmática (Fig. 9) (Barberon *et al.*, 2014).

La Estrategia I se activa por deficiencia de Fe a través de un mecanismo orquestado por el factor de transcripción FIT/bHLH29 (FER-LIKE IRON DEFICIENCY INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR), modulando la expresión de genes como *AHA2*, *FRO2* y *IRT1*, entre otros (Colangelo y Guerinot, 2004; Jakoby *et al.*, 2004; Ivanov *et al.*, 2013). FIT se heterodimeriza con cuatro miembros de la familia bHLH del subgrupo Ib bHLH38/39/100/101 (Fig. 9) (Yuan *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2013).

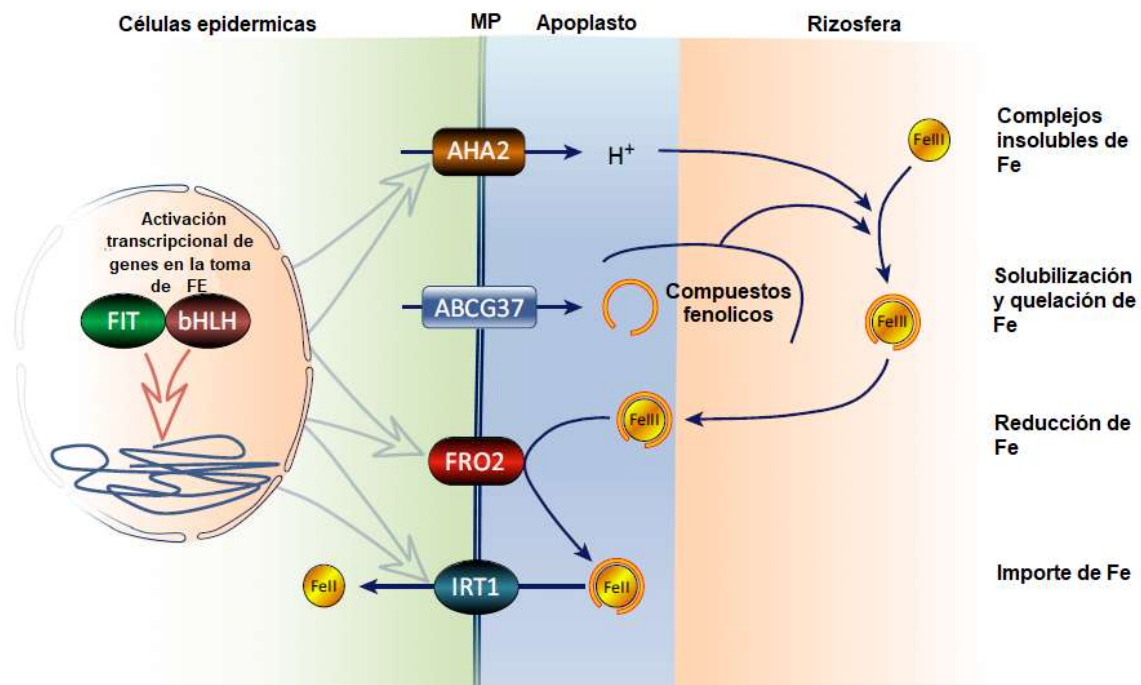


Figura 9. Regulación de la toma de hierro (Fe) en *Arabidopsis*. *Arabidopsis* usa los tres pasos de la estrategia 1 para reducir el hierro del medio. El primer paso consiste en la solubilización del Fe (III) promovida por una acidificación del medio a través de la liberación de protones por ATPasa AHA2. Posteriormente, se exportan compuesto fenólicos por la proteína ABCG37 para quelar el Fe (III), al solubilizarse es reducido por FRO2 a Fe (II), y transportado al interior de la célula por el transportador IRT1. Esta estrategia es inducible a través de la acción de FIT en combinación con uno de los cuatro factores de transcripción pertenecientes a la familia bHLH (bHLH 38/39/100/101). Modificado de Brumbarova et al., (2015).

2.4.1. Regulación de la expresión génica en respuesta al Fe

Los niveles del Fe en la célula deben de ser estrictamente regulados para evitar una sobreacumulación del micronutriente, el cual genera una sobreproducción de ERO, causando daño un celular y necrosis. Por lo tanto, la célula debe de ser capaz de percibir y regular los niveles de este nutriente. Su regulación es a nivel transcripcional y post-traducciona, una vez que el contenido intracelular de Fe aumenta, se reprime esta vía de señalización (Fig. 10) (Kobayashi *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2019).

Estudios recientes se han enfocado en la identificación del receptor del Fe que transmite la señal molecular para alcanzar un balance nutricional y evitar su toxicidad. BTS (BRUTUS) es una enzima que funciona como ligasa de ubiquitina RING E3 que regula negativamente los factores de transcripción que se inducen en deficiencia de Fe. La percepción del Fe ocurre a través de su dominio de hemeritina de unión al hierro (HUH) de BTS, el cual interactúa con el ion Fe para cambiar su conformación. Sin embargo, aún no se esclarece en su totalidad la percepción del Fe en la célula, y si es BTS el receptor o interactúa con algún receptor corriente arriba (Kobayashi *et al.*, 2013; Selote *et al.*, 2015).

En *Arabidopsis*, además de la ubiquitin ligasa BTS inducida por la deficiencia de Fe también se expresa PYE (POPEYE). Este FT es una proteína de la familia bHLH del subgrupo IVb, y regula negativamente un conjunto de genes involucrados en la movilización del Fe de la raíz hacia el follaje en condiciones limitantes de Fe (Long *et al.*, 2010). Se conoce que PYE se homodimeriza con los FT AtbHLH34, 104, 105 (ILR3) y 115 (Fig. 10) (Long *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2017). Los FT bHLH del subgrupo Ib (AtbHLH38,

39, 100 y 101) se heterodimerizan con FIT para regular los genes involucrados en la adquisición de Fe de la Estrategia I (Colangelo y Guerinot, 2004). Así mismo, se expresan los FT MYB10 y MYB72 miembros de la familia mieloblastosis (MYB), los cuales han sido identificados en la redistribución de Fe a través de la regulación de NAS4 (NICOTIANAMINE SYNTHASE 4), enzima involucrada en la síntesis de nicotinaminas (Colangelo y Guerinot, 2004; Palmer *et al.*, 2013). Adicionalmente, se ha reportado que MYB72 regula la producción y exportación de compuestos fenólicos para la adquisición de Fe (Fig. 10) (Van der Ent *et al.*, 2008; Zamioudis *et al.*, 2014).

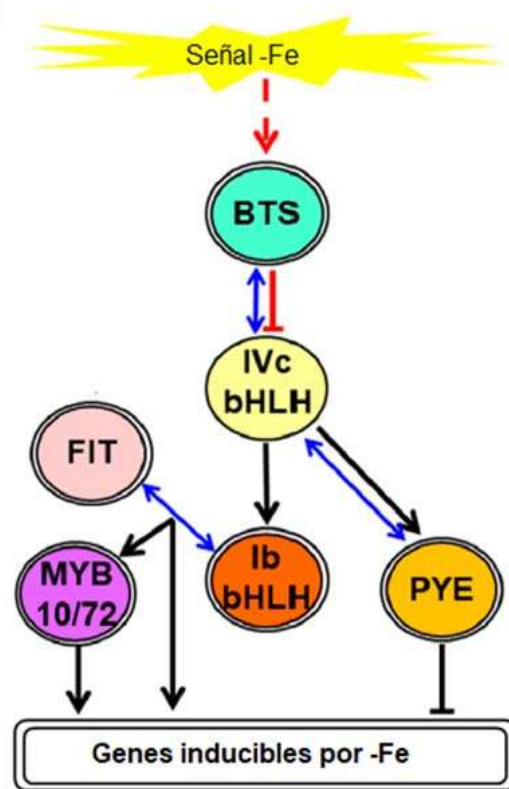


Figura 10. Regulación de los genes inducibles por la deficiencia de Fe en *Arabidopsis*. Los ovalos indican las proteínas reguladoras, y los colores el tipo. Los ovalos con doble línea son los genes inducidos bajo la deficiencia de Fe a nivel transcripcional. Las líneas discontinuas indican vías putativas. Las líneas de color negro indican una regulación transcripcional; y las de color azul es la interacción proteína-proteína y las rojas la regulación a nivel proteico o desconocido. Modificado de Kobayashi *et al.*, (2019)

2.5. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

Una adecuada nutrición mineral es indispensable para el crecimiento vegetal. Para optimizar la producción agrícola se aplican fertilizantes al suelo en grandes cantidades. No obstante, con un costo económico y ambiental insostenible (Zhang *et al.*, 2010). Se han buscado alternativas para disminuir el impacto negativo de los fertilizantes, la más promisoría es el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Estas bacterias ejercen un efecto benéfico sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Bakker *et al.*, 2007).

En la interacción simbiótica que tienen las PGPR con la planta donde el costo y el beneficio es compartido por ambas, y dicha interacción se pueden clasificar en dos (Droge *et al.*, 2012; Bulgarelli *et al.*, 2013). La primera es de tipo mutualista, y corresponde a una íntima interacción que involucra a un rango restringido de plantas hospederas. La interacción mutualista lleva a la formación de una estructura específica, como la formación de nódulos en las especies de la familia *Fabaceae* para la adquisición de nitrógeno (Masson-Boivin *et al.*, 2009). La segunda es conocida como una simbiosis asociada o cooperativa (Droge *et al.*, 2012). Esta consiste en la colonización de la superficie del sistema radicular de la raíz que resulta en un incremento de la germinación de las semillas, el crecimiento de la raíz, un aumento del área de la hoja, así como del contenido de clorofila, la toma de nutrientes, tolerancia al estrés abiótico, biocontrol y senescencia (Yang *et al.*, 2009; Barea *et al.*, 2013).

La promoción del crecimiento inducido por las PGPR es a través de mecanismos directos e indirectos (Glick, 1995). Los mecanismos directos consisten en cinco procesos (Fig. 11):

- 1) Fijación de nitrógeno: este proceso es a través de la reducción del nitrógeno gaseoso a amonio, catalizado por un complejo de enzimas nitrogenasas ($N_2 + 8H^+ + 16ATP = 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16Pi$) (Urquiaga *et al.*, 2012). Se ha reportado que en este mecanismo participa el gen *nifH*, un

gen que codifica a subunidades de enzimas con actividad de dinitrogenasas (Dixon y Kahn 2004).

- 2) Solubilización de minerales: las PGPR excretan ácidos orgánicos como el malato, el succinato y el citrato. Además se ha reportado que la actividad de las fosfatasas mejoran la asimilación del fosfato (Rodríguez *et al.*, 2006).
- 3) Producción de sideróforos: los sideróforos contribuyen en la promoción del crecimiento vegetal por la solubilización de minerales como el Fe y por el efecto que tiene hacia los patógenos fúngicos presentes en la rizosfera, restringiendo su crecimiento (Duijff *et al.*, 1999).
- 4) Biosíntesis de fitohormonas: se ha reportado que las PGPR producen auxinas y citocininas que le aportan a la planta (Vacheron *et al.*, 2013). Además, algunas PGPRs interfieren con la biosíntesis del etileno a través del metabolismo del ACC (precursor del etileno) a α -quetobutirato y amonio. Por medio de la enzima desaminasa ACC (*acdS*) (Glick *et al.*, 2014).
- 5) Liberación de compuestos volátiles: estos son metabolitos secundarios que excretan las PGPR promoviendo el crecimiento y la salud de la planta (Ryu *et al.*, 2003).

Por otro lado, los mecanismos indirectos que emplean las bacterias se incluyen cuatro (Fig. 11):

1. Producción de antibióticos: los antibióticos ayudan en el control de patógenos, previniendo el daño a la planta. Sin embargo, este efecto puede mostrar diferencias en sus acciones en diferentes condiciones de suelo (Glick 2015).
2. Síntesis de cianuro de hidrogeno: es un mecanismo de biocontrol que emplean las bacterias para controlar la proliferación de los fitopatógenos fúngicos (Ramette *et al.*, 2006).

3. Resistencia sistémica inducida: proceso que detiene la proliferación de patógenos en los tejidos vegetales por la activación de mecanismos de defensa (Couillerot *et al.*, 2009; Lugtenberg y Kamilova, 2009).
4. Quórum sensing: es una comunicación célula a célula empleando pequeñas señales difusibles. Las bacterias coordinan la expresión génica con la densidad poblacional, provocando una respuesta solo cuando la señalización alcanza un umbral crítico. A través de estas señales se modifica su comportamiento como una sola unidad transcribiendo genes para generar biofilm, modificar su patogenicidad o percepción de nutrientes. La señal más estudiada en el quórum sensing es la *N*-acil-L-homoserina lactona (Ortiz-Castro *et al.*, 2009; Cornforth *et al.*, 2014).

Los mecanismos directos e indirectos producidos por las PGPR impactan en la arquitectura del sistema radicular, ya sea por el crecimiento o la distribución espacial de la raíz primaria y las raíces laterales, su número y longitud (Fig. 11) (Vacheron *et al.*, 2013). El número de PGPRs descritas ha venido en aumento, con el consecuente potencial como biofertilizantes. Se han destacados varios géneros bacterianos considerados PGPR entre ellos: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klepsiella*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus* y *Serratia* entre otros (Glick, 1995; Saharan y Nehra 2011).

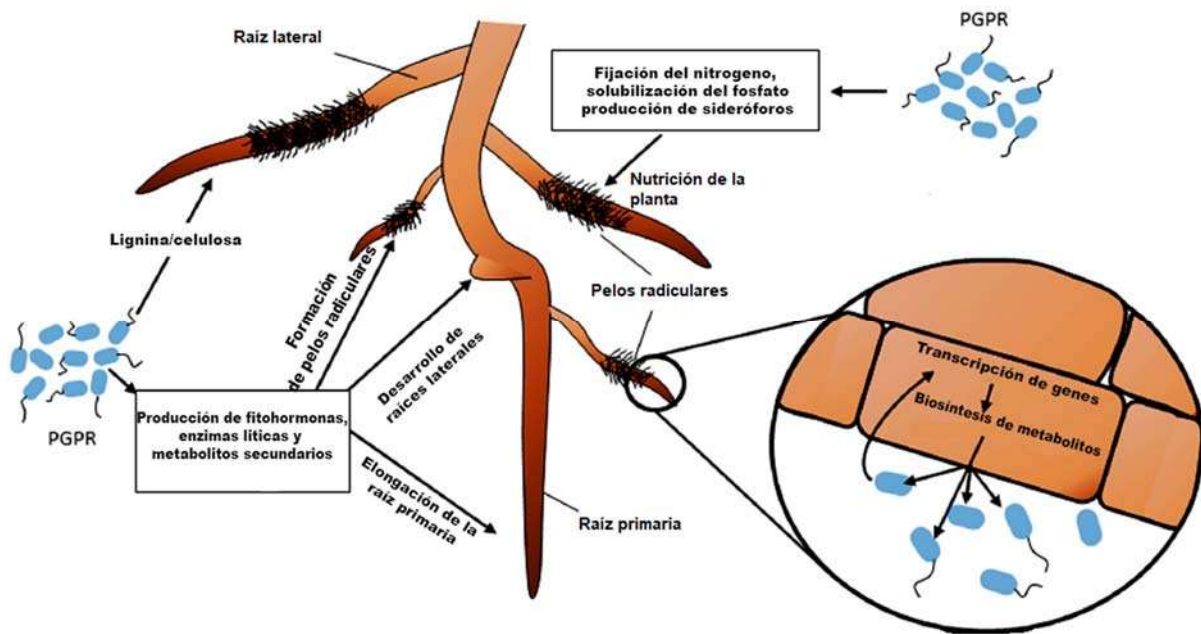


Figura 11. Impacto de la fitoestimulación de las PGPR sobre el desarrollo radicular, la adquisición de nutrientes y las funciones de la raíz. Las PGPRs pueden modular el desarrollo y crecimiento de la raíz a través de la producción de fitohormonas, metabolitos secundarios y enzimas. Los efectos observados comúnmente incluyen: la reducción del crecimiento de la raíz primaria, y el incremento del número y longitud de los pelos radiculares y raíces laterales. Las PGPRs también influyen en la nutrición de la planta a través de fijación de nitrógeno, solubilización del fósforo, o producción de sideróforos, y la modificación de la raíz por cambios en la transcripción genética y la biosíntesis de metabolitos (Modificada de Vacheron *et al.*, 2013).

2.5.1. Género *Pseudomonas*

Las bacterias del género *Pseudomonas* son bacilos gram negativos, que pueden vivir en diversos nichos ambientales y tienen una gran diversidad de especies que abarcan desde patógenas hasta benéficas. Además se ha destacado su potencial catabólico, metabólico y fisiológico, así como su versatilidad ya que pueden ser aisladas en la rizosfera y en otros ambientes como suelos alcalinos y cuerpos de agua (Morris *et al.*, 2008).

Este género es ampliamente estudiado por su papel como patógeno para las plantas como *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo, también varias especies han sido utilizadas en la agricultura debido a que promueven el crecimiento vegetal. En este rubro, se han destacado las especies *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas aureofaciens*

entre otras (Venturi, 2006; Rokhzad *et al.*, 2008). *Pseudomonas* mejora la toma de nutrientes como el fosfato y el hierro (Sharan y Nehra, 2011), a través de la excreción de ácidos orgánicos y protones que solubilizan el Pi; además de la producción de fosfatasas y fitasas que hidrolizan el Po y lo liberan en forma de Pi, dejando accesible al nutriente (Miller *et al.*, 2009). Además, excretan sideróforos que quelan el hierro (Saha *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que la interacción de este género con las plantas mejora la captación de nutrientes inclusive en ambientes hostiles (Egamberdiyeva, 2007). Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos moleculares que emplea esta simbiosis para captar los nutrientes. Thrin y colaboradores (2018) demostraron que el efecto promotor que induce la cepa *Pseudomonas nitroreducens*, es a través de una mayor captación de nitrógeno en *A. thaliana* por una mayor inducción de las proteínas transportadoras de nitrógeno NRT2.1 (Fig. 12). Así mismo, Montejano-Ramírez *et al.* (2018) demostraron que *Arthobacter agilis* UMCV2 promueve el crecimiento en *Medicago truncatula* por la inducción de los genes *FRO*, induciendo una mayor captación del hierro del medio. Esto indica que las bacterias son importantes probióticos para promover el crecimiento y la nutrición vegetal, quedando los mecanismos moleculares pendientes de esclarecer.

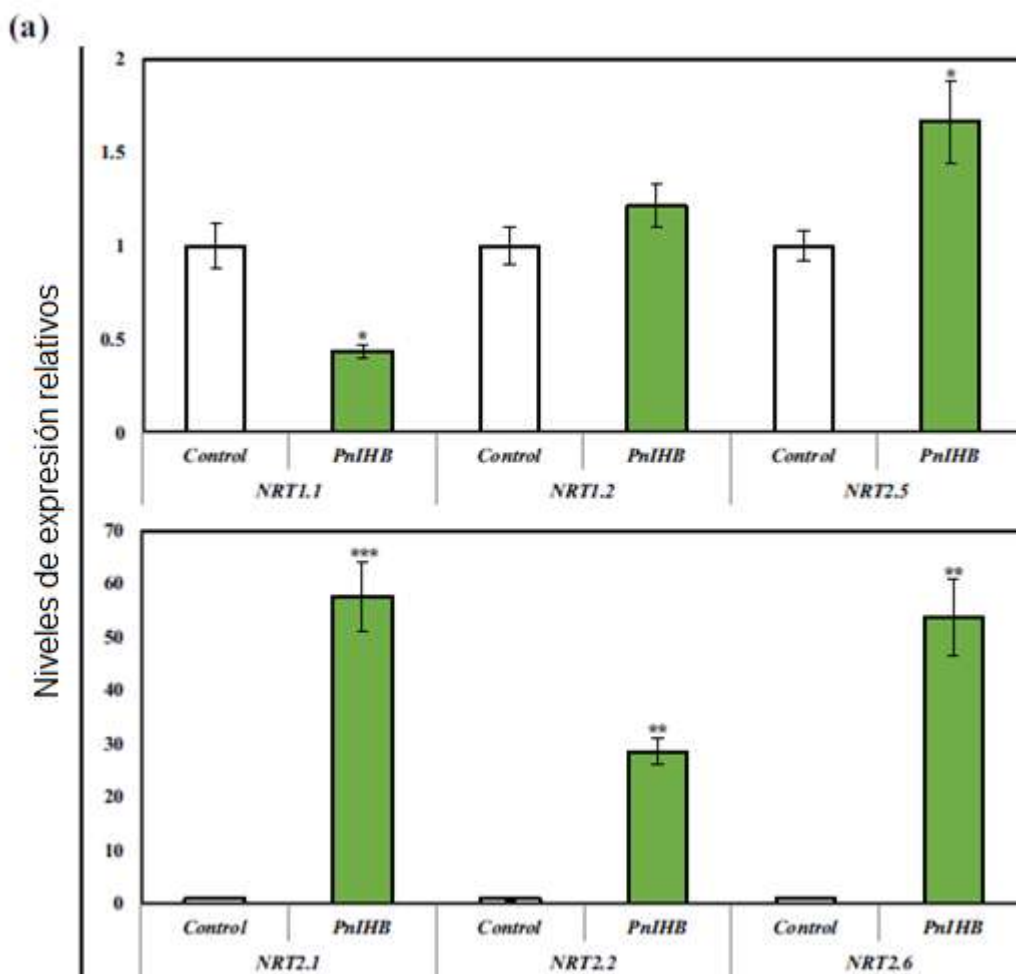


Figura 12. Cambios de expresión de genes *NRT* de *Arabidopsis* en respuesta a *Pseudomonas nitroreducens* IHB B 13561 (PnIHB). Análisis cuantitativo de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) se realizó con muestras de 8 días en interacción con la cepa PnIHB; en la condición control se usó caldo de lisogenia sin bacterias. En las gráficas se representa la expresión relativa de los genes *NRT* que tienen la actividad de transportadores de nitrato, en blanco la condición control y en verde la cepa PnIHB. Modificado de Trinh *et al.*, (2018).

3. JUSTIFICACIÓN

Diversas especies de bacterias del género *Pseudomonas* se han caracterizado como promotoras del crecimiento vegetal. Es de nuestro interés dilucidar la posible influencia de *P. putida* en la captación de fosfato y hierro en plántulas de *A. thaliana*.

4. HIPOTESIS

Pseudomonas putida promueve el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* a través de una mejor captación de fosfato y hierro.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar el efecto de *Pseudomonas putida* en la captación de hierro y fosfato en *Arabidopsis thaliana*.

5.2. Objetivos particulares

- i. Caracterizar el crecimiento de *A. thaliana* en co-cultivo con *P. putida*.
- ii. Estudiar el efecto de *P. putida* sobre la captación de hierro y fosfato.
- iii. Estudiar las vías de señalización que participan en la captación de hierro y fosfato de *A. thaliana* en interacción con *P. putida*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

Se utilizaron semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0), además se utilizaron líneas transgénicas *CycB1;1::GUS* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *ILR3:GUS* (Rampey *et al.*, 2006), *AtPT1:GUS* (Karthikeyan *et al.*, 2002), *AtPT2:GUS* (Karthikeyan *et al.*, 2002), *pPLDZ2:GUS-GFP* (Cruz-Ramírez *et al.*, 2006), *miR399:GUS-GFP* (Aung *et al.*, 2006), *ALMT1:GFP* (Mora-Macías *et al.*, 2017), *PYE:GFP* (Long *et al.*, 2010), *BTS:GFP* (Long *et al.*, 2010), *IRT1:YFP* (Vert *et al.*, 2002).

Para el estudio de la vía de señalización de hierro se utilizaron las mutantes *bts* (Long *et al.*, 2010), *pye* (Long *et al.*, 2010), *ilr3-1* (Rampey *et al.*, 2006), *ilr3-2* (Rampey *et al.*, 2006), *irt1* (Vert *et al.*, 2002) y *fit1* (Colangelo y Guerinot, 2004). La cepa bacteriana *Pseudomonas putida* KT2440 (Aguilar *et al.*, 2006), para su preservación se sembró en medios Luria Bertani (LB) agregando agar bacteriológico y se crecieron a 37°C por 24 h.

6.2. Condiciones de crecimiento

Las semillas se desinfectaron con etanol al 95% (v/v) por 4 min. y de cloro al 10% (v/v) durante 4 min. en agitación constante a 1200 rpm. Posteriormente, se realizaron cinco lavados con agua desionizada estéril, una vez desinfectadas se vernalizaron por 48 h. a 4 °C.

Las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri que contenían medio de cultivo de MS 0.2X ajustado a pH 7, este fue modificado de la formulación original de Murashige y Skoog (1962); se agregó fitagar al 1% (Phytechnology). Los medios de cultivo con deficiencia de hierro se prepararon usando ferrozina (3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-p, p'-disulfonic acid sodium sal), como quelante, adquirido de la casa SIGMA, y aplicado en una concentración de 100

μM . Para los medios con exceso de hierro se modificó el medio MS 0.2X agregando una concentración de $100 \mu\text{M}$ de FeSO_4 .

Una vez que el medio solidificó, las semillas fueron sembradas en la superficie del mismo y las placas se colocaron en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95-L) con un fotoperiodo de 16 h. luz, 8 h. oscuridad, a una intensidad de luz de $100 \mu\text{mol m}^2\text{s}^{-2}$ y a 22°C .

Las plántulas de *A. thaliana* de 4 días después de germinadas (ddg), fueron crecidas en medio MS 0.2X con ferrozina. Posteriormente, en los ensayos de co-inoculación, las plántulas fueron transferidas a medios en las mismas condiciones sobre colonias bacterianas sembradas mediante estriado con asa bacteriológica, y manteniéndose en interacción por un periodo de 6 días a 22°C .

6.3. Análisis del desarrollo vegetal *in vitro*

En los diferentes bioensayos, se analizaron a los 6 días de co-inoculación, haciendo una medición de la longitud de la raíz primaria, conteo del número de las raíces laterales presentes en la zona de transición entre la raíz y el tallo con la ayuda de un estereoscopio (Leica MZ6) y la densidad de las raíces laterales se calculó dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria. El peso fresco total, así como del follaje y de la raíz de 8 plántulas fue medido con una balanza analítica (Ohaus) y se evaluaron tres cajas de cada condición. Las diferencias entre los datos obtenidos fueron analizados con el programa STATISTICA 10.0 (Dell StatSoft, Austin, Texas, USA), usando pruebas de varianza y significancia Tukey. En las diferentes gráficas, se indica con letras si las medias de los distintos datos difieren significativamente ($p < 0.05$).

6.4. Cuantificación de clorofila

Plántulas de *A. thaliana* de seis días de interacción con la bacteria, fueron transferidas a cajas de microtítulo conteniendo 1 mL de etanol al 96%, para

incubarse durante 1 h. Posteriormente, en el sobrenadante se midió la absorbancia a una longitud de onda de 646 y 663 nm. El contenido total de clorofila fue calculado con la siguiente fórmula $[(7.15 \cdot A_{664.2}) + (18.71 \cdot A_{648.6})] / [1000 \cdot (\text{peso fresco})]$ y se reportó en mg de clorofila por peso fresco, como describe Lichtenthaler (1987) y Zhang *et al.*, (2008).

6.5. Actividad histoquímica de *GUS* y microscopía de campo claro

Las plántulas transgénicas de *A. thaliana* *CycB1;1:GUS*, *ILR3:GUS*, *AtPT1:GUS*, *AtPT2:GUS* en condiciones control y co-inoculadas con *P. putida*, se analizaron al primer, tercer y sexto día de interacción y fueron transferidas a cajas para microtítulo conteniendo X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido) al 0.1 % en un amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 al 0.1 M y un pH de 7) con $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ al 2 mM, estas fueron incubadas durante 30 min a 37 °C (Jefferson *et al.*, 1987). Una vez retirado la solución de X-Gluc se clarificó el tejido con la solución de HCL 0.24N y metanol al 20% (v/v) (Sol. 1) durante 60 min a 62 °C, una vez concluido este tiempo se remueve la Sol. 1 y se agregó una solución de NAOH al 7% (m/v) y etanol al 60 % (v/v) (Sol. 2) durante un periodo de 20 min cada uno; cuando el tiempo concluye se desecha la sol. 2. El tejido se fijó con tratamientos de etanol al 40, 20 y 10 % (v/v) sucesivamente durante un intervalo de 20 min cada uno. El etanol al 10 % se retiró para agregar glicerol al 50% (v/v) (Malamy y Benfey, 1997). Las plántulas fueron montadas con glicerol al 50% sobre portaobjetos de vidrio, cubiertos con cubreobjetos y sellados con barniz de uñas comercial, se observaron y se capturaron las fotografías con un microscopio Leica DFC450C. Para cada tratamiento, al menos 10 plántulas transgénicas fueron analizadas. La coloración azul en los tejidos se debe a actividad de la enzima β -glucuronidasa (*GUS*) sobre el sustrato X-Gluc cuya expresión está regulada por los promotores de los genes de interés.

6.6. Tinción de yoduro de propidio y microscopía confocal

Las plántulas de *A. thaliana* *pPLDZ2:GUS-GFP*, *miR399:GUS-GFP*, *ALMT1:GFP*, *PYE:GFP*, *BTS:GFP*, *IRT1:YFP* en condiciones control y en co-cultivos con *P. putida* se analizaron al primer, tercer y sexto día de interacción. Estas fueron transferidas a una solución de yoduro de propidio 10 mg/mL por un min. Las plántulas fueron enjuagadas en agua y montadas con glicerol al 50% sobre un portaobjetos y cubiertas con un cubreobjetos. Cada línea fue analizada por separado para el yoduro de propidio (con un láser de argón de una longitud de onda de 568 nm de excitación y una ventana de emisión de 585-610nm) y la proteína verde fluorescente [GFP] (488 nm de excitación/ 505-550 nm de emisión) o la proteína amarillo fluorescente [YFP] (514 nm de excitación/ 527 nm de emisión) usando un microscopio confocal (Olympus FV1200) para producir una imagen final. Para cada tratamiento, al menos 10 plantas transgénicas fueron analizadas.

6.7. Tinción de callosa con azul de anilina

Se siguió el protocolo propuesto por Müller *et al.*, (2015). Este consiste en la incubación de las plantas en una caja de micro-título durante 30 min con azul de anilina al 0.1% disuelta en un buffer de fosfato de sodio al 100 mM y a un pH de 7.2. Una vez concluido el tiempo, las plantas se montaron en un portaobjetos y se observaron en el microscopio confocal Olympus FV1200.

6.8. Técnica de Perls/DAB

Esta técnica tiñe el Fe^{+2} y Fe^{+3} de los tejidos de la raíz bajo las condiciones control y co-cultivadas con *P. putida*, para lograr esto se siguió la técnica propuesta por Roschztardt *et al.*, (2009). Las plántulas se incubaron en una solución de HCl al 4% (v/v) y ferrocianuro de potasio (solución de tinción de Perl) al 4% (v/v) durante 30 min. Al retirar la solución se hacen dos lavados con agua desionizada estéril

para que la reacción se detenga. Enseguida, las plantas fueron incubadas en una solución de metanol con NaN_3 al 0.01 M y H_2O_2 al 0.3% (v/v) durante una hora, una vez finalizada la incubación se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos al 0.1M y a un pH 7.4. Para la reacción de intensificación con DAB las plantas se incubaron durante un intervalo de 3 min en una solución de buffer de fosfatos al 0.1 M (pH 7.4) adicionando DAB al 0.025% (w/v) y H_2O_2 al 0.005%. Para detener la reacción, las plántulas se enjuagaron cinco veces con agua destilada estéril. Por último se montaron en portaobjetos con glicerol al 50% y se analizaron en un microscopio Leica DFC450C.

6.9. Análisis de microfotografías

Las microfotografías adquiridas en los microscopios (Nomarski y confocal) se analizaron en el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para cada tratamiento y línea se registraron 10 microfotografías, obteniendo parámetros como la expresión relativa de GUS y fluorescencia relativa. La expresión de los promotores fusionados a los reporteros GUS, GFP o YFP fue cuantificada determinando los pixeles de interés (azul, verde, o amarillo, respectivamente) en un área definida. Posteriormente, se obtuvo una unidad de valor arbitraria ($\text{UA}=\text{pixeles}/\mu\text{m}^2$), esta se normalizó a 1 en la condición control y los co-cultivos con *P. putida* fueron ajustados relativos a ésta, por esta razón es que en las figuras se reporta la expresión de GFP, o YFP como fluorescencia relativa o expresión relativa GUS para el caso de las líneas reporteras *GUS (uidA)*. La estadística para estos parámetros fue la misma que se utilizó en el apartado de “análisis del crecimiento vegetal”.

7. RESULTADOS

7.1. *Pseudomonas putida* modifica la arquitectura de la raíz

En plántulas de *A. thaliana* co-inoculadas con *P. putida* se evaluó el efecto de este microorganismo sobre la arquitectura del sistema radicular. Las plántulas se germinaron en medios MS 0.2X, y a los 4 ddg se transfirieron a medios control y co-inoculados con la bacteria. Se registraron los parámetros de la arquitectura de la raíz y se observó que la interacción inducía la emergencia de las raíces laterales, teniendo un impacto significativo en la densidad de las mismas; sin embargo, se observó una disminución en el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 13 a-c). El peso fresco del follaje dio como resultado cambios discretos en la acumulación de la masa foliar (Fig. 13 d); por otro lado, el peso fresco de la raíz mostro una diferencia significativa respecto al control (Fig. 13 e). No obstante, el peso fresco total de las plántulas dio como resultado una diferencia, aunque pequeña estadísticamente (Fig. 13 f). En las fotografías de la figura 13, se muestran las plántulas en la condición control (g) y la interacción con la sepa (h). Así, *P. putida* co-inoculada con plántulas de *A. thaliana* modifica la arquitectura de la raíz, acortando la raíz primaria y promoviendo la emergencia de las raíces laterales, además de aumentar el peso fresco de las plántulas.

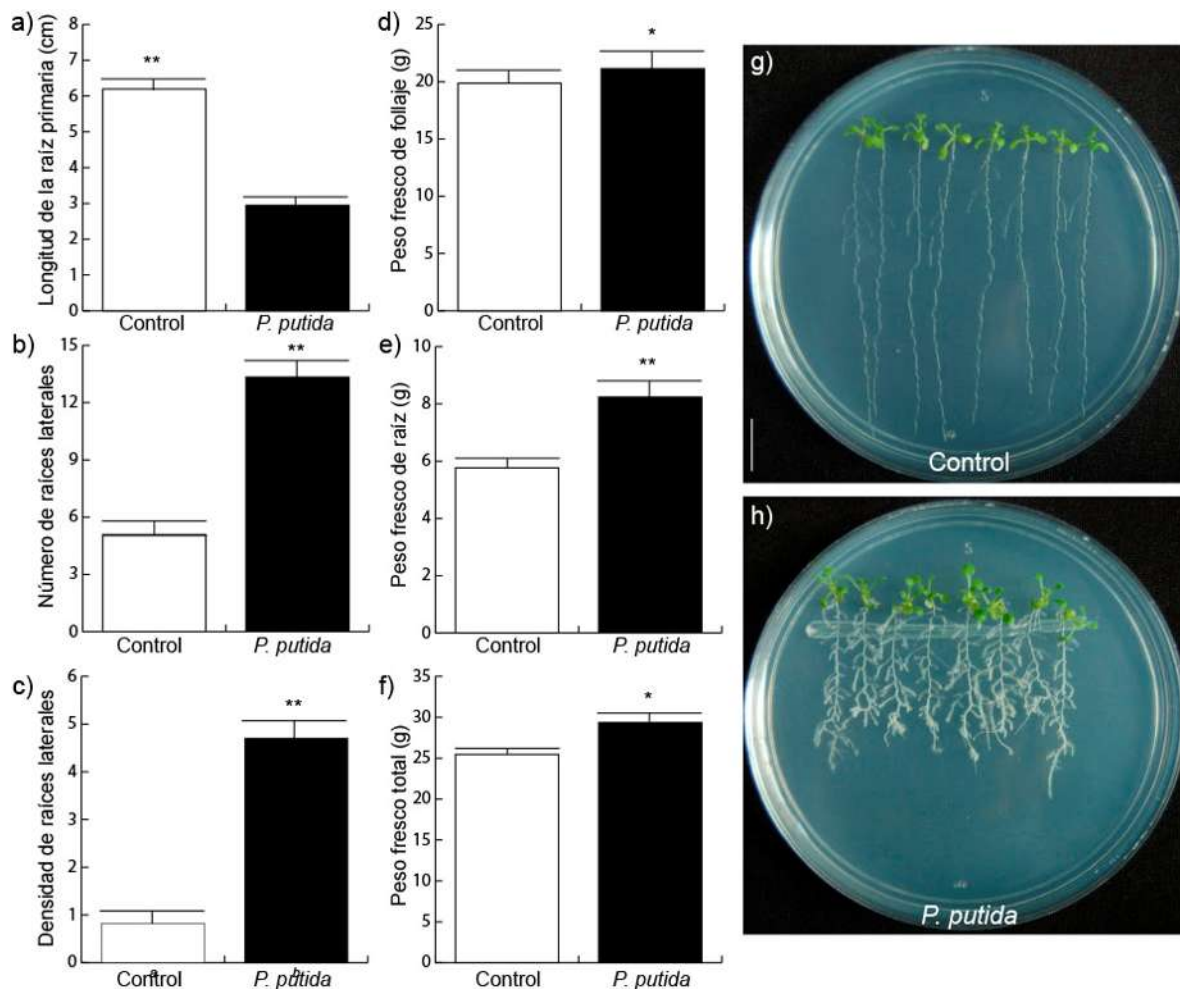


Figura 13. Efecto de la interacción de *P. putida* sobre el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas fueron germinadas y crecidas en medios MS 0.2X. Cumpliendo 4 ddg se transfirieron a medio control y medios en co-inoculación con la bacteria. A los 6 días de interacción se analizaron los siguientes parámetros: **a)** la longitud de la raíz primaria, **b)** el número de las raíces laterales, **c)** densidad de las raíces laterales, **d)** peso fresco del follaje, **e)** peso fresco de la raíz y **f)** peso fresco total. Las imágenes representativas **g)** condición control y **h)** co-cultivo con *P. putida* (barra de escala= 1 cm). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis t de Student con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido tres veces obteniendo resultados similares.

7.2. *P. putida* regula elementos involucrados en la toma de fósforo

Debido a que las plántulas de *A. thaliana* co-inoculadas con *P. putida* presentaron un fenotipo de la raíz similar al reportado en deficiencia de Pi (López-Bucio *et al.*, 2002; Ticconi y Abel, 2004; Desnos, 2008), se analizó la expresión de las líneas reporteras de deficiencia de Pi: *AtPT1:GUS*, un transportador de fósforo constitutivo (Karthikeyan *et al.*, 2002), y *AtPT2:GUS*, un transportador de fósforo inducible por la deficiencia del macronutriente (Karthikeyan *et al.*, 2002). Además, se evaluó la expresión del *miR399:GFP* involucrado en la regulación de *PHO2* (Aung *et al.*, 2006) y del marcador *PLDz2:GFP* una fosfolipasa que se expresa en las células del centro quiescente y de la cofia lateral (Cruz-Ramírez *et al.*, 2006).

Al evaluar la expresión de *AtPT1:GUS* se encontró una mayor inducción de este marcador en interacción con la bacteria, además se observó que la raíz presenta un fenotipo de crecimiento determinado, destacando la emergencia de los pelos radiculares en el ápice de la raíz (Fig. 14 a, b). Mientras que en la línea reportera *AtPT2:GUS*, se puede observar que con la interacción con la bacteria no induce la expresión de este reportero (Fig. 14 c, d).

Para el caso del *miR399:GFP*, las plantas control no presentan ninguna expresión en el ápice de la raíz primaria; por otro lado, se encontró que hay una inducción de la expresión de esta línea reportera en la zona vascular de la raíz cuando está en interacción con la bacteria (Fig. 14 e, f). Por último, en la línea reportera *PLDz2:GFP* se observó que su expresión se reprimió al estar en contacto con la bacteria (Fig. 14 g, h). Estos datos fueron cuantificados a través de un análisis de expresión relativa, reflejados en las gráficas posicionadas de lado izquierdo de la imagen (Fig. 14 i, j). Los datos sugieren que el fenotipo inducido en ápice de la raíz de *A. thaliana* por *P. putida* involucra elementos de la vía de señalización de deficiencia de Pi.

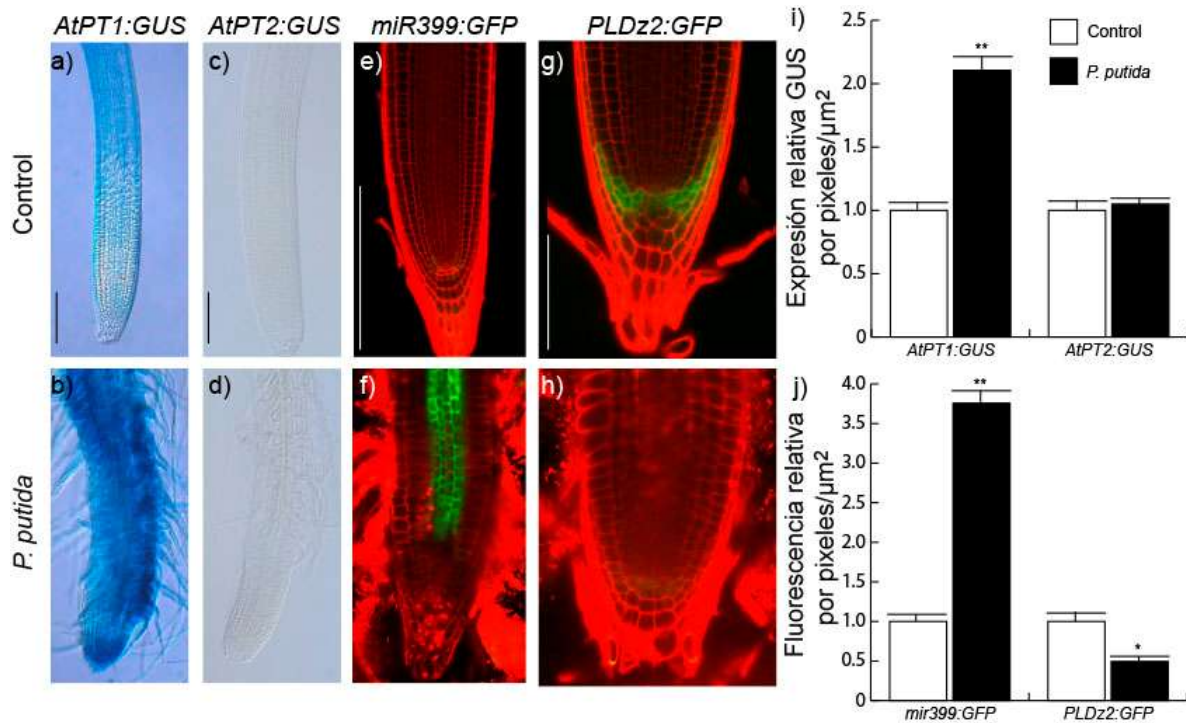


Figura 14. Respuesta de las líneas transgénicas *AtPT1:GUS*, *AtPT2:GUS*, *miR399:GFP* y *PLDz2:GFP* a la co-inoculación con *P. putida*. Las semillas fueron germinadas y crecidas en medios MS 0.2X y a los 4 ddg fueron transferidas a medios control y medios co-inoculados con la bacteria. A los 6 días de interacción las líneas transgénicas *AtPT1:GUS* y *AtPT2:GUS* fueron incubadas con el sustrato X-Gluc, por otro lado *miR399:GFP* y *PLDz2:GFP* fueron incubadas con yoduro de propidio. **a-h)** Micrografías representativas de cada línea reportera de la condición control y en interacción con la bacteria. **i)** Expresión relativa GUS de *AtPT1:GUS* y *AtPT2:GUS*. **h)** Fluorescencia relativa de *miR399:GFP* y *PLDz2:GFP*. Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=10 para FR). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis t de Student con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.3. *P. putida* regula programas relacionados en la modificación del meristemo apical de la raíz con un aumentando en la toma de Fe

Debido a que el medio MS 0.2X es rico en Pi, y a que la bacteria solo induce algunos elementos en la vía de señalización de deficiencia de Pi, se analizaron otros componentes involucrados con la captación de Pi y Fe, los cuales impactan en el desarrollo del meristemo. Se conoce que el malato está involucrado en la toma de Pi y Fe, para esto se analizó la línea reportera *ALMT1:GFP* que codifica para un transportador de malato (Mora-Macías *et al.*, 2017; Ham *et al.*, 2018). Se observó que las plántulas en contacto con la bacteria inducen la expresión de esta línea reportera (Fig. 15 a, b).

Para conocer el estatus de Fe en la planta se hizo la tinción de Perls/DAB, dicha tinción permite visualizar el Fe presente en el tejido vegetal (Roschztardtz *et al.*, 2009). En la condición control se puede observar una coloración café en el nicho de células fuente y parte de la columela; mientras que en las plántulas que estuvieron en contacto con la bacteria se observó que la tinción se magnifica encontrándose en todas las células de la raíz primaria (Fig. 15 c, d). Se ha reportado que el malato y el Fe forman un complejo que induce la deposición de callosa (Hoehenwarter *et al.*, 2016; Mora-Macías *et al.*, 2017). Para corroborar esto, se realizaron tinciones con azul de anilina para observar como es la deposición de este polisacárido. Se observó que la deposición de callosa en la condición control es en algunas células de la epidermis y córtex, pero en las plántulas bacterizadas la deposición de callosa fue mucho mayor que la condición control, destacando que este polisacárido se depositó en las células del meristemo así como en las de la estela y columela (Fig. 15. e, f). En los paneles g), h) e i) se presentan las gráficas del análisis cuantitativo en la diferencia colorimétrica que hay entre los dos tratamientos. Los datos sugieren que la diferenciación del meristemo puede ser producido por la deposición de callosa, inducido por una mayor captación de hierro solubilizado por el malato.

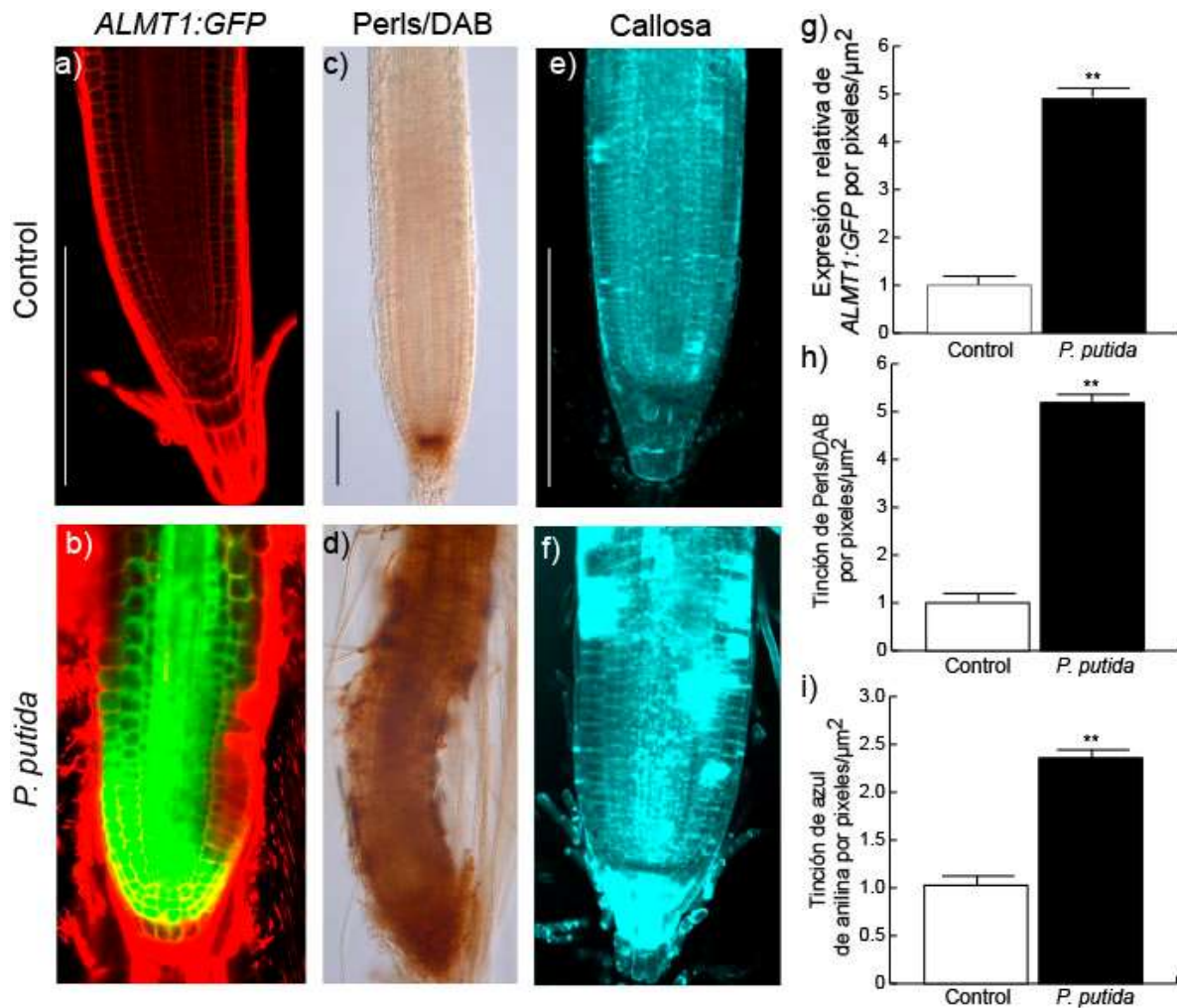


Figura 15. Respuesta de la línea reportera *ALMT1:GFP* y la diferencia colorimétrica de las tinciones de Perls/DAB y callosa a la co-inoculación con *P. putida*. Las semillas fueron germinadas y crecidas en medios MS 0.2X y a los 4 ddg fueron transferidas a medios control y co-inoculados con la bacteria. A los 6 días de interacción se analizaron los siguientes rubros. **a-b)** La línea transgénica *ALMT1:GFP*. **c-d)** Detección de Fe por la tinción de Perls/DAB. **e-f)** Tinción de azul de anilina para la detección de callosa. **g)** Expresión relativa GFP de la línea reportera *ALMT1:GFP*. **h)** Cuantificación de Fe en el tejido vegetal. **i)** Cuantificación de la expresión de las células teñidas con azul de anilina. Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=10 para FR). Los asteriscos indican una diferencia estadística de un análisis t de Student con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.4. La expresión de factores de transcripción involucrados en la regulación de la toma de Fe son modificados por la interacción con *P. putida*

Puesto que *P. putida* induce una mayor captación de Fe en *A. thaliana*, se analizó la expresión de algunos elementos clave en la vía de regulación de la captación de Fe: BRUTUS, una ubiquitin ligasa de tipo E3 (Long *et al.*, 2010; Selote *et al.*, 2015), y PYE e ILR3, factores de transcripcionales de tipo bHLH, que regulan la captación de Fe (Rampey *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2019). Las plántulas de *A. thaliana* que portan las construcciones nos permiten visualizar la expresión de los diferentes elementos en la señalización de la deficiencia de Fe, fueron crecidas en condición control y posteriormente transferidas a medios 0.2X y co-inoculadas con *P. putida*.

Los tres reporteros analizados son inducibles por la deficiencia de Fe. El reportero *BTS:GFP* al estar en contacto con la bacteria se observó una inducción de la expresión y se presentó en toda la zona meristemática de la raíz a comparación de la condición control la cual su expresión está reprimida (Fig. 16 a, b, g). El análisis de expresión de *PYE:GFP* en condición control se expresa en las células de la cofia y columela, mientras que la plántula co-inoculada se observó la expresión en toda la zona meristemática de la raíz primaria (Fig. 16 c, d, g). Finalmente, al hacer el análisis del reportero *IRL3:GUS*, cuya expresión se localiza en las células de la columela, cofia y estela, la interacción con la bacteria indujo su expresión en dichos tejidos (Fig. 16 e, f, h). Estos resultados sugieren que la captación de Fe producida por la interacción con *P. putida* requiere de la expresión de estos elementos que participan en la vía de señalización de Fe

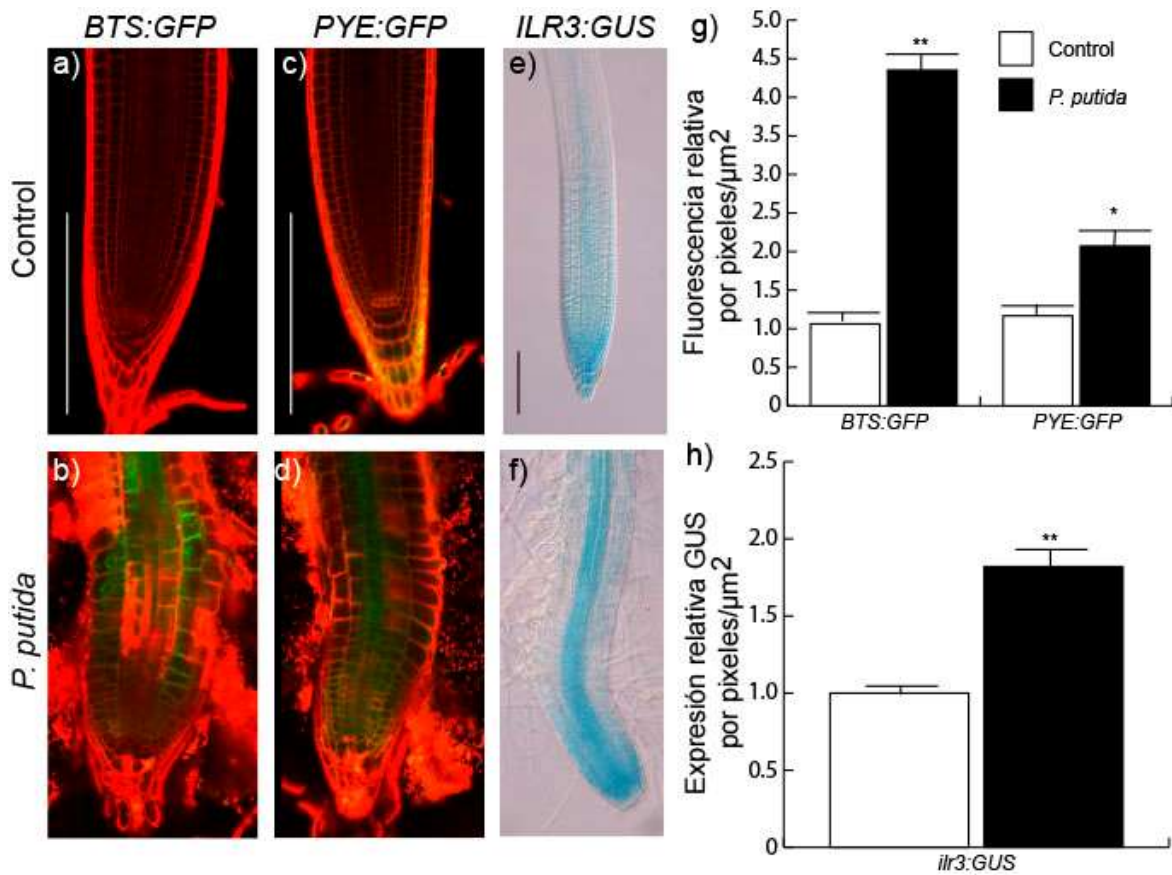


Figura 16. Efecto de la interacción con *P. putida* en la expresión de *BTS:GFP*, *PYE:GFP* y *ILR3:GUS*. Las semillas fueron germinadas y crecidas en medios MS 0.2X y a los 4 ddg fueron transferidas a medios control y medios co-inoculados con la bacteria. A los 6 días de interacción se analizaron: **a-b)** La línea transgénica *BTS:GFP*. **c-d)** La línea transgénica *PYE:GFP*. **e-f)** La línea transgénica *ILR3:GUS*. **g)** Expresión relativa GFP de las líneas reporteras *BTS:GFP* y *PYE:GFP*. **h)** Análisis de expresión relativa del reportero *ILR3:GUS*. Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=10 para FR). Los asteriscos indican una diferencia estadística de un análisis t de Student con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.5. *P. putida* regula la arquitectura de la raíz a través de elementos de la señalización del Fe

Debido a la inducción de expresión de los elementos involucrados en la captación de Fe ocasionados por la interacción con la bacteria, se decidió evaluar la respuesta radicular a bacterización en las tres mutantes implicadas en este proceso: *bts*, *pye* e *ilr3-2* (Rampey *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2016).

Las plántulas silvestres y las mutantes antes mencionadas fueron germinadas y crecidas durante 4 días en medios suplementados con 100 μ M de Ferrozina (FZ). A los 4 ddg se transfirieron a diferentes medios: medios MS 0.2X, medios MS 0.2X inoculado con *P. putida*, medios suplementados con 100 μ M FZ y medios con 100 μ M FZ e inoculados con *P. putida*.

En la mutante *bts* se observó que esta es resistente desde la germinación en los medios con deficiencia de Fe. En la condición control, se observó que no hay diferencia significativa entre la mutante y la planta silvestre (Fig. 17 a, b, c). Mientras que las plántulas inoculados con la bacteria, se observó que tanto Col-0 como *bts* presentaron un crecimiento en la raíz primaria, además de tener una mayor formación de raíces laterales teniendo una diferencia significativa en la mutante *bts* (Fig. 17 a, b, d). Por otro lado, las plántulas transferidas en medios suplementados con FZ, la diferencia radicó en la elongación de la raíz primaria, siendo *bts* la que presentó una mayor longitud con respecto a Col-0, sin embargo no hubo una diferencia significativa en las raíces laterales entre ambas (Fig. 17 a, b, e). Por último, el análisis de las plántulas en los medios con FZ co-inoculadas con la bacteria se observó que la mutante *bts* tuvo una mayor elongación en la raíz primaria a comparación de Col-0; además, la mutante generó un mayor número raíces laterales que la planta silvestre (Fig. 17 a, b, f).

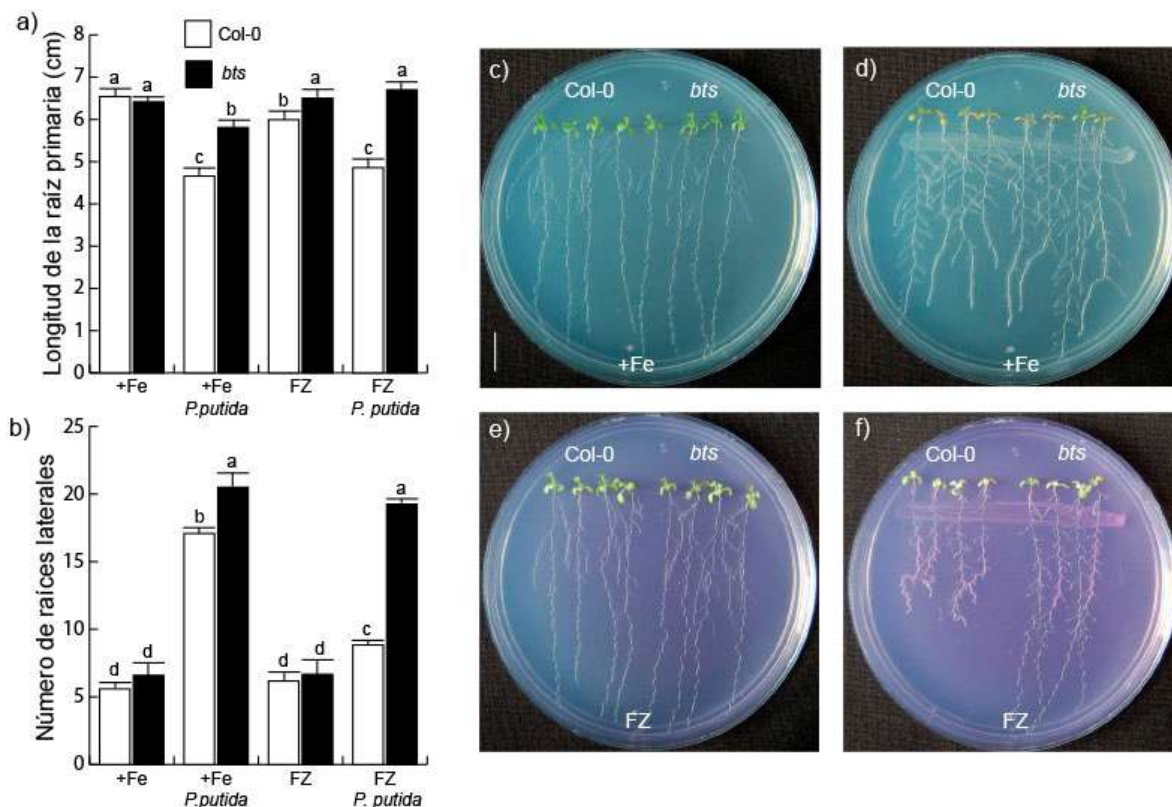


Figura 17. Efecto de *P. putida* en la mutante *bts*. Las plántulas silvestres y mutantes fueron germinadas sobre medio MS 0.2X. A los 4 ddg se transfirieron a medios MS 0.2 X y a medios suplementados con 100 μ M FZ, estas mismas condiciones fueron inoculadas con la bacteria. **a)** La longitud de la raíz primaria; **b)** el número de raíces laterales. **c-f)** Imágenes representativas de la condición control y suplementados con FZ, y las condiciones de la bacteria inoculada (Barra de escala= 1cm). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

La mutante *pye* presenta un fenotipo de hipersensibilidad a la deficiencia de Fe en los medios suplementados con FZ. En la condición control se observó que la mutante *pye* se restablece el fenotipo en el follaje, además de tener una mayor elongación en las raíces laterales, sin embargo la raíz primaria no presentó un mayor crecimiento desde su transferencia, se destaca su longitud con una flecha. Mientras que Col-0 presentó un crecimiento en la raíz primaria sin tener cambios significativos en el número de raíces laterales (Fig. 18 a, b, c). Al analizar la condición inoculada con *P. putida* en medios MS 0.2X, en las plántulas silvestres se observó un mayor crecimiento en la raíz primaria y una mayor promoción de las raíces laterales, por otro lado se observó que la mutante *pye* presenta una hipersensibilidad en esta condición, además de no presentar cambios en el

número de raíces laterales comparado con las plántulas control (Fig. 18 a, b, d). En los medios con FZ, las plántulas Col-0 mostraron un crecimiento en la raíz primaria acompañado de una clorosis en el follaje, mientras que la mutante *pye* presentó una hipersensibilidad característica de esta mutación (Fig. 18 a, b, e). En la condición con FZ inoculados con la bacteria, Col-0 tuvo un crecimiento en la raíz primaria sin llegar a ser igual al observado en la condición de los medios MS 0.2X inoculado con la bacteria, por otro lado *pye* presentó una hipersensibilidad en la raíz primaria con una cantidad reducida en el número de raíces laterales (se destaca la longitud de la raíz primaria de la mutante con una flecha) (Fig. 18 a, b, f).

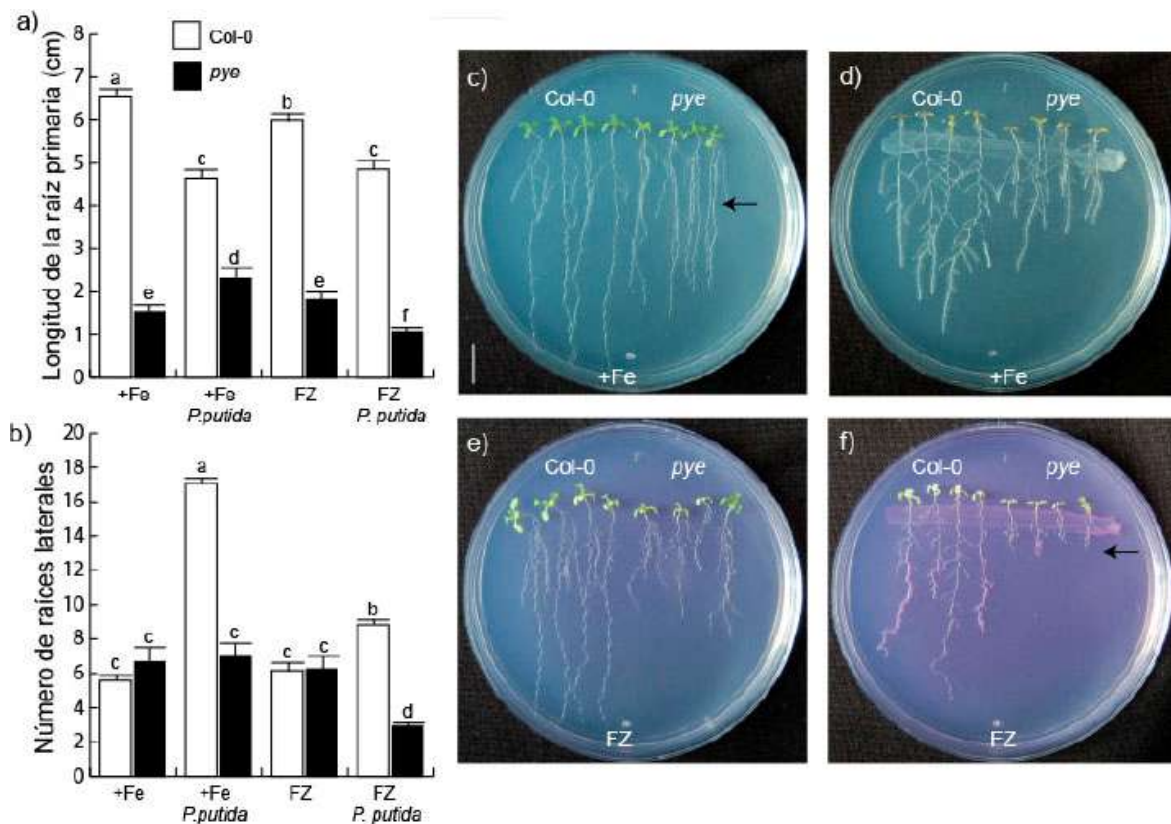


Figura 18. Efecto de *P. putida* en la mutante *pye*. Las plántulas silvestres y mutantes fueron germinadas sobre medio MS 0.2X. A los 4 ddd se transfirieron a medios MS 0.2 X y a medios suplementados con 100 μ M FZ, estas mismas condiciones fueron inoculadas con la bacteria. **a)** La longitud de la raíz primaria; **b)** el número de raíces laterales. **c-f)** Imágenes representativas de la condición control y suplementados con FZ, y las condiciones de la bacteria inoculada (Barra de escala= 1cm). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Por último, se registraron los datos de la mutante *ilr3-2*. Esta mutación presenta un fenotipo de hipersensibilidad en los medios con deficiencia de Fe adicionados con FZ. En la condición control, la mutante *ilr3-2* no presentó un crecimiento en la raíz primaria a comparación de Col-0 (la flecha destaca la longitud de la misma), así mismo no hubo cambios en el número de raíces laterales entre ambas (Fig. 19 a, b, c). En la condición inoculada con la bacteria, se observó que la línea mutante presentó una hipersensibilidad en la raíz primaria a comparación de Col-0 que presenta un crecimiento en la raíz primaria y una promoción en el número de las raíces laterales (Fig. 19 a, b, d). En la condición de los medios suplementados con FZ se observó el mismo fenotipo de Col-0 teniendo un crecimiento en la raíz primaria acompañado de una clorosis en el follaje, en comparación con la mutante *ilr3-2* que presentó un fenotipo de hipersensibilidad en esta condición (Fig. 19 a, b, e). Por último, en los medios adicionados con FZ e inoculados con la bacteria, Col-0 tuvo una elongación en la raíz primaria y raíces laterales sin llegar a ser igual al efecto observado anteriormente, sin embargo en esta condición la mutante manifestó un fenotipo de hipersensibilidad (Fig. 19 a, b, f).

Con base en los resultados antes mencionados, se sugiere que durante la interacción planta-microorganismo se necesitan los elementos BTS, PYE e ILR3 para regular la respuesta radicular de *A. thaliana* a *P. putida*.

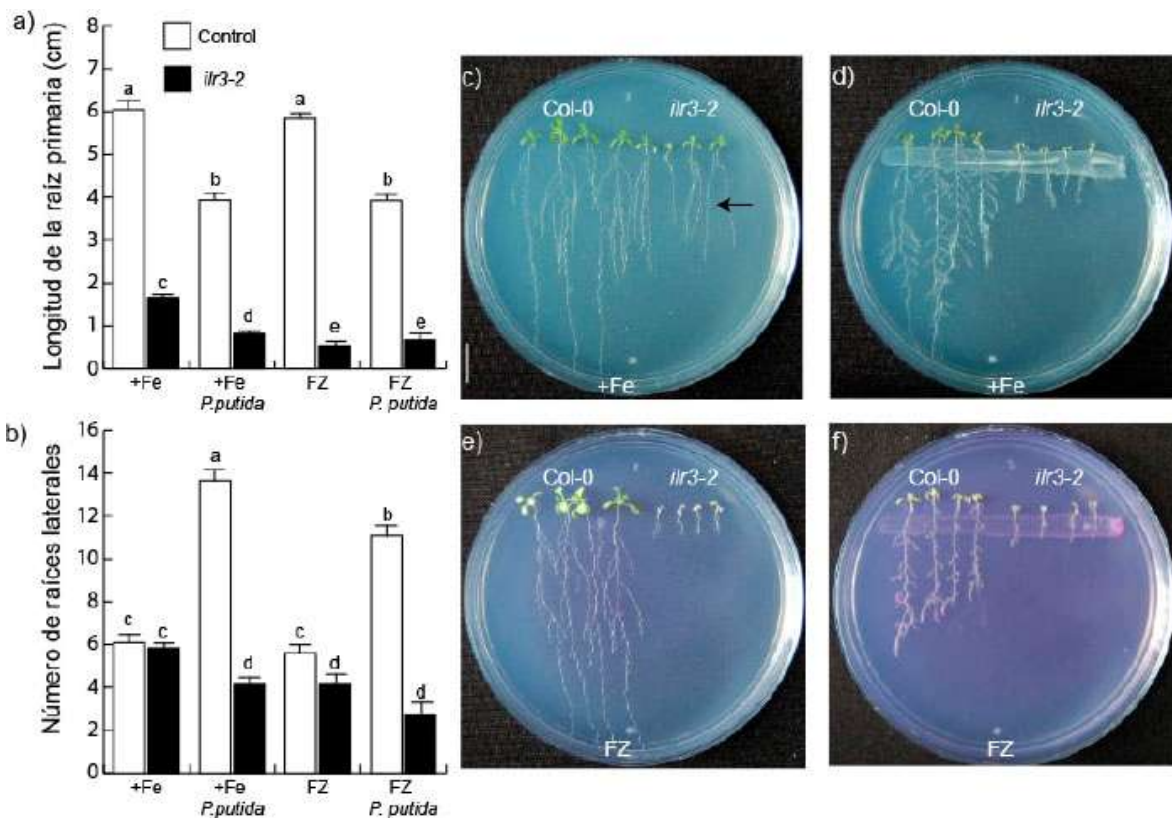


Figura 19. Efecto de *P. putida* en la mutante *ilr3-2*. Las plántulas silvestres y mutantes fueron germinadas sobre medio MS 0.2X. A los 4 ddg se transfirieron a medios MS 0.2 X y a medios suplementados con 100 μ M FZ, estas mismas condiciones fueron inoculadas con la bacteria. **a)** La longitud de la raíz primaria; **b)** el número de raíces laterales. **c-f)** Imágenes representativas de la condición control y suplementados con FZ, y las condiciones de la bacteria inoculada (Barra de escala= 1cm). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.6. *P. putida* regula el crecimiento y la toma de Fe independientemente de *fit* y de *irt1*

La captación del Fe involucra el factor de transcripción de tipo bHLH conocido como FIT el cual regula la expresión de *IRT1* una proteína que internaliza el Fe de la rizosfera a la célula (Eide *et al.*, 1996; Vert *et al.*, 2002; Barberon *et al.*, 2014). Para determinar si los elementos antes mencionados están implicados en el efecto generado por la bacteria se usaron las mutantes *fit* e *irt1* (Vert *et al.*, 2002; Colangelo y Guerinot, 2004). Las plántulas fueron crecidas en medios MS 0.2X y a los 4 ddg se transfirieron a medios control, medios adicionados con 100 μ M Fe y medios inoculados con la bacteria.

En la condición control se observó que las mutantes *fit* e *irt1* presentan un fenotipo de clorosis en el follaje. Haciendo una cuantificación de clorofila se observó que hay una disminución de clorofila en las mutantes a comparación de la línea silvestre (Fig. 20). Mientras que en la condición con un exceso de hierro (100 μ M Fe), la línea silvestre no presentó cambios significativos comparados con la condición control; por otro lado, la mutante *fit* no mostró un cambio significativo en la cantidad del pigmento, sin embargo *irt1* tuvo un aumento considerable a comparación de su condición control (Fig. 20). Las plántulas que estuvieron en la condición inoculada con la bacteria, Col-0 no presentó un cambio significativo en la cantidad de clorofila a comparación con las dos condiciones, mientras que en las mutantes *fit* e *irt1* se observó que la cantidad de clorofila tuvo un incremento del pigmento similar a las plántulas silvestres (Fig. 20).

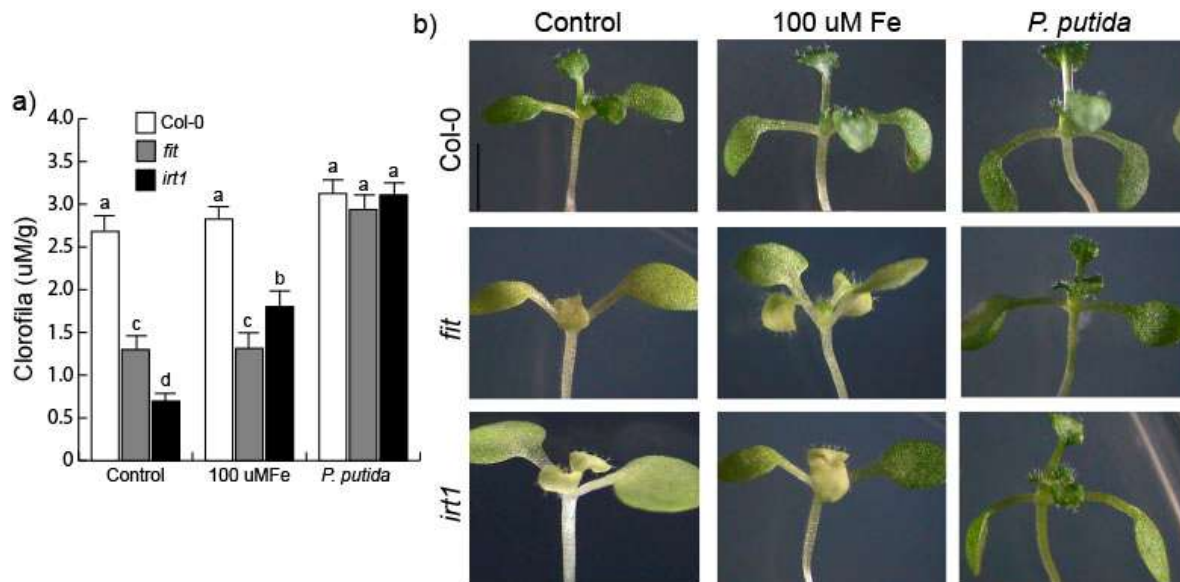


Figura 20. Efecto de *P. putida* en los niveles de clorofila en las mutantes *fit* e *irt1*. Las plántulas silvestres y mutantes fueron germinadas sobre medio MS 0.2X. A los 4 ddg se transfirieron a medios MS 0.2 X, medios adicionados con 100 µM de Fe y medios co-inoculados con *P. putida*. A los 6 ddg se realizó la cuantificación de clorofila. **a)** Cuantificación de clorofila µM/g. **b)** Imágenes representativas de la línea silvestre y de las mutantes en los diferentes tratamientos (Barra de escala= 10 mm). Los datos indican la media ± la desviación estándar (n=15). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Debido a que la bacteria incrementó la cantidad de clorofila del follaje en las mutantes *fit* e *irt1*, se decidió llevar a cabo la tinción de Perls/DAB para determinar el efecto de la bacteria sobre la presencia de Fe en el tejido vegetal de las dos mutantes. En la condición control, las plántulas silvestres presentaron una tinción en el nicho de células fuente y parte de la cofia; de la misma forma fue en las mutantes *fit* e *irt1*, sin embargo la tinción de ambas fue reducida respecto a Col-0 (Fig. 21). En el tratamiento de 100 µM de Fe, hubo un aumento de la tinción en Col-0 en la zona meristemática, esta se presentó en el nicho de células fuente y cofia, así como en las células de la endodermis; sin embargo *fit* no presentó cambios significativos en la tinción, pero *irt1* tuvo un aumento en la tinción en las mismas zonas de Col-0 sin llegar a ser similares (Fig. 21). Por último, en las plántulas co-inoculadas con la bacteria se observó que tanto la línea silvestre como las mutantes tuvieron un aumento en la tinción en toda la zona meristemática, de forma similar entre ellas (Fig. 21). Estos datos sugieren que la

toma de Fe producido por la interacción con la bacteria es independiente a estos dos elementos: FIT e IRT1.

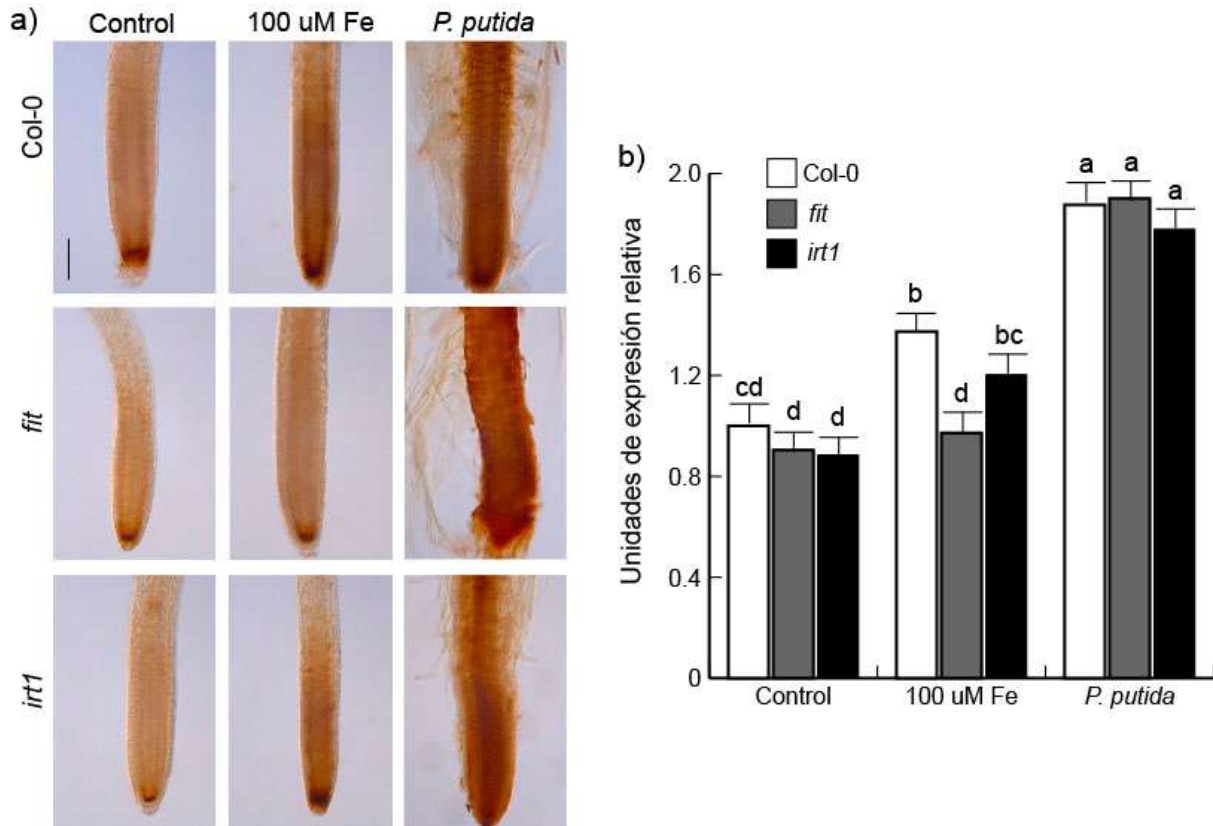


Figura 21. Respuesta de las mutantes *fit* e *irt1* sobre la tinción de Perls/DAB en contacto con *P. putida*. Las plántulas fueron germinadas en medios MS 0.2X y a los 4 ddg fueron transferidas a medios control, medios adicionados con 100 μ M Fe y medios co-inoculados con la bacteria. A los 6 ddg se realizó la tinción Perls/DAB. **a)** Micrografías representativas de la línea silvestre y de las mutantes en los diferentes tratamientos. **b)** Cuantificación de la expresión de la presencia de Fe en el tejido vegetal. Los datos indican la media \pm la desviación estándar ($n=10$ para FR). Las distintas letras indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p<0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.7. La expresión del transportador de hierro se modifica en respuesta a la interacción con *P. putida*

Debido al efecto producido por *P. putida* en la mutante *irt1* y para dilucidar el efecto que produce la bacteria en la toma de Fe, se analizó la expresión del transportador IRT1, involucrado en la internalización de Fe (Vert *et al.*, 2002; Brumbarova *et al.*, 2015). Las plántulas de *A. thaliana* portan la construcción que nos permite visualizar la expresión del transportador, estas fueron germinadas en medios con suficiencia de Fe y en medios en deficiencia de Fe adicionados con FZ. A los 4 ddg se transfirieron a medios con Fe y medios adicionados con FZ, así mismo estas dos condiciones fueron inoculadas con la bacteria, estos tratamientos fueron usados para las dos condiciones en las que fueron germinadas las plántulas.

La expresión de *IRT:YFP* ocurre principalmente en las células de la epidermis de la zona de formación de raíces laterales. Los resultados del análisis de expresión de las plántulas germinadas en medios en suficiencia de Fe fueron los siguientes: las plántulas transferidas a los medios con suficiencia de Fe se observó la expresión en algunas células de la epidermis, a comparación del tratamiento con FZ donde la expresión del reportero se localizó en todas las células de la epidermis del área analizada; por lo contrario, las plántulas que estuvieron en contacto con la bacteria se observó que la expresión del reportera se reprime en su totalidad; así mismo las plántulas que estuvieron en el tratamiento con FZ y inoculadas con la bacteria, la expresión del reportero fue muy similar a la condición de suficiencia de Fe (Fig. 22).

Por último, cuando se realizó el análisis de las plántulas que fueron germinadas en medios adicionados con FZ se observó lo siguiente: en los medios con suficiencia de Fe la expresión de la línea reportera fue en todas las células de la epidermis de la zona analizada, en cuanto a la condición con FZ se obtuvo la expresión máxima de este reportero; sin embargo, al hacer el análisis en la condición con suficiencia de Fe e inoculada con la bacteria se observó que la expresión se reprime, de igual

forma la condición adicionada con FZ e inoculada con la bacteria la expresión del reportero se reprime sin llegar a ser igual a la antes mencionada (Fig. 22).

Con estos resultados podemos plantear que la toma de Fe que induce la bacteria en las plántulas de *A. thaliana* es a través de otras proteínas que ayudan a internalizar el Fe.

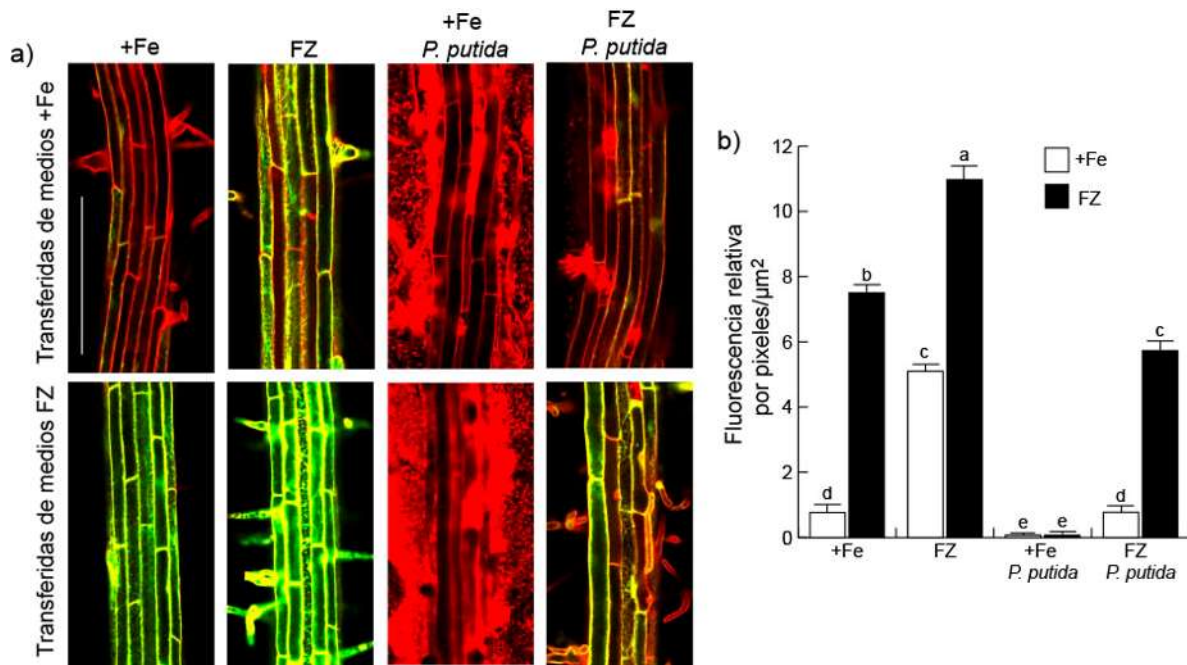


Figura 22 Efecto de *P. putida* en la expresión de *IRT1:YFP*. Las plántulas fueron germinadas en medios con suficiencia de Fe y adicionadas con FZ. A los 4 ddg fueron transferidas a medios con suficiencia de Fe, medios adicionados con FZ y medios co-inoculados con la bacteria. A los 6 ddg fueron incubadas con yoduro de propidio. **a)** Micrografías representativas de la línea transgénica en los distintos tratamientos. **b)** Cuantificación de la fluorescencia relativa de la línea reportera. Los datos indican la media \pm la desviación estándar ($n=10$ para FR). Las distintas letras indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p<0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

8. DISCUSIÓN y CONCLUSIONES

Los procesos involucrados en las interacciones entre las PGPRs y las plantas han sido ampliamente estudiados para determinar el impacto que hay sobre el desarrollo y el crecimiento. Los datos presentados en este trabajo mostraron que *P. putida* altera el programa de crecimiento del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*, modificando el crecimiento indeterminado a determinado de la raíz primaria acompañado con una mayor formación de raíces laterales (Fig. 13).

La deficiencia de fósforo provoca un cambio del programa de crecimiento de la raíz de indeterminado a determinado (López-Bucio *et al.*, 2002; Abel, 2017). Debido al efecto producido por la interacción con la bacteria se decidió utilizar varias líneas reporteras involucradas en el estatus nutricional de Pi. La interacción con *P. putida* promovió la inducción de expresión de la línea reportera de *AtPT1:GUS*, no obstante la línea reportera *AtPT2:GUS* no presentó inducción de la expresión (Karthikeyan *et al.*, 2002) (Fig. 14), por lo tanto esto nos sugiere que a pesar de tener un fenotipo similar a la deficiencia de Pi la planta no reacciona como una deficiencia *per se*. Para conocer más acerca del estatus de Pi se realizó el análisis de la línea reportera *miR399:GFP*, la interacción con la bacteria promueve la inducción de esta línea reportera (Fig. 14); esto sugiere que la inducción de este reportero producido por la bacteria es para promover la internalización y movilización del Pi (Bari *et al.*, 2006 Hsieh *et al.*, 2009). Por último, la expresión de la línea reportera *pPLDZ:GFP* se reprime, lo que nos sugiere que se pierde la identidad de las células del nicho de células fuente (Fig. 14). Por lo tanto, la interacción planta-microorganismo modifica el estatus nutricional de Pi cambiando el crecimiento de la raíz primaria de indeterminado a determinado.

Diversos estudios han demostrado que el impacto de la deficiencia del Pi está relacionado con el Fe (Ward *et al.*, 2008; Bournier *et al.*, 2013). Para determinar si esto se lleva a cabo con la interacción con la bacteria se realizó el análisis de diversos elementos que se encuentran involucrados en el proceso de

diferenciación producido por un desbalance nutricional de Pi (Ham *et al.*, 2018). La proteína transportadora que media la exudación de malato (ALMT1), solubiliza el Fe y el Pi de la rizosfera (Müller *et al.*, 2015; Balzergue *et al.*, 2017). En la expresión de la línea reportera *ALMT1:GFP* se observó que la interacción induce la expresión de este reportero (Fig. 15). Además, se ha reportado que durante este proceso simultáneamente ocurre una acumulación de Fe dentro del plasmodesmo (Mora-Macías *et al.*, 2017, Balzergue *et al.*, 2017), por lo que se evaluó el Fe presente en el tejido vegetal usando la tinción de Perls/DAB. Realizando el análisis de esta tinción se observó que las plántulas que estuvieron en contacto con la bacteria presentan una mayor coloración en la punta de la raíz que las que estaban en condición control (Fig. 15). Lo anterior sugiere que el efecto producido por la bacteria puede ser a través de una mayor captación de Fe provocando un desbalance nutricional entre el Fe y el Pi. La acumulación de Fe en el plasmodesmo induce la deposición de callosa; este es un polisacárido que se produce cuando se forma un complejo entre el malato y el Fe. La deposición de este polisacárido produce el cierre de la comunicación a través del plasmodesmo y por lo tanto se interrumpe el transporte de factores de transcripción que regulan el mantenimiento del meristemo (Müller *et al.*, 2015). Para evaluar los niveles de callosa se utilizó el azul de anilina. Se observó que las plántulas al estar en interacción con la bacteria hay una deposición mucho mayor de callosa respecto a las plántulas control (Fig. 15). Estos datos sugieren que el proceso de diferenciación que se observa en esta interacción es a través de la formación del complejo malato-Fe, el cual posteriormente genera una deposición de callosa.

Lo anterior sugiere que la interacción con la bacteria provoca una mayor captación de Fe presente en el medio. Para una captación adecuada de Fe se necesitan elementos relacionados en esa vía de señalización. Para ello, se analizó la expresión de las siguientes líneas reporteras: la ubiquitin ligasa E3 (*BTS:GFP*) y los factores de transcripción que se encuentran río abajo para regular la captación de Fe (*PYE:GFP* e *ILR3:GUS*) (Long *et al.*, 2010; Selote *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015; Kobayashi *et al.*, 2019). El contacto directo con *P. putida* ocasionó una inducción de expresión de las líneas reporteras (Fig. 16). La expresión de estos

elementos han sido ampliamente relacionados con la deficiencia de hierro; sin embargo se ha reportado que la inducción de estos genes es para regular la captación y homeostasis del Fe (Long *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2013). Por lo tanto, se sugiere que a través de la inducción de estos genes se modifica la captación de este micronutriente.

Para determinar la participación de los elementos antes mencionados, se evaluó el comportamiento de las mutantes en la vía de señalización. La mutante *bts* en las distintas condiciones en la que fue analizada, presentó una resistencia en la interacción con la bacteria. Además, se observó que las plántulas Col-0 que provenían de medios con deficiencia de Fe y estuvieron en contacto con la bacteria en medios MS 0.2X no presentaron el mismo fenotipo que se mencionó anteriormente, lo que sugiere que la bacteria suministra el Fe que le hizo falta a la plántula desde su germinación (Fig. 17). La resistencia que se observó de la mutante sugiere que *BTS* regula negativamente la captación de Fe producido por la interacción con la bacteria. Por otro lado, al evaluar las mutantes *pye* e *ilr3-2* mostraron una hipersensibilidad al estar en contacto con la bacteria en las distintas condiciones en las que fue analizada (Fig. 18, 19). La hipersensibilidad presente en las mutantes sugiere que la toma de Fe inducida por la bacteria necesita de los factores de transcripción *bHLH* del subgrupo IV b (*PYE*) y c (*ILR3*) para regular esta interacción.

La toma de Fe que utiliza *Arabidopsis thaliana* es la Estrategia I, y debido al efecto que produce la planta sobre los elementos que regulan la señalización de Fe; fue de interés analizar el factor de transcripción FIT. Este regula la inducción de los transcritos de las proteínas involucradas en la Estrategia I. Por lo tanto además del análisis del factor de transcripción, se analizó la proteína que importa el Fe hacia el interior de la raíz (*IRT1*) (Römhel, 1987; Walker y Connolly, 2008). Ambas mutantes presentan un fenotipo de clorosis en el follaje en condición control. En condiciones de exceso de Fe el fenotipo de clorosis no se restablece. Sin embargo, al estar en contacto con la bacteria la cantidad de clorofila de las mutantes se aumenta hasta llegar a niveles de clorofila similares a Col-0 (Fig. 20).

Por lo tanto, la interacción con *P. putida* promueve la toma de Fe de manera independiente a los elementos canónicos en la Estrategia 1. Al teñir las plántulas con la técnica de Perls/DAB se observó una mayor cantidad de Fe en el tejido vegetal en las plántulas mutantes y silvestres cuando estuvieron en contacto con la bacteria (Fig. 21). Por último se realizó un análisis de expresión de la línea reportera *IRT1:GFP*, el cual se expresa en condiciones de deficiencia de Fe, las plántulas que estuvieron en contacto con la bacteria se observó una represión de la expresión del reportero (Fig. 22). Por lo tanto se sugiere que para este proceso pueden estar involucrados otros elementos en la vía para tomar el Fe del medio, además se sugiere que *IRT1* puede ser complementado con otras proteínas para internalizar el Fe como *NRAMP*, *YSL* y *ZIP* (Curie *et al.*, 2000; Thomine *et al.*, 2000).

Finalmente, es indispensable destacar que en este trabajo se demostró una vía molecular por la cual una bacteria promotora del crecimiento produce cambios en el desarrollo radicular de la plántula. En conjunto, los resultados generados demuestran que para que *P. putida* promueva el crecimiento de *A. thaliana* requiere elementos de la vía de señalización de Fe (BTS, PYE e ILR3), los cuales activan la captación del micronutriente a través de una vía independiente de FIT e *IRT1*. Además la interacción con la bacteria induce la expresión de *ALMT1*, lo que lleva a la solubilización de Pi y del Fe. Para poder captar el Pi se induce la expresión de las líneas reporteras constitutivas (*miR399* y *AtPT1*). Debido a la inducción de *ALMT1* se sugiere la formación del complejo malato-Fe que desencadena una deposición de callosa cerrando la comunicación vía plasmodesmo provocando la diferenciación del meristemo apical de la raíz. En la fig. 23 se muestra un modelo para explicar que señales moleculares regulan la modificación morfológica de la raíz.

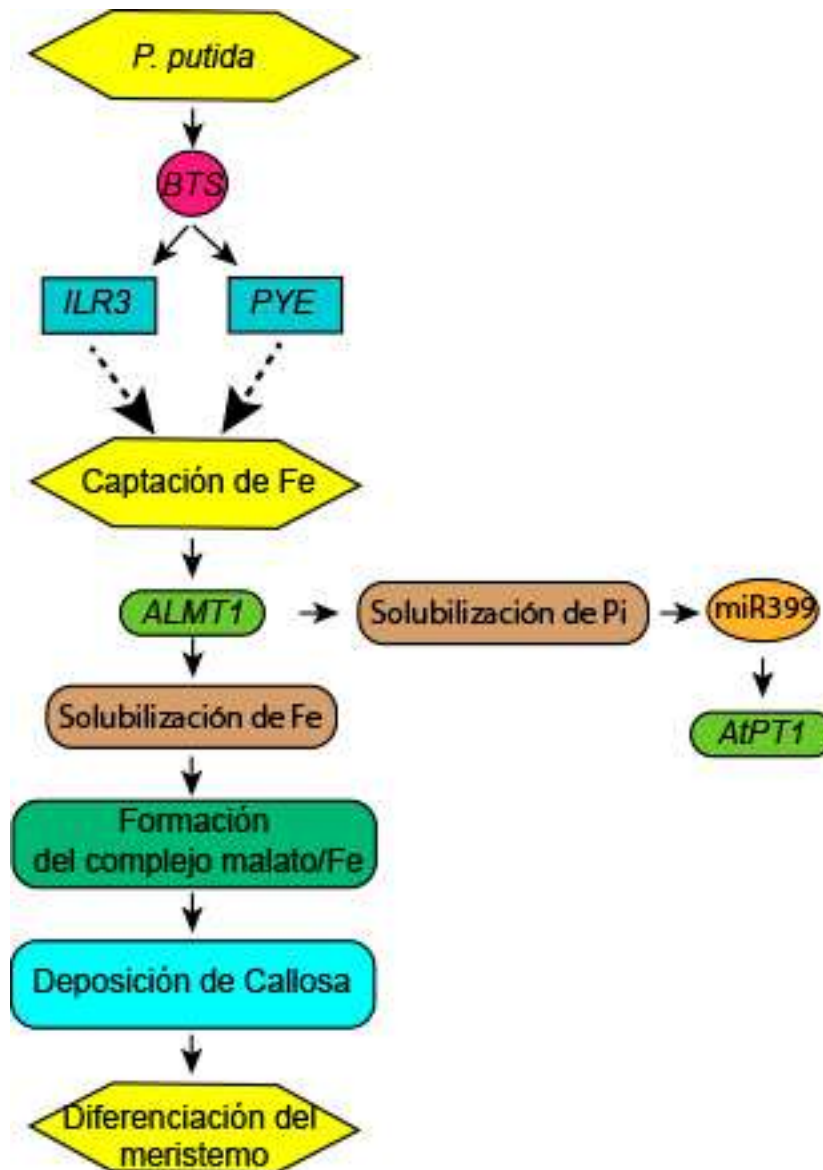


Figura 23. *P. putida* promueve el desarrollo radicular de *Arabidopsis thaliana* a través de la toma de Fe. En este modelo, *P. putida* regula la toma de Fe a través de la ubiquitin ligasa E3 (BTS), y a su vez este va a regular a los factores de transcripción PYE e ILR3. Una vez internalizado el Fe en la célula vegetal se involucra la función de la proteína transportadora que media la exudación de malato (ALMT1). El ácido málico promueve la solubilización del Pi y el Fe, este evento promueve la inducción del *miR399* permitiendo la expresión del transportador *AtPT1*. Además se sugiere que a través de la actividad de ALMT1 se forma el complejo malato-Fe desencadenando la deposición de callosa, este proceso provocará la diferenciación del meristemo.

9. REFERENCIAS

- Abel S. 2017.** Phosphate scouting by root tips. *Curr. Opin. Plant Biol.* 39: 168-177.
- Aguilar J.A., Zavala A.N., Diaz-Perez C., Cervantes C., Diaz-Perez A.L., Campos-Garcia J. 2006.** The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2070-2079
- Alassimone J., Roppolo D., Geldner N., Vermeer J.E. 2012.** The endodermis: development and differentiation of the plant's inner skin. *Protoplasma* 249: 433–443
- Alonso-Blanco C., Andrade J., Becker C., Bemm F., Bergelson J., Borgwardt K.M., Cao J., Chae E., Dezwaan T.M., Ding W., Ecker J.R. 2016.** 1135 genomes reveal the global pattern of polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 166: 481-491
- Arpat A.B., Magliano P., Wege S., Rouached H., Stefanovic A., Poirier Y. 2012.** Functional expression of *PHO1* to the Golgi and trans-Golgi network and its role in export of inorganic phosphate. *Plant J.* 71: 479–491
- Aung K., Lin S.I., Wu C.C., Huang Y.T., Su C.L., Chiou T.J. 2006.** *pho2*, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a microRNA399 target gene. *Plant Physiol.* 141: 1000-1011
- Balergue C., Dartevelle T., Godon C., Laugier E., Meisrimler C., Teulon J.M., Creff A., Bissler M., Brouchoud C., Hagege A., Müller J. 2017.** Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat. Comm.* 8: 15300
- Baek D., Kim M.C., Chun H.J., Kang S., Park H.C., Shin G., Park J., Shen M., Hong H., Kim W.Y., Kim D.H. 2013.** Regulation of miR399f transcription by *AtMYB2* affects phosphate starvation responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161: 362-373
- Bakker P.A.H.M., Raaijmakers J.M., Bloemberg G.V., Hofte M., Lemanceau P., Cooke M. 2007.** New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research. *Eur. J. Plant Path.* 119: 241–242

Balk J. Schaedler T.A. 2014. Iron cofactor assembly in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 65: 125–153

Barberon M. Geldner N. 2014. Radial transport of nutrients: the plant root as apolarized epithelium. *Plant Physiol.* 166: 528–537

Barberon M., Dubeaux G., Kolb C., Isono E., Zelazny E., Vert G. 2014. Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 8293-8298

Barea J.M., Pozo M.J., Azcón R., Azcón-Aguilar C. 2013. Microbial interactions in the rhizosphere. *Mol. Microbiol. Ecol. Rhiz.* 1: 29-44

Bayle V., Arrighi J.F., Creff A., Nespoulous C., Vialaret J., Rossignol M., González E., Paz-Ares J., Nussaume L. 2011. Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *Plant Cell.* 23:1523–1535

Beemster G.T.S.S., Fiorani F., Inzé D. 2003. Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant Sci.* 8: 154-158

Berardini T. Z., Leonore R., Donghui L., Mezheritsky Y., Muller R., Strait E., Huala E. 2015. The *Arabidopsis* information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *Genesis* 53:474-485

Berg G. Smalla K. 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Micro. Ecol.* 68: 1–13.

Bournier M., Tissot N., Mari S., Boucherez J., Lacombe E., Briat J.F., Gaymard, F. 2013. Arabidopsis ferritin 1 (*AtFer1*) gene regulation by the phosphate starvation response 1 (*AtPHR1*) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *J. Biol. Chem.* 288: 22670-22680

Briat J.F., Dubos C., Gaymard F. 2015. Iron nutrition, biomass production, and plant product quality. *Trends. Plant Sci.* 20: 33-40

Brumbarova T., Bauer P., Ivanov R. 2015. Molecular mechanisms governing *Arabidopsis* iron uptake. *Trends. Plant Sci.* 20: 124-133

Burck-Smith T. M. Zambryski P. C. 2012 Plasmodesmata paradigm shift: regulation from without versus within. *Ann. Rev. Plant Biol.* 63: 239-260

Bulgarelli D., Schlaeppi K., Spaepen S., van Themaat E.V.L., Schulze-Lefert P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 64: 807-838

Bustos R., Castrillo G., Linhares F., Puga M.I., Rubio V., Pérez-Pérez J., Solano R., Leyva A., Paz-Ares, J. 2010. A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *PLoS genetics*, 6: 1001102

Cakmak I. 2002. Plant nutrition research: priorities to meet human needs for food in sustainable ways. *Plant Soil.* 247: 3–24

Cardona-López X., Cuyas L., Marín E., Rajulu C., Irigoyen M.L., Gil E., Puga M.I., Bligny R., Nussaume L., Geldner N., Paz-Ares J. 2015. ESCRT-III-associated protein ALIX mediates high-affinity phosphate transporter trafficking to maintain phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 27: 2560-2581

Che J., Yamaji N., Ma J.F. 2018. Efficient and flexible uptake system for mineral elements in plants. *New Phytol.* 219: 513-517

Chen Y.F., Li L.Q., Xu Q., Kong Y.H., Wang H., Wu, W.H. 2009. The WRKY6 transcription factor modulates PHOSPHATE1 expression in response to low Pi stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 21: 3554-3566

Chen Z.H., Nimmo G.A., Jenkins G.I., Nimmo, H.G. 2007. BHLH32 modulates several biochemical and morphological processes that respond to Pi starvation in *Arabidopsis*. *Biochem. J.* 405: 191-198

Clarkson D.T. 1993. Roots and the delivery of solutes to the xylem. *Philos. Trans. Royal Society London. Series B: Biological Sciences* 341: 5–17

Colangelo E.P., Guerinot M.L. 2004. The essential basic helix-loop-helix protein FIT1 is required for the iron deficiency response. *Plant Cell.* 16: 3400-3412

Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T., Peter Doerner. 1999. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20: 503-508

Cornforth D.M., Popat R., McNally L., Gurney J., Scott-Phillips T.C., Ivens A., Diggle S.P., Brown S.P. 2014. Combinatorial quorum sensing allows bacteria to resolve their social and physical environment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 4280-4284

Couillerot O., Prigent-Combaret C., Caballero-Mellado J., Moëgne-Loccoz Y. 2009. *Pseudomonas fluorescens* and closely-related fluorescent pseudomonas as biocontrol agents of soil-borne phytopathogens. *Letter App. Micro.* 48, 505–512

Cruz-Ramírez A., Oropeza-Aburto A., Razo-Hernández F., Ramírez-Chávez E., Herrera-Estrella L. 2006. Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplasmidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in *Arabidopsis* roots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 6765-6770

Curie C., Alonso J.M., Le Jean M., Ecker J.R., Briat J.F. 2000. Involvement of NRAMP1 from *Arabidopsis thaliana* in iron transport. *Biochem. J.* 347: 749–755.

De Rybel B., Vassileva V., Parizot B., Demeulenaere M., Grunewald W., Audenaert D., Van Campenhout J., Overvoorde P., Jansen L., Vanneste S., Möller B. 2010. A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr. Biol.* 20: 1697–1706

Devaiah B.N., Karthikeyan A.S., Raghothama K.G. 2007. WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 143: 1789-1801

Desnos T. 2008. Root branching responses to phosphate and nitrate. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 82–87

Dixon R. y Kahn D. 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 621–631

Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B., 1993. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84

Drogue B., Doré H., Borland S., Wisniewski-Dyé F., Prigent-Combaret C. 2012. Which specificity in cooperation between phytostimulating rhizobacteria and plants?. *Res. Microbio.* 163: 500-510

Duijff B.J., Recorbet G., Bakker P.A.H.M., Loper J.E., Lemanceau P. 1999. Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of *Fusarium* wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology.* 89: 1073–1079

Egamberdiyeva D. 2007. The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appl. Soil Ecol.* 36: 184-189

Eide D., Broderius M., Fett J., Guerinot M.L. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 5624-5628

Fageria N.K., Baligar V.C., Jones C.A. 2011. Growth and Mineral Nutrition Of Field Crops. vol. xxi. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 560

Feldman L.J. 1994. "Themaizeroot,"in The Maize Handbook, eds M. Freeling and V.Walbo t(New York, NY: Springer),29–37

Franco-Zorrilla J.M., Valli A., Todesco M., Mateos I., Puga M.I., Rubio-Somoza I., Leyva A., Weigel D., García J.A., Paz-Ares J. 2007. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Gene.* 39:1033

Fitter A., Williamson I., Linkohr B., Leyser O. 2002. Root system architecture determines fitness in an Arabidopsis mutant in competition for immobile phosphate ions but not for nitrate ions. *Proc. Roy. Soc. Lon. SeriesB: Biol. Sci.* 269: 2017–2022

Fourcroy P., Sisó-Terraza P., Sudre D., Savirón M., Reyt G., Gaymard F., Abadía A., Abadía J., Álvarez-Fernández A., Briat, J.F. 2014. Involvement of the ABCG37 transporter in secretion of scopoletin and derivatives by Arabidopsis roots in response to iron deficiency. *New Phytol.* 201: 155-167

Geldner N. 2013. The endodermis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64: 531–5587

Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41: 109-117.

Glick B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169: 30–39

Glick B.R. 2015. Resource acquisition. In: Beneficial plant-bacterial interactions. Springer, New York: 29–63

Gu M., Chen A., Sun S., Xu G. 2016. Complex regulation of plant phosphate transporters and the gap between molecular mechanisms and practical application: what is missing? *Mol. Plant.* 9: 396-416

Guerinot M.L. y Yi Y. 1994. Iron: nutritious, noxious, and not readily available. *Plant Physiol.* 104: 815–820

Ham B.K., Chen J., Yan Y., Lucas W.J. 2018. Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Curr. Opin. Biotech.* 49: 1-9

- Hancock A.M., Brachi B., Faure N., Horton M.W., Jarymowycz L.B., Sperone F.G., Toomajian C., Roux F., Bergelson J. 2011.** Adaptation to climate across the *Arabidopsis thaliana* genome. *Science* 334, 83–86
- Hänsch R., Mendel R.R. 2009.** Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 259–266
- Holford I.C.R. 1997.** Soil phosphorus: its measurements and its uptake by plants. *Soil Research.* 35: 227–239
- Hoehenwarter W., Monchgesang S., Neumann S., Majovsky P., Abel S., Muller J. 2016.** Comparative expression profiling reveals a role of the root apoplast in local phosphate response. *BMC Plant Biol.* 16:106
- Hsieh L.C., Lin S.I., Shih A.C.C., Chen J.W., Lin W.Y., Tseng C.Y., Li W.H., Chiou T.J. 2009.** Uncovering small RNA-mediated responses to phosphate deficiency in *Arabidopsis* by deep sequencing. *Plant Physiol.* 151: 2120-2132
- Huang T.K., Han C.L., Lin S.I., Chen Y.J., Tsai Y.C., Chen Y.R., Chen J.W., Lin W.Y., Chen P.M., Liu T.Y., Chen, Y.S. 2013.** Identification of downstream components of ubiquitin-conjugating enzyme PHOSPHATE2 by quantitative membrane proteomics in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* 25: 4044-4060
- Ishikawa H., Evans M.L. 1995.** Specialized zones of development in roots. *Plant Physiol.* 109: 725 – 727
- Ivanov R., Brumbarova T., Bauer P. 2013.** Fitting into the harsh reality: regulation of iron-deficiency responses in dicotyledonous plants. *Mol. Plant.* 5: 27-42
- Jakoby M., Wang H.Y., Reidt W., Weisshaar B., Bauer P. 2004.** FRU (BHLH029) is required for induction of iron mobilization genes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters.* 577: 528-534
- Jing H. y Strader L.C. 2019.** Interplay of auxin and cytokinin in lateral root development. *Inter. J. Mol. Sci.* 20: 486.
- Jones D.L., Hodge A., Kuzyakov Y. 2004.** Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* 163: 459–480
- Karthikeyan S.A., Varadarajan D.K., Mukatira U.T., D’Urzo M.P., Damsz B., Raghothama K.G. 2002.** Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol.* 130: 221–233

Kobayashi T., Nagasaka S., Senoura T., Itai R.N., Nakanishi H., Nishizawa N.K. 2013. Iron-binding haemerythrin RING ubiquitin ligases regulate plant iron responses and accumulation. *Nat. Comm.* 4: 2792

Kobayashi T. y Nishizawa N.K. 2012. Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 63: 131-152.

Kobayashi T., Nozoye T., Nishizawa N.K. 2019. Iron transport and its regulation in plants. *Free Rad. Biol. Med.* 133: 11-20

Koornneef M., Meinke D., 2010.The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J.* 61: 909-921

Lambers H., Plaxton W.C. 2015. Phosphorus: back to the roots. *Ann. Plant Rev, Phos. Met. Plants.* 48:3–22

Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplaze L. 2013. Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.* 18: 450-458

Li X., Zhang H., Ai Q., Liang G., Yu D. 2016. Two bHLH transcription factors, *bHLH34* and *bHLH104*, regulate iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 170: 2478-2493

Liang G., Zhang H., Li X., Ai Q., Yu, D. 2017. bHLH transcription factor *bHLH115* regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Botany.* 68: 1743-1755

Lichtenthaler H.K., 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148: 350-382.

Liu F., Chang X.J., Ye Y., Xie W.B., Wu P., Lian X.M. 2011. Comprehensive sequence and whole-life-cycle expression profile analysis of the phosphate transporter gene family in rice. *Mol. Plant.* 4: 1105–1122

Liu J.H., Yang L., Luan M.D., Wang Y., Zhang C., Zhang B., Shi J.S., Zhao F.G., Lan W.Z., Luan S. 2015. A vacuolar phosphate transporter essential for phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112: E6571–E6578

Liu T.Y., Huang T.K., Tseng C.Y., Lai Y.S., Lin S.I., Lin W.Y., Chen J.W., Chiou, T.J. 2012. PHO2-dependent degradation of PHO1 modulates phosphate homeostasis in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24: 2168-2183

Lobreaux S., Massenet O., Briat J.F. 1992. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets. *Plant Mol. Biol.* 19: 563–5757

López-Arredondo D.L., Leyva-González M.A., González-Moraless S.I., López-Bucio J., Herrera-Estrella, L. 2014. Phosphate nutrition: improving low-phosphate tolerance in crops. *Ann. Rev. Plant Biol.* 65: 95–123.

López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Herrera-Estrella L. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 280–287

López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M.F., 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

Long T.A., Tsukagoshi H., Busch W., Lahner B., Salt D.E., Benfey P.N. 2010. The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in Arabidopsis roots. *Plant Cell.* 22: 2219-2236

Lugtenberg B.J. Kamilova F. 2009. Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 63: 541–556

Lundmark M., Kørner C.J., Nielsen T.H. 2010. Global analysis of microRNA in Arabidopsis in response to phosphate starvation as studied by locked nucleic acid-based microarrays. *Phys. Planta.* 140: 57-68

Lynch J. P., Brown K. M. 2001. Topsoil foraging – an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. *Plant and Soil.* 237: 225–237

Maathuis F.J.M. 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Curr. Opin. Plant Bio.* 12: 250–258.

Maathuis F.J.M., Diatloff E. 2013. Plant Mineral Nutrients: Methods and Protocols, *Meth. Mol. Biol.* 953: 1-20

Malamy J.E., Benfey P.N. 1997. Down and out in Arabidopsis: the formation of lateral roots. *Trends. Plant Sci.* 2: 390–396

Marschner H. 2011. Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic press.

Marschner H., Marschner P. 2012. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. vol. xv. Elsevier/Academic Press, London/Waltham. 89: 651

Masson-Boivin C., Giraud E., Perret X., Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* 17: 458-466

Miller S.H., Browne P., Prigent-Combaret C., Combes-Meynet E., Morrissey J.P., O'Gara F. 2010. Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environ. Microbiol. Rep.* 2: 403-411

Misson J., Thibaud M.C., Bechtold N., Raghothama K., Nussaume L. 2004. Transcriptional regulation and functional properties of *Arabidopsis* Pht1; 4, a high affinity transporter contributing greatly to phosphate uptake in phosphate deprived plants. *Plant Mol. Biol.* 55:727-41

Miura K., Rus A., Sharkhuu A., Yokoi S., Karthikeyan A.S., Raghothama K.G., Baek D., Koo Y.D., Jin J.B., Bressan R.A., Yun D.J. 2005. The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 7760-7765

Montejano-Ramírez V, Martínez-Cámara R, García-Pineda E, Valencia-Cantero E (2018) Rhizobacterium *Arthobacter agilis* UMCV2 increases organ-specific expression of *FRO* genes in conjunction with genes associated with the systemic resistance pathways of *Medicago truncatula*. *Physiol. Planta.* 40:138

Mora-Macias J., Ojeda-Rivera J.O., Gutierrez-Alanis D., Yong-Villalobos L., Oropeza-Aburto A., Raya-Gonzalez J., Jimenez- Dominguez G., Chavez-Calvillo G., Rellan-Alvarez R., Herrera-Estrella L. 2017. Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114: E3563-E3572

Morita S. y Nemoto K. 1995. Morphology and anatomy of rice roots with special reference to coordination in organo-and histogenesis. *Stru. Func. Roots.* 75-86.

Morris C.E., Sands D.C., Vinatzer B.A., Glaux C., Guilbaud C., Buffiere A., Yan S., Dominguez H., Thompson B.M. 2008. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle. *The ISME J.* 2: 321

Muchhal U.S., Pardo J.M., Raghothama K.G. 1996. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 10519–10523

Müller J., Toev T., Heisters M., Teller J., Moore K.L., Hause G., Dinesh D.C., Bürstenbinder K., Abel S. 2015. Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Devel. Cell.* 33: 216-230

Murashige T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497

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

Nagarajan V.K., Satheesh V., Poling M.D., Raghothama K.G., Jain, A. 2016. *Arabidopsis* MYB-related *HHO2* exerts a regulatory influence on a subset of root traits and genes governing phosphate homeostasis. *Plant Cell Physiol.* 57: 1142-1152

Nussaume L., Kanno S., Javot H., Marin E., Pochon N., Ayadi A., Nakanishi T.M., Thibaud, M.C. 2011. Phosphate import in plants: focus on the *PHT1* transporters. *Plant Sci.* 2:1–12

Olsen L.I., Palmgren M.G., 2014. Many rivers to cross: the journey of zinc from soil to seed. *Front. Plant Sci.* 5: 30

Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J. 2009. The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Sign. Behav* 4:701-712.

Palmer C.M., Hindt M.N., Schmidt H., Clemens S., Guerinot M.L. 2013. *MYB10* and *MYB72* are required for growth under iron-limiting conditions. *PLoS Genetics.* 9: 1003953

Park B.S., Seo J.S., Chua N.H. 2014. NITROGEN LIMITATION ADAPTATION recruits *PHOSPHATE2* to target the phosphate transporter *PT2* for degradation during the regulation of *Arabidopsis* phosphate homeostasis. *Plant Cell.* 26: 454-464

Pant B.D., Musialak-Lange M., Nuc P., May P., Buhtz A., Kehr J., Walther D., Scheible, W.R. 2009. Identification of nutrient-responsive *Arabidopsis* and rapeseed microRNAs by comprehensive real-time polymerase chain reaction profiling and small RNA sequencing. *Plant Physiol.* 150: 1541-1555

Petricka J. J., Winter C. M. y Benfey P. N. 2012 Control of *Arabidopsis* Root Development. *Ann. Rev. Plant Biol.* 63: 563-590

Phillipson B.A., Pimpl P., Pinto daSilva L.L., Crofts A.J., Taylor J.P., Movafeghi A., Robinson D.G., Denecke J. 2001. Secretory bulk flow of soluble proteins is efficient and COPII dependent. *Plant Cell.* 13:2005-20

Pilon-Smits E.A.H., Quinn C.F., Tapken W., Malagoli M., Schiavon M., 2009. Physiological functions of beneficial elements. *Cur. Opin. Plant Biol.* 12: 267–274

Puga M.I., Mateos I., Charukesi R., Wang Z., Franco-Zorrilla J.M., de Lorenzo L., Irigoyen M.L., Masiero S., Bustos R., Rodríguez J., Leyva A. 2014. SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of Phosphate Starvation Response 1 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 14947-52

Ramette A., Moëgne-Loccoz Y., Défago G. 2006. Genetic diversity and biocontrol potential of fluorescent pseudomonads producing phloroglucinols and hydrogen cyanide from Swiss soils naturally suppressive or conducive to *Thielaviopsis basicola*-mediated black root rot of tobacco. *FEMS Microbiol Ecol.* 55: 369–381

Rampey R. A., Woodward A. W., Hobbs B. N., Tierney M. P., Lahner B., Salt D. E., Bartel B. 2006. An *Arabidopsis* basic helix-loop-helix leucine zipper protein modulates metal homeostasis and auxin conjugate responsiveness. *Genetics.* 174: 1841-1857

Rengel Z. 2001. Genotypic differences in micronutrient use efficiency incrops. *Comm. Soil Sci. Plant Ana.* 32: 1163–1186

Rengel Z. y Marschner P. 2005. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytol.* 168: 305-312.

Robinson N.J., Procter C.M., Connolly E.L., Guerinot M.L. 1999. A ferricchelate reductase for iron uptake from soils. *Nature.* 397: 694-697

Rodríguez-Celma J., Lin W.D., Fu G.M., Abadía J., López-Millán A.F., Schmidt W., 2013. Mutually exclusive alterations in secondary metabolism are critical for the uptake of insoluble iron compounds by *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 162: 1473-1485

Rodriguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil.* 287: 15–21

Rokhzadi A., Asgharzadeh A., Darvish F., Nour-Mohammadi G., Majidi E. 2008. Influence of plant growth-promoting rhizobacteria on dry matter accumulation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field conditions. *American-Eurasian J. Agri. Envir. Sci.* 3: 253-257

Römheld V. 1987. Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol. Planta.*, 70: 231-234

Roschttardt H., Conéjéro G., Curie C., Mari S. 2009. Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiol.* 151: 1329-1338

Rubio V., Linhares F., Solano R., Martín A.C., Iglesias J., Leyva A. Paz-Ares J. 2001. A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* 15: 2122-2133

Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Wei H.X., Paré P.W., Kloepper J.W. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 4927–4932

Saharan B.S. Nehra V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: a critical review. *Life Sci Med Res.* 21: 30

Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B.K., Bhattacharjee S., Tribedi, P. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Envir. Sci. Poll. Res.* 23: 3984-3999

Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R., Laux T., 2007. Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature.* 446: 811-8147

Santi S. y Schmidt W. 2009. Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytol.* 183: 1072–1084

Selote D., Samira R., Matthiadis A., Gillikin J.W., Long T.A. 2015. Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Physiol.* 167: 273-286

Schachtman D.P., Reid R. J., Ayling S. M. 1998. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiol.* 116, 447–453

Schmid N.B., Giehl R.F., Döll S., Mock H.P., Strehmel N., Scheel D., Kong X., Hider R.C., von Wirén N. 2014. Feruloyl-CoA 6'-Hydroxylase1-dependent coumarins mediate iron acquisition from alkaline substrates in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 164: 160-172

Schulz A. 1995. Plasmodesmal widening accompanies the short-term increase in symplasmic phloem unloading in pea root-tips under osmotic stress. *Protoplasma* 188: 22–37

Stefanovic A., Arpat A.B., Bligny R., Gout E., Vidoudez C., Bensimon M., Poirier Y. 2011. Over-expression of *PHO1* in *Arabidopsis* leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *Plant J.* 66: 689–699

- Secco D., Wang C., Arpat B.A., Wang Z., Poirier Y., Tyerman S.D., Wu P., Shou H., Whelan J. 2012.** The emerging importance of the SPX domain-containing proteins in phosphate homeostasis. *New Phytol.* 193: 842-51
- Shen J., Yuan L., Zhang J., Li H., Bai Z., Chen X., Zhang W., Zhang F. 2011.** Phosphorus dynamics: from soil to plant. *Plant Physiol.* 156: 997-1005
- Somssich M., Khan G.A., Persson S. 2016.** Cell wall heterogeneity in root development of Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* 7: 1242.
- Su T., Xu Q., Zhang F.C., Chen Y., Li L.Q., Wu W.H., Chen Y.F. 2015.** *WRKY42* modulates phosphate homeostasis through regulating phosphate translocation and acquisition in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 167: 1579-1591
- Sunkar R. and Zhu, J.K. 2004.** Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *Plant Cell.* 16: 2001-2019
- Svistoonoff S., Creff A., Reymond M., Sigoillot-Claude C., Ricaud L., Blanchet A., Nussaume L., Desnos T. 2007.** Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat. Genetics* 39: 792–796
- Takano J., Tanaka M., Toyoda A., Miwa K., Kasai K., Fuji K., Onouchi H., Naito S., Fujiwara T. 2010.** Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107: 5220–5225
- Thomine S., Wang R., Ward J.M., Crawford N.M., Schroeder J.I. 2000.** Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in Arabidopsis with homology to Nramp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 4991–4996
- Thrin C S, Lee H, Lee W J, Lee S J, Chung N, Han J, Kim J, Hong S W, Lee H (2018)** Evaluation of the plant growth-promoting activity of *Pseudomonas nitroreducens* in *Arabidopsis thaliana* and *Lactuca sativa*. *Plant Cell Rep.* 37: 873-885
- Ticconi C.A. Abel S. 2004.** Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures. *Trends. Plant Sci.* 9: 548–555
- Ticconi C.A., Lucero R.D., Sakhonwasee S., Adamson A.W., Creff A., Nussaume L., Desnos T., Abel S. 2009.** ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106: 14174–14179
- Toloti Carneiro J. M., Chacón-Madrid K., Miranda B. C. Zezzi M. A. 2015** *Arabidopsis thaliana* and omics approaches a review. *J. Integ. Omics.* 5: 1-16

Urquiaga S., Xavier R.P., de Moraes R.F., Batista R.B., Schultz N., Leite J.M., e Sá J.M., Barbosa K.P., de Rsende A.D., Alves B.J.R., Boddey R.M. 2012. Evidence from field nitrogen balance and ¹⁵N natural abundance data for the contribution of biological N₂ fixation to Brazilian sugarcane varieties. *Plant Soil* 356: 5–21

Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M.L., Touraine B., Moeënne-Loccoz Y., Muller D., Legendre L., Wisniewski-Dye F., Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front. Plant Sci.* 356: 1-19

Van der Ent S., Verhagen B.W., Van Doorn R., Bakker D., Verlaan M.G., Pel M.J., Joosten R.G., Proveniers M.C., Van Loon L.C., Ton J., Pieterse C.M. 2008. MYB72 is required in early signaling steps of rhizobacteria-induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 146: 1293-1304

Venturi V. 2006. Regulation of quorum sensing in Pseudomonas. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 274-291

Verbelen J.P., de Cnodder T., Le J., Baluska F. 2006. The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities. *Plant Sig. Behav.* 1: 296-304

Vert G., Grotz N., Dédaldéchamp F., Gaymard F., Guerinot M.L., Briat J.F., Curie C. 2002. IRT1, an Arabidopsis transporter essential for iron uptake from the soil and for plant growth. *Plant Cell.* 14: 1223-1233

Vermeer J.E., Geldner N. 2015. Lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*: a force awakens. *F1000Prime Repots.* 7, 32

Vermeer J.E., vonWangenheim D., Barberon M., Lee Y., Stelzer E.H.K., Maizel A., Geldner N. 2014. A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in Arabidopsis. *Science.* 343: 178–183

von Wandruszka R. 2006. Phosphorus retention in calcareous soils and the effect of organic matter on its mobility. *Geoch. Trans.* 7: 1-6

Walker E.L. y Connolly E.L. 2008. Time to pump iron: iron-deficiency-signaling mechanisms of higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11: 530-535

Wang F., Deng M., Xu J., Zhu X., Mao C. 2018. Molecular mechanisms of phosphate transport and signaling in higher plants. *Sem. Cell Dev. Bio.* 74: 114-122

- Wang H., Xu Q., Kong Y.H., Chen Y., Duan J.Y., Wu W.H., Chen Y.F. 2014.** Arabidopsis WRKY45 transcription factor activates PHOSPHATE TRANSPORTER1; 1 expression in response to phosphate starvation. *Plant Physiol.* 164: 2020-2029
- Wang N., Cui Y., Liu Y., Fan H., Du J., Huang Z., Yuan Y., Wu H., Ling H.Q. 2013.** Requirement and functional redundancy of Ib subgroup bHLH proteins for iron deficiency responses and uptake in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant.* 6: 503-513
- Wang Y., Stass A., Horst W.J. 2004.** Apoplastic binding of aluminum is involved in silicon-induced amelioration of aluminum toxicity in maize. *Plant Physiol.* 136: 3762–3770
- Wang Z., Ruan W., Shi J., Zhang L., Xiang D., Yang C., Li C., Wu Z., Liu Y., Yu Y., Shou H. 2014.** Rice *SPX1* and *SPX2* inhibit phosphate starvation responses through interacting with *PHR2* in a phosphate-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:14953-8
- Ward J.T., Lahner B., Yakubova E., Salt D.E., Raghithama K. 2008.** The effect of iron on the primary root elongation of Arabidopsis during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* 147: 1181-119
- Wedepohl K.H. 1995.** The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 59: 1217–1232
- Wege S., Khan G.A., Jung J.Y., Vogiatzaki E., Pradervand S., Aller I., Meyer A.J., Poirier Y. 2015.** The EXS domain of PHO1 participates in the response of shoots to phosphate deficiency via a root-to-shoot signal. *Plant Physiol.* 170:385–400
- Wild R., Gerasimaite R., Jung J.Y., Truffault V., Pavlovic I., Schmidt A., Saiardi A., Jessen H.J., Poirier Y., Hothorn M., Mayer A. 2016.** Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science* 352:986-90
- Yang J., Kloepper J.W., Ryu C-M. 2009.** Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.* 14:1–4
- Yuan Y.X., Zhang J., Wang D.W., Ling H.Q. 2005.** *AtbHLH29* of *Arabidopsis thaliana* is a functional ortholog of tomato FER involved in controlling iron acquisition in strategy I plants. *Cell Res.* 15:613-621

Zamioudis C., Hanson J., Pieterse C.M. 2014. β -Glucosidase *BGLU42* is a MYB72-dependent key regulator of rhizobacteria-induced systemic resistance and modulates iron deficiency responses in Arabidopsis roots. *New Phytol.* 204: 368-379

Zavaliev R., Ueki S., Epel B.L., Citovsky V. 2011. Biology of callose (b-1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma.* 248: 117–130

Zhang F., Shen J., Zhang J., Zuo Y., Li L., Chen X. 2010. Rhizosphere processes and management for improving nutrient use efficiency and crop productivity: implications for China. *Adva. Agro.* 107: 1–32

Zhang J., Liu B., Li M., Feng D., Jin H., Wang P., Liu J., Xiong F., Wang J., Wang H.B. 2015. The bHLH transcription factor *bHLH104* interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in Arabidopsis. *Plant Cell.* 27: 787-805

Zhang Z., Liao H., Lucas W.J. 2014. Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *J. Inte. Plant Bio.* 56:192-220