



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD DE GENÓMICA AVANZADA

Evaluación de la sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* en *Arabidopsis thaliana*  
en el aprovechamiento de fósforo insoluble

Tesis que presenta

**L.B.T. Moisés Frausto Romo**

Para obtener el grado de

**Maestro en Ciencias**

En la especialidad de

**Biología de Plantas**

Director de Tesis

**Dr. Luis Herrera Estrella**

Irapuato, Guanajuato

Enero de 2019

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico otorgado para mis estudios de maestría mediante la beca 454,143.

Al CINVESTAV-IRAPUATO, por proporcionar los recursos materiales y humanos necesarios durante mi formación en el posgrado.

Al Dr. Luis Herrera Estrella, por permitirme formar parte de su equipo de investigación, por su apoyo, asesoría y su gran contribución a mi formación.

A los doctores Alfredo Cruz y José Ordaz, por formar parte de mi comité y por su asesoría en este proyecto.

Al M.C. Rogelio Nájera y al Dr. David Gómez, por su contribución invaluable en el desarrollo de los métodos de MALDI-MSI y UPLC-HRMS, y por su compañerismo.

A todos los compañeros del Laboratorio de Fisiología e Ingeniería Metabólica de Plantas: Ara, Félix, Lolis, Thelma, Javier Raya, Javier Mora, Hugo, Gerardo, Elohim, Lenin, Jonathan, Paco, Tania, Benjamín, Alan, las dos Karen, Lesli y Brenda.

A mis padres Abigail y Lauro, por todo. Este trabajo se lo dedico a ustedes.

A todos los buenos profesores que he tenido a lo largo de mi formación.

A mis amigos, especialmente a los más cercanos: Irving, Judith, Paola, Jonathan, Alan, Take y Marco.

A Mariana, la persona con más vida que he conocido.

A las buenas charlas, las buenas bebidas, la buena compañía, los buenos libros y la buena música.

# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT .....	3
I. INTRODUCCIÓN .....	5
1.1. El fósforo como componente fundamental de los seres vivos.....	5
1.2. El ciclo del fósforo y los <i>pools</i> de reserva en el suelo.....	5
1.3. Principales componentes de fósforo inorgánico en los suelos .....	9
1.4. Dependencia del uso de fertilizantes fosforados para la producción de alimento y la crisis del fósforo.....	11
1.4.1. Distribución y tamaño de las reservas mundiales de roca fosfato .....	11
1.4.2. Agotamiento de las reservas de roca fosfato y el pico de producción de fósforo.....	12
1.4.3. Acciones por tomar para asegurar la producción de alimento en relación con el fósforo .....	13
1.5. Efectos y respuestas de las plantas a la deficiencia de fósforo .....	14
1.5.1. Modificaciones de la arquitectura del sistema radicular en respuesta a la deficiencia de P .....	15
1.5.2. Respuestas fisiológicas, metabólicas y regulatorias a la deficiencia de P.....	18
1.6. Desarrollo de plantas mejoradas por ingeniería genética para aumentar la eficiencia del uso del P .....	20
1.7. <i>ALMT1</i> , <i>STOP1</i> y los ácidos orgánicos: su importancia en múltiples tipos de estrés .....	22
1.7.1. Los ácidos orgánicos y su interacción con aniones del suelo.....	22
1.7.2. Relevancia de <i>ALMT1</i> y <i>STOP1</i> en el desarrollo de las plantas bajo estrés .....	23
II. HIPÓTESIS .....	25
III. OBJETIVOS .....	25
3.1. Objetivo general.....	25
3.2. Objetivos particulares .....	25
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1. Material vegetal .....	26
4.2. Desinfección y vernalización de semillas .....	26
4.3. Cultivo <i>in vitro</i> .....	27
4.3.1. Limpieza de trazas de fósforo del gelificante.....	27
4.3.2. Sistema con agar como gelificante.....	29
4.3.3. Sistema con goma gellan (Phytigel) como gelificante.....	30
4.4. Cultivo en sustrato .....	30
4.4.1. Sistema en sustrato para propagación de semillas.....	31
4.4.2. Sistema en sustrato inorgánico inerte para evaluación de tratamientos de P.....	31

4.5. Generación de líneas sobreexpresantes homocigotas .....	32
4.6. Extracción de material genético .....	33
4.6.1. DNA plasmídico .....	34
4.6.2. DNA genómico .....	34
4.6.3. RNA total .....	34
4.7. qRT-PCR .....	35
4.8. Cuantificación de protones exudados por la raíz .....	35
4.9. Cuantificación de ácidos orgánicos exudados por la raíz .....	36
4.10. Localización espacial de citrato y malato en exudado y ápice de raíz .....	36
4.11. Obtención y análisis de datos .....	37
V. RESULTADOS .....	38
5.1. Validación de los sistemas de cultivo .....	38
5.1.1. Validación del sistema <i>in vitro</i> .....	38
5.1.2. Validación del sistema de hidroponía en sustrato .....	40
5.2. Asociación entre variables descriptivas y variables de productividad .....	44
5.3. Selección de líneas sobreexpresantes de <i>ALMT1</i> y <i>STOP1</i> .....	45
5.4. Visualización y cuantificación de la exudación de ácidos orgánicos y H <sup>+</sup> por la raíz .....	46
5.5. Evaluación de la productividad de plantas sobreexpresantes de <i>ALMT1</i> y <i>STOP1</i> en medios con P poco biodisponible .....	51
5.5.1. Evaluación de la productividad <i>in vitro</i> .....	51
5.5.2. Evaluación de la productividad en hidroponía en sustrato .....	53
5.6. Evaluación de la tolerancia a toxicidad por Al <sup>3+</sup> y H <sup>+</sup> de las líneas sobreexpresantes .....	55
VI. DISCUSIÓN .....	56
6.1. La sobreexpresión de <i>ALMT1</i> y <i>STOP1</i> promueve el aumento en la tasa de exudación de ácidos orgánicos, pero no de H <sup>+</sup> , bajo deficiencia de P .....	56
6.2. La sobreexpresión de <i>ALMT1</i> y <i>STOP1</i> incrementa la productividad en condiciones <i>in vitro</i> , pero no en invernadero .....	59
6.3. La sobreexpresión de <i>STOP1</i> en <i>Arabidopsis</i> no aumenta la tolerancia a Al <sup>3+</sup> .....	62
6.4. Relevancia de la exudación de ácidos orgánicos en la deficiencia de P en <i>Arabidopsis</i> .....	63
VII. CONCLUSIONES .....	66
VIII. PERSPECTIVAS .....	67
IX. BIBLIOGRAFÍA .....	68
X. ANEXOS .....	76

## RESUMEN

Más de la mitad de los suelos agrícolas son deficientes en fósforo (P) biodisponible, haciendo necesaria la aplicación de fertilizantes. Sin embargo, el fósforo de los fertilizantes se fija rápidamente a la matriz del suelo o precipita al reaccionar con cationes, creando depósitos nutritivos de baja disponibilidad para los cultivos. Las plantas han desarrollado múltiples estrategias para el minado de P inorgánico, por ejemplo: [1] la modificación de la arquitectura radicular y [2] la exudación de ácidos orgánicos de bajo peso molecular hacia la rizosfera, principalmente malato y citrato. Recientemente se reportó la importancia del transportador de malato ALMT1 (ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1) y su principal regulador positivo transcripcional STOP1 (SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1) en el proceso de agotamiento del meristemo del ápice radicular de *Arabidopsis thaliana* bajo deficiencia de P. STOP1 es un factor de transcripción que, además de *ALMT1*, regula positivamente la expresión de *MATE* (*MULTI-DRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION*), un gen que codifica para un transportador de citrato. El objetivo de este trabajo fue evaluar las variables morfológicas, genéticas, fisiológicas y de rendimiento de líneas de *A. thaliana* sobreexpresantes de *STOP1* y *ALMT1* con las de sus contrapartes silvestre y mutante en sistemas *in vitro* y de hidroponía en sustrato, utilizando como fuente de fósforo a compuestos insolubles representativos de suelos ácidos y neutros/alcalinos. Se seleccionaron tres líneas sobreexpresantes por gen, con niveles de expresión de *ALMT1* de 2-20 veces mayores que el de plantas silvestres bajo deficiencia de P. Dos de las tres líneas sobreexpresantes de cada gen mostraron un incremento del 53-128% y de 40-85% en la exudación de malato y citrato con respecto a plantas silvestres bajo deficiencia de P, respectivamente. Además, mediante dos metodologías independientes (UPLC-HRMS [*Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry*] y MALDI-MSI [*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Imaging*]) se probó que las plantas transformadas responden a la deficiencia de P incrementando las tasas de exudación de ácidos orgánicos, mientras que las de las plantas silvestres se mantienen sin cambios. Dos líneas sobreexpresantes de *STOP1* y una de *ALMT1* mostraron un incremento estadísticamente significativo de 24-46% en la generación de área foliar en los tratamientos de hidroxapatita y fosfato tricálcico con respecto a controles en los experimentos *in vitro*. El incremento en la generación de área foliar se relaciona en todos los casos con un mayor desarrollo radicular en términos de longitud total del sistema radicular (aumento del 25-38%), pero

no con las tasas de exudación de ácidos orgánicos. Estos resultados sugieren que el aumento en el desempeño de las plantas con modificaciones genéticas dirigidas a aumentar la exudación de carboxilatos se explica principalmente por un efecto de los ácidos orgánicos en un mayor desarrollo radicular y no por un efecto directo de la exudación de ácidos orgánicos para aumentar la solubilización de compuestos recalcitrantes de P. No se encontraron diferencias en el área foliar bajo los tratamientos de fosfato de Al y Fe. En los experimentos de hidroponía en sustrato con hidroxiapatita o fosfato de Al como única fuente de P, no se encontraron diferencias en área foliar, tiempo de floración ni semilla producida en ninguna de las líneas sobreexpresantes con respecto a las plantas silvestres. Estos resultados, junto con experimentos *in vitro* adicionales utilizando bajos niveles de sacarosa, sugieren que las posibles ventajas dadas por la sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* se limitan a sales de P medianamente recalcitrantes. Es necesario continuar con la evaluación de un mayor número de líneas sobreexpresantes y bajo un mayor número de tratamientos de sales de P con distinta solubilidad. Se espera que los descubrimientos hechos y las metodologías desarrolladas en este trabajo aporten a la caracterización de los mayores componentes fenotípicos que contribuyen al aumento de productividad de plantas con modificaciones genéticas dirigidas a la exudación de carboxilatos en deficiencia de P. Esto con objeto de diseñar variedades de plantas superiores en la eficiencia del uso de P que tengan un impacto significativo en campo en términos de rendimientos y disminución del uso de fertilizantes.

## ABSTRACT

Over 50% of agricultural soils have deficiency of bioavailable phosphorus (P), making fertilizer application necessary to sustain yield. However, P in fertilizers is rapidly fixed in the soil matrix or reacts with cations forming precipitates, creating rich P deposits with low availability for crop uptake. Plants have developed manifold strategies for P scavenging, remarkably the modification of the root architecture and the exudation to the rhizosphere of low molecular weight organic acids, mainly malate and citrate. Recently, the importance of the malate transporter *ALMT1* (ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1) and its positive transcriptional regulator *STOP1* (SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1) in the meristematic exhaustion of the *Arabidopsis thaliana* root tip under P deficiency was reported. *STOP1* is a transcription factor which in addition to *ALMT1* also positively regulates *MATE* (MULTI-DRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION), a gene encoding a citrate transporter. The aim of my work was to evaluate, under *in vitro* and hydroponic systems, the morphologic, genetic, physiological and yield variables of *ALMT1* and *STOP1* overexpressing *A. thaliana* lines regarding those of wild type (WT) and mutants plants using insoluble P compounds characteristics of acids and neutral/alkaline soils. Two of the three overexpressing lines of each gene shown a 53-128% and 40-85% increase in malate and citrate exudation as compared to WT plants, respectively. Furthermore, through two independents methodologies (UPLC-HRMS [Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to High-Resolution Mass Spectrometry] and MALDI-MSI [Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Imaging]) it was proven that transformed plants respond to P deficiency by increasing its organic acids exudation rates, while those of WT plants remain unchanged. Two *STOP1* and one of *ALMT1* overexpressing lines showed a statistically significant increase in leaf area generation of 24-46% under hydroxyapatite and tricalcium phosphate treatments in comparison with WT plants in *in vitro* experiments. In all cases, the increase in leaf area generation relates to enhanced root systems in terms of total root length (25-38% increase), but no with the organic acids exudation rates. These results suggest that the higher performance showed by the genetically modified plants aimed to increase carboxylates exudation is mainly explained by an effect of excreted organic acids on the root systems and not by a direct effect of organic acid exudation on the scavenging of insoluble forms of Pi. No differences were found in leaf area under the Al and Fe phosphate treatments. In the hydroponics experiments using hydroxyapatite or Al phosphate as an only P source, no differences were found in leaf area, flowering time or seed production in any of the overexpressing lines with respect to WT plants.

Along with additional low sucrose *in vitro* experiments, these results suggest that the possible advantages given by the overexpression of *ALMT1* and *STOP1* are limited to moderately recalcitrant P salts. It is necessary to continue the evaluation with a greater number of overexpressing lines and using a greater number of P salts treatments with different solubility. It is expected that both experimental findings and the methodologies developed in this work support the characterization of the mayor phenotypic components that promote the increase in productivity of genetically modified plants aimed to increase carboxylates exudation under P deficiency. This with regard to the future improvement of crops with an enhanced P uptake efficiency that has a significant impact in the field in terms of yield and fertilizer use reduction.



# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1. El fósforo como componente fundamental de los seres vivos

Pese a componer una discreta fracción de la corteza terrestre, el fósforo (P), por sus características químicas, es uno de los elementos sobre el cual se fundamentan todos los sistemas biológicos conocidos (Filippelli, 2008). En las plantas, los nutrientes esenciales son clasificados en dos grupos dependiendo de la cantidad requerida para su completar su ciclo de vida. Los macronutrientes constituyen normalmente >0.1% en peso seco de la planta, mientras que los micronutrientes <0.05% (Hossner, 2008). La concentración de P en la biomasa de las plantas es usualmente de 1-5 g kg<sup>-1</sup> en peso seco (Bünemann & Condrón, 2007). El P es un macronutriente que tiene importancia como: [1] constituyente de macromoléculas (e.g. membranas biológicas y ácidos nucleicos), [2] en la transferencia de energía (i.e. los ésteres de fosfato y otros enlaces fosfato de alta energía representan la energía metabólica celular), [3] en la regulación de reacciones enzimáticas y procesos metabólicos (e.g. enzimas reguladas por fosforilación) y [4] como agente de tolerancia a cationes (i.e. la gran afinidad del ácido fítico por el Zn, Fe y otros metales pesados lleva a la formación de complejos con importancia en la detoxificación en las raíces y en el llenado de la semilla) [Hawkesford *et al.*, 2012]. Pese a lo esencial del P, su biodisponibilidad para las plantas en la corteza terrestre es, en general, bastante baja.

## 1.2. El ciclo del fósforo y los *pools* de reserva en el suelo

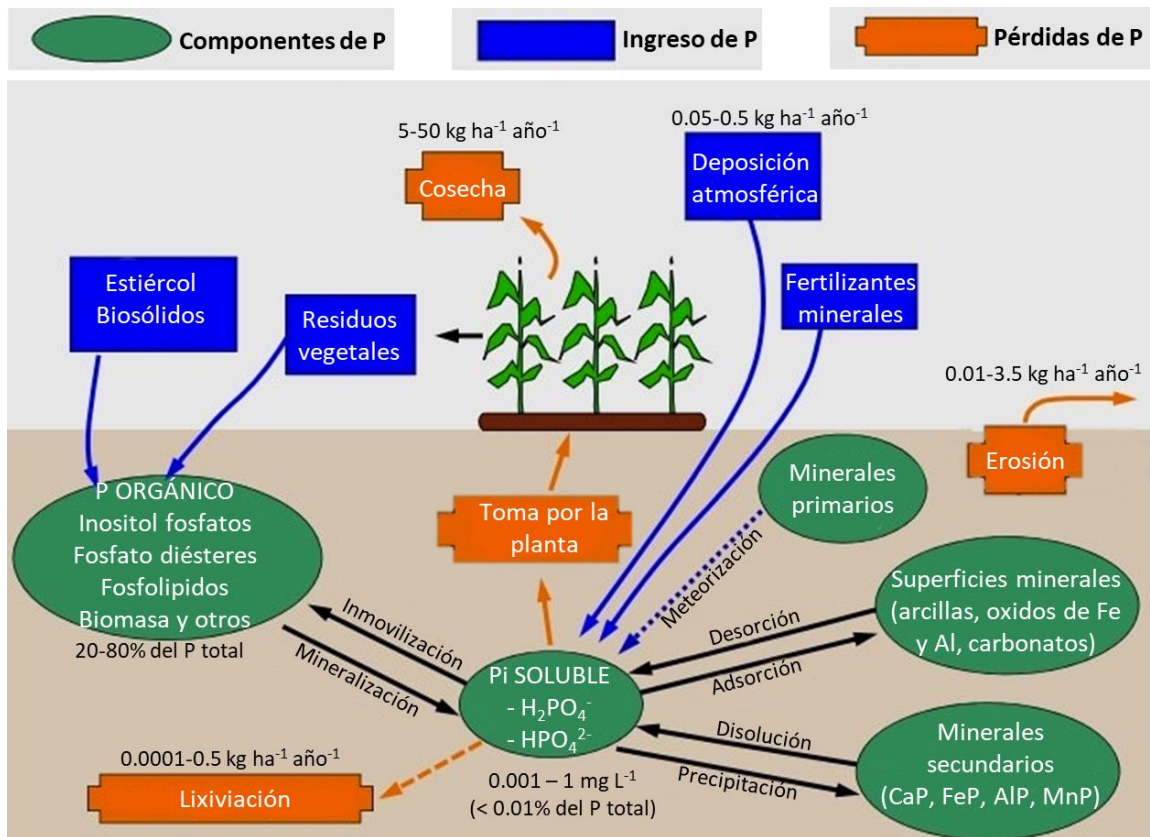
Los mayores reservorios de P se encuentran en los océanos y la litosfera, mientras que la fase gaseosa de P, el fosfano (PH<sub>3</sub>), es despreciable (Bünemann & Condrón, 2007; Schlesinger *et al.*, 2013). El ciclo global del P tiene cuatro componentes principales: [1] el levantamiento tectónico y exposición de las rocas portadoras de P a las fuerzas de meteorización; [2] erosión física y meteorización química de las rocas, produciendo suelos y proveyendo de P soluble y particulado a los ríos; [3] transporte fluvial de P a lagos y océanos; y [4] sedimentación del P e incorporación a los componentes sedimentarios (Ruttenberg, 2003; Schlesinger *et al.*, 2013).

Debido a que la escala de tiempo a las que operan las fuerzas tectónicas que actúan en el ciclo global del P, al igual que en el del carbono, ocurren en periodos de cientos de millones de años (Cordell *et al.*, 2009; Filippelli, 2008; Ruttenberg, 2003), en sentido antropocéntrico, es válido simplificar el ciclo

de fósforo al de los sistemas agrícolas (Figura 1). El impacto de la agricultura en el ciclo del P no es menor, simplemente basta considerar que más del 10% del área de la superficie total de planeta se destina a la producción agrícola (von Uexküll & Mutert, 1995). Lo primero que debe constatar en el ciclo de P así definido es que este es un ciclo abierto, es decir, que existen entradas y salidas significativas de P que no corresponden necesariamente al ciclaje del elemento dentro del sistema.

En relación a los componentes de P en los suelos (Figura 1), este se encuentra casi en su totalidad en su estado oxidado como ortofosfato, donde la fase mineral, el P inorgánico (Pi), está compuesta por minerales primarios y secundarios, principalmente fosfatos de calcio, hierro y aluminio (Bünemann & Condron, 2007; Hemwall, 1957). En cuanto a la fase orgánica, pese a que el conocimiento de su naturaleza en el suelo es limitada, se sabe que son comunes tres grandes grupos: [1] inositol fosfato (10-60%), siendo uno de los compuestos más comunes el fitato; [2] fosfato diésteres (1-2%), tal como los ácidos nucleicos; y [3] fosfolípidos (1-2%) (Brady & Weil, 2016). El resto de la proporción de P orgánico está constituida por una fase compleja de especies químicas pobremente identificadas. En suma, la concentración total de P en el suelo a nivel mundial se encuentra generalmente entre 1,000 – 5,000 kg ha<sup>-1</sup> en los primeros 50 cm de suelo, en donde la proporción entre P orgánico e inorgánico varía significativamente dependiendo del tipo de suelo (Yang *et al.*, 2013).

Las plantas no pueden obtener directamente P desde los componentes orgánicos o complejos minerales del suelo, sino únicamente como aniones de ortofosfato (Pi soluble), principalmente como H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> y en menor grado como HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Kirkby & Johnston, 2008). El motivo de que estas formas aniónicas sean las disponibles para la nutrición vegetal, y no el PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> o el mismo ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), se debe a que prácticamente son las únicas especies inorgánicas solubles existentes en el equilibrio de estas especies químicas dentro del rango de pH 4-10 (Lynn & Bonfield, 2005). Debido a la alta densidad de carga negativa del fosfato, este reacciona rápidamente con cationes y superficies cargadas de la matriz del suelo, limitando su biodisponibilidad. El fosfato en la fracción soluble del suelo comprende menos del 0.01% del P total, correspondiente a concentraciones de 0.001-1 mg L<sup>-1</sup> (0.031-31 μM) para suelos de muy infértiles a altamente fertilizados, respectivamente (Brady & Weil, 2016).



**Figura 1. El ciclo del P en un sistema agrícola.** A diferencia del ciclo global del P, en este esquema solo se ilustran los componentes y procesos que tienen relevancia en el sistema agrícola para producción de alimento. Estos procesos pueden clasificarse en ingresos de P, pérdidas de P y componentes de P en el suelo. Más detalles en el texto. Figura modificada de Wikipedia [[https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphorus\\_cycle](https://en.wikipedia.org/wiki/Phosphorus_cycle)] con datos de Brady & Weil (2016); Bünemann & Condon (2007); Kirkby & Johnston (2008); y Tiessen (2008).

Las plantas absorben y concentran el P de cerca de  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  en la solución del suelo a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  en la savia del xilema ( $1-10 \text{ mM}$  de Pi citosólico en plantas en suficiencia de P), y aproximadamente a  $4,000 \text{ mg kg}^{-1}$  en la semilla (Tiessen, 2008; Versaw & Garcia, 2017). Es evidente que el Pi debe ser remplazado constantemente en la solución del suelo, es decir, el suelo debe tener acción amortiguadora para mantener el Pi soluble en una concentración relativamente constante. Esto lleva al concepto ampliamente aceptado de la existencia de componentes de abastecimiento (*pools*) de Pi en el suelo que están en equilibrio entre sí, permitiendo la transferencia de P entre los distintos componentes (Kirkby & Johnston, 2008). El primer *pool* consiste en Pi soluble disponible directamente para la planta. El segundo *pool* se compone por Pi unido débilmente por adsorción a las superficies de los componentes del suelo, encontrándose en rápido equilibrio con el Pi soluble. El tercer *pool* está compuesto por Pi unido con mayor fuerza a los componentes del suelo, formando enlaces químicos, o como Pi adsorbido en superficies internas y, por tanto, poco disponible. El

cuarto pool se compone de los minerales primarios, principalmente apatitas;  $P_i$  precipitado en fuentes muy poco solubles,  $P_i$  formando parte integral de minerales como minerales secundarios, y  $P_i$  espacialmente inaccesible por encapsulación, también llamado P ocluido. Este último *pool* comúnmente libera fósforo en cantidades significativas solo en periodos de varios años. La relación entre los componentes del P en el suelo y la acción buffer con respecto al  $P_i$  soluble se ilustra mediante flechas en la Figura 1. Adicionalmente debe considerarse que los *pools* no suelen encontrarse homogéneamente distribuidos, sino en forma heterogénea formando parches. Estos parches nutritivos pueden ser orgánicos o inorgánicos, temporales (i.e. que dependan de la humedad para ser disponibles) y variar en tamaño, duración, forma y concentración de nutrientes (Hodge, 2004). Además debe considerarse la capacidad de fijación de P de los suelos, la cual depende principalmente de tres factores: [1] la cantidad y tipo de arcilla, [2] el pH, y [3] la proporción de materia orgánica (Brady & Weil, 2016). Esto explica porque en algunos agroecosistemas de alta fijación de  $P_i$  es necesario adicionar una gran cantidad de fertilizantes fosforados para que saturen una considerable proporción de los sitios de unión a P, y de esta manera aumentar la concentración de  $P_i$  soluble que permita obtener rendimientos aceptables. En suma, los conceptos de pools y parches nutritivos ilustran el panorama general de la naturaleza y distribución del P en los suelos.

Entre las causas de pérdidas de P del sistema (Figura 1), las dadas por erosión se consideran las de mayor importancia. La erosión se da principalmente por corrientes de agua después de lluvias intensas o riego excesivo, o por ventarrones cuando el suelo está expuesto en su superficie, comúnmente después de cosechar. Este P se pierde como fósforo particulado, y cuando llega a los cuerpos de agua ocasiona serios problemas de eutrofización. Otro factor importante en la pérdida de P del sistema es el debido a la cosecha, cuya magnitud depende del cultivo en cuestión en cada ciclo. Debido a la alta reactividad del  $P_i$  soluble, las pérdidas de P por lixiviación suelen considerarse de bajo impacto, sin embargo hay reportes que subrayan su importancia significativa en la eutrofización de cuerpos de agua (Anderson & Magdoff, 2005; Fortune *et al.*, 2005). Dentro de las entradas de P en el sistema (Figura 1), la fracción orgánica está dadas por el reingreso de los residuos vegetales después de la cosecha, estiércol en forma de abonos y otros biosólidos. El ingreso de  $P_i$  esta dado casi completamente por fertilizantes minerales (Cordell *et al.*, 2009), siendo la contribución atmosférica poco relevante en los sistemas agrícolas, aunque cobra importancia crucial en ecosistemas naturales, especialmente en regiones como en el amazonas, donde la deficiencia de P es pronunciada (Yu *et al.*, 2015). Por tanto, en los sistemas agrícolas con alto grado de fertilización mineral, las especies de  $P_i$  suelen dominar en el suelo.

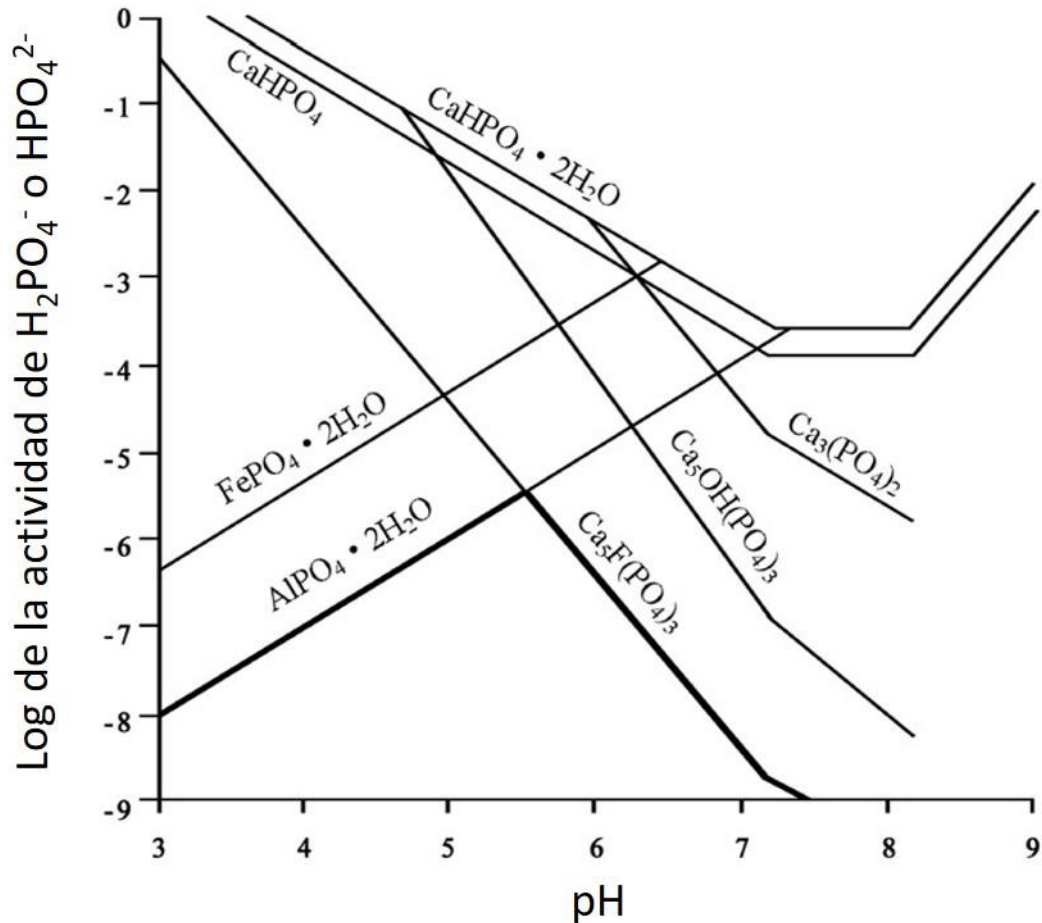
### 1.3. Principales componentes de fósforo inorgánico en los suelos

La mayoría de los compuestos inorgánicos de P se agrupan en dos categorías (Tabla 1): [1] fosfatos de calcio, característicos de suelos neutros/alcalinos y [2] fosfatos de hierro y aluminio (y en menor grado de manganeso), característicos de suelos ácidos (Brady & Weil, 2016; Hemwall, 1957). Cada grupo de compuestos es estable e insoluble a los pH donde son prevalentes, haciéndose inestables y solubles cuando el pH tiende hacia los valores opuestos (Figura 2). Según la Asociación Internacional de la Industria de Fertilizantes (IFA: [www.fertilizer.org](http://www.fertilizer.org)), el fertilizante mineral fosforado más consumido a nivel mundial, con el 50% del mercado, es el fosfato de diamonio. Otros fertilizantes comunes de P son el superfosfato simple y triple, fosfato monoamónico, roca fosfato pulverizada y otros fertilizantes que contienen nitrógeno y/o potasio. Debido a las características de fijación de  $P_i$  en el suelo, los fertilizantes de  $P_i$  tienen una muy baja persistencia en el suelo, reaccionando rápidamente para formar compuestos cristalinos, precipitados coloidales o siendo adsorbidos por las arcillas (Lindsay *et al.*, 1962).

**Tabla 1. Compuestos inorgánicos de fósforo importantes en suelo**

Compuesto	Fórmula
Compuestos de hierro y aluminio	
Strengita	$FePO_4 \cdot 2H_2O$
Variscita	$AlPO_4 \cdot 2H_2O$
Compuestos de calcio	
Fluorapatita	$[3Ca_3(PO_4)_2] \cdot CaF_2$
Carbonato apatita	$[3Ca_3(PO_4)_2] \cdot CaCO_3$
Hidroxiapatita	$[3Ca_3(PO_4)_2] \cdot Ca(OH)_2$
Oxiapatita	$[3Ca_3(PO_4)_2] \cdot CaO$
Fosfato tricálcico	$Ca_3(PO_4)_2$
Fosfato octacálcico	$Ca_8H_2(PO_4)_6 \cdot 5H_2O$
Fosfato dicálcico	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$
Fosfato monocálcico	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$
Compuestos de magnesio	
Estruvita	$NH_4MgPO_4 \cdot 6H_2O$

En cada grupo, los compuestos están listados en orden creciente de solubilidad.  
Tabla adaptada de Brady & Weil (2016).



**Figura 2. La fijación de fósforo en el suelo depende del pH.** El fósforo adicionado en el suelo en forma de fertilizante es inestable y reacciona rápidamente para formar complejos insolubles cuya naturaleza depende en gran medida de pH. La línea gruesa indica el límite mínimo de la solubilidad del Pi dado un determinado pH. Figura modificada de Liu et. al., 2008.

Con respecto al pH de máxima disponibilidad de Pi para la planta, definiendo en este contexto a la disponibilidad como el cambio en el Pi soluble en función del pH (suministro por parte del suelo) en conjunto con la toma del elemento por las raíces de la planta, se dice comúnmente que este se sitúa en un rango aproximado de 6.0 – 7.0 unidades (Brady & Weil, 2016; Price, 2006). Dentro de este rango supuestamente se localiza un pico de máxima disponibilidad de Pi, el cual se localiza entre los picos de máxima fijación de compuestos con Al y Fe a pH ácido y de Ca a pH alcalino. Recientemente este rango de pH de “alta” disponibilidad se ha puesto en duda, etiquetándose de falta de evidencia y sin poder de predicción, siendo el rango real de máxima disponibilidad de Pi más bajo del comúnmente reportado (Barrow, 2017), posiblemente cerca de 5.5, tal como se ilustra el pico de la línea gruesa en la Figura 2.

## **1.4. Dependencia del uso de fertilizantes fosforados para la producción de alimento y la crisis del fósforo**

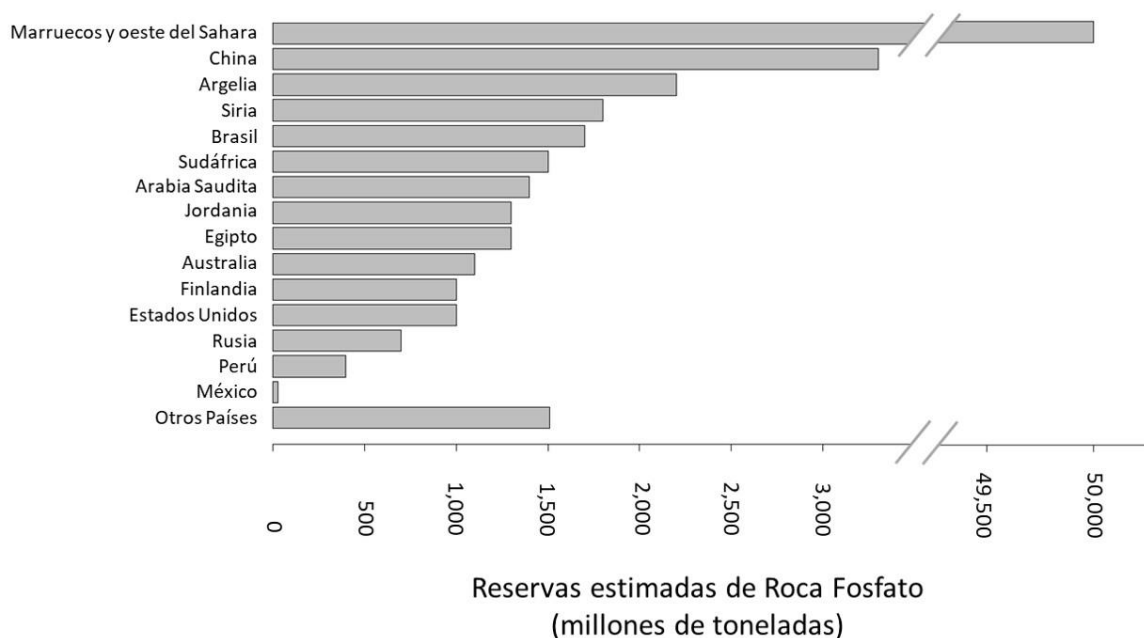
Se estima que cerca del 50% de la tierra cultivada presenta algún grado de deficiencia de P (Lynch, 2011). Históricamente, en la agricultura se ha procurado la adición de fertilizantes para aumentar la producción, utilizándose inicialmente como materia prima solamente estiércol y otros tipos de materia orgánica, y la roca fosfato y el guano hasta casi iniciado el siglo XIX. No fue hasta mediados del siglo pasado, en el auge de la revolución verde, que la roca fosfato se convirtió por mucho en la principal materia prima de fertilizantes (Cordell *et al.*, 2009). Es un hecho que, bajo el esquema de producción actual de alimentos dado por la revolución verde, es indispensable la roca fosfato para la producción de fertilizantes fosforados y mantenimiento de los rendimientos actuales. Bajo este panorama, las preguntas que surgen son: [1] ¿En dónde se encuentran y qué tan grandes son las reservas de roca fosfato?, [2] ¿Para cuánto tiempo se proyecta que nos abastecerán estas reservas?, y [3] ¿Existen alternativas para continuar a largo plazo la producción de fertilizantes fosforados en las cantidades necesarias?

### **1.4.1. Distribución y tamaño de las reservas mundiales de roca fosfato**

Primero debe definirse a que hace referencia la palabra “reserva”, esto en el contexto de que no existe un sistema mundial aceptado para clasificar a las reservas de roca fosfato. El Servicio Geológico de los Estados Unidos (USGS, [www.usgs.gov](http://www.usgs.gov)), probablemente la referencia más importante con respecto a las estimaciones mundiales de roca fosfato, define una reserva como “la porción del recurso identificado a partir del cual un producto mineral o energético puede ser extraído de manera económicamente viable y legal al momento de la determinación”. De la misma manera, la USGS define recurso como “una concentración natural de un material sólido, líquido o gaseoso dentro o sobre la corteza terrestre en tal forma que la extracción en términos económicos de un producto es considerada viable, ya sea actualmente o en un tiempo futuro”.

El recurso de roca fosfato comprende más de 300 mil millones de toneladas, de las cuales 70 mil millones corresponden a reservas (United States Geological Survey, 2018). La roca fosfato minada es utilizada principalmente para la producción de fertilizantes, hasta un 95% en Estados Unidos (United States Geological Survey, 2018). La distribución es bastante localizada, teniéndose más del 70% de la reserva mundial en Marruecos y el oeste del Sahara y el 95% en solo 12 países (Figura 3). México cuenta con una reserva de 30 millones de toneladas de roca fosfato. Debido a la distribución

tan localizada de las reservas de roca fosfato, la oferta mundial de este recurso puede restringirse gravemente por las políticas internas de los países poseedores de las mayores reservas, lo que potencialmente ocasionaría una crisis alimentaria global, especialmente en los países en desarrollo (Cooper *et al.*, 2011; Elser & Bennett, 2011; Obersteiner *et al.*, 2013).



**Figura 3. Reservas y distribución por país de roca fosfato.** Los países se muestran listados en orden de abundancia de sus reservas de roca fosfato. Las reservas de México (30 millones de toneladas) no son mayores que la de algunos de los países englobados en la categoría “Otros países” y solo se muestra para señalar su posición en el contexto global. Graficado utilizando datos del USGS (2018).

#### 1.4.2. Agotamiento de las reservas de roca fosfato y el pico de producción de fósforo

La USGS estimó que en 2017 se minaron 263 millones de toneladas de roca fosfato, 8 mil toneladas más que en 2016 y 22 mil más que en 2015 (United States Geological Survey, 2018). Considerando variables como las predicciones en la demanda creciente de fertilizantes en los países subdesarrollados y en el incremento en la población mundial a mediano y largo plazo, las reservas actuales de roca fosfato solo podrán satisfacer la demanda por unas cuantas décadas (Gilbert, 2009).

El pico del fósforo hace referencia, de manera similar a pico de petróleo, al momento en el tiempo donde la producción alcanzaría un máximo y a partir de ahí solo puede disminuir, es decir, donde la demanda superaría a la oferta. En este gráfico de la producción en función del tiempo, con forma de campana de Gausse, se utilizan datos históricos y estimaciones basadas en diversas variables



relevantes a la producción futura. Debido principalmente a que los métodos actuales de estimación de las reservas de roca fosfato dependen en gran parte de la provisión voluntaria de datos de industrias privadas y gobiernos, a veces basados en estimaciones geológicas relativamente viejas (Elser & Bennett, 2011; United States Geological Survey, 2018), las predicciones de cuándo ocurrirá el pico del fósforo suele variar dependiendo la fecha de la estimación. Sin embargo, la mayoría de los analistas sugieren que podría darse en este siglo o principios del siguiente (Cordell & White, 2014). También se ha calculado que la producción, a tasa constante, será suficiente por 370 años, aunque a costo de un déficit considerable en la producción en los próximos 100 años y de que para después del año 2100 las reservas se concentren solo en 7 países (Cooper *et al.*, 2011). Desafortunadamente hoy en día no existe una materia prima alternativa para sustituir en gran proporción a la roca fosfato.

#### **1.4.3. Acciones por tomar para asegurar la producción de alimento en relación con el fósforo**

Para proponer soluciones integrales en la utilización del P se debe primeramente plantear el panorama general para saber en dónde focalizar los esfuerzos. Un enfoque que ha sido aplicado en este contexto es el análisis de flujo de sustancias (Cordell *et al.*, 2009; Cordell & White, 2014; Y. Liu *et al.*, 2008). Este tipo de análisis cuantifica las entradas y salidas de la sustancia o material de interés a cada punto importante de un sistema, permitiendo entender mejor las cargas sobre un ambiente, y así poder identificar regiones de desperdicio, regiones de intervención para reducir el gasto o contaminación, o puntos por mejorar para aumentar la eficiencia en el uso de una sustancia. A partir de este tipo de estudios, es evidente que la solución tiene varios componentes que se deben de atender, en concreto:

- [1] Reutilizar estiércol, residuos de los cultivos, desperdicios de comida y otra materia orgánica. Es posible recuperar de manera sencilla estruvita, un compuesto que además de fósforo contiene amonio y magnesio, a partir de excretos animales y humanos en las plantas de tratamiento de agua y otros depósitos (Antonini *et al.*, 2012; Gilbert, 2009).
- [2] Cambio de dieta en la población. Se estima que la producción de alimento para una dieta vegetariana necesita casi tres veces menos P que una a base de carne (Cordell *et al.*, 2009).
- [3] Aumentar la eficiencia en la cadena de flujo del P en la producción de alimento. Solo un quinto de la roca fosfato minada destinada a producir alimento se consume como tal,

perdiéndose el resto en distintas estancias que van desde el minado, la producción de fertilizantes, el campo de cultivo y las cadenas de distribución (Cordell & White, 2014).

- [4] Mejorar los métodos de producción de alimento. Desarrollo de nuevas variedades de cultivos que generen altos rendimientos en la cosecha con una disposición mínima de fertilizantes fosforados; tecnificación del campo y aplicación de técnicas de manejo apropiadas; y mejoramiento genético animal para una mejor utilización del P (Golovan *et al.*, 2001).

Al objetivo de asegurar la alimentación futura a largo plazo pueden sumarse el encontrar nuevas minas de roca fosfato, desarrollar tecnología para hacer viable el minado de otras materias primas para producir fertilizantes, desarrollo de fertilizantes con mayor biodisponibilidad en el largo plazo, y la aplicación de políticas que favorezcan el uso responsable de los fertilizantes. Además deben considerarse interacciones más amplias, tales como las relativas a la eutrofización, el cambio climático, la crisis energética y la escases de agua, teniendo en cuenta las respectivas políticas en cada caso (Cordell & White, 2014).

Es claro que, bajo este esquema global, la biotecnología juega un papel esencial para asegurar la producción sustentable de alimento a largo plazo. Para llegar a estos objetivos de mejoramiento es indispensable generar conocimiento con respecto a cómo las plantas se adaptan a suelos deficientes en fósforo, bajo qué mecanismos específicos y cómo interactúan estos con el ambiente y otros tipos de estrés. De esta manera podría en principio diseccionar las contribuciones específicas de los mecanismos propios vegetales para luego identificar blancos para el mejoramiento, ya sea clásico y/o por ingeniería genética, que conlleven a la generación de nuevas variedades y, en última instancia, a reducir el flujo de fósforo en forma de fertilizante.

### **1.5. Efectos y respuestas de las plantas a la deficiencia de fósforo**

Consecuente a la situación generalizada de deficiencia de Pi disponible en la mayoría de los suelos, las plantas han desarrollado un número de estrategias complejamente reguladas a distintos niveles, que desembocan en estrategias de minado de P y de modificaciones metabólicas, morfológicas y fisiológicas que aumentan la eficiencia del uso de P y permiten el mantenimiento de la homeostasis celular de P (Ham *et al.*, 2018; López-Arredondo *et al.*, 2014). Estas estrategias se pueden clasificar en dos categorías: mejoramiento en la eficiencia de la toma de P y mejoramiento en la eficiencia de la utilización de P. La primera se refiere a mecanismos que promueven el aumento en la entrada de

fósforo a la raíz desde la solución del suelo (concentración de P dentro de la planta/concentración de Pi disponible en la solución del suelo), mientras que la segunda hace referencia a los mecanismos que efficientizan el uso interno de P (rendimientos de la cosecha/P total en la planta) (Hasan *et al.*, 2016). La eficiencia del uso de P se refiere al efecto combinado de las eficiencias en la toma y utilización del P.

Los efectos (i.e. cambios negativos que no forman directamente parte de una estrategia para combatir al estrés) más comunes y generales por la deficiencia de P en las plantas son la disminución del área foliar y peso del brote, disminución de la tasa fotosintética por unidad de área, retraso en la floración, decremento del peso de la semilla total producida y disminución del P en el tejido (Drew, 1975; Mollier & Pellerin, 1999; Nord & Lynch, 2008). Varias plantas también suelen acumular antocianinas en las hojas, presentando un color morado característico (Hernández & Munné-Bosch, 2015). Cabe aclarar que esta separación entre efectos del estrés y respuestas al estrés por P puede crear algo de ambigüedad, ya que existe evidencia emergente que apunta a que la retardación del crecimiento después del estrés no es necesariamente mediada por el daño causado por el agente estresante, sino por programas genéticos activados por el estrés (Heuer *et al.*, 2017). Sin embargo, en el enfoque aquí tomado se refiere como respuestas solo a los mecanismos reportados que desembocan en acciones que aumentan directamente la eficiencia del uso de P de la planta.

### **1.5.1. Modificaciones de la arquitectura del sistema radicular en respuesta a la deficiencia de P**

Las definiciones de la arquitectura, morfología, distribución y topología utilizadas en este escrito están basadas en las definidas en el glosario de Lynch (1995). La arquitectura del sistema radicular (ASR) se define como el arreglo global de los componentes individuales del sistema radicular, es decir, la geometría explícita de los ejes radiculares. Aquí, las variables relacionadas a los pelos radiculares, que comúnmente son englobados en morfología, se incluyen en el concepto de ASR. El cambio en la ASR dependiente de la deficiencia de algún nutriente, incluyendo el fósforo, varía entre especies, dentro de especies y dependiendo del estado de desarrollo de una misma planta (Shahzad & Amtmann, 2017). Debido al número de nombres que se utilizan en la literatura para describir a las raíces en diferentes especies, que suelen ser utilizados de manera confusa e inconsistente (Gregory, 2006), he adoptado la nomenclatura recomendada por la Sociedad Internacional para la Investigación de Raíces (ISRR, *International Society for Root Research*, [www.rootresearch.org](http://www.rootresearch.org)), la cual está basada en el sitio de origen o nacimiento de cada raíz. En resumen, dicha taxonomía define

cuatro clases de raíces (Zobel & Waisel, 2010): [1] la raíz principal (*tap root*), la cual es la primera en emerger de la semilla; [2] raíces laterales, las cuales son ramificaciones de cualquiera de las otras clases de las raíces; [3] raíces aéreas (*shoot-borne roots*), que surgen de los tejidos del brote; y [4] raíces basales, que se originan del hipocótilo o mesocótilo. Esta nomenclatura, además de reflejar la posición el sitio de origen, está soportada en evidencia que diferencia cada clase de raíz en términos genéticos y funcionales (Zobel & Waisel, 2010).

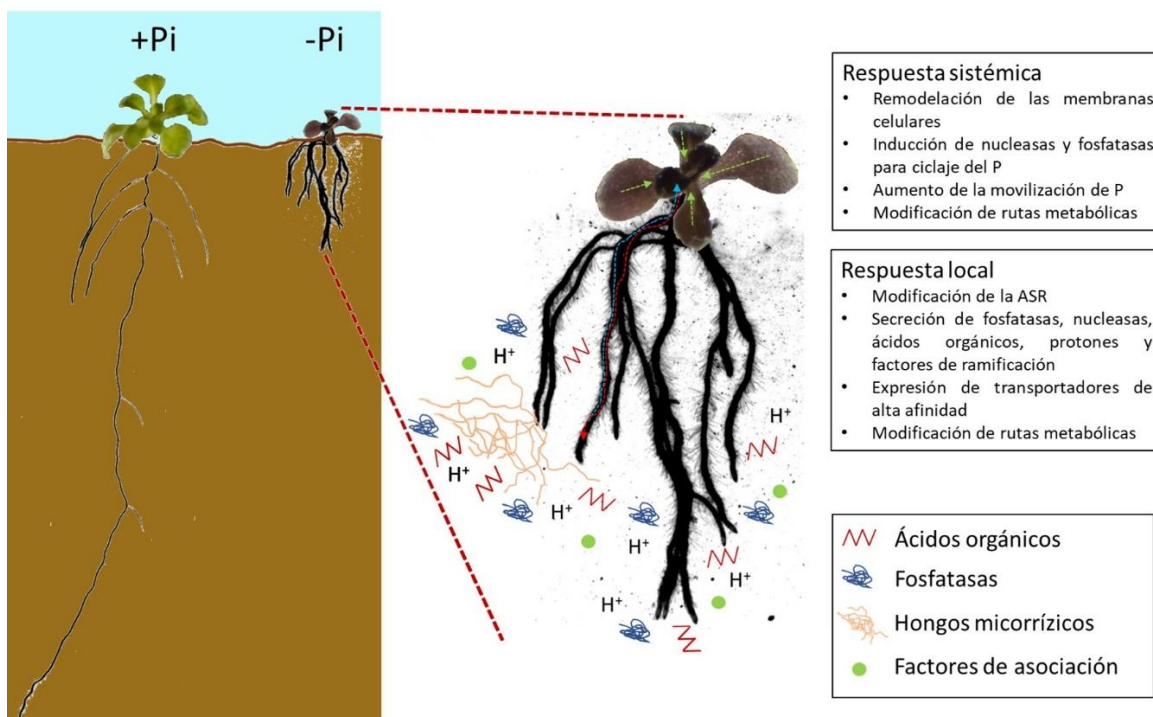
La mayoría de los avances en la comprensión, a distintos niveles, del proceso de modificación de la ASR en deficiencia de P se han obtenido con la planta modelo *Arabidopsis thaliana* en cultivo *in vitro*, por lo que se revisarán solo las modificaciones reportadas en este sistema para esta especie. Sin embargo, específicamente con respecto al cambio en la ASR, se tiene una buena base de información de varias plantas de interés agronómico crecidas en sistemas hidropónicos no estériles con sustratos inertes.

En plántulas de *Arabidopsis*, probablemente la respuesta más evidente a la deficiencia de P es el acortamiento de la raíz primaria (López-Bucio *et al.*, 2003), por lo que no es de sorprender que se haya y siga usando como marcador fenotípico para la identificación de mutantes que no presenten esta respuesta (Balzergue *et al.*, 2017; Mora-Macías *et al.*, 2017; Sanchez-Calderon *et al.*, 2006). Sin embargo, el efecto de acortamiento radicular se da en todas las clases de raíces de *Arabidopsis*, restringiendo espacialmente al sistema radicular a las capas más superficiales del medio (Figura 4). En este sentido, además del acortamiento radicular, otro mecanismo que proporciona un aumento en el volumen de exploración superficial es la proliferación, proceso que involucra el desarrollo de nuevas raíces laterales (Hodge, 2004). En deficiencia de Pi, *Arabidopsis* presenta incremento en la densidad, diámetro, número total y longitud de raíces laterales de primer orden y órdenes superiores (Jain *et al.*, 2007; López-Bucio *et al.*, 2002). Los pelos radiculares son células modificadas de la rizodermis, llamadas tricoblastos, que tienen forma alargada y aumentan significativamente el volumen de exploración de la raíz. La deficiencia de Pi provoca un aumento en la longitud y densidad de pelos radiculares, un decremento en la distancia del ápice radicular al lugar de inicio de su aparición, y un incremento en el número de tricoblastos (Bates & Lynch, 1996; Ma *et al.*, 2001). Simulaciones basadas en modelos matemáticos sugieren que estas cuatro variables actúan en sinergia para aumentar la eficiencia en la toma de Pi (Ma *et al.*, 2001). Se propone que el conjunto de estas adaptaciones en la ASR de *Arabidopsis* proporciona ventajas ecológicas al aumentar el

volumen de exploración en las capas superficiales del suelo, donde se suele acumular el P (Péret *et al.*, 2011).

Es claro que la relativa simplicidad de la ASR y organización celular en la raíz de plántulas de *Arabidopsis*, una dicotiledónea, contrasta con la de plantas cultivadas, especialmente con las de los cereales. Por ejemplo, morfológicamente el arroz y maíz poseen 10-15 capas de células corticales y de 800-1200 células componen cada uno de sus centros quiescentes, mientras que *Arabidopsis* solo tiene una capa de células corticales y 4 son las células del centro quiescente (Hochholdinger & Zimmermann, 2008). Con respecto a la ASR, en el maíz cobran especial importancia las raíces basales (raíces de corona y seminales) y aéreas, mientras que la raíz primaria suele tener importancia solo en la etapa de plántula y es poco responsiva a la deficiencia de P (Calderon-Vazquez *et al.*, 2011). En contraste, *Arabidopsis* y en general las dicotiledóneas, dependen esencialmente de la raíz primaria para el desarrollo de su sistema radicular. Sin embargo, se puede generalizar que la ASR de las plantas de cultivo en deficiencia de P se modifica de tal forma que se favorece la exploración de mayor volumen de suelo, principalmente en las capas superficiales. El arroz en deficiencia de P aumenta su superficie radicular 2.5 veces con respecto a aquellas crecidas en suficiencia de este nutriente (Kirk & Van Du, 1997), mientras que en el frijol común se estimula la generación de nuevas raíces basales, que además tienden a crecer con ángulos más estrechos, es decir, raíces más paralelas a la superficie del suelo (Lynch & Beebe, 1995). De manera similar, las raíces laterales de primer orden del maíz son más largas en los primeros días bajo deficiencia de fósforo (Mollier & Pellerin, 1999). Estudios en cebolla, zanahoria, trigo, tomate y lechuga, empleando predicciones basadas en modelos matemáticos, ponen de manifiesto la importancia del aumento de longitud y densidad de los pelos radiculares en la contribución del aumento del área superficial de la raíz, lo que conlleva al aumento en la toma de P del suelo (Itoh & Barber, 1983). Estudios con diversas plantas de cultivo, utilizando principalmente líneas endogámicas recombinantes, revelan la importancia de otras variables adicionales a las ya mencionadas, tal como el número de verticilos de las raíces basales y el aumento en el número de raíces aéreas (Lynch, 2011). Un caso especial de modificación a la ASR en deficiencia de P son las raíces proteoides o en racimo, las cuales consisten en arreglos densos de raíces laterales con pelos radiculares y que son características de especies que crecen en ambientes con muy bajos niveles de P disponible, y que comúnmente no micorrizan (Lambers *et al.*, 2015). Adicionalmente, a manera de extensión de las raíces, en el 70-80% de las especies vegetales la asociación con hongos micorrízicos se ve favorecida bajo deficiencia de P

(Smith *et al.*, 2011). El hongo recibe carbono de la planta hospedera y la planta recibe a cambio fósforo y otros nutrientes.



**Figura 4. Respuestas de las plantas a deficiencia de P.** A nivel molecular y de modificación de la raíz, las plantas responden con un conjunto de estrategias frecuentemente clasificadas como locales y sistémicas. Las flechas roja y azul ilustran la comunicación entre brote y raíz vía xilema y floema, esencial para la señalización sistémica; mientras que las flechas verdes indican el favorecimiento de la relocalización de P a tejidos jóvenes y frutos, efecto de la respuesta sistémica. Aunque las plantas en la imagen son *Arabidopsis thaliana* Col-0 crecidas *in vitro*, los procesos indicados son generalizados y no específicamente de esta especie.

### 1.5.2. Respuestas fisiológicas, metabólicas y regulatorias a la deficiencia de P

En deficiencia de P, las plantas expresan transportadores de alta afinidad ( $K_m$  10 – 100  $\mu$ M) para apoyar a los transportadores de baja afinidad ( $K_m$  en el rango mM) de expresión constitutiva (Hasan *et al.*, 2016). Estos transportadores de P se agrupan en cinco familias (PHT1-5), y se han reportado, mayoritariamente miembros de la familia PHT1, en diversos cultivos de interés como maíz, arroz, trigo, cebada, soya y tomate (Wang *et al.*, 2017). El conjunto de los transportadores PHT1-5, muchos de estos altamente responsivos a niveles bajos de P, tienen función en aumentar la eficiencia del uso de fósforo de la planta mediante el incremento del flujo de Pi desde la solución del suelo y en la relocalización el P interno a nivel tejido y organelo específico (Versaw & Garcia, 2017; Wang *et al.*, 2017). Debido a la baja concentración en la solución del suelo, la expresión de transportadores de alta afinidad en la raíz se acompaña por estrategias que promueven el minado de P; es decir,

excreción de moléculas que solubilizan Pi de fuentes orgánicas e inorgánicas. Estas estrategias incluyen el incremento en la síntesis y excreción por parte de la raíz de ácidos orgánicos aniónicos (principalmente malato, citrato y oxalato), fosfatasas ácidas y ribonucleasas (Calderon-Vazquez *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015); además de la acidificación en la rizosfera mediada por la excreción de protones vía H<sup>+</sup>-ATPasas, estrategia efectiva en suelos neutros y alcalinos para solubilizar fosfatos de calcio (Lambers *et al.*, 2015). La escisión de Pi de los fosfolípidos membranales, mediada por fosfolipasas, para sustituirlos por galactolípidos y sulfolípidos en plantas superiores permite acceder a este pool estructural interno de P para su utilización en procesos celulares. Esta translocación de Pi se da en brote y raíz, tanto en las membrana plasmática como organelares, y es reversible tiempo después que la planta ha logrado suplirse de P (Tjellström *et al.*, 2008). Adicionalmente, la inducción de la expresión de fosfatasas y ribonucleasas celulares promueven la movilización de P de reservas internas y su reciclado, favoreciendo su disponibilidad (Thibaud *et al.*, 2010). Además de aumentar el P interno en tejido, las plantas eficientizan su uso metabólico. El transporte de electrones utiliza rutas de conservación de energía en la mitocondria, el ciclo de Krebs consume menos ATP y se expresan enzimas de la glucólisis no dependientes de Pi o ATP (Hasan *et al.*, 2016). Otras respuestas metabólicas tienen que ver en redireccionar el flujo metabólico para la exudación de ácidos orgánicos mediante el aumento de la actividad de enzimas glucolíticas tales como fosfoenolpiruvato carboxilasa y fructoquinasa; y enzimas del metabolismo de ácidos orgánicos como malato deshidrogenasa y citrato sintasa (Neumann & Römheld, 2007; Ryan *et al.*, 2001). La exudación de fotosintatos desde la raíz, tales como ácidos orgánicos, además puede tener importancia para estimular el crecimiento de microorganismos benéficos no simbióticos solubilizadores de P (Harvey *et al.*, 2009); mientras que el aumento de la exudación de factores de asociación, tales como las estrigolactonas, favorecen asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos (Besserer *et al.*, 2006). Recientemente se ha reportado una relación positiva entre el contenido de pectina en la pared celular con el Pi soluble en tejido en plantas de arroz y Arabidopsis cuando se someten a un tratamiento de deficiencia de P (Zhu *et al.*, 2015). Naturalmente la deficiencia de P reduce los niveles internos de Pi, ATP y ADP; lo cual afecta el metabolismo respiratorio y a las reacciones dependientes de estos compuestos. Sin embargo, estas modificaciones al metabolismo de la planta pueden considerarse como efectos de la deficiencia de P y no como respuestas dirigidas a aumentar la eficiencia del uso de P.

Las estrategias frente a la deficiencia de P se han clasificado como respuestas (o señales) sistémicas y locales, ambas con vías de regulación parcialmente independientes. Las respuestas locales se

refieren a las que tienen como fin la modificación de la ASR para aumentar la toma de Pi desde el suelo, siendo responsivas a la concentración de Pi en solución e independiente del Pi en tejido; mientras que las señales sistémicas o de larga distancia son responsivas a las fluctuaciones internas de Pi y son transportadas vía tejidos vasculares a células blanco distantes para que ejecuten sus funciones (Thibaud *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2014). En los últimos años se han logrado caracterizar muchos de los componentes moleculares clave que actúan en ambos tipos de respuesta, permitiendo elaborar modelos que reconstruyen parcialmente los mecanismos regulatorios vegetales para enfrentar la deficiencia de P (Gutiérrez-Alanís *et al.*, 2018; Ham *et al.*, 2018). Es claro que se trata de un sistema complejo de regulación tejido específico y a varios niveles donde participan diversos tipos de proteínas tales como factores de transcripción (e.g. PHR1 [Rubio *et al.*, 2001] y STOP1 [Balergue *et al.*, 2017; Mora-Macías *et al.*, 2017]), transportadores de Pi y ácidos orgánicos (ALMT1, [Balergue *et al.*, 2017; Mora-Macías *et al.*, 2017]), ferroxidasas (LPR1 [Svistoonoff *et al.*, 2007]), proteínas reguladoras (eg. PDR2 [Ticconi *et al.*, 2009]) y péptidos señal (Gutiérrez-Alanís *et al.*, 2017); mRNA y miRNAs que viajan por los tejidos conductores (Zhang *et al.*, 2016); diversas moléculas reguladoras y de transducción de señales como inositol polifosfato (Wild *et al.*, 2016), sacarosa (Lei *et al.*, 2011),  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  y especies reactivas de oxígeno (Müller *et al.*, 2015); hormonas vegetales (auxinas, etileno, citocininas, estrigolactonas, giberelinas, y en menor medida el ácido abscísico [Zhang *et al.*, 2014]); polímeros como la calosa (Müller *et al.*, 2015); y modificaciones epigenéticas a nivel de metilación del DNA (Yong-Villalobos *et al.*, 2015, 2016). Pese a que la mayoría de los avances en la elucidación de los componentes moleculares en deficiencia de P se han logrado utilizando como modelo a *Arabidopsis*, muchos de estos tienen sus homólogos en cultivos de interés; tales como arroz, maíz, trigo, soya y sorgo (Calderon-Vazquez *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2017). La comprensión detallada a nivel molecular de las respuestas a deficiencia de P en las plantas abre la posibilidad de diseñar variedades con mejoras en mecanismos puntuales de regulación con mayor eficiencia del uso del P.

## **1.6. Desarrollo de plantas mejoradas por ingeniería genética para aumentar la eficiencia del uso del P**

Gran parte de los genes involucrados en las respuestas a deficiencia de P se han sobre-expresado en plantas, generalmente utilizando promotores constitutivos en *Arabidopsis thaliana*, y evaluado bajo tratamientos de deficiencia de Pi. Varias revisiones en la literatura científica que tocan el tema



han listado extensivamente los genes y especies así evaluados (Gu *et al.*, 2016; López-Arredondo *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017), por lo que en este apartado se limitará a mencionar algunos ejemplos representativos y el impacto en el desarrollo de la planta bajo estrés por P.

Uno de los primeros trabajos reportados se enfocó en aumentar la secreción de citrato mediante la sobreexpresión de la citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* en plantas de tabaco (López-Bucio *et al.*, 2000). Las líneas transgénicas excretaban 3-4 veces más citrato que el control y produjeron consistentemente mayor biomasa en brote y fruto al evaluarse en suelos alcalinos subóptimos adicionados con hidroxapatita (López-Bucio *et al.*, 2000). La expresión de la pirofosfatasa- $H^+$  de *Arabidopsis* (*AVP1*) se ve inducida en la deficiencia de P, incrementándose la acidificación de la rizosfera y proliferación radicular mediada por P-ATPasa (Yang *et al.*, 2007). Plantas de *Arabidopsis*, arroz y tomate sobreexpresantes de *AVP1* bajo tratamientos de deficiencia de P ( $KH_2PO_4$  o roca fosfato) presentan mayor área foliar, desarrollo radicular, excreción de ácidos orgánicos y acidificación de la rizosfera; además de mayor rendimiento de fruto en el caso de tomate (Yang *et al.*, 2007). Desde entonces, este sistema se ha probado exitosamente en otras especies como algodón, alfalfa, trigo y cebada (Gaxiola *et al.*, 2011, 2016). Además, el sistema *AVP1* provee de otros efectos benéficos bajo estrés por salinidad y deficiencia de N. *Arabidopsis* sobreexpresante de la fitasa *MtPHY1* de *Medicago truncatula* presenta mayor peso seco en brote y contenido de P en tejido con respecto al control al ser evaluadas en sistema *in vitro* con fitato como única fuente de P (Xiao *et al.*, 2005). El micro RNA miR399 se transloca vía floema desde el brote a la raíz en deficiencia de P, degradando el mRNA de *PHO2*, el cual es un regulador postraduccional negativo de transportadores *PHT1*. La sobreexpresión en tomate de miR399 de *Arabidopsis* ocasiona un aumento de la concentración de P en los tejidos de estas plantas transgénicas con respecto sus controles silvestres, explicado por la abundancia de los transportadores de fosfato y un aumento de la excreción de protones y fosfatasas ácidas (Gao *et al.*, 2010). La sobreexpresión en arroz del factor de transcripción *OsMYB4P*, un regulador positivo de la transcripción de genes responsivos a deficiencia de P, ocasiona un mayor desarrollo foliar y concentración de P en tejido tanto en suficiencia como deficiencia de P; además cambia la ASR en términos de una mayor longitud de la raíz principal y mayor densidad y longitud de raíces laterales (Yang *et al.*, 2014). La sobreexpresión en arroz del transportador de alta afinidad *OsPT1* aumentó la concentración de P en brote a lo largo de las etapas de desarrollo de la planta con respecto al control; lo que resultó en la producción de más macollos por planta, un rasgo agronómico importante relacionado con la producción de semilla en arroz (Seo *et al.*, 2008). La fosfito oxidoreductasa (*ptxD*) de *Pseudomonas stutzeri* cataliza la

reacción oxidación del fosfito para generar fosfato. No se conocen plantas capaces de metabolizar el fosfito, solo un reducido número de bacterias; por lo que las plantas genéticamente modificadas para expresar *ptxD* son prácticamente las únicas que aprovechan esta fuente de P (López-Arredondo & Herrera-Estrella, 2012). Este sistema se ha reportado en Arabidopsis, algodón, arroz y tabaco; este último necesita 30-50% menos P en forma de fosfito para alcanzar un rendimiento similar al de plantas control con fosfato en invernadero, mientras que en campo generan hasta 20% más de biomasa (López-Arredondo & Herrera-Estrella, 2012; Manna *et al.*, 2016; Pandeya *et al.*, 2018). Además, el sistema *ptXD*-fosfito aporta un agente herbicida no letal y proporciona una mayor biodisponibilidad del elemento debido a la menor reactividad en suelo del fosfito con respecto al fosfato.

Todos los ejemplos anteriormente mencionados se basan en aumentar la eficiencia de la toma de fósforo; ya sea por minado bioquímico, el aprovechamiento de otras fuentes de P, aumento en el volumen de exploración de las raíces y/o por la acción de transportadores de P alta afinidad. Se ha prestado mucho menos atención a desarrollar sistemas que se enfoquen en mejorar la eficiencia en la utilización de P. Esto se debe principalmente a la complejidad y al aun deficiente entendimiento de los mecanismos involucrados y sus interacciones en este tipo de respuesta (Gu *et al.*, 2016; Tian *et al.*, 2012). El panorama es algo similar con respecto a modificar favorablemente la ASR por transgénesis (Heuer *et al.*, 2017; Tian *et al.*, 2012); aunque existen casos exitosos como la sobreexpresión de *AVP1* (Yang *et al.*, 2007). Recientemente se reportó el rol en Arabidopsis del transportador de malato ALMT1 y su principal regulador positivo STOP1 (también regulador positivo del transportador de citrato MATE) en la modificación de la ASR en deficiencia de P (Balzergue *et al.*, 2017; Mora-Macías *et al.*, 2017), por lo que su sobreexpresión podría significar un sistema que aumente la excreción de ácidos orgánicos y promueva el desarrollo del sistema radicular.

## **1.7. ALMT1, STOP1 y los ácidos orgánicos: su importancia en múltiples tipos de estrés**

### **1.7.1. Los ácidos orgánicos y su interacción con aniones del suelo**

Los ácidos orgánicos son compuestos carbonados que contienen al menos un grupo carboxilo. En este trabajo, el termino ácidos orgánicos hace referencia únicamente a los aniones de ácidos orgánicos de bajo peso molecular no aminoacídicos, con especial énfasis en malato y citrato. Dependiendo del número de grupos carboxilo y sus constantes de disociación, los ácidos orgánicos

se comportan como aniones capaces de acomplejar cationes en solución e intercambiarse por aniones en la matriz del suelo (Brady & Weil, 2016; Ryan et al., 2001). Estas características químicas permiten a la planta disminuir la toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$  y minar P insoluble, respectivamente.

La movilización de Pi por los ácidos orgánicos se da por mecanismos de intercambio de ligandos, mientras que cationes tales como  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  se solubilizan formando complejos de carboxilatos (Gerke *et al.*, 1994). Dichos complejos solubles pueden ser estables dependiendo del número de grupos carboxilo y su orientación relativa a los grupos hidroxilo en la molécula, además que el metal complejante protege al ácido orgánico de la biodegradación (Gerke, 1992).

### **1.7.2. Relevancia de *ALMT1* y *STOP1* en el desarrollo de las plantas bajo estrés**

Los genes que codifican para el transportador de malato *ALMT1* (ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1) y el factor de transcripción *STOP1* (SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1) han sido estudiados intensivamente los últimos años, sobre todo por su importancia en la tolerancia a la toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{H}^+$  y, recientemente, por su papel en la respuesta de modificación de arquitectura radicular bajo deficiencia de P.

La tolerancia a  $\text{Al}^{3+}$  en un rasgo fisiológicamente simple, dado por la liberación de malato en la punta de la raíz, pero genéticamente complejo, ya que es una característica multigénica (Hoekenga *et al.*, 2003). En trigo se identificó y clonó por primera vez a *ALMT1*, un transportador de malato responsivo a  $\text{Al}^{3+}$  y que cosegrega con la tolerancia a aluminio de la descendencia de la cruce de dos variedades que contrastan en esta característica (Sasaki *et al.*, 2004). Más tarde se descubrió el homólogo de *ALMT1* en *Arabidopsis*; demostrándose igualmente que, al mediar la excreción de malato, es un gen clave en la tolerancia a  $\text{Al}^{3+}$  (Hoekenga *et al.*, 2006). Además, se encontró que *ALMT1* responde específicamente a  $\text{Al}^{3+}$  y no a otros elementos rizotóxicos, que su expresión está restringida a la raíz y, que es regulado postranscripcional y postraduccionalmente mediante fosforilación (Kobayashi *et al.*, 2007). La regulación de *ALMT1* es compleja, muestra de ello es que los niveles de transcripción son inducidos independientemente por ácido indol-3-acético, ácido abscísico, bajo pH,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y flagelina22, un péptido producido por bacterias fitopatógenas (Kobayashi *et al.*, 2013). Además, el transportador de citrato *MATE* es también responsivo a muchos de los mismos inductores de *ALMT1*, lo que sugirió que ambos genes comparten mecanismos regulatorios (Kobayashi *et al.*, 2013).

En 2007 se caracterizó a *STOP1*, un gen que codifica para un factor de transcripción tipo dedos de zinc de localización nuclear, cuya mutación ocasiona hipersensibilidad a toxicidad por  $H^+$  y  $Al^{3+}$  debido a que es necesario para la inducción de la transcripción de *ALMT1* y el transportador de citrato *MATE*, además de otros genes de relevancia para estos tipos de estrés (Iuchi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Sawaki *et al.*, 2009). Aunque se ha demostrado que *ALMT1* es fundamentalmente regulado por *STOP1*, otros factores de transcripción juegan un rol en su expresión inducible (Tokizawa *et al.*, 2015). *STOP2*, un gen homólogo de *STOP1* que presenta niveles menores de expresión, tiene función redundante al inducir la expresión de varios genes que regula *STOP1* (incluido *MATE*), sin embargo es incapaz de activar a *ALMT1* (Kobayashi *et al.*, 2014). Las plantas que presentan hipersensibilidad a  $Al^{3+}$  o  $H^+$ , como es el caso en las mutantes *almt1* y *stop1*, se caracterizan por tener un menor desarrollo radicular cuando se someten a estos tipos de estrés, restringiendo su capacidad para tomar agua y nutrientes e impactando en su desarrollo.

Recientemente se reportó que *ALMT1* y *STOP1* juegan un papel importante en la modificación de la ASR en respuesta a concentraciones bajas de P en el medio. La acumulación y distribución de Fe en el ápice de la raíz, seguida del endurecimiento de las paredes celulares y el agotamiento meristemático, son procesos fundamentales para detener el crecimiento radicular bajo condiciones de deficiencia de P (Gutiérrez-Alanís *et al.*, 2018). Bajo deficiencia de P, la exudación de malato promueve la acumulación y movilización de  $Fe^{3+}$  en el apoplasto del meristemo apical de raíz. Por lo tanto, *almt1* y *stop1* son incapaces de acumular Fe en las zonas de transición y elongación, por lo que presentan un fenotipo de raíz larga en contraste con plantas silvestres (Balzergue *et al.*, 2017; Mora-Macías *et al.*, 2017). Bajo deficiencia de Pi, el módulo STOP1-ALMT1 es esencial para inhibir la elongación celular en la raíz; además, STOP1 funcional es requerido también para promover el agotamiento meristemático (Balzergue *et al.*, 2017; Gutiérrez-Alanís *et al.*, 2018; Mora-Macías *et al.*, 2017). Adicionalmente, se suele asumir que la exudación de ácidos orgánicos en la rizosfera tiene un efecto benéfico para el desarrollo de las plantas que crecen en suelos deficientes en P, pese a que la evidencia solo es contundente para plantas con adaptaciones específicas tal como las raíces en racimo y grandes tasas de exudación de carboxilatos (Lambers *et al.*, 2015).

Uno de los sistemas más prometedores para la generación de nuevas variedades que presenten mayor eficiencia en la toma de P es el de minado de P por exudación de ácidos orgánicos, principalmente por cuatro razones: [1] la abundancia de ácidos orgánicos en tejido, [2] la creciente evidencia de su importancia en el minado de P, [3] sus funciones múltiples en la toxicidad por

caciones, el minado de otros nutrientes y el reclutamiento de microorganismos benéficos; y [4] el reciente descubrimiento de su rol en la modificación de la ASR en deficiencia de P. Especialmente este último punto renueva el interés de estudiar los sistemas dirigidos a potenciar la exudación de ácidos orgánicos, ya que comúnmente solo se evalúan los niveles de exudación de unos pocos carboxilatos y su relación con la respuesta en cuanto a variables de productividad (e.g. área foliar, semilla producida y P en tejido), ignorando el cambio en la ASR. En este contexto, la sobreexpresión en *A. thaliana* de los genes que codifican para transportador de malato ALMT1 y su principal regulador positivo STOP1 (también regulador positivo de MATE, un transportador de citrato) son un buen sistema para evaluar la importancia de la exudación de carboxilatos y el cambio en la ASR sobre las variables de productividad de la planta.

## II. HIPÓTESIS

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* son más productivas que su contraparte silvestre al crecer con compuestos de fósforo de baja biodisponibilidad como única fuente de este elemento.

## III. OBJETIVOS

### 3.1. Objetivo general

Evaluar las variables morfológicas, genéticas, fisiológicas y de rendimiento de líneas de *A. thaliana* sobreexpresantes de *STOP1* y *ALMT1* y comparar con las de sus contrapartes silvestre y mutantes (*stop1* y *almt1*) en sistemas *in vitro* y de hidroponía en sustrato utilizando compuestos insolubles de fósforo representativos de suelos ácidos y neutros/alcalinos.

### 3.2. Objetivos particulares

- Diseñar y validar un sistema *in vitro* y un sistema de hidroponía en sustrato adecuados para evaluar compuestos minerales insolubles de P.
- Analizar el área foliar y la arquitectura radicular de las plantas crecidas *in vitro* bajo diferentes niveles de disponibilidad de Pi.

- Analizar el área foliar, tiempo de floración y producción de semilla de las plantas crecidas en hidroponía en sustrato bajo diferentes niveles de disponibilidad de Pi.
- Analizar los niveles de expresión de *ALMT1* de las líneas sobreexpresantes.
- Cuantificar la exudación de equivalentes de H<sup>+</sup> de las plantas en deficiencia de P.
- Evaluar la tolerancia a toxicidad por Al<sup>3+</sup> de las sobreexpresantes de *STOP1* y *ALMT1* y compararlas con plantas silvestres y mutantes.
- Cuantificar y visualizar los ácidos orgánicos, principalmente citrato y malato, en exudados de raíz de las líneas sobreexpresantes y sus controles.
- Relacionar posibles variables de arquitectura del sistema radicular y tasas de exudación de ácidos orgánicos y H<sup>+</sup> con variables las variables de productividad de área foliar y producción de semilla.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas de *Arabidopsis thaliana*

Línea	Descripción
WT	Ecotipo silvestre Columbia ( <i>Col-0</i> ) accesión (CS70000).
<i>almt1</i>	Mutante insercional <i>SALK_009629</i> (N509629) en el gen <i>ALUMINUM ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1</i> ( <i>ALMT1</i> ), que codifica para un transportador de malato.
<i>stop1</i>	Mutante insercional <i>SALK_114108</i> (N614108) en el gen <i>SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1</i> ( <i>STOP1</i> ), que codifica para un factor de transcripción tipo dedos de zinc.
L1 - L24	Líneas sobreexpresantes de <i>STOP1</i> ( <i>p35S::STOP1</i> ) en el fondo WT.
L25 - L48	Líneas sobreexpresantes de <i>ALMT1</i> ( <i>p35S::ALMT1</i> ) en el fondo WT.
L49 - L72	Líneas sobreexpresantes de <i>STOP1</i> ( <i>p35S::STOP1</i> ) en el fondo <i>stop1</i> .
L73 - L93	Líneas sobreexpresantes de <i>ALMT1</i> ( <i>p35S::ALMT1</i> ) en el fondo <i>almt1</i> .

### 4.2. Desinfección y vernalización de semillas

Todas las semillas fueron desinfectadas y vernalizadas previamente a iniciar experimentos. La desinfección se llevó a cabo en tubos Eppendorf de polipropileno de 1.5 mL con la semilla a

desinfectar y bajo condiciones de esterilidad dentro de campana de flujo laminar, de la siguiente manera:

1. Se agregó 1 mL de etanol al 100% y se dejó en agitación 8 min. Se descartó la solución.
2. Se agregó 1 mL de solución comercial CLORALEX™ al 20% y se dejó en agitación por 6 minutos. Se descartó la solución.
3. Se agregó 1 mL de agua destilada estéril y se dejó en agitación por 10 min. Se descartó la solución.
4. Se repitió tres veces más el paso 3 y se adicionó 1 mL de agua destilada estéril.
5. Como parte de la vernalización, se envolvieron en papel aluminio los tubos Eppendorf con la semilla desinfectada y se guardaron por al menos 3 días a 4 °C. Después de este tiempo las semillas estuvieron listas para ser sembradas.

### **4.3. Cultivo *in vitro***

En este trabajo se utilizaron dos sistemas *in vitro*. Estos difirieron en el tipo y concentración de gelificante utilizado, la formulación nutrimental, el ángulo de inclinación de incubación de las cajas Petri, la forma de crecimiento de las raíces en el medio, y el sitio de siembra de las semillas en el gel.

Para ambos sistemas, se esterilizó el medio en autoclave (120°C, 15 psi por 15 min) y se vertió en cajas Petri estériles. Las cajas se sembraron en condiciones de esterilidad y se incubaron en cámaras de crecimiento a 23 °C, iluminancia de 7,500 lx y con fotoperiodo 16/8 h luz/obscuridad. 48 h después de la siembra se consideró como el primer día de edad de la plántula o 1 dpg (día postgerminación).

En los experimentos en ambos sistemas en donde se buscó evaluar alguna característica relativa a la concentración de P en el medio o que se afectara por la misma (e.g. el fosfato afecta la concentración de Al<sup>3+</sup> libre), se limpiaron las trazas de P de los gelificantes.

#### **4.3.1. Limpieza de trazas de fósforo del gelificante**

Para limpiar impurezas de P en el gelificante se utilizó alumina, un óxido de aluminio con gran afinidad al fosfato en solución a pH ácido. El protocolo consistió en dos pasos: [1] activación de la alumina y [2] Incubación y limpieza del gelificante.

#### **4.3.1.1. Activación de la alumina**

Se modificó y adaptó a escala laboratorio un método de acidificación de alumina a partir de un protocolo de preparación de un buffer de P de fase sólida (PennState College of Agricultural Sciences [www.plantscience.psu.edu](http://www.plantscience.psu.edu)). Para activar 100 gr de perlas de alumina (1.5 – 2.0 mm de diámetro), el procedimiento fue siguiente:

1. Se pesaron 100 gr de alumina en un matraz de 1 litro.
2. Se adicionaron 350 mL de agua destilada y se puso en agitación orbital (180 rpm) 30 minutos.
3. Se removieron y descartaron 35 mL de solución. El pH de es de aproximadamente 9.0.
4. Se adicionaron 35 mL de HCl 2.50 N.
5. Se dejó el matraz en agitación por 60 minutos. El pH de la solución se encontró en un rango de 3.0 – 3.5.
6. Se descartó la solución del matraz por decantación.
7. Primer lavado: Se adicionaron 350 mL de agua destilada y se dejó 30 min en agitación. El pH se encontró un rango de 3.5 - 3.7. Se descartó el líquido por decantación.
8. Segundo lavado: Se adicionaron 350 mL de agua destilada y se dejó 30 min en agitación. El pH se encontró en un rango de 3.8 – 4.0. Se descartó el líquido por decantación.
9. Se vaciaron las perlas de alumina en un recipiente plástico y se dejaron secar en un horno a 60-70 °C por 24 h. Estas perlas de alumina activada se guardaron en un lugar seco y libre de humedad hasta su uso.

#### **4.3.1.2. Incubación y limpieza del gelificante con alumina**

Para limpiar el gelificante para preparar un litro de medio de cultivo se procedió de la siguiente manera:

1. Se pesó la cantidad correspondiente de gelificante para 1 L de medio y se adicionó a un matraz de 2 L con 900 mL de agua destilada.
2. Se ajustó el pH a aproximadamente 4.5 con HCL 1 N.
3. Se agregaron 5 g de alumina activada.
4. Se dejó al menos 12 h en agitación orbital (200 rpm).
5. Se recuperó el agua con gelificante por decantación, la cual en este punto se asumió libre de trazas de P. Las perlas de alumina se desecharon y se ajustó el pH a 5.5.



6. Se trató de manera rutinaria la mezcla agua-gelificante para la preparación del medio de cultivo.

#### 4.3.2. Sistema con agar como gelificante

Se utilizó la formulación de MS 0.1X, 10 g L<sup>-1</sup> de agar, 10 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 3.5 mM de MES. La concentración de P en forma de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> fue de 10 y 500 μM para tratamientos de deficiencia y suficiencia de P, respectivamente. Las semillas se sembraron en la superficie del medio en las cajas Petri, y se incubaron en la cámara de crecimiento con una rejilla que las mantuvo uniformemente espaciadas a un ángulo aproximado de 80°. De esta manera las plántulas crecieron con la raíz y el brote sobre la superficie del medio, sin penetrarlo. Las plántulas cuyas raíces penetraron el medio en este sistema fueron descartadas para los análisis. Este sistema se utilizó para la propagación de plantas, selección de plantas transformadas, verificación inicial de fenotipos en deficiencia de P y para la obtención de material vegetal para distintos análisis (exudados de raíz, MALDI-MSI, evaluación de cambios de pH y extracción de RNA y DNA). A continuación, se resume el perfil nutritivo de ambos sistemas de cultivo *in vitro*.

Componente*	Concentración (μMol L <sup>-1</sup> )	
	Sistema con Agar	Sistema con Phytigel
N	6026	8026
K	2879	2879
Ca	299	2299
P	10 - 1000	0.5 - 1000
S	173	1173
Mg	150	1150
B	10	10
Mn	10	10
Fe	10	30
Zn	3	3
Cu	0.04	0.04
Mo	0.21	0.21
Inositol	55.51	55.51
Glicina	2.66	2.66
Piridoxina	0.0243	0.0243
Ácido nicotínico	0.0406	0.0406
Tiamina	0.0029	0.0029

\*En ambos sistemas se adicionaron con 10 g L<sup>-1</sup> de sacarosa.

### 4.3.3. Sistema con goma gellan (Phytigel) como gelificante

Se utilizó como base la formulación de MS 0.1X adicionada con 1 mM de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$  y 20  $\mu\text{M}$  de Fe-EDTA. Un total de 4 g  $\text{L}^{-1}$  de Phytigel™ (Sigma-Aldrich®) y 10 g  $\text{L}^{-1}$  de sacarosa. En tratamientos con pH = 5.70, se adicionó 3.5 mM de MES. La concentración de P varió entre 0.5 y 1000  $\mu\text{M}$ . Una vez solidificado el medio se cortó transversalmente a aproximadamente 3/4 de la altura de la caja Petri y se retiró y desechó la porción de gel más chica. Las semillas se sembraron en la zona central de la región del corte transversal y las cajas se incubaron en una cámara de crecimiento sin rejilla y recostadas uniformemente una sobre otra con un ángulo aproximado de 55°. De esta forma las plántulas crecieron con el brote prácticamente sin contacto con el medio de cultivo y con las raíces penetrando el medio y creciendo a través de este. Las plántulas cuyas raíces no penetraron el medio en los primeros 3 días postgerminación fueron descartadas para los análisis. Este sistema se utilizó para la evaluación fenotípica *in vitro* de plantas bajo diversos tratamientos de sales de P y toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$ . En los tratamientos para la evaluar la toxicidad por aluminio se ajustó el pH a 4.20, con 100  $\mu\text{M}$  de P ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ . La concentración de Phytigel en este medio fue de 6 g  $\text{L}^{-1}$ .

Las sales insolubles de P utilizadas inicialmente en este trabajo fueron fosfato de aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ), fosfato de hierro ( $\text{FePO}_4$ ), fosfato monocálcico [ $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ ], fosfato dicálcico [ $\text{CaHPO}_4$ ], fosfato tricálcico [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ], hidroxiapatita [ $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ ] y estruvita ( $\text{NH}_4\text{MgPO}_4$ ). Posteriormente se acotó a las sales de fosfato de hierro, fosfato de aluminio, fosfato tricálcico e hidroxiapatita; a concentraciones de 320, 480, 645 y 645  $\mu\text{M}$ , respectivamente. El pH de los tratamientos con sales de fosfato de aluminio y fosfato de hierro se justó a 4.50, mientras que para el fosfato tricálcico e hidroxiapatita se ajustó a 8.00.

### 4.4. Cultivo en sustrato

En todos los experimentos en sustrato se utilizaron recipientes de plásticos y se llevaron a cabo en invernadero o en cuartos de crecimiento. En los cuartos de crecimiento se mantuvo controlada temperatura a 23 °C con fotoperiodo 16/8 h (luz/obscuridad), mientras que en invernadero las condiciones fueron variables (no medidas).

#### **4.4.1. Sistema en sustrato para propagación de semillas**

Se utilizó una mezcla de perlita:vermiculita:peat moss (1:1:1). Se trasplantaron a sustrato plántulas germinadas *in vitro* de 6-12 dpv y se dejaron tapadas con plástico translucido por al menos dos días. Se regó con agua corriente cuando fuera necesario y se fertilizó con fertilizante triple 17 (N:P:K).

#### **4.4.2. Sistema en sustrato inorgánico inerte para evaluación de tratamientos de P**

Se utilizó una mezcla perlita:vermiculita (1:2) regada con solución nutritiva MS 0.1X modificada. Todos los experimentos utilizando este sistema se realizaron en bandejas de 50 pocillos cónicos independientes. Después de ensayos preliminares, se decidió trabajar únicamente con fosfato de aluminio e hidroxiapatita a 31 ppm. Tanto las concentraciones de nutrientes como de las sales insolubles de P utilizadas se establecieron con respecto al volumen de un pocillo (70 mL). Cada tratamiento con sal insoluble de P se preparó mezclando en seco un volumen conocido de sustrato con la cantidad correspondiente del compuesto de fósforo. El sustrato enriquecido con la sal insoluble de P se distribuyó en las bandejas de 50 pocillos. Cada bandeja contó con solo un tratamiento de P. Cuando el tratamiento de P fue  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , este se adicionó con la solución nutritiva. Cada pocillo se regó con 30 mL de la solución nutritiva de hidroponía 2.33X (Ver tabla). El pH de la solución nutritiva se ajustó a 9.0 para los tratamientos con fosfato tricálcico o hidroxiapatita, a pH = 7.0 para cuando se utilizó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , y a pH = 2.2 para fosfato de aluminio o fosfato de hierro (este pH se obtiene después de agregar 2.5 mL de HCl 3N por litro de solución nutritiva 2.33X a pH 5.0). Similarmente se agregó a cada pocillo 5 mL de solución 0.1% de Confidor® (Bayer Crop Science), un insecticida sistémico para el control de plagas. Las bandejas se dejaron tapadas por al menos tres días para permitir la homogenización por difusión de los componentes en solución. Después de este tiempo, con ayuda de una micropipeta, se sembraron de 5-10 semillas de *Arabidopsis* por pocillo. A los 12 dpv, se eliminaron plántulas de manera de dejar solamente una por pocillo. El riego se realizó como fuese necesario, en etapa vegetativa mediante microaspersión utilizando una pistola de fumigación, y por subirrigación después de iniciada la floración. Todos los riegos se hicieron con agua destilada. A cada pocillo se le adaptaron independientemente guías de madera para guiar el crecimiento de cada planta en floración y para permitir la cosecha de semillas por individuo. A continuación, se presenta los componentes de la solución nutritiva de hidroponía 1X.

Compuesto	Concentración (μM)
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	2061
KNO <sub>3</sub>	1879
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O	299
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2150
KI	0.5000
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	10
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.2067
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0400
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0420
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10
Na <sub>2</sub> EDTA · H <sub>2</sub> O	20
CaNO <sub>3</sub>	1000

#### 4.5. Generación de líneas sobreexpresantes homocigotas

Los genes *STOP1* y *ALMT1* se aislaron a partir de DNA genómico de *Arabidopsis thaliana* Col-0 silvestre, utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente. Las secuencias de los oligos fueron las siguientes:

Oligo	Secuencia
ALMT1.cl (Fw)	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCGATGGTCACTCAGCTCTCTCAAGTG-3'
ALMT1.cl (Rv)	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCCGCAAGATTATAGAGACGAGAC-3'
STOP1.cl (Fw)	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCTATGGAACTGAAGACGATTTGTGC-3'
STOP1.cl (Rv)	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGCCTTAGAGACTAGTATCTG-3'

La amplificación inicial de ambos genes por PCR se llevó a cabo con una polimerasa casera (94 °C 7 min, 30 ciclos [94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 3 min], 72 °C 7 min, 4 °C indefinido) en la siguiente mezcla de reacción: 2 μL de buffer 10X, 1.2 μL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 1 μL de cada oligo específico (10 μM), 2 μL de dNTP's (2 mM), 100 ng de DNA (1-2 μL), 2 μL de DNA polimerasa, y el volumen necesario de agua DEPC para aforar a 20 μL. Se comprobó visualmente en un gel de electroforesis en agarosa 1% con bromuro de etidio (0.25 μM) la presencia de un solo amplicón del tamaño esperado en cada caso. Además, se confirmó la identidad del amplicón mediante un análisis de restricción, utilizando al menos dos enzimas distintas por gen (*EcoRV* y *PvuII* para la construcción con *ALMT1*, y *Avall* y *PvuII* para la construcción con *STOP1*). Posteriormente se utilizó una polimerasa de alta fidelidad (*Pushion Hot Start High Fidelity DNA Polymerase*, Thermo Scientific™), siguiendo las

recomendaciones del fabricante, para amplificar por PCR los amplicones utilizados en la clonación en el vector donante.

El diseño de los iniciadores con sitios *attB* y la recombinación mediante el sistema Gateway® Technology se realizó siguiendo los lineamientos del fabricante (Invitrogen™). Se utilizó pDONOR™221 (Invitrogen™) como vector donante y pFASTG02 (Shimada *et al.*, 2010) como vector de destino. Las células electrocompetentes utilizadas fueron de *Escherichia coli* (DH5-Alpha) [para la generación de clones de entrada] y *Agrobacterium tumefaciens* (GPV2260) [para la generación de clones de expresión]. La transformación bacteriana se realizó por electroporación y se plaquearon en los medios de selección específicos con los antibióticos correspondientes a 100 µg L<sup>-1</sup>. En cada paso de generación de clonas se seleccionaron tres colonias independientes, se realizó PCR de colonia y se confirmó por análisis de restricción la identidad de cada gen inserto, respectivamente.

Una vez obtenidos los clones de expresión, se transformaron distintas líneas de Arabidopsis mediante la técnica de inmersión floral modificada (Martinez-Trujillo *et al.*, 2004). Líneas WT y *almt1* se transformaron con la construcción *p35S::ALMT1*, mientras que líneas WT y *stop1* con la construcción *p35S::STOP1*, creándose cuatro grupos de transformantes. Una vez generada la T0, se germinaron semillas de cada grupo en cajas Petri con glufosinato de amonio 100 pM (Sigma-Aldrich®). Se seleccionaron de 20-24 individuos con resistencia al agente de selección y se propagaron en suelo. Utilizando el agente de selección, se realizó un análisis de segregación de las líneas T1 y se propagaron solo aquellas con una segregación cercana a 3:1. Finalmente se evaluó la segregación de individuos de cada línea T2, y se seleccionaron para los experimentos solo los lotes de semillas con individuos que no presentaron segregación de la resistencia al herbicida, es decir, semillas de líneas homocigotas.

#### **4.6. Extracción de material genético**

En todos los casos, una vez extraído el material genético, se corrieron electroforesis en gel de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio para la visualización de integridad. Además, se estimaron los parámetros de pureza 260/280 y 260/230 y la concentración de ácidos nucleicos mediante espectrometría (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific™). Las muestras de ácidos nucleicos se mantuvieron guardadas a -80 °C hasta su uso.

#### **4.6.1. DNA plasmídico**

Para extracción de DNA plasmídico se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN®) y una microcentrífuga, siguiéndose las indicaciones del fabricante.

#### **4.6.2. DNA genómico**

La extracción de DNA genómico de Arabidopsis se realizó por el método de CTAB. Primeramente, se pulverizaron plantas completas en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se dispuso en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Por cada 100 mg de tejido pulverizado se agregó 1 mL de buffer de extracción (2% CTAB, 100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl y 20 mM EDTA). Se mezcló por inversión e incubó en agitación (750 rpm) a 55 °C por 20 min. Se centrifugó a 15,000 rpm por 13 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se añadió un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 15,000 rpm por 13 min. Se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo y se añadió una tercera parte de volumen de acetato de sodio 3M (pH = 5.2) y dos volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló por inversión e incubó a -20 °C por 1 h. Se centrifugó a 15,000 rpm por 13 min y descartó el sobrenadante. Se lavó dos veces con etanol al 70% la pastilla generada y posteriormente se centrifugó a 7,600 rpm por 2 min. Se retiró el etanol con una micropipeta y se dejó secar el pellet en campana. Finalmente, se resuspendió el pellet en agua DEPC.

#### **4.6.3. RNA total**

La extracción de RNA total de Arabidopsis se realizó por el método de TRIzol™ (Invitrogen™). Se pulverizó el tejido fresco en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y se dispuso en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se añadió 1 mL de TRIzol™ por cada 100 mg de tejido pulverizado, se homogenizó por vortex e incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se recuperó la solución en un tubo nuevo, se añadieron 200 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) por cada mL de TRIzol™ utilizado, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo frío. Se añadieron 500 µL de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 75%, se dio un pulso de vortex y se centrifugó a 7,500 rpm por 5 min a 4 °C. Se retiró el etanol y se dejó secar la pastilla en campana. Por último, se resuspendió la pastilla en agua DEPC.

## 4.7. qRT-PCR

Se extrajo RNA total de raíces de plantas de 14 dpq crecidas en deficiencia de P (10  $\mu$ M) de las siguientes líneas: WT, *almt1*, *stop1*, sobreexpresantes de *STOP1* (L6.5, L7.1, L18, L21.3 y L22.3) y sobreexpresantes de *ALMT1* (27.4, L30.2, L38.1, L39.3, L41.5 y L52.2). El RNA se cuantificó por espectrometría y se corrió un gel de electroforesis disponiendo cantidades iguales de cada muestra. En función de la intensidad de bandeo, se corrigió manualmente la cantidad de material dispuesto por pozo hasta que la intensidad de bandeo en el gel fuera aproximadamente similar en todas las muestras.

Los oligonucleótidos utilizados fueron:

Oligo	Secuencia
ALMT1.RT (Fw)	5'-CTTTGTGCAAGCTGCGTTGTC-3'
ALMT1.RT (Rv)	5'-AATGCTCCGGAATCCGACT-3'
ACT2.RT (Fw)	5'-GAATTGTCTCGTTGTCCTCCTCAC-3'
ACT2.RT (Rv)	5'-TGCAAATCCAGCCTTCACCATAC-3'

Se sintetizaron los cDNAs con la siguiente mezcla de reacción: 0.5  $\mu$ L de cada oligo Fw (10  $\mu$ M), 300 ng de RNA (0.75-4  $\mu$ L) y el volumen respectivo de agua DEPC para aforar a 6.5  $\mu$ L. Se mezcló por pipeteo y se incubó a 65 °C por 5 min, en hielo por 5 min y se añadió 1  $\mu$ L de DTT (0.1 M), 2  $\mu$ L Buffer 5X, 1  $\mu$ L dNTPs (10 mM) y 0.25  $\mu$ L de enzima SuperScript III (Invitrogen™). Se mezcló y se incubó en termociclador (25 °C 1 min, 50 °C 1 h, 70 °C 15 min, 4 °C indefinido).

La mezcla de reacción para el qPCR fue la siguiente: 5  $\mu$ L de SensiFAST™, 0.4  $\mu$ L de oligo Fw y Rv específico, respectivamente; 1  $\mu$ L de cDNA y 3.2  $\mu$ L de agua DEPC. El programa de amplificación fue el siguiente: 95 °C por 2 min y 40 ciclos (95 °C 5 s, 65 °C 10 s, 72 °C 10 s).

El qPCR se realizó en un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) mediante detección de SYBR® Green. La expresión relativa se calculó mediante el método Ct de cuantificación relativa. Se realizaron dos replicados biológicos para cada línea y dos replicados técnicos.

## 4.8. Cuantificación de protones exudados por la raíz

Se crecieron las distintas líneas de Arabidopsis en cajas Petri con agar hasta los 14 dpq en condiciones de suficiencia de P (500  $\mu$ M de Pi, pH = 5.70) y después se hizo un trasplante ya sea a cajas con condiciones similares o en deficiencia de P (10  $\mu$ M de Pi, pH = 5.70) por tres días.

Posteriormente, las plantas de 17 dpg, en grupos de cinco individuos, se transfirieron por 24 h a placas de 24 pocillos (Corning® Costar®) con 1000  $\mu$ L medio líquido suficiente (500  $\mu$ M) o deficiente (0  $\mu$ M) en Pi, adicionado como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . En seguida las placas se dispusieron en un agitador orbital a 100 rpm por 7 min y se retiraron las plantas. De cada uno de los pocillos se tomaron 400  $\mu$ L y se repartieron en dos pocillos en una placa de 96 pozos (Corning® Costar®) para su análisis. La formulación del medio líquido fue MS 0.1X (sin MES, vitaminas ni sacarosa), 0 o 500  $\mu$ M de Pi y 0.15 mM de púrpura de bromocresol (rango de sensibilidad de pH 5.2 – 6.8). El pH del medio se ajustó a 6.6 y se esterilizó por filtración (Miller® GP 0.22  $\mu$ m). Se preparó una curva estándar a pH 5.1, 5.4, 5.7, 6.0, 6.3 y 6.6. El cambio de pH se calculó mediante la medición de la absorbancia a 430 nm en el espectrómetro TECAN® Infinite M1000 y la asociación con la curva estándar (por cuadruplicado). La conversión de unidades de pH a equivalentes de  $\text{H}^+$  exudados al medio se realizó mediante la asociación con curvas de titulación de las dos formulaciones de medio nutritivos con púrpura de bromocresol (por triplicado). Los experimentos se hicieron por cuadruplicado, con dos réplicas técnicas.

#### **4.9. Cuantificación de ácidos orgánicos exudados por la raíz**

Las condiciones de crecimiento de las plantas y formulación de los medios fueron similares a las de los ensayos de cuantificación de protones, excepto en que el medio líquido de exudación careció del indicador de pH y el tiempo de incubación fue de solamente 2 h. De cada pocillo se recuperaron 700  $\mu$ L de medio de exudación en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se liofilizaron y se guardaron a -80 °C para su análisis por UPLC-HRMS (*Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to High Resolution Mass Spectrometry*) [ANEXOS Información A1]. Los ácidos orgánicos evaluados fueron: malato, citrato, lactato, malonato, fumarato, succinato, alfa-cetoglutarato y piruvato. Los experimentos se hicieron por cuadruplicado, con tres réplicas técnicas. Todo el proceso, hasta la liofilización, se llevó a cabo en condiciones de esterilidad.

#### **4.10. Localización espacial de citrato y malato en exudado y ápice de raíz**

Las plantas fueron crecidas en medio semisólido *in vitro* en suficiencia de Pi (500  $\mu$ M) hasta los 7 dpg, después se realizó un trasplante a tratamiento similar o de deficiencia de Pi (10  $\mu$ M) por tres días. Las plantas de 10 dpg se incubaron 7 h sobre una membrana de nylon (BrightStar®-Plus Membranes, Applied Biosystems®), unida a la placa de MALDI-MSI por una cinta doble cara,



saturada con solución suficiente (500  $\mu\text{M}$ ) o deficiente (0  $\mu\text{M}$ ) en Pi, según correspondiera, y dentro de una caja Petri. La formulación de las soluciones utilizadas fue similar a las del medio de exudación en la cuantificación de ácidos orgánicos. La placa MALDI-MSI con las plantas se incubó en la misma cámara de crecimiento donde se crecieron las plantas, a una inclinación de 55° y en condiciones de luz continua. Después de cumplido el tiempo de incubación, se removieron cuidadosamente los brotes con un bisturí, se retiró la placa a una caja Petri nueva y seca, y se dejó secar la membrana con las raíces a temperatura ambiente en campana de flujo laminar por 15 min. La placa seca se fotografió, se guardó en una caja Petri sellada y se procesó para su análisis por MALDI-MSI (ANEXOS Información A2). Se realizaron tres réplicas biológicas para cada uno de los genotipos por cada uno de los tratamientos y para citrato y malato por separado. Todo el proceso se realizó en campana de flujo laminar; sin embargo, a partir de la incubación de las plantas en la placa de MALDI-MSI, no en condiciones de esterilidad.

#### **4.11. Obtención y análisis de datos**

La arquitectura radicular se caracterizó con el software semiautomático RootNav (Pound *et al.*, 2013) [para la raíz principal y raíces secundarias de primer orden] e ImageJ (Schneider *et al.*, 2012) [para las raíces secundarias de segundo y tercer orden]. El área foliar y las variables morfológicas de la semilla se evaluaron con los softwares Easy Leaf Area (Easlon & Bloom, 2014) y SmartGrain (Tanabata *et al.*, 2012), respectivamente. Todos estos softwares realizan el análisis a partir de fotografías proporcionadas por el usuario. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon D5300 con el objetivo AF-S Micro-Nikkor 60mm f/2.8G ED, o AF-S Nikkor 18-140mm f/3.5-5.6G ED VR. Cuando fue necesario, las fotografías se modificaron (e.g. contraste, brillo, cambio de color y dimensiones) con el programa *GNU Image Manipulation Program* (Kimball *et al.*, 2017). Todos los datos se procesaron en RStudio (R Core Team, 2018). Se utilizaron los paquetes “ggplot2” (Wickham, 2016), “RColorBrewer” (Neuwirth, 2014), “gridExtra” (Auguie, 2017), “agricolae” (de Mendiburu, 2017) y “dplyr” (Wickham *et al.*, 2018). Para los análisis de segregación se utilizó la prueba chi-cuadrada, considerándose líneas con segregación 3:1 las que obtuvieran un valor  $p > 0.80$  bajo la hipótesis nula de segregación 3:1. Para los contrastes entre variables de arquitectura radicular, área foliar, características de semilla y cuantificación de exudación de ácidos orgánicos y protones; se realizó ANOVA y prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). Para los análisis de correlación, se utilizó un modelo lineal y se presenta el coeficiente ajustado de correlación de Pearson  $R^2$ . Los detalles del análisis de datos con respecto a UPLC-HRMS y MALDI-MSI se resumen en ANEXOS (Información A.1 y A.2).

## V. RESULTADOS

### 5.1. Validación de los sistemas de cultivo

Para la validación de los sistemas de cultivo *in vitro* y de hidropónia, se utilizaron únicamente plantas de *Arabidopsis silvestre* y P soluble en forma de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

#### 5.1.1. Validación del sistema *in vitro*

Se diseñó y validó un sistema *in vitro* a base de goma gellan que presentó las siguientes características (ANEXOS Figura A1):

- Estabilidad del gel en un rango de pH de 4.0 – 9.0.
- El gel permite la penetración y el crecimiento radicular a través de él, permitiendo que el sistema radicular este en completo contacto con los tratamientos de sales insolubles de P.
- Debido a la limpieza con alumina de impurezas de P del gelificante, se aseguró que prácticamente todo el P en los tratamientos fuera provisto por la sal insoluble dispuesta.
- El corte en el medio de cultivo a la altura del sitio de siembra permitió que el brote tuviera un contacto mínimo con el medio de cultivo.
- La goma gellan crea geles más cristalinos que el agar, lo cual permite obtener imágenes más nítidas de la arquitectura radicular y facilita la identificación de contaminación en el medio.
- Se logró homogeneidad en la distribución de las sales insolubles de P en el gel solidificado.

El sistema *in vitro* se validó mediante una cinética a 24 días de diversos tratamientos de P soluble en un rango de amplio de concentraciones (0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000  $\mu\text{M}$ ) y comparando los rasgos de arquitectura radicular y brote de plantas silvestres con los reportados en los estudios de nutrición de P. Se encontró una relación directamente proporcional entre la concentración de P en el medio y la longitud de la raíz primaria, la longitud total del sistema radicular, la longitud promedio de raíces laterales y el área foliar, respectivamente (Figura 5, ANEXOS Figura A1A, Tabla 2). La relación fue inversamente proporcional entre la concentración de P en el medio y la densidad de raíces laterales; mientras que el número total y longitud promedio de raíces laterales fue mayor en los tratamientos de 0.5 – 10  $\mu\text{M}$  de P a los 8 dpv, pero se invirtió esta tendencia en los días posteriores (Figura 5, Tabla 2). También se observó una clara acumulación de antocianinas en el

brote en las plántulas en los tratamientos con 0.5 – 10  $\mu\text{M}$  de P (ANEXOS Figura A1-A), además de una mayor proliferación de pelos radiculares con respecto a los tratamientos con mayor concentración de P.

Tabla 2. Mediciones de variables de raíz y brote en función de la concentración de P de plantas *in vitro*

Tratamiento de P ( $\mu\text{M}$ )	Área foliar ( $\text{cm}^2$ ) 24 dpg	Raíz primaria (mm) 24 dpg	Número de laterales 24 dpg	Longitud total (mm) 24 dpg	Densidad de laterales 24 dpg	Longitud de laterales (mm)	
						8 dpg	24 dpg
0.5	0.042 (0.001)	5.0 (0.6)	10.0 (0.3)	40.8 (2.5)	25.1 (2.7)	1.4 (0.2)	3.6 (0.2)
1	0.043 (0.002)	4.7 (0.4)	9.2 (0.6)	35.6 (2.6)	23.5 (2.9)	1.1 (0.2)	3.4 (0.3)
5	0.044 (0.001)	10.6 (0.6)	9.6 (0.7)	62.4 (4.0)	9.9 (1.4)	1.1 (0.2)	5.6 (0.3)
10	0.061 (0.002)	11.2 (1.1)	8.8 (0.5)	87.5 (4.2)	11.2 (1.9)	1.7 (0.3)	8.9 (0.4)
50	0.201 (0.013)	21.3 (1.7)	12.5 (1.0)	154.3 (12.9)	6.4 (0.5)	1.0 (0.2)	10.6 (0.4)
100	0.329 (0.026)	35.6 (1.5)	14.6 (1.2)	160.6 (14.1)	4.1 (0.3)	0.6 (0.2)	8.3 (0.6)
500	0.302 (0.022)	60.0 (1.9)	8.8 (0.9)	149.0 (13.0)	1.4 (0.1)	0.5 (0.2)	9.8 (0.5)
1000	0.341 (0.026)	56.3 (1.6)	8.9 (0.9)	155.0 (12.0)	1.5 (0.1)	0.6 (0.2)	11.3 (0.5)

Se muestra la media de cada una de las variables con el SEM entre paréntesis

La respuesta *in vitro* de *Arabidopsis* a la deficiencia de P en el sistema desarrollado es cualitativamente equivalente a lo reportado en la literatura (Ver antecedentes). Por lo tanto, se siguió con la optimización de las concentraciones de sales insolubles de P, tal que limitaran la generación de área foliar similar a con la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de P soluble. Estas concentraciones fueron 480  $\mu\text{M}$  para fosfato de aluminio (pH = 4.50), 320  $\mu\text{M}$  para fosfato de hierro (pH = 4.50), y 645  $\mu\text{M}$  para fosfato tricálcico e hidroxapatita (pH = 8.00), respectivamente (ANEXOS Figura A2).

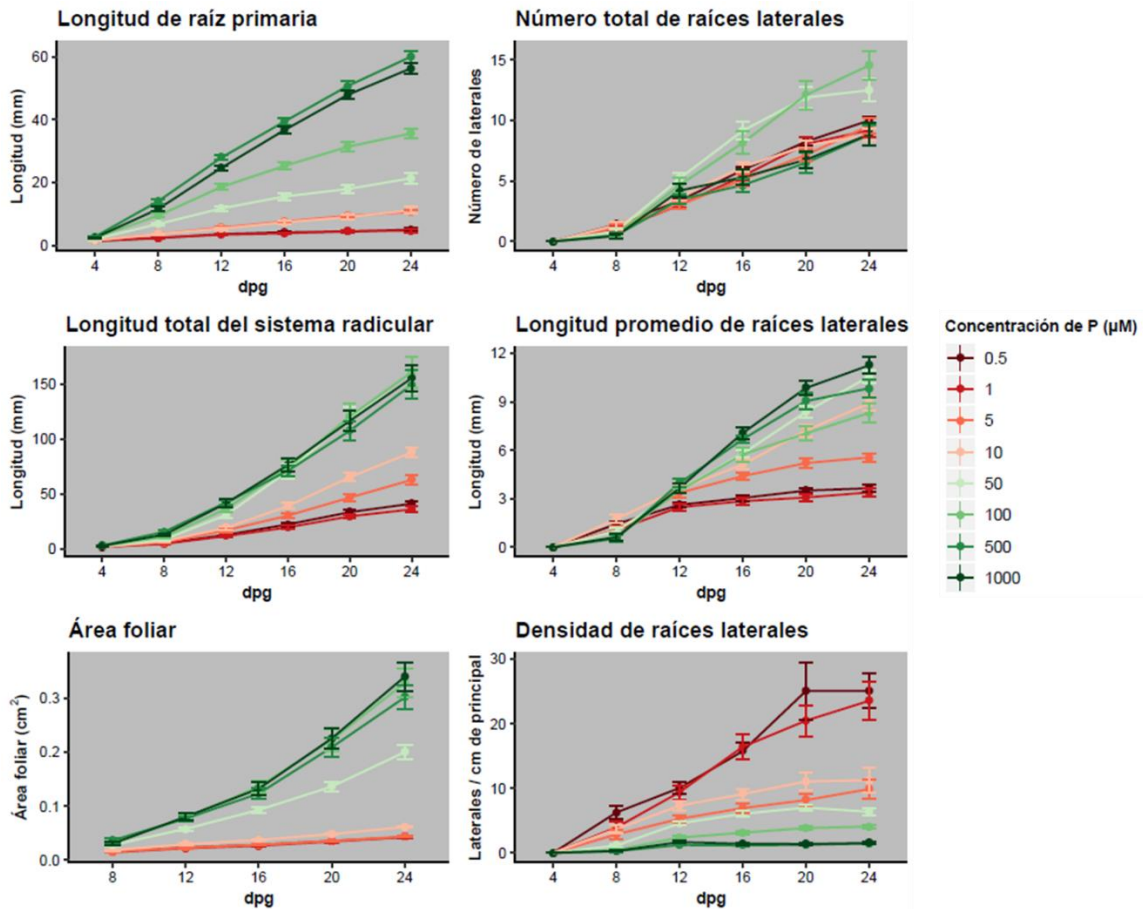


Figura 5. Validación del sistema *in vitro*. Se utilizaron plantas silvestres de Arabidopsis, tomándose datos cada cuatro días. Se evaluaron ocho concentraciones de P adicionado como KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH = 5.70. Las barras de error representan SEM (n = 20).

### 5.1.2. Validación del sistema de hidroponía en sustrato

Se diseñó y validó un sistema de hidroponía en sustrato a base de vermiculita y perlita que presentó las siguientes características:

- El sustrato se proporciona estéril, posee una excelente capacidad de intercambio iónico y de retención de humedad, y carece prácticamente de impurezas de P disponible. Si no se adiciona una fuente de P, las plántulas presentan síntomas de deficiencia de P en brote y mueren a las pocas semanas de germinadas.
- El sustrato es totalmente de origen mineral (roca expandida), por lo que no hay interacción con componentes orgánicos, los cuales contribuyen a aumentar la biodisponibilidad de P mineral.

- El sustrato posee pH neutro, y su acidificación o alcalinización se logra fácilmente, mediante la adición de ácido o base a la solución del primer riego.
- Debido a su esterilidad nutrimental, el perfil nutricional en este sistema es fácilmente personalizable mediante fertirriego.
- El tamaño de partícula del sustrato es homogéneo, por lo que la mezcla con las sales insolubles de P se lleva a cabo uniformemente.
- Las plantas de Arabidopsis son capaces de completar su ciclo de vida en este sistema sin ningún problema.

El sistema de hidroponía en sustrato se validó mediante una cinética con tratamientos de 0.8, 4, 8, 40, 80, 400 y 800  $\mu\text{M}$  de P soluble (con respecto al volumen de sustrato en el pocillo). Se sembraron directamente en sustrato semillas de plantas silvestres y se crecieron hasta que completaron su ciclo de vida. Las variables evaluadas fueron área foliar, tiempo de floración y varias características de las semillas producidas. Se encontró una relación directamente proporcional entre la concentración de P del tratamiento y el tiempo de floración, la generación de área foliar y la semilla total producida por planta (Figura 6, Tabla 3). Los tratamientos con las concentraciones 0.8-8 y 400-800  $\mu\text{M}$  de P, respectivamente, no presentaron diferencias significativas entre sí en ninguna de las variables evaluadas (Figura 6, Tabla 3). Los cambios de mayor magnitud tanto en área foliar a los 25 dpg (diferencia de 2.43 veces) como en el tiempo de floración del 50% de los individuos (diferencia de 24 días) se dieron entre los tratamientos de 80 y 400  $\mu\text{M}$  de P (Tabla 3). Por su parte, las plantas bajo las concentraciones de 0.8-8  $\mu\text{M}$  de P producen semilla solo del 5-7% de su potencial (referido como el obtenido bajo los dos tratamientos más altos de P), mientras que los tratamientos de 40 y 80  $\mu\text{M}$  de P producen al 13 y 25%, respectivamente (Tabla 3).

No se presentaron diferencias significativas en el peso de 100 semillas ni el área de semilla; sin embargo, se encontraron diferencias de pequeña magnitud, pero estadísticamente significativas, en el cociente longitud:ancho de las semillas entre algunos tratamientos (Figura 6). También se observó la acumulación de antocianinas en los tratamientos de 0.8, 4 y 8  $\mu\text{M}$  de P en las primeras semanas de crecimiento.

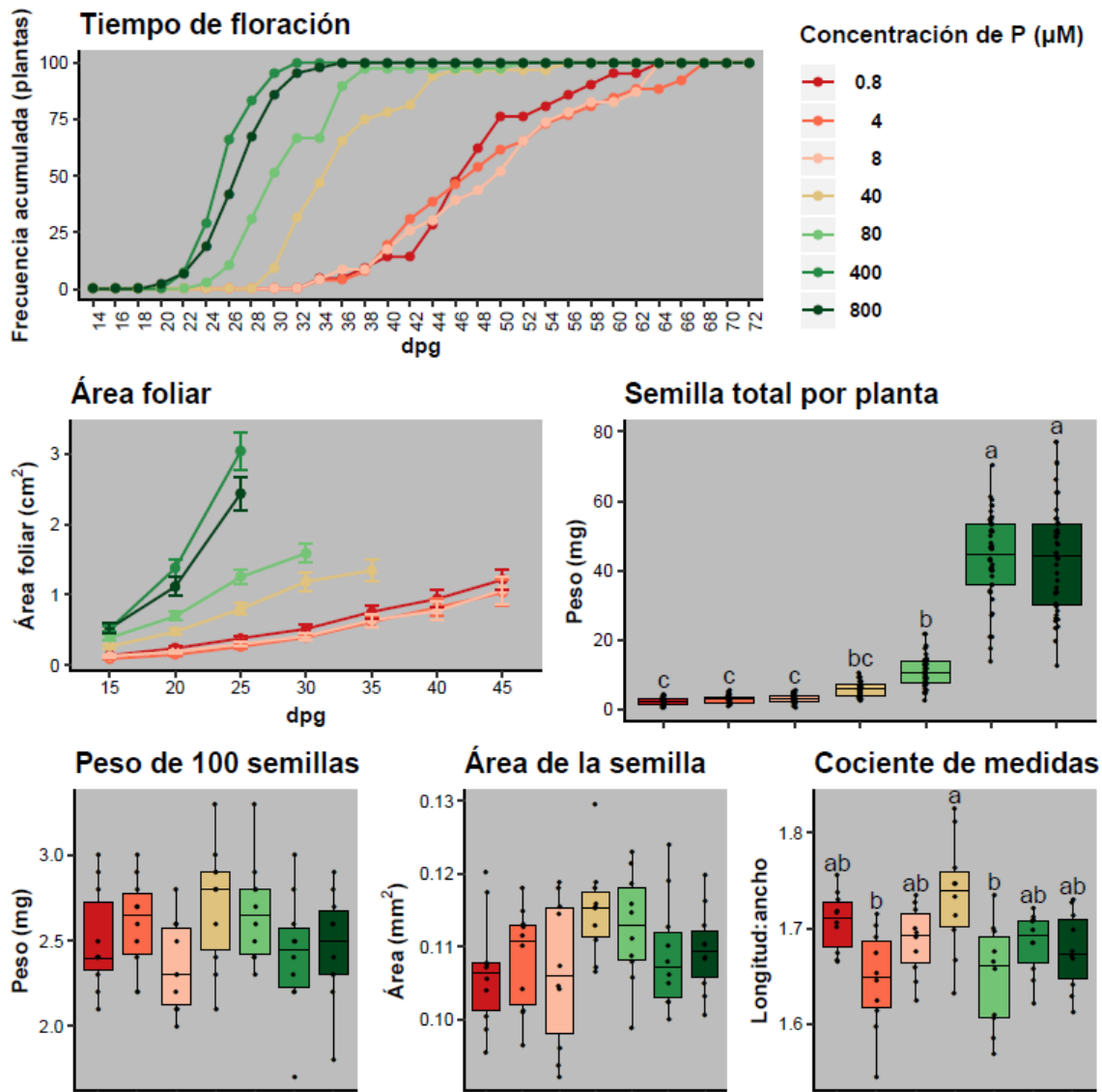
**Tabla 3. Mediciones de área foliar, floración y semilla producida en función de la concentración de P de plantas en hidroponía en sustrato**

Tratamiento de P ( $\mu\text{M}$ )	Área foliar 25 dpg ( $\text{cm}^2$ )	Floración $\geq 50\%*$ (dpg)	Semilla producida (mg)
0.8	0.38 (0.04)	48	2.2 (0.30)
4	0.26 (0.03)	48	2.9 (0.27)
8	0.30 (0.04)	50	2.9 (0.30)
40	0.80 (0.08)	36	5.8 (0.42)
80	1.25 (0.10)	30	11.0 (0.75)
400	3.04 (0.27)	26	43.8 (1.89)
800	2.44 (0.24)	28	43.8 (2.50)

Se muestra la media de cada una de las variables con el SEM entre paréntesis

\*Se reporta el primer día postgerminación en el cual la proporción acumulada de individuos que florecieron en ese tratamiento fue  $\geq 50\%$ .

De manera similar al sistema *in vitro*, la respuesta a la deficiencia de P de Arabidopsis en el sistema hidropónico es consistente con lo reportado (Ver antecedentes). En concreto, la deficiencia de P disminuye la generación de biomasa en etapa vegetativa, ocasiona retraso en la floración y disminuye la producción de semilla. Se siguió con la optimización de las concentraciones de sales insolubles de P; buscándose que el área foliar, el tiempo de floración y la producción de semilla por planta contrastaran con el tratamiento de 1 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Estas concentraciones fueron de 1 mM para fosfato de aluminio, fosfato de hierro e hidroxapatita; sin embargo, no para fosfato tricálcico (ANEXOS Figura A3). Se decidió trabajar con la sal más contrastante característica de cada tipo de suelo: fosfato de aluminio para pH ácido e hidroxapatita para pH neutro/alcalino.



**Figura 6. Validación del sistema de hidroponía en sustrato.** Se utilizaron plantas silvestres de *Arabidopsis*, tomándose datos cada dos días para el tiempo de floración y cada 5 días para el área foliar. Las mediciones del área foliar se llevaron a cabo hasta que florecieron más del 50% de las plantas en el tratamiento. Se evaluaron siete concentraciones de P adicionado como  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , en pH neutro. Las barras de error en la cinética del área foliar representan SEM. Inicialmente se contó con 50 plantas en cada tratamiento; sin embargo, para los tratamientos de 0.8, 4, 8, 40, 80, 400 y 800  $\mu\text{M}$  de P solo 18, 21, 21, 28, 38, 44 y 42 individuos completaron su ciclo de vida, respectivamente. Para el peso de 100 semillas, área y cociente longitud:ancho de las semillas, se tomaron muestras de semillas pertenecientes a 10 individuos elegidos al azar por tratamiento. Para los gráficos de diagrama de caja y bigote, los grupos estadísticos se encuentran representados con letras y fueron determinados mediante ANOVA-Tukey HSD (valor de  $p < 0.05$ ). Este experimento se llevó a cabo en un cuarto de cultivo con temperatura controlada a 23 °C y fotoperiodo 16:8 (luz:oscuridad).

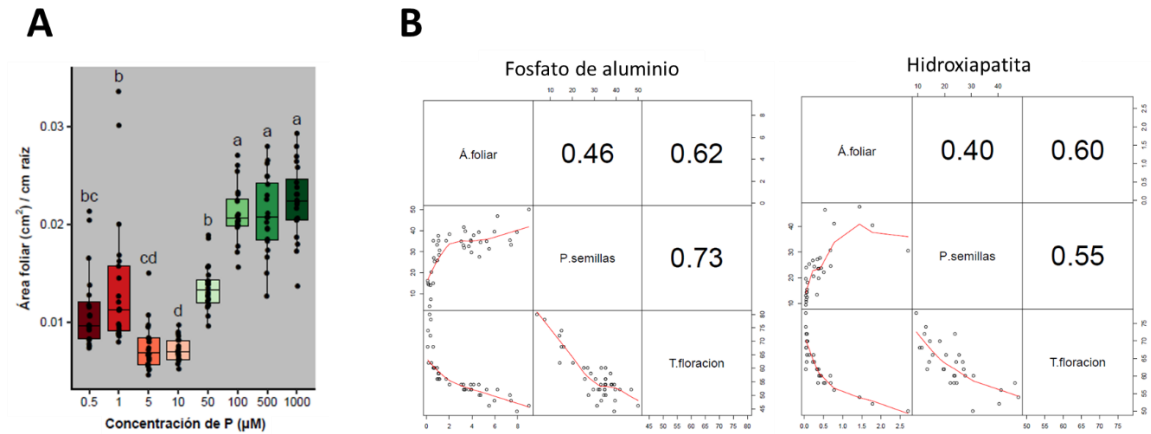
## 5.2. Asociación entre variables descriptivas y variables de productividad

Con los datos obtenidos en la validación de ambos sistemas, se planteó buscar variables descriptivas (variables de ASR *in vitro*; y área foliar y tiempo de floración en hidroponía en sustrato) que correlacionaran con las principales variables de productividad en cada sistema (área foliar *in vitro* y producción de semilla en hidroponía en sustrato).

En el sistema *in vitro*, la única correlación importante que se encontró con el área foliar fue la longitud total del sistema radicular (ANEXOS Figura A4). Estas dos variables presentan una correlación positiva entre sí. Por tanto, se propuso al cociente de área foliar:longitud total del sistema radicular como un parámetro de eficiencia en la generación de área foliar dado un sistema radicular (Figura 7A). Sin embargo, esta correlación no se mantiene en todos los tratamientos: a concentraciones de 0.5-5  $\mu\text{M}$  de P el  $R^2 < 0.15$ , a 10  $\mu\text{M}$  de P el  $R^2 = 0.41$ , y de 500-1000  $\mu\text{M}$  de P el  $R^2 \geq 0.69$ . Además, este parámetro de eficiencia varía significativamente entre algunos de los tratamientos (Figura 7A). Por tanto, el índice de eficiencia de generación de área foliar propuesto, aunque probablemente útil al comparar genotipos bajo un mismo tratamiento, debe tomarse con precaución para hacer comparaciones entre diferentes condiciones de disponibilidad de  $\text{P}_i$ .

En el sistema hidropónico, no se encontró ninguna correlación alta entre la producción de semilla y el área foliar (20 dpq) o el tiempo de floración ( $R^2 < 0.30$ ) en el experimento de validación con la sal soluble de P (Experimento de la Figura 6). Se procedió a analizar de la misma manera los datos de los experimentos donde se utilizaron las sales insolubles como única fuente de P (Experimento de la Figura A3, en ANEXOS). Interesantemente, solo se encontró una correlación importante ( $R^2 > 0.40$ ) entre las tres variables evaluadas en los tratamientos de fosfato de aluminio e hidroxapatita (Figura 7B). El peso de las semillas producidas tiene una relación positiva con el área foliar, y negativa con el tiempo de floración. Estas observaciones validan en cierta medida el uso del área foliar como variable de rendimiento en los experimentos *in vitro*.

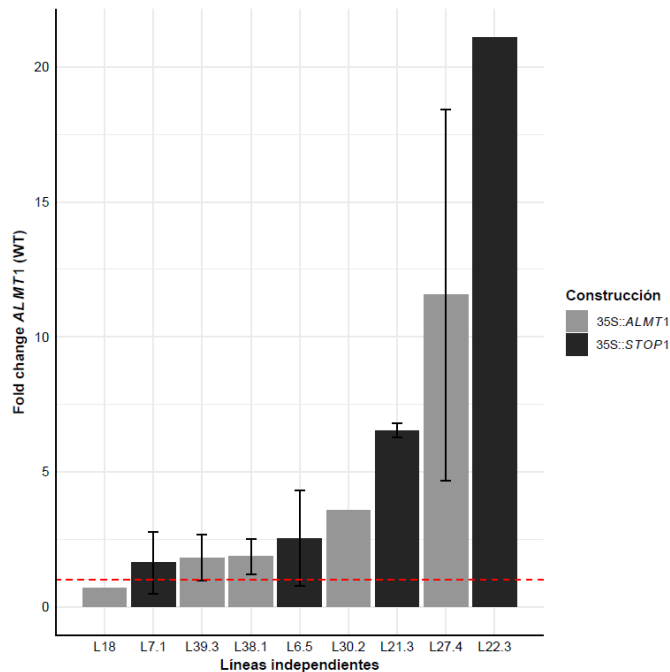




**Figura 7. Asociación entre variables descriptivas y de productividad. (A)** Cociente área foliar: longitud del sistema radicular como índice de eficiencia en el sistema *in vitro*, con  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  como fuente de P. **(B)** Correlación entre la producción de semilla, área foliar (40 dpj) y el tiempo de floración en el sistema de hidroponía en sustrato, con fosfato de aluminio (izquierda) o hidroxiapatita (derecha) como fuentes de P. Á.foliar = área foliar, P.semillas = peso de semillas, T.floración = tiempo de floración.

### 5.3. Selección de líneas sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1*

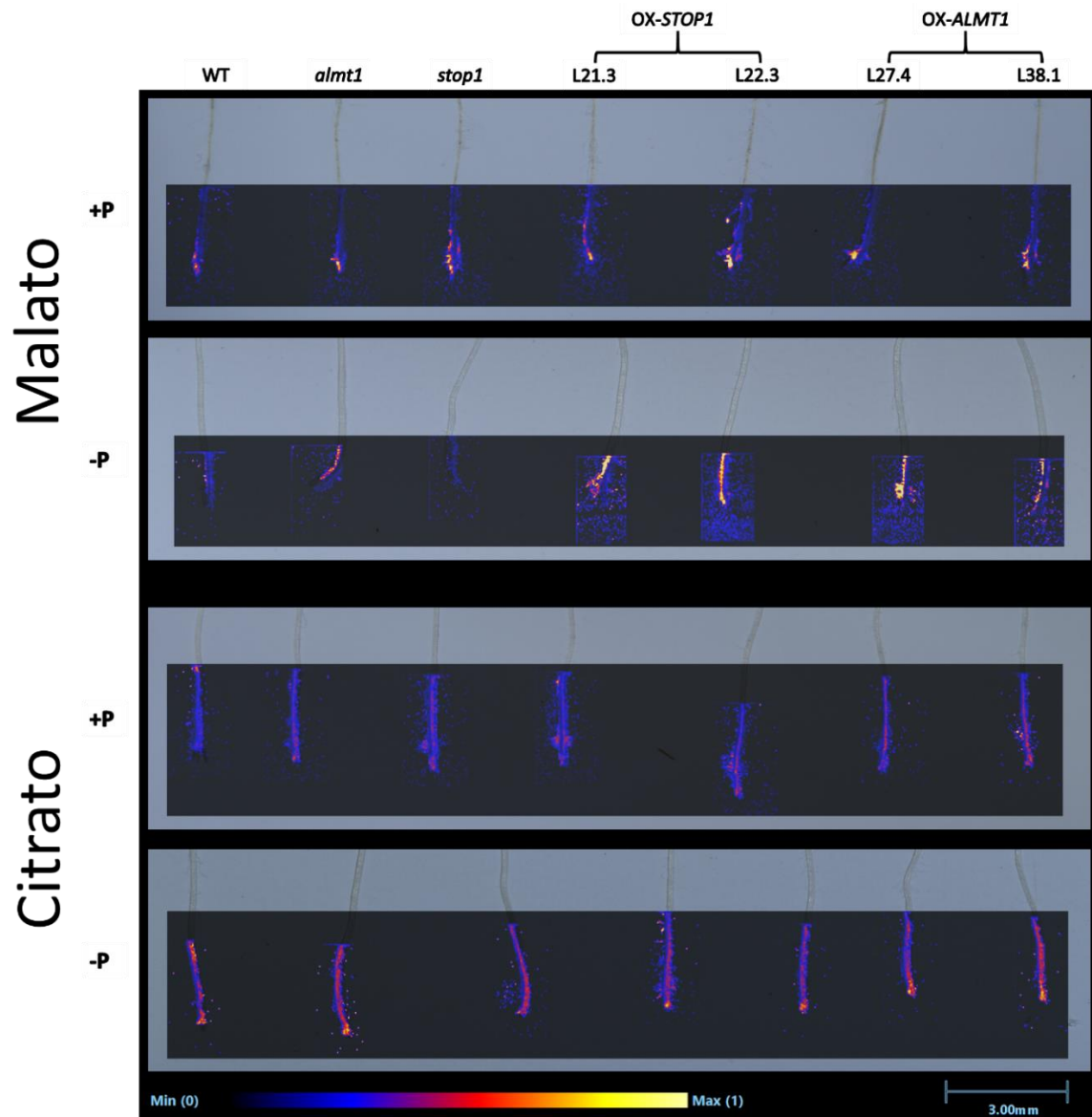
Se obtuvieron 9 y 7 líneas transformadas con los vectores de sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* con segregación 3:1, respectivamente. Se seleccionaron al azar 5 líneas de cada gen para el análisis de la expresión de *ALMT1* en sistema radicular en -P por qRT-PCR. De estas se seleccionaron tres líneas sobreexpresantes de cada gen con respecto a los niveles más altos de expresión (Figura 8). Se eligieron las líneas L27.4, L38.1 y L39.3 de la construcción p35S::*ALMT1*; y L6.5, L21.3 y L22.3 de la construcción p35S::*STOP1*. Estas líneas presentaron niveles de expresión de *ALMT1* aproximadamente 2-20 veces mayor que en las plantas silvestres.



**Figura 8. qRT-PCR de líneas transformadas.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de *ALMT1* en el sistema radicular en -P de líneas transformadas de *Arabidopsis*. Las barras representan la media del *fold change* con respecto a la de las plantas silvestres (línea roja punteada) y las barras de error representan el SEM. Se hicieron dos replicados biológicos y dos replicados técnicos. Se utilizó *ACT2* como control interno.

#### 5.4. Visualización y cuantificación de la exudación de ácidos orgánicos y H<sup>+</sup> por la raíz

Se espera que la sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* se refleje en mayores tasas de exudación de malato y de malato y citrato por parte de la raíz, respectivamente. MALDI-MSI es una técnica de espectrometría de masas diseñada para visualizar la distribución espacial de moléculas mediante el escaneo punto-a-punto de una muestra, para finalmente recrear un mapa de distribución e intensidad de señal de las moléculas de interés. Se realizó un análisis dirigido para la detección de malato y citrato tanto en tejido como en exudado de ápice de la raíz principal de plantas mutantes, silvestres y sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* bajo tratamientos de suficiencia (+P) y deficiencia (-P) de P. Las imágenes obtenidas por MALDI-MSI muestran una mayor acumulación en tejido y distribución de exudado de malato en las plantas sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* en -P con respecto a las plantas mutantes y silvestres (Figura 9). En +P no se detectaron diferencias entre los distintos genotipos (Figura 9). En las comparaciones entre tratamientos de P solo parecen contrastar los exudados de malato de las plantas sobreexpresantes, mientras que las plantas silvestres y mutantes permanecen aparentemente sin cambios tanto en exudados como en tejido (Figura 9). En las imágenes de citrato, no se perciben diferencias entre genotipos en ninguno de los dos tratamientos de P; sin embargo, resulta clara la mayor acumulación de citrato en tejido de todos los genotipos en -P con respecto a +P (Figura 9).



**Figura 9. MALDI-MSI de raíces de plantas silvestres, mutantes y sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* en tratamientos de P.** Se crecieron *in vitro* plantas en suficiencia de P (+P) hasta los 7 dpg, luego se trasplantaron a tratamientos de deficiencia de P (-P) o +P por 3 días. Estas plantas de 10 dpg se incubaron en membranas de nylon saturadas con solución +P o -P, según correspondiera, por 7 h; después de lo cual se llevó a cabo el análisis dirigido de MALDI-MSI para malato y citrato. Se presenta la imagen obtenida por MALDI-MSI superpuesta a una fotografía de los ápices radiculares obtenida momentos antes de iniciar el análisis. En todos los casos, el acomodo de las raíces de las plantas es, de izquierda a derecha: WT, *almt1*, *stop1*, L21.3, L22.3, L27.4 y L38.1. Las escalas de intensidad y longitud son similares para todas las imágenes. Se obtuvieron imágenes por triplicado (ANEXOS Figura A5).

Para apoyar los resultados cualitativos de MALDI-MSI, se cuantificaron citrato y malato en exudados de raíz. Además, debido a que los ácidos orgánicos en tejido provienen en gran medida del ciclo de Krebs, se cuantificaron fumarato, succinato y alfa-cetoglutarato. Se analizaron también oxalato y malonato, ácidos orgánicos de importancia en el minado de P (Ryan et al., 2001), este último junto con el malato es el ácido orgánico más abundante exudado por plantas como el garbanzo (Li &

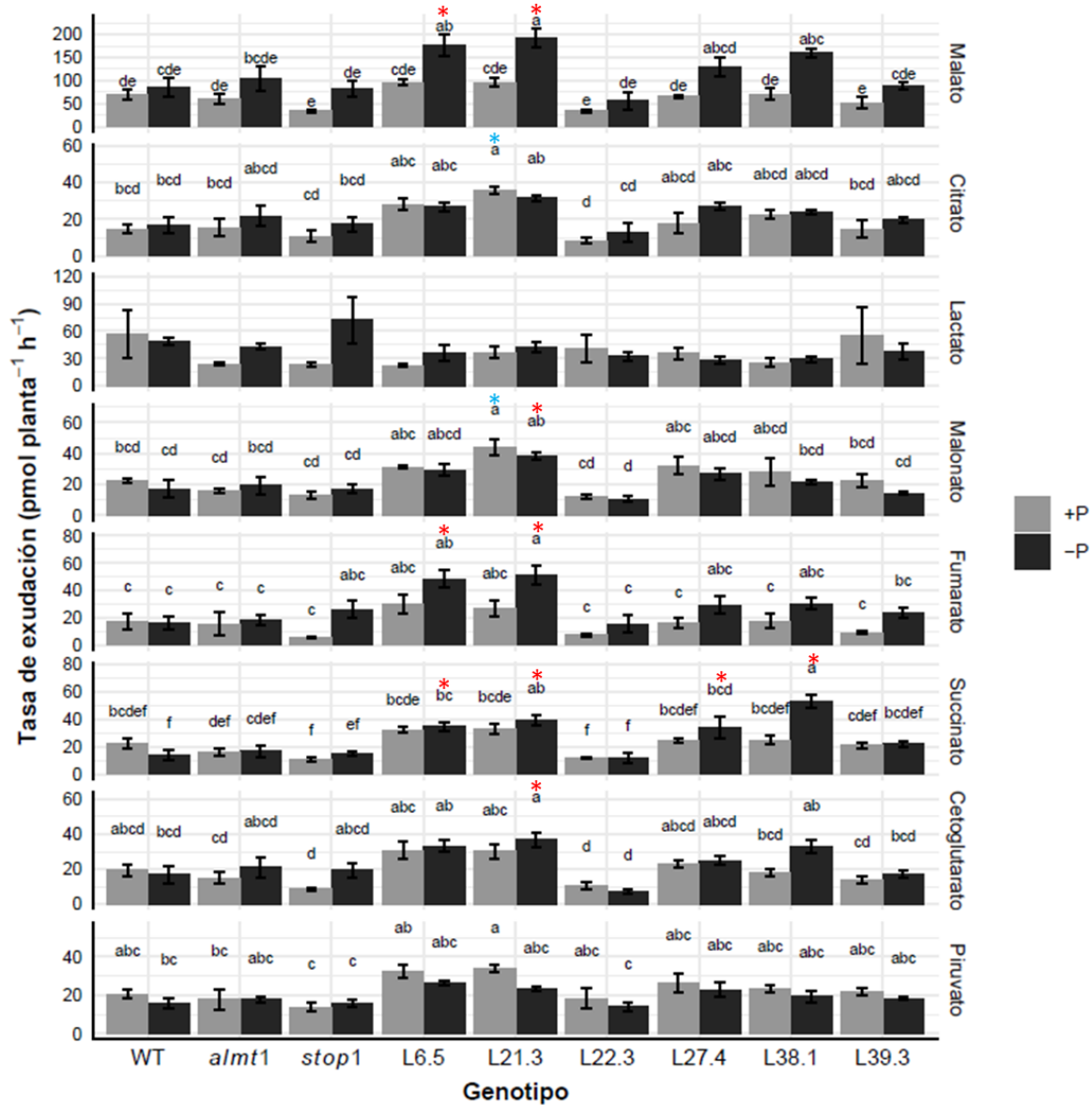
Copeland, 2000). Como controles se incluyeron en el análisis piruvato y lactato, compuestos de reducida importancia en el minado de P. Además, la exudación de ácido láctico es una respuesta a condiciones de anoxia (Choi & Roberts, 2007). Se obtuvieron exudados de raíz de plantas silvestres, mutantes y sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* bajo suficiencia o deficiencia de P; y se cuantificó malato, citrato, lactato, malonato, fumarato, succinato, alfa-cetoglutarato y piruvato por UPLC-HRMS (Figura 10). Los datos de cuantificación del oxalato se suprimieron, ya que su concentración en exudado se encontró por debajo de los niveles de cuantificación.

Solo las líneas L6.5 y L21.3, sobreexpresantes de *STOP1*, presentaron consistentemente tasas de exudación significativamente mayores en varios de los carboxilatos evaluados con respecto a plantas silvestres; mientras que las líneas L27.4 y L38.1, sobreexpresantes de *ALMT1*, solamente presentaron mayor tasa de exudación de succinato en -P. No se encontraron diferencias significativas entre las tasas de exudación de *alm1* y *stop1* y las de las plantas silvestres, ni tampoco entre sus tasas de exudación en +P y -P (Figura 10). A continuación, se presentan los *fold change* de las tasas de exudación de ácidos orgánicos estadísticamente significativas con respecto a la de las plantas silvestres en +P o -P según corresponda:

Genotipo	Tratamiento	<i>Fold change</i> de la tasa de exudación de ácidos orgánicos con diferencias significativas con respecto a los de plantas silvestres bajo el mismo tratamiento					
		Malato	Citrato	Malonato	Fumarato	Succinato	$\alpha$ -cetoglutarato
L6.5	-P	2.09	-	-	2.96	2.52	-
L21.3	+P	-	2.45	1.95	-	-	-
	-P	2.27	-	2.29	3.16	2.86	2.17
L27.4	-P	-	-	-	-	2.47	-
L38.1	-P	-	-	-	-	3.85	-

Las cuatro líneas enlistadas anteriormente fueron además las líneas sobreexpresantes más responsivas al tratamiento de deficiencia de P y que presentaron las mayores tasas de exudación de ácidos orgánicos totales en ese tratamiento, aunque solo estadísticamente significativas para L6.5 y L21.3 (ANEXOS Figura A6). Con respecto a plantas WT en +P y -P, respectivamente, el *fold change* de las tasas de exudación de carboxilatos totales fueron las siguientes:

<i>Fold change</i> de la tasa de exudación de ácidos orgánicos totales con respecto a los de plantas silvestres bajo el mismo tratamiento									
Genotipo / Tratamiento	WT	<i>alm1</i>	<i>stop1</i>	L6.5	L21.3	L22.3	L27.4	L38.1	L39.3
+P	1	0.73	0.49	1.24	1.38	0.59	0.99	0.95	0.87
-P	1	1.14	1.15	1.79	1.99	0.70	1.41	1.61	1.05



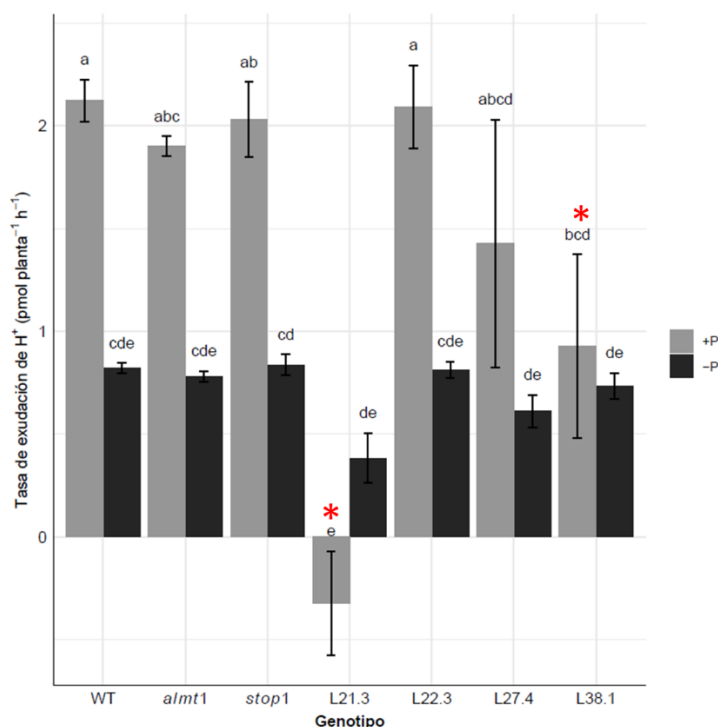
**Figura 10. Cuantificación por UPLC-HRMS de ácidos orgánicos provenientes de exudados de raíz bajo tratamientos de P.** Se crecieron *in vitro* plantas en suficiencia de P (+P) hasta los 15 dpg, luego se trasplantaron a tratamientos de deficiencia de P (-P) o +P por 3 días. Posteriormente se incubaron 2 h en medio líquido +P o -P y se procesó el exudado para la cuantificación de ácidos orgánicos. Los contrastes estadísticos se realizaron para cada uno de los ácidos orgánicos, incluyendo todos los genotipos y ambos tratamientos de P. Los grupos estadísticos se encuentran representados con letras y fueron determinados mediante ANOVA-Tukey HSD (valor de  $p < 0.05$ ). Las barras de error representan el SEM ( $n = 4$ ). Los asteriscos azules (\*) y rojos (\*) indican los genotipos cuyas tasas de exudación difieren significativamente a la de las plantas silvestres en los tratamientos +P y -P, respectivamente. Líneas sobreexpresantes de *STOP1*: L6.5, L21.3 y L22.3; líneas sobreexpresantes de *ALMT1*: L27.4, L38.1 y L39.3.

Para evaluar la repuesta de cada genotipo al tratamiento, se calculó el *fold change* de las tasas de exudación de ácidos orgánicos totales en -P con respecto a +P:

Fold change de la tasa de exudación de ácidos totales en -P con respecto a +P								
WT	<i>almt1</i>	<i>stop1</i>	L6.5	L21.3	L22.3	L27.4	L38.1	L39.3
0.94	1.47	2.21	1.36	1.36	1.12	1.34	1.61	1.14

Aunque los valores de *fold change* de *almt1* y *stop1* son altos, la cantidad de ácidos orgánicos exudados por estas líneas en -P no difieren con respecto a plantas WT (ANEXOS Figura A6, Tabla anterior).

Debido a su relevancia en el minado de P en suelos neutros/alcalinos, se cuantificó la tasa de exudación de equivalentes de H<sup>+</sup> de las líneas sobreexpresantes en deficiencia de P. Para esto se incubaron plantas de cada genotipo en medio líquido con púrpura de bromocresol bajo tratamientos +P o -P y se evaluó por espectrofotometría. La exudación de H<sup>+</sup> tiende a ser menor en -P en todos los genotipos, excepto L21.3 (Figura 11). Se registró una disminución en la exudación de equivalentes de H<sup>+</sup> de aproximadamente 25-100% en las líneas L21.3, L27.4 y L38.1 en +P con respecto a las plantas silvestres, aunque estadísticamente significativa solo en L21.3 y L38.1 (Figura 11). No se registraron cambios significativos en las tasas de exudación en -P.



**Figura 11. Cuantificación de la liberación de equivalentes de H<sup>+</sup> por la raíz en tratamientos de P.** Se crecieron *in vitro* plantas en suficiencia de P (+P) hasta los 15 dpg, luego se trasladaron a tratamientos de deficiencia de P (-P) o +P por 3 días. Posteriormente se incubaron 24 h en medio líquido con púrpura de bromocresol y se analizó el cambio de pH del medio por espectrofotometría. La asociación entre el cambio de pH en el medio y los equivalentes de H<sup>+</sup> se logró mediante la construcción de curvas de calibración. Los grupos estadísticos se encuentran representados con letras y fueron determinados mediante ANOVA-Tukey HSD (valor de p <0.05). Las barras de error representan el SEM (n=4), mientras que los asteriscos rojos (\*) indican las tasas de exudación de H<sup>+</sup> de los genotipos que difieren significativamente de la de las plantas silvestres. Líneas sobreexpresantes de *STOP1*: L6.5, L21.3 y L22.3; líneas sobreexpresantes de *ALMT1*: L27.4, L38.1 y L39.3.

Los experimentos de cuantificación de ácidos orgánicos y H<sup>+</sup> exudados por la raíz en +P y -P se realizaron una única ocasión, por lo cual es necesario repetirlos para corroborar las observaciones aquí reportadas.

## 5.5. Evaluación de la productividad de plantas sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* en medios con P poco biodisponible

Una vez caracterizadas genética y fisiológicamente las líneas sobreexpresantes, se procedió a su evaluación morfológica y de rendimiento en los sistemas *in vitro* y de hidroponía en sustrato con sales insolubles de P como única fuente de este elemento.

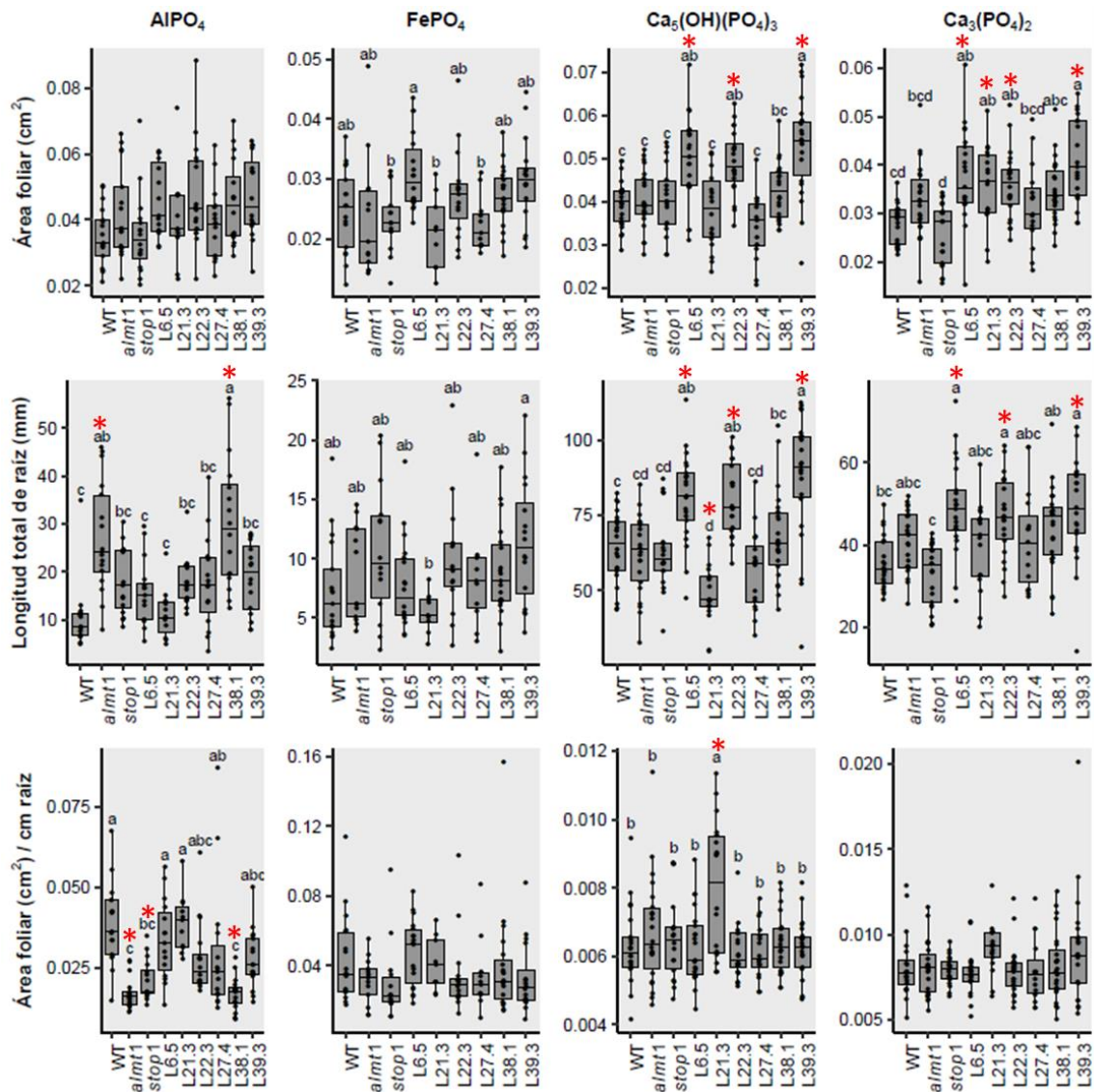
### 5.5.1. Evaluación de la productividad *in vitro*

Se evaluó el área foliar y la arquitectura radicular de plantas de 20 dpv crecidas en medio con fosfato de hierro, fosfato de aluminio, fosfato tricálcico o hidroxapatita como única fuente de P. No se encontraron diferencias significativas en la producción de área foliar en los tratamientos de fosfatos de Al y Fe de ninguna línea sobreexpresante con respecto a las plantas silvestres (Figura 12). Sin embargo, las líneas L6.5, L22.3 y L39.3 generaron consistentemente de 24-46% mayor área foliar en los tratamientos con fosfatos de calcio con respecto a plantas silvestres, lo cual tuvo relación en con un aumento significativo de la longitud total del sistema radicular (25-38%), pero no con el índice de eficiencia área foliar/cm de raíz (Figura 12). A continuación, se resumen el fold change en área foliar y longitud total de raíz en los tratamientos de fosfatos de calcio con respecto a las plantas silvestres:

Fold change de área foliar y longitud total de raíz con respecto a los de plantas silvestres										
Tratamiento	Variable	WT	<i>almt1</i>	<i>stop1</i>	L6.5	L21.3	L22.3	L27.4	L38.1	L39.3
Fosfato tricálcico	Área Foliar	1	1.17	0.93	1.34	1.28	1.29	1.13	1.23	1.46
	Longitud de raíz	1	1.16	0.93	1.38	1.13	1.32	1.16	1.25	1.37
Hidroxapatita	Área Foliar	1	1.02	1.02	1.27	0.96	1.24	0.87	1.07	1.34
	Longitud de raíz	1	0.97	0.98	1.26	0.76	1.25	0.88	1.06	1.36

El aumento en la longitud total de raíz de estas líneas se explica por la suma de ligeras contribuciones de todas las variables de arquitectura de raíz analizadas [ANEXOS Figura A7]: número, densidad y longitud de raíces laterales y longitud de la raíz primaria. Adicionalmente, la línea L21.3 presentó diferencias significativas en la generación de área foliar bajo el tratamiento de fosfato tricálcico. Esta diferencia la línea L21.3 no se relacionó tan claramente con el desarrollo radicular; sino que parece contribuir el aumento (no estadísticamente significativo) del 13% de su índice de eficiencia de desarrollo foliar con respecto a las plantas silvestres (Figura 12). Las líneas mutantes *stop1* y *almt1* no presentaron diferencias significativas en la generación de área foliar, índice de eficiencia de desarrollo foliar ni en ninguna variable de arquitectura radicular bajo los tratamientos de fosfato

de hierro, fosfato tricálcico e hidroxiapatita, con respecto a plantas silvestres (Figura 12, ANEXOS Figura A7). Sin embargo, las mutantes tienden a presentar un mayor desarrollo radicular y un menor índice de eficiencia de generación de área foliar en el tratamiento de fosfato de aluminio, aunque el área foliar no presenta cambios (Figura 12, ANEXOS Figura A7).



**Figura 12.** Evaluación del efecto de la sobreexpresión de *ALTM1* y *STOP1* sobre la productividad in vitro de área foliar. Se crecieron in vitro plantas con fosfato de aluminio ( $\text{AlPO}_4$ ), fosfato de hierro ( $\text{FePO}_4$ ), fosfato tricálcico [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] o hidroxiapatita [ $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ ] como única fuente de P. Las plantas se evaluaron a los 20 dpv. Los grupos estadísticos se encuentran representados con letras y fueron determinados mediante ANOVA-Tukey HSD (valor de  $p < 0.05$ ;  $n = 13-22$ ). Los contrastes estadísticos se realizaron por tratamiento (sal de P). Los asteriscos rojos (\*) indican las medias de los genotipos que difieren significativamente con respecto a las de las plantas silvestres. Líneas sobreexpresantes de *STOP1*: L6.5, L21.3 y L22.3; líneas sobreexpresantes de *ALMT1*: L27.4, L38.1 y L39.3.

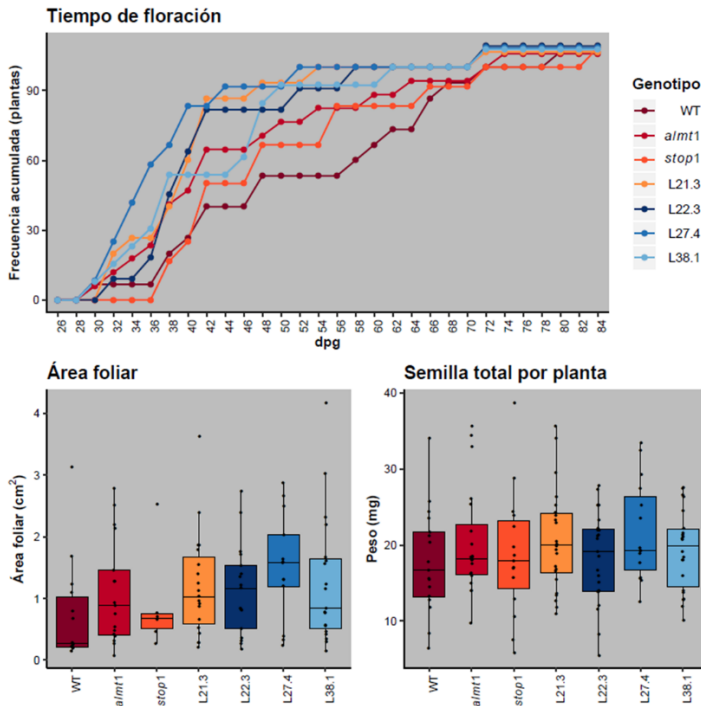


### **5.5.2. Evaluación de la productividad en hidroponía en sustrato**

Para evaluar las variables de tiempo de floración, área foliar (25 dpj) y la producción de semillas, se crecieron plantas silvestres, mutantes y sobreexpresantes de *STOP1* y *ALMT1* en el sistema de hidroponía en sustrato desarrollado. En el tratamiento de fosfato de aluminio, todos los genotipos parecen tener tiempos de floración menores que las plantas silvestres, especialmente las líneas sobreexpresantes de ambos genes. Sin embargo, esto no se reflejó en diferencias significativas en la generación de área foliar a los 25 dpj ni en la producción de semilla (Figura 13A). En el tratamiento de hidroxapatita, no se identificó ninguna diferencia en los tiempos de floración, generación de área foliar ni en la producción de semillas (Figura 13B).

A

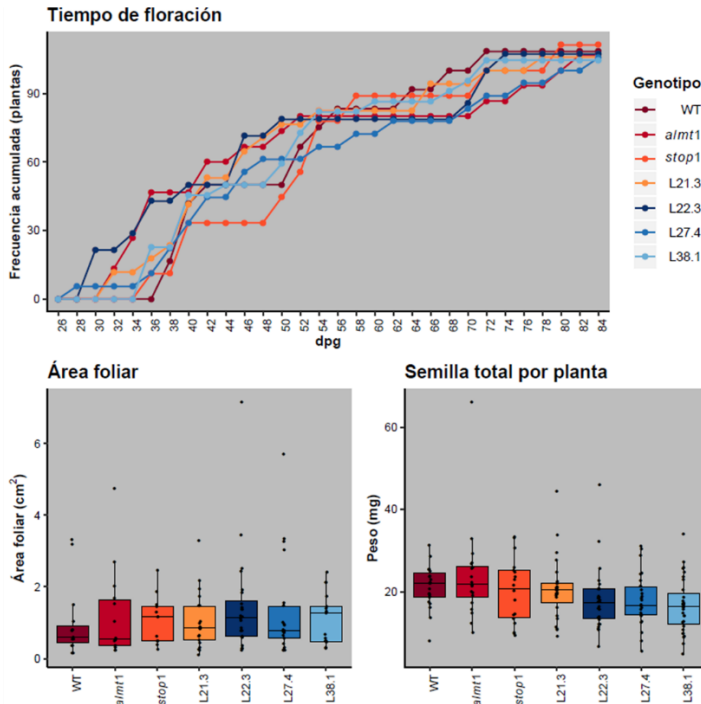
## Fosfato de aluminio



**Figura 13. Evaluación del efecto de la sobreexpresión de ALTM1 y STOP1 sobre el tiempo de floración, generación de área foliar y producción de semilla.** Se crecieron plantas en el sistema de hidroponía en sustrato, con (A) fosfato de aluminio (n= 15-24) o (B) hidroxiapatita (n= 18-31) como única fuente de P. El área foliar se evaluó a los 25 dpg, y el tiempo de floración se registró cada dos días. Para las variables de área foliar y semilla producida se realizó un ANOVA para evaluar las diferencias entre los genotipos, las cuales no fueron significativas en ninguna de las variables en ninguno de los tratamientos (valor de  $p > 0.05$ ). Líneas sobreexpresantes de *STOP1*: L21.3 y L22.3; líneas sobreexpresantes de *ALMT1*: L27.4 y L38.1. Este experimento se llevó a cabo en invernadero en el periodo de agosto-diciembre del 2018.

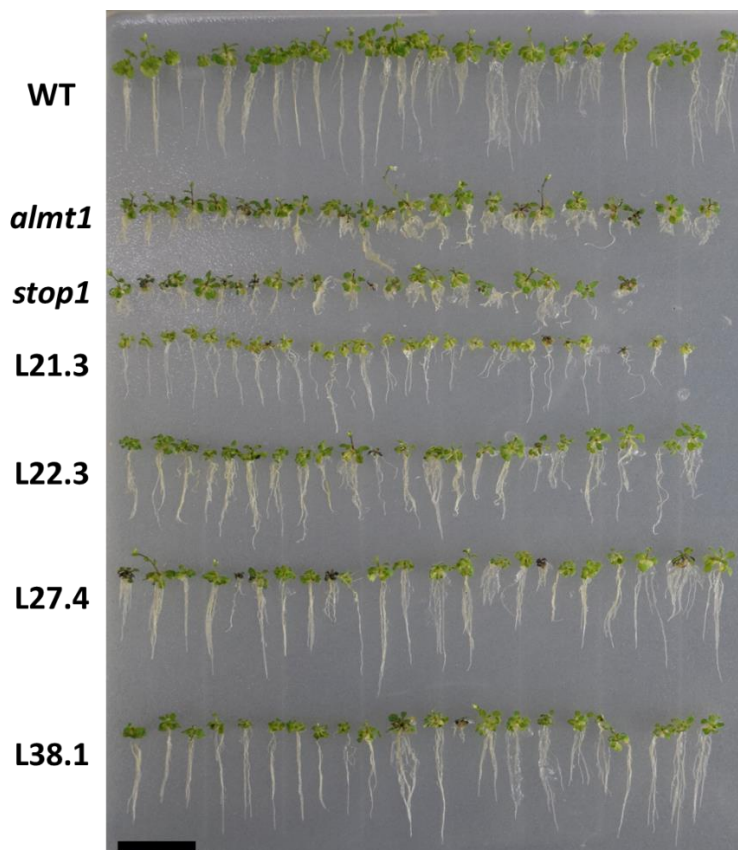
B

## Hidroxiapatita



## 5.6. Evaluación de la tolerancia a toxicidad por $\text{Al}^{3+}$ y $\text{H}^+$ de las líneas sobreexpresantes

Debido a que la principal asociación de los genes *ALMT1* y *STOP1* tiene que ver con la tolerancia a la toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{H}^+$ , respectivamente; se evaluaron plantas en un medio tóxico en Al ( $300 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{pH} = 4.20$ ). Se observó claramente el fenotipo característico de sistema radicular corto de *almt1* y *stop1* con respecto a las plantas silvestres (Figura 14). Las líneas L27.4 y L38.1, sobreexpresantes de *ALMT1*, presentaron una arquitectura radicular comparable a las plantas silvestres (Figura 14). Las líneas L21.3 y L22.3, sobreexpresantes de *STOP1*, presentaron una arquitectura radicular menos desarrollada que las plantas silvestres, pero mayor que las mutantes (Figura 14). Además, se detectó disminución en el área foliar en la línea L21.3, siendo esta menor incluso que la de las plantas *almt1* y *stop1* (Figura 14).



**Figura 14.** Evaluación de la tolerancia a toxicidad por  $\text{Al}^{3+}$  y  $\text{H}^+$  de las líneas sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1*. Se crecieron plantas en un medio adicionado con  $300 \mu\text{M}$  de  $\text{AlCl}_3$ , con  $\text{pH}$  ajustado a 4.20. Se fotografió a los 23 dpv. La barra de escala equivale a 2 cm. Líneas sobreexpresantes de *STOP1*: L21.3 y L22.3; líneas sobreexpresantes de *ALMT1*: L27.4 y L38.1.

## VI. DISCUSIÓN

Considerando que a nivel mundial más del 90% de la roca fosfato minada se destina a la producción de fertilizantes (United States Geological Survey, 2018), y que de estos el 40% se adiciona a solo tres cultivos (Heffer *et al.*, 2017), el mejoramiento genético direccionado a unas pocas especies para aumentar su habilidad de crecer en suelos deficientes en Pi disponible tendría un efecto sustancial en el consumo de fertilizantes fosforados. Además, las especies de P inorgánico suelen predominar en los suelos arables (Stutter *et al.*, 2015). Es probable que, debido en parte al auge existente en el reciclaje de P en forma de estruvita, una sal de P cuya solubilidad incrementa considerablemente en la presencia de ácidos orgánicos (Antonini *et al.*, 2012; Talboys *et al.*, 2016), la tendencia de acumulación de especies minerales de fósforo en suelos agrícola vaya a la alza alrededor del mundo. Debido a la anterior, el minado de P inorgánico se posiciona como una de las estrategias más prometedoras para direccionar el mejoramiento de cultivos. Este trabajo tuvo como objetivos principales evaluar la capacidad de líneas de Arabidopsis sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* para: [1] aumentar su tasa de exudación de ácidos orgánicos en deficiencia de P y [2] de desarrollarse en medios con fuentes insolubles de P, con especial énfasis en evaluar variables de productividad (i.e. área foliar y producción de semillas).

### **6.1. La sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* promueve el aumento en la tasa de exudación de ácidos orgánicos, pero no de H<sup>+</sup>, bajo deficiencia de P**

Mediante las técnicas de MALDI-MSI y UPLC-HRMS dirigidas a la visualización de la distribución espacial y cuantificación de ácidos orgánicos se demostró que, en algunas líneas, la sobreexpresión de *STOP1* y *ALMT1* promueven la mayor exudación de ácidos orgánicos en deficiencia de P con respecto a plantas silvestres y mutantes de los mismos genes (Figuras 9 y 10, ANEXOS Figuras A5 y A6). Sin embargo, las tasas de exudación en -P cuantificadas fueron estadísticamente significativas solo en las líneas sobreexpresantes de *STOP1* L6.5 y L21.3 (malato, fumarato y succinato para ambas; y malonato y alfa-cetoglutarato solo en L21.3) [Figura 10].

Debido a la convención utilizada en los trabajos publicados referentes a *ALMT1* y *STOP1* en Arabidopsis (Hoekenga *et al.*, 2003, 2006; Iuchi *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2007; Kobayashi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2009), las tasas de exudación de carboxilatos reportadas en este trabajo se normalizaron por planta. Sin embargo, para el contraste con modelos matemáticos referentes a las

concentraciones de exudados necesarias por longitud de ápice de raíz para que el minado de P por ácidos orgánicos sea eficiente, se suelen normalizar las tasas de exudación por longitud de raíz (Gerke *et al.*, 2000; Neumann & Römheld, 2007). Bajo esta normalización, el incremento con respecto a WT de las tasas de exudación de L6.5 y L21.3 se mantiene; además de que la línea L38.1 (sobresexpresante de *ALMT1*) presenta la mayor tasa de exudación de malato (1.43X con respecto a plantas silvestres bajo el mismo tratamiento) y de ácidos orgánicos totales en -P (Tabla 4). Por tanto, se consideró también a L38.1 como una línea con mayor capacidad de exudación de ácidos orgánicos con respecto a plantas WT. Sin embargo, no existe correlación entre la longitud total de raíz con respecto a la exudación de cada ácido orgánico cuantificado (ANEXOS Figura A8). Esto se explica por el hecho de que la exudación de ácidos orgánicos se localiza principalmente en los ápices radiculares (Heuer *et al.*, 2017). Es de gran interés evaluar la exudación de ácidos orgánicos en regiones maduras de las raíces de plantas sobresexpresantes mediante MALDI-MSI con objeto de discernir si, además de las tasas de exudación, la sobresexpresión de *ALMT1* y *STOP1* modifica los sitios de exudación de ácidos orgánicos en la raíz bajo deficiencia de P.

**Tabla 4. Tasa de exudación de ácidos orgánicos totales normalizada por longitud total del sistema radicular\***

Genotipo**	Tratamiento	Tasa de exudación ( $\mu\text{mol cm raíz}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
L22.3	+P	22.96
<i>stop1</i>	+P	29.68
L39.3	+P	33.29
L27.4	+P	33.50
L6.5	+P	34.01
L22.3	-P	34.20
<i>almt1</i>	+P	34.47
L38.1	+P	35.22
WT	+P	46.64
L39.3	-P	47.64
L27.4	-P	50.68
L21.3	+P	51.98
<i>stop1</i>	-P	62.08
<i>almt1</i>	-P	73.87
WT	-P	77.35
L6.5	-P	84.36
L21.3	-P	90.25
L38.1	-P	94.97

\*Las combinaciones de genotipos y tratamientos se encuentran enlistados en orden respecto a la media de su tasa de exudación (n=4).

\*\* Líneas sobresexpresantes de *STOP1*: L6.5, L21.3 y L22.3; líneas sobresexpresantes de *ALMT1*: L27.4, L38.1 y L39.3.

Bajo el tratamiento +P, solo L21.3 presentó diferencias significativas en las tasas de exudación con respecto a las plantas silvestres, específicamente de malonato y citrato. De manera general, las líneas sobreexpresantes de *ALMT1* (L38.1) y *STOP1* (L6.5 y L21.3) responsivas a -P, mantienen niveles comparables en las tasas de exudación de carboxilatos en +P con respecto a las plantas silvestres (ANEXOS Figura A6). Esta característica es importante para minimizar la pérdida de fotosintatos.

Debido al pH fisiológico (7.1-7.4), la exudación de ácidos orgánicos se da en forma de sus respectivos aniones (Neumann & Römheld, 2007). Se suele asumir que, con objeto de balancear las cargas en tejido, altas tasas de exudación de aniones de ácidos orgánicos correlacionan con una alta tasa de exudación de H<sup>+</sup>. Esto impactaría directamente el minado de P en suelos neutros/alcalinos. Para responder si el aumento en la tasa de exudación de ácidos orgánicos correlaciona con la exudación de H<sup>+</sup>, se cuantificaron los equivalentes de H<sup>+</sup> exudados en un sistema similar al empleado para la cuantificación de ácidos orgánicos. No se encontraron diferencias significativas en la exudación de H<sup>+</sup> en -P entre ninguno de los genotipos evaluados, por lo que no hay evidencia de la asociación de los mecanismos de exudación de ácidos orgánicos con la de H<sup>+</sup> (Figura 11). Interesantemente, las líneas L21.3 y L38.1 presentaron un decremento significativo en la exudación de H<sup>+</sup> en +P (Figura 11).

Las tasas de exudación de H<sup>+</sup> son consistentemente menores en todos los genotipos en -P que en +P (Figura 11); justamente lo contrario con respecto al cambio en las tasas de exudación de malato (Figura 10), donde en -P aumenta la exudación. Esta evidencia sugiere que los mecanismos de exudación de H<sup>+</sup> y ácidos orgánicos, principalmente malato, están desacoplados y que otros cationes podrían tener mayor relevancia en el balance de cargas (e.g. Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> y/o Mg<sup>2+</sup>). Este patrón se ha reportado en *Lupinus albus*, una proteácea que presenta grandes tasas de exudación de ácidos orgánicos, principalmente citrato, como una estrategia efectiva para minar P del suelo (Lambers *et al.*, 2015). En *L. albus*, la exudación de citrato es independiente de la exudación de H<sup>+</sup>, y aunque su contribución al balance de cargas es importante, es aproximadamente igual al de K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup> o Mg<sup>2+</sup> (Zhu *et al.*, 2005).

No se encontró relación entre los niveles de expresión por qRT-PCR y las tasas de exudación de carboxilatos (Figuras 8 y 10). Sin embargo, al revisar el experimento de qRT-PCR, se encontró que los oligonucleótidos del gen normalizador *ACT2* tienen un diseño deficiente, ya que pueden amplificar tanto cDNA como DNA genómico (Ver Materiales y Métodos). Debido a que no se utilizó DNAsa, es muy probable que la señal de amplificación de DNA genómico interviniera en la

cuantificación, lo cual limita las inferencias que pueden hacerse a partir de los resultados de qRT-PCR.

## **6.2. La sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* incrementa la productividad en condiciones *in vitro*, pero no en invernadero**

En el sistema *in vitro*, no se encontraron diferencias en generación de área foliar en los tratamientos de fosfato de Al y Fe, sales representativas de suelos ácidos (Figura 12). Es posible que el tratamiento de fosfato de Al ocasionase el estrés conjunto de P y Al<sup>3+</sup>. Sin embargo, debido a que la longitud de la raíz prima de plantas *almt1* y *stop1* fue significativamente mayor que las de la línea WT (ANEXOS Figura 7), el supuesto estrés de toxicidad por Al<sup>3+</sup>, si es que existió, fue secundario al de deficiencia de P. Las líneas L27.4 y L38.1 presentaron mayor desarrollo en algunas variables de ASR; sin embargo, al igual que las líneas mutantes, esto no se reflejó en la generación de área foliar. Bajo el tratamiento de fosfato de Fe no se presentaron diferencias significativas en ningún rasgo de ASR. Esto podría indicar que bajo este tratamiento, además de la deficiencia de P, las plantas están sometidas a un estrés importante por toxicidad de Fe.

En los experimentos *in vitro* bajo los tratamientos de fosfato tricálcico e hidroxapatita, sales representativas de suelos neutros/alcalinos, las líneas L6.5, L22.3 y L39.3 generaron mayor área foliar con respecto a las plantas silvestres (Figura 12). Este aumento en el área foliar se relacionó con un mayor desarrollo radicular de estas líneas en términos de longitud total de raíz, pero no con las tasas de exudación de carboxilatos (ANEXOS Figuras A6 y A7). Esta misma relación se observó en plantas silvestres bajo distintos tratamientos de P soluble (ANEXOS Figura A4). Estos datos sugieren que el desarrollo radicular en *Arabidopsis*, y no la exudación de ácidos orgánicos, proporciona la mayor contribución a la generación de área foliar en condiciones *in vitro*. Esto es cierto al menos para fosfatos de calcio a pH neutro/alcalino y bajo cierto rango de concentración de P soluble. Sin embargo, también podría ser válido para el tratamiento de fosfato de aluminio, donde existe un aumento (no significativo) en la generación de área foliar que se relaciona con el incremento de la longitud total de sistema radicular en las líneas *almt1* y L38.1, pero no de *stop1* (Figura 12). La observación de que *stop1* no siga esta tendencia se puede explicar por la sensibilidad a H<sup>+</sup> de esta línea mutante (Iuchi *et al.*, 2007). Interesantemente, las líneas L21.3 y L22, cuyas tasas de exudación de carboxilatos fueron las más contrastantes (menor y mayor, respectivamente), generaron mayor área foliar bajo el tratamiento de fosfato tricálcico; mientras que bajo el tratamiento de la sal menos

soluble, hidroxiapatita, solo L22.3 mostró diferencias significativas. Bajo ambos tratamientos, la línea L21.3 muestra incremento en el índice de eficiencia de desarrollo foliar (no estadísticamente significativo con fosfato tricálcico), pero no en la longitud total de raíz. Esto podría indicar que la exudación de ácidos orgánicos contribuye directamente al minado de P, aunque en menor medida que el aumento del desarrollo radicular.

Ya que el aumento en la generación de área foliar se relaciona estrechamente con el desarrollo radicular, pero no de la exudación de ácidos orgánicos, surge naturalmente la pregunta ¿qué es lo que ocasiona el mayor desarrollo radicular en las líneas sobreexpresantes? Una posibilidad, altamente especulativa, sería que la acumulación en tejido de ácidos orgánicos distintos al malato de alguna manera bloquea parcialmente la respuesta de acortamiento radicular en deficiencia de P, promoviendo que las longitudes de las raíces tiendan a aumentar. Se ha reportado que la adición de 1 mM de citrato a un medio deficiente en P ocasiona que las plantas WT no respondan acortando su sistema radicular (Mora-Macías *et al.*, 2017). Sin embargo, a pH neutro/alcalino hay ausencia de respuesta local de *Arabidopsis* a la deficiencia de P, lo cual se relaciona con la disminución de la expresión de *ALMT1* (Balzergue *et al.*, 2017). Los tratamientos de fosfatos de calcio se dispusieron a pH = 8.0, sin buffer adicionado. Debido a que la tasa de exudación de equivalentes H<sup>+</sup> tiende a disminuir en las líneas sobreexpresantes (Figura 11), es concebible que se retrase la respuesta de acortamiento radicular por la deficiencia en la acidificación del medio circundante de la rizosfera.

En los experimentos en hidroponía en sustrato con hidroxiapatita o fosfato de Al como únicas fuentes de P, no se encontraron diferencias en la generación de área foliar (20 dpv), tiempos de floración ni en la semilla producida (Figura 13). Estos resultados contrastan con los reportes de plantas transformadas de *Arabidopsis*, tabaco, cebada y canola donde el incremento en la exudación de citrato o malato se asocia con aumentos en variables de productividad cuando se desarrollan con este tipo de compuestos de P (Delhaize *et al.*, 2009; Koyama *et al.*, 2000; López-Bucio *et al.*, 2000; Lü *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, en la mayoría de estos reportes se han encontrado algunos patrones que limitan las conclusiones con respecto a la mejora en la eficiencia de la toma de P por la exudación de ácidos orgánicos, en concreto:

- no evalúan el cambio de la ASR entre plantas silvestres y transformadas,
- no aíslan el estrés por deficiencia de P del de toxicidad por Al<sup>3+</sup>, y/o
- no aíslan la sal insoluble del tratamiento de otras fuentes de P o factores que puedan contribuir a su biodisponibilidad.



Por ejemplo, Delhaize *et al.* (2009) toma en cuenta el mayor desarrollo radicular de las plantas de cebada sobreexpresantes de *ALMT1* para explicar su mayor productividad, lo cual asocia con el aumento en la tolerancia a  $Al^{3+}$  y en la eficiencia de toma de P. Sin embargo, al no separar la contribución de cada tipo de estrés y al utilizar suelo, con distintos pools de P, no es posible asociar la exudación de malato con el minado de una fuente característica de P. El reporte de Lü *et al.* (2012) es el único en donde se evalúa la ASR, se aísla el estrés por P y se provee de una sola fuente de P a sus plantas de tabaco transformadas (sobreexpresantes de malato deshidrogenasa). De manera similar que en el presente trabajo, Lü *et al.* (2012) encontraron una asociación entre la longitud total de raíz y producción de biomasa producto de la modificación genética dirigida a promover la exudación de ácidos orgánicos.

Se ha reportado que el aumento relativo de las tasas de exudación de carboxilatos de las plantas transformadas para promover la exudación de ácidos orgánicos con respecto a las silvestre oscila entre 1.3 – 4 (Koyama *et al.*, 2000; López-Bucio *et al.*, 2000; Lü *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013), lo cual se encuentra en el rango observado en algunas líneas sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* generadas en este trabajo. Se han reportado el incremento de 5-10 veces en las tasas de exudación de malato en *Arabidopsis* sobreexpresante de *ALMT1* bajo toxicidad de  $Al^{3+}$ ; sin embargo, no se evaluaron variables de rendimiento bajo condiciones de estrés abiótico (Kobayashi *et al.*, 2013). *Arabidopsis* sobreexpresante de citrato sintasa, con una tasa de exudación de citrato máxima de 1.6X con respecto a la de las WT, presenta mayor diámetro de roseta cuando se desarrolla en un suelo deficiente en P y tóxico en  $Al^{3+}$  (Koyama *et al.*, 2000). El hecho de no encontrar diferencias en los experimentos en invernadero en las líneas sobreexpresantes generadas, algunas de las cuales presentaron niveles similares de inducción de exudación de citrato (sin tomar en cuenta otros ácidos orgánicos), probablemente se explica por la diferencia en las variables experimentales discutidas anteriormente. Otra posibilidad es que las sales de P utilizadas (hidroxiapatita y fosfato de Al) en los experimentos de invernadero posean una biodisponibilidad demasiado baja y no sean efectivamente solubilizadas por las plantas sobreexpresantes. Es necesario probar otras sales de P en el sistema hidropónico para evaluar esta posibilidad.

Finalmente, la falta de asociación entre las diferencias entre los experimentos de los sistemas *in vitro* y de hidroponía en sustrato podría deberse a las condiciones de crecimiento. La variable principal que se consideró fue la presencia de sacarosa en el sistema *in vitro*. Debido a que el fenómeno estudiado se relaciona a la exudación de carboxilatos bajo deficiencia de P, la sacarosa

en el medio podría sobreestimar el efecto de la modificación genética sobre las tasas de exudación de carboxilatos con respecto a sistemas de crecimiento sin sacarosa. Para evaluar esta posibilidad, se crecieron plantas *in vitro* en condiciones similares a las de experimento resumido en la Figura 12, pero reduciendo la concentración de sacarosa de 1% a 0.2%. Pese a que se evaluaron solo dos líneas sobreexpresantes de cada gen, con un número bajo de individuos, las tendencias de aumento en generación de área foliar de las plantas transgénicas se mantuvieron en el tratamiento de fosfato tricálcico (ANEXOS Figura A9). Sin embargo, se perdió esta tendencia bajo el tratamiento de hidroxapatita, un fosfato de calcio altamente insoluble. Esto sugiere que el aumento en las tasas de exudación de las líneas sobreexpresantes generadas es solo eficiente en minar P de fosfatos de calcio medianamente recalcitrantes. Estos resultados explicarían por qué no se observaron diferencias en los experimentos en invernadero, donde solo se evaluaron fosfato de Al e hidroxapatita. Interesantemente, en el tratamiento de fosfato de Fe en el experimento *in vitro* bajo en sacarosa, las líneas con mayor área foliar fueron *stop1*, *almt1* y L22.3, las cuales se caracterizaron precisamente por tener las menores tasas de exudación de ácidos orgánicos totales (ANEXOS Figura 6).

### **6.3. La sobreexpresión de *STOP1* en *Arabidopsis* no aumenta la tolerancia a $Al^{3+}$**

Se evaluó el efecto de la sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* en la tolerancia a toxicidad por  $Al^{3+}$ . Las líneas L27.4 y L38.1, sobreexpresantes de *ALMT1* presentaron un sistema radicular comparable al de las plantas silvestres (Figura 14). Estas observaciones son consistentes con lo reportado por Kobayashi *et al.* (2013), donde la línea sobreexpresante de *ALMT1* con tasa de exudación de malato 20 veces mayor que la silvestre mostró una longitud de raíz 20% mayor, mientras que la línea con una tasa 5 veces mayor no presentó diferencias.

Pese al papel fundamental de *STOP1* en la tolerancia a toxicidad por  $H^+$  y  $Al^{3+}$ , su sobreexpresión en *Arabidopsis* ocasionó la disminución de la longitud de raíz bajo toxicidad por  $Al^{3+}$ , con respecto a las WT (Figura 14). Esto podría deberse a efectos debidos a la desregulación de genes bajo el control de *STOP1*. Además del fenotipo de aumento en la tasa de exudación de carboxilatos en las líneas sobreexpresantes, la recuperación de los fenotipos en -P y bajo toxicidad de  $Al^{3+}$  de *stop1* y *almt1* complementadas con las mismas construcciones, muestra que [1] los transgenes son funcionales y [2] que el transgen p35S::*STOP1* no restaura completamente el fenotipo de *stop1* bajo toxicidad por

Al<sup>3+</sup> (ANEXOS F10). Estos resultados son consistentes con los reportados por Iuchi *et al.* (2007), donde líneas complementadas de *stop1* con p35S::*STOP1* presentan una ligera disminución de su longitud de raíz bajo toxicidad por Al<sup>3+</sup>.

#### **6.4. Relevancia de la exudación de ácidos orgánicos en la deficiencia de P en Arabidopsis**

Debido a que en todos los experimentos donde se evaluaron las líneas sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* también se evaluaron las líneas *almt1* y *stop1* con alelos nulos, surgen naturalmente observaciones relativas a la importancia de estos genes en el fenómeno de adquisición de P.

Una de las observaciones más sorprendentes encontradas en este trabajo fue la similitud de las líneas WT, *almt1* y *stop1* en las tasas de exudación y localización espacial de ácidos orgánicos, exudación de H<sup>+</sup>, variables de productividad y, con excepción del tratamiento de fosfato de Al, arquitectura radicular. Por los resultados de dos metodologías independientes (MALDI-MSI y UPLC-HRMS), es claro que las líneas *almt1*, *stop1* y WT no se diferencian entre sí ni parecen ser responsivas a -P con relación a su tasa de exudación de ácidos orgánicos. En contraste, plantas silvestres bajo estrés por Al<sup>3+</sup> incrementan al menos 6 veces su tasa de exudación de malato con respecto a condiciones control (Kobayashi *et al.*, 2007). Esto se explica debido a la diferencia en los niveles de inducción de la transcripción entre ambos tipos de estrés. Los transportadores *ALMT1* y *MATE* se inducen de manera proporcional de 3-4 veces más bajo deficiencia de P (Balzergue *et al.*, 2017; Mora-Macías *et al.*, 2017), alcanzándose el pico de expresión a las 24 h después del trasplante a -P (Balzergue *et al.*, 2017). Bajo toxicidad por Al<sup>3+</sup>, *ALMT1* se induce hasta 70 veces en 12 h (Kobayashi *et al.*, 2007). Más aun, la inducción de *ALMT1* por erbio y bajo pH, similar en magnitud a la reportada en -P, tampoco se relaciona con diferencias significativas en tasas de exudación de malato con respecto al control (Kobayashi *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren fuertemente que *ALMT1* y *STOP1* no juegan un papel relevante en las tasas de exudación de ácidos orgánicos hacia la rizosfera en deficiencia de P en Arabidopsis. Interesantemente, los cambios en las tasas de exudación en -P de las líneas sobreexpresantes parecen emular las respuestas en condiciones de toxicidad por Al<sup>3+</sup>. Por tanto, el sistema de sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* puede suponer una vía para dotar de una estrategia novedosa de toma de P a Arabidopsis, y que en principio puede extrapolarse a otras especies.

Para movilizar efectivamente P se necesita una concentración de 10  $\mu\text{mol}$  de citrato u oxalato por gramo de suelo (Gerke *et al.*, 2000). Considerando un suelo de 1 gr por  $\text{cm}^3$ , que el diámetro de la raíz de *Arabidopsis* es de unos 100  $\mu\text{m}$ , y asumiendo [1] que los ácidos orgánicos exudados permanecerán a 1 mm de distancia de la raíz y [2] que la sumatoria de los ácidos orgánicos cuantificados tengan la misma capacidad de solubilización de P que el citrato u oxalato, se resuelve que *Arabidopsis silvestre* en deficiencia de P acumulará 10  $\mu\text{mol}$  de ácidos orgánicos  $\text{gr}^{-1}$  de suelo en 18:00 h. En contraste, las líneas L6.5, L21.3 y L38.1 lo lograrían en 16:30, 15:15 y 14:30 h, respectivamente. Sin embargo, la exudación de ácidos orgánicos se restringe a la punta de la raíz, incluso en líneas sobreexpresantes de *ALMT1* (Delhaize *et al.*, 2004). Si además se asume que el total de exudación por planta se restringe a los 5 mm de ápice de la raíz primaria, entonces el tiempo necesario para concentrar 10  $\mu\text{mol}$  de ácidos orgánicos  $\text{gr}^{-1}$  de suelo es de 3:00, 1:45, 1:30 y 2:00 h para las líneas WT, L6.5, L21.3 y L38.1, respectivamente. Estos cálculos sugieren que las tres líneas sobreexpresantes con mayor tasa de exudación son capaces de acumular suficientes ácidos orgánicos en suelos para la solubilización de P de 1.5-2 veces más rápido que las plantas silvestres. Estas conclusiones deben tomarse con precaución, ya que se basan en varios supuestos que pueden ser erróneos, tal como la equivalencia en la solubilización de P de todos los ácidos orgánicos y la exudación localizada en el ápice de una sola raíz no móvil; además que no se considera el tiempo de resiliencia en suelo de los ácidos orgánicos, por lo que se están subestimando los tiempos de acumulación. Sin embargo, debido a que las proporciones relativas de ácidos orgánicos son aproximadamente equivalentes en todos los genotipos (ANEXOS Figura A6) y asumiendo que otros factores interactúan homogéneamente entre genotipos, las conclusiones con respecto a la magnitud de las diferencias de acumulación de ácidos orgánicos son aceptables. El hecho de que la exudación de ácidos orgánicos se limite principalmente a los ápices de raíz y que las líneas *almt1* y *stop1* no detengan el crecimiento radicular en -P, sugiere que los ácidos orgánicos podrían acumularse en la rizosfera por tiempo de permanencia del ápice radicular en un mismo volumen de suelo, y no por modificar las tasas de exudación de ácidos orgánicos.

Si bien la exudación de carboxilatos parece no ser relevante en el minado de P en *Arabidopsis*, las mutantes *almt1* y *stop1* están sujetas a una marcada desregulación en su respuesta transcripcional de genes, incluyendo componentes de la respuesta local y sistémica en deficiencia de P (Mora-Macías *et al.*, 2017). No se tiene claro por qué estas perturbaciones genéticas no impactaron en el rendimiento de estas mutantes en -P. Una posibilidad es que, debido a la homogeneidad de distribución de las sales de P en ambos sistemas, el cambio en arquitectura radicular no presentara

ventajas por explorar capas más superficiales del sustrato. Es probable que la relevancia de *ALMT1* y *STOP1* en deficiencia de P se limite a su papel en la modificación de la arquitectura radicular.

Aunque las tasas de exudación de citrato no cambiaron entre genotipos ni tratamientos (Figura 10); fue clara su acumulación en tejido, principalmente en el ápice radicular, bajo deficiencia de P (Figura 9, ANEXOS Figura A5). En el caso del malato, la mayor acumulación en tejido solo es apreciable en las líneas sobreexpresantes en -P (Figura 9). Estos resultados están en acuerdo con las observaciones de que tanto la tolerancia a  $Al^{3+}$  como la respuesta local a la deficiencia de P se relacionan estrechamente con la concentración de ácidos orgánicos en el nicho meristemático en el ápice de raíz (Balzergue *et al.*, 2017; Kopittke *et al.*, 2017; Mora-Macías *et al.*, 2017). Pese a la relación estrecha entre las tasas de exudación de ácidos orgánicos y la tolerancia a estrés por  $Al^{3+}$ , el efecto protector parece explicarse principalmente por la formación de complejos no tóxicos en los apoplastos del ápice de raíz (Kopittke *et al.*, 2017). No puede descartarse la posibilidad de que el aumento en las tasas de exudación bajo estrés por  $Al^{3+}$  sea solo la consecuencia de la mayor acumulación de ácidos orgánicos el ápice radicular. En las imágenes MALDI-MSI de malato, es clara la relación de intensidad en el tejido con la cantidad de exudado en las plantas sobreexpresantes. Además, esto explicaría el por qué, además de malato, se presenta conjuntamente una mayor tasa de exudación de succinato en L27.4 y L31.8, sobreexpresantes de *ALMT1*; y de malonato, fumarato, succinato y alfa-cetoglutarato en L6.5 y L21.3, sobreexpresantes de *STOP1* (Figura 10).

Interesantemente, el análisis de correlación entre las tasas de exudación de los ácidos orgánicos indica que, a excepción del lactato y piruvato, todos los metabolitos evaluados presentan una correlación positiva entre sus tasas de exudación (ANEXOS Figura A8). Aunque el malato supone del 25-40% del total de ácidos orgánicos cuantificados (ANEXOS Figura A6), es importante considerar la contribución de todos los carboxilatos exudados en el minado de P. Son necesarios estudios más amplios para caracterizar los compuestos de mayor abundancia en los exudados de raíz bajo deficiencia de P. De esta manera puede ponderarse la importancia relativa de los compuestos exudados para posteriormente, mediante ingeniería metabólica, direccionar el metabolismo a su acumulación y exudación hacia la rizosfera.

## VII. CONCLUSIONES

En dos tercios de las líneas transgénicas evaluadas, la sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* derivó en el incremento de 1.4-2 veces en la exudación de ácidos orgánicos totales bajo deficiencia de P, principalmente malato.

La sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* induce el aumento de exudación de ácidos orgánicos bajo deficiencia de P, pero no de equivalentes de H<sup>+</sup>. Las plantas silvestres no son responsivas en cuanto a las tasas de exudación de ácidos orgánicos.

En condiciones *in vitro*, algunas líneas sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* generaron mayor área foliar en tratamientos de fosfatos de calcio con respecto a plantas silvestres. Este aumento en el área foliar se explica consistentemente por el mayor desarrollo radicular, pero no por la mayor exudación de ácidos orgánicos.

En los experimentos en invernadero con fuentes poco disponibles de P, las plantas sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* no presentaron diferencias con respecto a plantas silvestres en variables de área foliar, tiempos de floración y semilla producida. Es probable que las líneas sobreexpresantes generadas sean capaces de solubilizar solo sales medianamente insolubles, tal como el fosfato tricálcico, pero no sales más recalcitrantes como la hidroxapatita.

El hecho de no observar diferencias en las sales características de suelos ácidos en los sistemas *in vitro* e hidropónico pudiera explicarse debido a que se no se evaluó conjuntamente el estrés por Al<sup>3+</sup>, un poderoso inductor de la exudación de ácidos orgánicos.

Se espera que las metodologías desarrolladas en este trabajo contribuyan a la evaluación y desarrollo de plantas mejoradas en la toma y uso eficiente de P.

## VIII. PERSPECTIVAS

Las observaciones y resultados obtenidos a partir de este trabajo llevan a plantear los siguientes experimentos:

- Realizar un amplio escrutinio de un mayor número de líneas sobreexpresantes de *ALMT1* y *STOP1* en fosfatos de calcio para evaluar la consistencia del cambio de arquitectura radicular y la exudación de ácidos orgánicos con respecto a la generación de área foliar. Después de afinar criterios de selección de líneas, continuar con experimentos en invernadero.
- Reanalizar por qRT-PCR los niveles de expresión de *ALMT1* en las líneas transformadas. Incluir los tratamientos de +P y -P, así como a *STOP1* y *MATE*.
- Cuantificar las tasas de exudación de ácidos orgánicos a distintos tiempos de incubación en deficiencia de P.
- Analizar por MALDI-MSI la diferencia de exudación de malato y citrato en distintas regiones de la raíz en deficiencia de P.
- Elucidar como la sobreexpresión de *ALMT1* y *STOP1* modifican la arquitectura de raíz en los tratamientos con fosfatos de calcio en los experimentos *in vitro*. Para esto: [1] Evaluar mediante adición exógena al medio, el efecto de la acumulación de distintos ácidos orgánicos en la modificación de la arquitectura radicular en - P; y [2] aumentar la resolución de las imágenes de raíz por MALDI-MSI para visualizar mejor la acumulación y distribución de ácidos orgánicos en raíz en -P.
- Seguir con el diseño de sistemas *in vitro* con bajos niveles de sacarosa. Adicionalmente, eliminar variables irrelevantes en suelo, tal como la luz en las raíces.
- Aumentar el número de tratamientos de sales insolubles en las evaluaciones de productividad. Incluir experimentos en suelo.
- Evaluar la capacidad de las líneas sobreexpresantes para tomar P adherido a matrices, tal como óxidos de aluminio. Para esto se puede montar un sistema *in vitro* en gel tal como el reportado por Hanlon *et al.* (2018); mientras que para hidroponía se puede acoplar alumina al sustrato tal como en los sistemas de buffer de P de fase sólida (PennState College of Agricultural Sciences [www.plantscience.psu.edu](http://www.plantscience.psu.edu)).
- Generar y evaluar líneas sobreexpresantes con promotores inducibles a deficiencia de P y con modificaciones metabólicas direccionadas a la acumulación de carboxilatos.

- Una vez obtenido un sistema robusto en *Arabidopsis*, extrapolar las modificaciones genéticas a plantas de interés agrícola.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, B. H., & Magdoff, F. R. (2005). Relative Movement and Soil Fixation of Soluble Organic and Inorganic Phosphorus. *Journal of Environment Quality*, 34(6), 2228. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0025>
- Antonini, S., Arias, M. A., Eichert, T., & Clemens, J. (2012). Greenhouse evaluation and environmental impact assessment of different urine-derived struvite fertilizers as phosphorus sources for plants. *Chemosphere*, 89(10), 1202–1210. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.07.026>
- Auguie, B. (2017). gridExtra: Miscellaneous Functions for “Grid” Graphics.
- Balzergue, C., Darteville, T., Godon, C., Laugier, E., Meisrimler, C., Teulon, J. M., ... Desnos, T. (2017). Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nature Communications*, 8(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms15300>
- Barrow, N. J. (2017). The effects of pH on phosphate uptake from the soil. *Plant and Soil*, 410(1–2), 401–410. <https://doi.org/10.1007/s11104-016-3008-9>
- Bates, T. R., & Lynch, J. P. (1996). Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment*, 19(5), 529–538. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1996.tb00386.x>
- Besserer, A., Puech-Pagès, V., Kiefer, P., Gomez-Roldan, V., Jauneau, A., Roy, S., ... Séjalon-Delmas, N. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*, 4(7), 1239–1247. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040226>
- Brady, N. C., & Weil, R. R. (2016). *The Nature and Properties of Soils* (15th ed.). Columbus: Pearson.
- Bünemann, E. K., & Condon, L. M. (2007). Phosphorus and Sulphur Cycling in Terrestrial Ecosystems. In *Nutrient Cycling in Terrestrial Ecosystems* (pp. 65–92). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-68027-7\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-68027-7_3)
- Calderon-Vazquez, C., Sawers, R. J. H., & Herrera-Estrella, L. (2011). Phosphate Deprivation in Maize: Genetics and Genomics. *Plant Physiology*, 156(3), 1067–1077. <https://doi.org/10.1104/pp.111.174987>
- Choi, W. G., & Roberts, D. M. (2007). *Arabidopsis* NIP2;1, a major intrinsic protein transporter of lactic acid induced by anoxic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24209–24218. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700982200>
- Cooper, J., Lombardi, R., Boardman, D., & Carliell-Marquet, C. (2011). The future distribution and production of global phosphate rock reserves. *Resources, Conservation and Recycling*, 57(January), 78–86. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2011.09.009>
- Cordell, D., Drangert, J. O., & White, S. (2009). The story of phosphorus: Global food security and food for thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292–305. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009>
- Cordell, D., & White, S. (2014). Life’s Bottleneck: Sustaining the World’s Phosphorus for a Food Secure Future. *Annual Review of Environment and Resources*, 39(1), 161–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-010213-113300>
- De-Mendiburu, F. (2017). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=agricolae>



- Delhaize, E., Ryan, P. R., Hebb, D. M., Yamamoto, Y., Sasaki, T., & Matsumoto, H. (2004). Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(42), 15249–15254. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406258101>
- Delhaize, E., Taylor, P., Hocking, P. J., Simpson, R. J., Ryan, P. R., & Richardson, A. E. (2009). Transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) expressing the wheat aluminium resistance gene (TaALMT1) shows enhanced phosphorus nutrition and grain production when grown on an acid soil. *Plant Biotechnology Journal*, *7*(5), 391–400. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00403.x>
- Drew, M. C. (1975). Supply of phosphate, nitrate, ammonium and potassium on the growth of the seminal root system, and the shoot, in barley. *New Phytologist*, *75*(3), 479–490. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1975.tb01409.x>
- Easlon, H. M., & Bloom, A. J. (2014). Easy Leaf Area: Automated Digital Image Analysis for Rapid and Accurate Measurement of Leaf Area. *Applications in Plant Sciences*, *2*(7), 1400033. <https://doi.org/10.3732/apps.1400033>
- Elser, J., & Bennett, E. (2011). A broken biogeochemical cycle. *Nature*, *478*(7367), 29–31. <https://doi.org/10.1038/478029a>
- Filippelli, G. M. (2008). The Global Phosphorus Cycle: Past, Present, and Future. *Elements*, *4*(2), 89–95. <https://doi.org/10.2113/GSELEMENTS.4.2.89>
- Fortune, S., Lu, J., Addiscott, T. M., & Brookes, P. C. (2005). Assessment of phosphorus leaching losses from arable land. *Plant and Soil*, *269*(1–2), 99–108. <https://doi.org/10.1007/s11104-004-1659-4>
- Gao, N., Su, Y., Min, J., Shen, W., & Shi, W. (2010). Transgenic tomato overexpressing ath-miR399d has enhanced phosphorus accumulation through increased acid phosphatase and proton secretion as well as phosphate transporters. *Plant and Soil*, *334*(1), 123–136. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0219-3>
- Gaxiola, R. A., Edwards, M., & Elser, J. J. (2011). A transgenic approach to enhance phosphorus use efficiency in crops as part of a comprehensive strategy for sustainable agriculture. *Chemosphere*, *84*(6), 840–845. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.062>
- Gaxiola, R. A., Regmi, K., & Hirschi, K. D. (2016). Moving On Up: H<sup>+</sup>-PPase Mediated Crop Improvement. *Trends in Biotechnology*, *34*(5), 347–349. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.12.016>
- Gerke, J. (1992). Phosphate, aluminium and iron in the soil solution of three different soils in relation to varying concentrations of citric acid. *Zeitschrift Für Pflanzenernährung Und Bodenkunde*, *155*(4), 339–343. <https://doi.org/10.1002/jpln.19921550417>
- Gerke, J., Römer, W., & Beißner, L. (2000). The quantitative effect of chemical phosphate mobilization by carboxylate anions on P uptake by a single root. II. The importance of soil and plant parameters for uptake of mobilized P. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *163*(2), 213–219. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-2624\(200004\)163:2<213::AID-JPLN213>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-2624(200004)163:2<213::AID-JPLN213>3.0.CO;2-0)
- Gilbert, N. (2009). Environment: The disappearing nutrient. *Nature*, *461*(7265), 716–718. <https://doi.org/10.1038/461716a>
- Golovan, S. P., Meidinger, R. G., Ajakaiye, A., Cottrill, M., Wiederkehr, M. Z., Barney, D. J., ... Forsberg, C. W. (2001). Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnology*, *19*(8), 741–745. <https://doi.org/10.1038/90788>
- Gregory, P. (2006). Roots and the Architecture of Root Systems. In *Plant Roots* (pp. 18–44). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470995563.ch2>
- 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?

- Molecular Plant*, 9(3), 396–416. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.12.012>
- Gutiérrez-Alanís, D., Ojeda-Rivera, J. O., Yong-Villalobos, L., Cárdenas-Torres, L., & Herrera-Estrella, L. (2018). Adaptation to Phosphate Scarcity: Tips from Arabidopsis Roots. *Trends in Plant Science*, xx, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.04.006>
- Gutiérrez-Alanís, D., Yong-Villalobos, L., Jiménez-Sandoval, P., Alatorre-Cobos, F., Oropeza-Aburto, A., Mora-Macías, J., ... Herrera-Estrella, L. (2017). Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14 Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling. *Developmental Cell*, 41(5), 555–570.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.05.009>
- Ham, B. K., Chen, J., Yan, Y., & Lucas, W. J. (2018). Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.07.005>
- Hanlon, M. T., Ray, S., Saengwilai, P., Luthe, D., Lynch, J. P., & Brown, K. M. (2018). Buffered delivery of phosphate to Arabidopsis alters responses to low phosphate. *Journal of Experimental Botany*, 69(5), 1207–1219. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx454>
- Harvey, P. R., Warren, R. A., & Wakelin, S. (2009). Potential to improve root access to phosphorus: The role of non-symbiotic microbial inoculants in the rhizosphere. *Crop and Pasture Science*, 60(2), 144–151. <https://doi.org/10.1071/CP08084>
- Hasan, M. M., Hasan, M. M., Teixeira da Silva, J. A., & Li, X. (2016). Regulation of phosphorus uptake and utilization: Transitioning from current knowledge to practical strategies. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 21(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s11658-016-0008-y>
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichey, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Møller, I. S., & White, P. (2012). Functions of Macronutrients. In *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (pp. 135–189). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6>
- Heffer, P., Gruère, A., & Roberts, T. (2017). *Assessment of Fertilizer Use by Crop at the Global Level*. Retrieved from [https://www.fertilizer.org/images/Library\\_Downloads/2017\\_IFA\\_AgCom\\_17\\_134\\_rev\\_FUBC\\_assessment\\_2014.pdf](https://www.fertilizer.org/images/Library_Downloads/2017_IFA_AgCom_17_134_rev_FUBC_assessment_2014.pdf)
- Hemwall, J. B. (1957). The Fixation of Phosphorus by Soils. *Advances in Agronomy*, 9(C), 95–112. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60110-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60110-8)
- Hernández, I., & Munné-Bosch, S. (2015). Linking phosphorus availability with photo-oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 66(10), 2889–2900. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv056>
- Heuer, S., Gaxiola, R., Schilling, R., Herrera-Estrella, L., López-Arredondo, D., Wissuwa, M., ... Rouached, H. (2017). Improving phosphorus use efficiency: a complex trait with emerging opportunities. *Plant Journal*, 90(5), 868–885. <https://doi.org/10.1111/tpj.13423>
- Hochholdinger, F., & Zimmermann, R. (2008). Conserved and diverse mechanisms in root development. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(1), 70–74. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.10.002>
- Hodge, A. (2004). The plastic plant: Root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*, 162(1), 9–24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01015.x>
- Hoekenga, O. A., Maron, L. G., Piñeros, M. A., Cançado, G. M. A., Shaff, J., Kobayashi, Y., ... Kochian, L. V. (2006). AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), 9738–9743. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602868103>
- Hoekenga, O. A., Vision, T. J., Shaff, J. E., Monforte, A. J., Lee, G. P., Howell, S. H., & Kochian, L. V. (2003). Identification and Characterization of Aluminum Tolerance Loci in Arabidopsis (

- Landsberg erecta (Columbia) by Quantitative Trait Locus Mapping . A Physiologically Simple But Genetically Complex Trait 1, (June), 936–948. <https://doi.org/10.1104/pp.103.023085.worldwide>
- Hossner, L. R. (2008). Macronutrients. In W. Chesworth (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science* (pp. 443–445). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3995-9\\_337](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3995-9_337)
- Itoh, S., & Barber, S. A. (1983). Phosphorus Uptake by Six Plant Species as Related to Root Hairs. *Agronomy Journal*, 75(3), 457. <https://doi.org/10.2134/agronj1983.00021962007500030010x>
- Iuchi, S., Koyama, H., Iuchi, A., Kobayashi, Y., Kitabayashi, S., Kobayashi, Y., ... Kobayashi, M. (2007). Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9900–9905. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700117104>
- Jain, A., Poling, M. D., Karthikeyan, A. S., Blakeslee, J. J., Peer, W. A., Titapiwatanakun, B., ... Raghothama, K. G. (2007). Differential Effects of Sucrose and Auxin on Localized Phosphate Deficiency-Induced Modulation of Different Traits of Root System Architecture in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 144(1), 232–247. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092130>
- Kimball, S., Mattis, P., & The GIMP Team. (2017). GNU Image Manipulation Program (GIMP). Retrieved from <http://www.gimp.org/>
- Kirk, G. J. D., & Van Du, L. (1997). Changes in rice root architecture, porosity, and oxygen and proton release under phosphorus deficiency. *New Phytologist*, 135(2), 191–200. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00640.x>
- Kirkby, E. A., & Johnston, A. E. (2008). Soil and fertilizer phosphorus in relation to crop nutrition (pp. 177–223). Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8435-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8435-5_9)
- Kobayashi, Y., Hoekenga, O. A., Itoh, H., Nakashima, M., Saito, S., Shaff, J. E., ... Koyama, H. (2007). Characterization of AtALMT1 Expression in Aluminum-Inducible Malate Release and Its Role for Rhizotoxic Stress Tolerance in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 145(3), 843–852. <https://doi.org/10.1104/pp.107.102335>
- Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Sugimoto, M., Lakshmanan, V., Iuchi, S., Kobayashi, M., ... Koyama, H. (2013). Characterization of the Complex Regulation of AtALMT1 Expression in Response to Phytohormones and Other Inducers. *Plant Physiology*, 162(2), 732–740. <https://doi.org/10.1104/pp.113.218065>
- Kobayashi, Y., Lakshmanan, V., Kobayashi, Y., Asai, M., Iuchi, S., Kobayashi, M., ... Koyama, H. (2013). Overexpression of AtALMT1 in the Arabidopsis thaliana ecotype Columbia results in enhanced Al-activated malate excretion and beneficial bacterium recruitment. *Plant Signaling & Behavior*, 8(9), e25565. <https://doi.org/10.4161/psb.25565>
- Kobayashi, Y., Ohshima, Y., Kobayashi, Y., Ito, H., Iuchi, S., Fujita, M., ... Koyama, H. (2014). STOP2 activates transcription of several genes for Al- and low pH-tolerance that are regulated by STOP1 in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 7(2), 311–322. <https://doi.org/10.1093/mp/sst116>
- Kopittke, P. M., McKenna, B. A., Karunakaran, C., Dynes, J. J., Arthur, Z., Gianoncelli, A., ... Blamey, F. P. C. (2017). Aluminum Complexation with Malate within the Root Apoplast Differs between Aluminum Resistant and Sensitive Wheat Lines. *Frontiers in Plant Science*, 8(August), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01377>
- Koyama, H., Kawamura, A., Kihara, T., Hara, T., Takita, E., & Shibata, D. (2000). Overexpression of Mitochondrial Citrate Synthase in Arabidopsis thaliana Improved Growth on a Phosphorus-Limited Soil. *Plant and Cell Physiology*, 41(9), 1030–1037. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcd029>
- Lambers, H., Martinoia, E., & Renton, M. (2015). Plant adaptations to severely phosphorus-impooverished soils. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.04.002>
- Lei, M., Liu, Y., Zhang, B., Zhao, Y., Wang, X., Zhou, Y., ... Liu, D. (2011). Genetic and genomic evidence

- that sucrose is a global regulator of plant responses to phosphate starvation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 156(3), 1116–1130. <https://doi.org/10.1104/pp.110.171736>
- Li, J., & Copeland, L. (2000). Role of malonate in chickpeas. *Phytochemistry*, 54(6), 585–589. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00162-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00162-X)
- Liu, J., Magalhaes, J. V., Shaff, J., & Kochian, L. V. (2009). Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *The Plant Journal*, 57(3), 389–399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03696.x>
- Liu, Y., Villalba, G., Ayres, R. U., & Schroder, H. (2008). Global phosphorus flows and environmental impacts from a consumption perspective. *Journal of Industrial Ecology*, 12(2), 229–247. <https://doi.org/10.1111/j.1530-9290.2008.00025.x>
- López-Arredondo, D. L., & Herrera-Estrella, L. (2012). Engineering phosphorus metabolism in plants to produce a dual fertilization and weed control system. *Nature Biotechnology*, 30(9), 889–893. <https://doi.org/10.1038/nbt.2346>
- López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., López-Bucio, J., & Herrera-Estrella, L. (2014). Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 95–123. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035949>
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 280–287. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)
- López-Bucio, J., De la Vega, O. M., Guevara-García, A., & Herrera-Estrella, L. (2000). Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotechnology*, 18(4), 450–453. <https://doi.org/10.1038/74531>
- 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 Physiology*, 129(1), 244–256. <https://doi.org/10.1104/pp.010934>
- Lü, J., Gao, X., Dong, Z., Yi, J., & An, L. (2012). Improved phosphorus acquisition by tobacco through transgenic expression of mitochondrial malate dehydrogenase from *Penicillium oxalicum*. *Plant Cell Reports*, 31(1), 49–56. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1138-3>
- Lynch, J. P. (1995). Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology*, 109(1), 7–13. <https://doi.org/10.1104/pp.109.1.7>
- Lynch, J. P. (2011). Root Phenotypes for Enhanced Soil Exploration and Phosphorus Acquisition: Tools for Future Crops. *Plant Physiology*, 156(3), 1041–1049. <https://doi.org/10.1104/pp.111.175414>
- Lynch, J. P., & Beebe, S. E. (1995). Adaptation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) to low phosphorus availability. *HortScience*, 30(6), 1165–1171.
- Lynn, A. K., & Bonfield, W. (2005). A novel method for the simultaneous, titrant-free control of pH and calcium phosphate mass yield. *Accounts of Chemical Research*, 38(3), 202–207. <https://doi.org/10.1021/ar040234d>
- Ma, Z., Bielenberg, D. G., Brown, K. M., & Lynch, J. P. (2001). Regulation of root hair density by phosphorus availability in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell and Environment*, 24(4), 459–467. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00695.x>
- Ma, Z., Walk, T. C., Marcus, A., & Lynch, J. P. (2001). Morphological synergism in root hair length, density, initiation and geometry for phosphorus acquisition in Arabidopsis thaliana: A modeling approach. *Plant and Soil*, 236(2), 221–235. <https://doi.org/10.1023/A:1012728819326>
- Manna, M., Achary, V. M. M., Islam, T., Agrawal, P. K., & Reddy, M. K. (2016). The development of a

- phosphite-mediated fertilization and weed control system for rice. *Scientific Reports*, 6(April), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep24941>
- Martinez-Trujillo, M., Limones-Briones, V., Cabrera-Ponce, J. L., & Herrera-Estrella, L. (2004). Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22(1), 63–70. <https://doi.org/10.1007/BF02773350>
- Mollier, a, & Pellerin, S. (1999). Maize root system growth and development as influenced by phosphorus deficiency. *J. Exp. Bot.*, 50(333), 487–497. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1093/jexbot/50.333.487>
- Mora-Macías, J., Ojeda-Rivera, J. O., Gutiérrez-Alanís, D., Yong-Villalobos, L., Oropeza-Aburto, A., Raya-González, J., ... Herrera-Estrella, L. (2017). Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(17), E3563–E3572. <https://doi.org/10.1073/pnas.1701952114>
- Müller, J., Toev, T., Heisters, M., Teller, J., Moore, K. L., Hause, G., ... Abel, S. (2015). Iron-Dependent Callose Deposition Adjusts Root Meristem Maintenance to Phosphate Availability. *Developmental Cell*, 33(2), 216–230. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.007>
- Neumann, G., & Römheld, V. (2007). The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In R. Pinton, Z. Varanini, & Z. Nannipieri (Eds.), *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface* (2nd ed., pp. 23–72). Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.2134/jeq2009.0001br>
- Neuwirth, E. (2014). RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=RColorBrewer>
- Nord, E. A., & Lynch, J. P. (2008). Delayed reproduction in *Arabidopsis thaliana* improves fitness in soil with suboptimal phosphorus availability. *Plant, Cell and Environment*, 31(10), 1432–1441. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01857.x>
- Obersteiner, M., Peñuelas, J., Ciais, P., van der Velde, M., & Janssens, I. A. (2013). The phosphorus trilemma. *Nature Geoscience*, 6(11), 897–898. <https://doi.org/10.1038/ngeo1990>
- Pandeya, D., López-Arredondo, D. L., Janga, M. R., Campbell, L. M., Estrella-Hernández, P., Bagavathiannan, M. V., ... Rathore, K. S. (2018). Selective fertilization with phosphite allows unhindered growth of cotton plants expressing the ptxD gene while suppressing weeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 201804862. <https://doi.org/10.1073/pnas.1804862115>
- Pound, M. P., French, A. P., Atkinson, J. A., Wells, D. M., Bennett, M. J., & Pridmore, T. (2013). Breakthrough Technologies RootNav: Navigating Images of Complex Root Architectures 1[C][W]. <https://doi.org/10.1104/pp.113.221531>
- Price, G. (2006). *Australian soil fertility manual*. (G. Price, Ed.) (3rd ed.). Fertilizer Industry Federation of Australia. CSIRO.
- R Core Team. (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- 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 & Development*, 15(16), 2122–2133. <https://doi.org/10.1101/gad.204401.availability>
- Ruttenberg, K. C. (2003). The Global Phosphorus Cycle. In *Treatise on Geochemistry* (Vol. 8, pp. 585–643). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-08-043751-6/08153-6>
- Ryan, P., Delhaize, E., & Jones, D. (2001). Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 527–560. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.527>
- Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Gutierrez-Ortega, A., Hernandez-Abreu, E.,

- & Herrera-Estrella, L. (2006). Characterization of low phosphorus insensitive Mutants Reveals a Crosstalk between Low Phosphorus-Induced Determinate Root Development and the Activation of Genes Involved in the Adaptation of Arabidopsis to Phosphorus Deficiency. *Plant Physiology*, *140*(3), 879–889. <https://doi.org/10.1104/pp.105.073825>
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S. J., Ryan, P. R., ... Matsumoto, H. (2004). A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter, 645–653. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2003.01991.x>
- Sawaki, Y., Iuchi, S., Kobayashi, Y., Kobayashi, Y., Ikka, T., Sakurai, N., ... Koyama, H. (2009). STOP1 Regulates Multiple Genes That Protect Arabidopsis from Proton and Aluminum Toxicities. *Plant Physiology*, *150*(1), 281–294. <https://doi.org/10.1104/pp.108.134700>
- Schlesinger, W. H., Bernhardt, E. S., Schlesinger, W. H., & Bernhardt, E. S. (2013). The Global Cycles of Nitrogen and Phosphorus. In *Biogeochemistry* (pp. 445–467). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385874-0.00012-1>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Seo, H. M., Jung, Y., Song, S., Kim, Y., Kwon, T., Kim, D. H., ... Nam, J. (2008). Increased expression of OsPT1, a high-affinity phosphate transporter, enhances phosphate acquisition in rice. *Biotechnology Letters*, *30*(10), 1833–1838. <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9757-7>
- Shimada, T. L., Shimada, T., & Hara-Nishimura, I. (2010). A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of Arabidopsis thaliana: TECHNICAL ADVANCE. *Plant Journal*, *61*(3), 519–528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04060.x>
- Stutter, M. I., Shand, C. A., George, T. S., Blackwell, M. S. A., Dixon, L., Bol, R., ... Haygarth, P. M. (2015). Land use and soil factors affecting accumulation of phosphorus species in temperate soils. *Geoderma*, *257–258*, 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2015.03.020>
- Svistoonoff, S., Creff, A., Reymond, M., Sigoillot-Claude, C., Ricaud, L., Blanchet, A., ... Desnos, T. (2007). Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics*, *39*(6), 792–796. <https://doi.org/10.1038/ng2041>
- Talboys, P. J., Heppell, J., Roose, T., Healey, J. R., Jones, D. L., & Withers, P. J. A. (2016). Struvite: a slow-release fertiliser for sustainable phosphorus management? *Plant and Soil*, *401*(1–2), 109–123. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2747-3>
- Tanabata, T., Shibaya, T., Hori, K., Ebana, K., & Yano, M. (2012). SmartGrain: High-Throughput Phenotyping Software for Measuring Seed Shape through Image Analysis. *Plant Physiology*, *160*(4), 1871–1880. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205120>
- Thibaud, M. C., Arrighi, J. F., Bayle, V., Chiarenza, S., Creff, A., Bustos, R., ... Nussaume, L. (2010). Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in Arabidopsis. *Plant Journal*, *64*(5), 775–789. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04375.x>
- Tian, J., Wang, X., Tong, Y., Chen, X., & Liao, H. (2012). Bioengineering and management for efficient phosphorus utilization in crops and pastures. *Current Opinion in Biotechnology*, *23*(6), 866–871. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.03.002>
- Ticconi, C. A., Lucero, R. D., Sakhonwasee, S., Adamson, A. W., Creff, A., Nussaume, L., ... Abel, S. (2009). ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *106*(33), 14174–14179. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901778106>
- Tiessen, H. (2008). Phosphorus in the global environment. In H. J. P. White P.J. (Ed.), *The Ecophysiology of Plant-Phosphorus Interactions* (pp. 1–7). Dordrecht: Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8435-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8435-5_1)
- Tjellström, H., Andersson, M. X., Larsson, K. E., & Sandelius, A. S. (2008). Membrane phospholipids

- as a phosphate reserve: The dynamic nature of phospholipid-to-digalactosyl diacylglycerol exchange in higher plants. *Plant, Cell and Environment*, 31(10), 1388–1398. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01851.x>
- Tokizawa, M., Kobayashi, Y., Saito, T., Kobayashi, M., Iuchi, S., Nomoto, M., ... Koyama, H. (2015). SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1, CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR2, and Other Transcription Factors Are Involved in *ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER1* Expression. *Plant Physiology*, 167(3), 991–1003. <https://doi.org/10.1104/pp.114.256552>
- United States Geological Survey. (2018). *Phosphate Rock. Mineral Commodity Summaries*. Retrieved from [https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/phosphate\\_rock/mcs-2018-phosp.pdf](https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/phosphate_rock/mcs-2018-phosp.pdf)
- Versaw, W. K., & Garcia, L. R. (2017). Intracellular transport and compartmentation of phosphate in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 39, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.015>
- von Uexküll, H. R., & Mutert, E. (1995). Global Extent, Development and Economic-Impact of Acid Soils. *Plant and Soil*, 171, 1–15. <https://doi.org/10.1007/BF00009558>
- Wang, D., Lv, S., Jiang, P., & Li, Y. (2017). Roles, Regulation, and Agricultural Application of Plant Phosphate Transporters. *Frontiers in Plant Science*, 8(May), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00817>
- Wang, Y.-L., Almvik, M., Clarke, N., Eich-Greatorex, S., Øgaard, A. F., Krogstad, T., ... Clarke, J. L. (2015). Contrasting responses of root morphology and root-exuded organic acids to low phosphorus availability in three important food crops with divergent root traits. *AoB Plants*, 7, plv097. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plv097>
- Wang, Y., Xu, H., Kou, J., Shi, L., Zhang, C., & Xu, F. (2013). Dual effects of transgenic Brassica napus overexpressing CS gene on tolerances to aluminum toxicity and phosphorus deficiency. *Plant and Soil*, 362(1–2), 231–246. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1289-1>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer-Verlag. Retrieved from <http://ggplot2.org>
- Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2018). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. Retrieved from <https://cran.r-project.org/package=dplyr>
- Wild, R., Gerasimaite, R., Jung, J. Y., Truffault, V., Pavlovic, I., Schmidt, A., ... Mayer, A. (2016). Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science*, 352(6288), 986–990. <https://doi.org/10.1126/science.aad9858>
- Xiao, K., Harrison, M. J., & Wang, Z. Y. (2005). Transgenic expression of a novel *M. truncatula* phytase gene results in improved acquisition of organic phosphorus by Arabidopsis. *Planta*, 222(1), 27–36. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-1511-y>
- Yang, H., Knapp, J., Koirala, P., Rajagopal, D., Peer, W. A., Silbart, L. K., ... Gaxiola, R. A. (2007). Enhanced phosphorus nutrition in monocots and dicots over-expressing a phosphorus-responsive type I H<sup>+</sup>-pyrophosphatase. *Plant Biotechnology Journal*, 5(6), 735–745. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2007.00281.x>
- Yang, W. T., Baek, D., Yun, D. J., Hwang, W. H., Park, D. S., Nam, M. H., ... Kim, D. H. (2014). Overexpression of OsMYB4P, an R2R3-type MYB transcriptional activator, increases phosphate acquisition in rice. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80, 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.02.024>
- Yang, X., Post, W. M., Thornton, P. E., Jain, A., & Ridge, O. (2013). The distribution of soil phosphorus for global biogeochemical modeling, 2525–2537. <https://doi.org/10.5194/bg-10-2525-2013>
- Yong-Villalobos, L., Cervantes-Pérez, S. A., Gutiérrez-Alanis, D., Gonzales-Morales, S., Martínez, O., & Herrera-Estrella, L. (2016). Phosphate starvation induces DNA methylation in the vicinity of cis-acting elements known to regulate the expression of phosphate-responsive genes. *Plant*

- Signaling and Behavior*, 11(5), 1–4. <https://doi.org/10.1080/15592324.2016.1173300>
- Yong-Villalobos, L., González-Morales, S. I., Wrobel, K., Gutiérrez-Alanis, D., Cervantes-Peréz, S. A., Hayano-Kanashiro, C., ... Herrera-Estrella, L. (2015). Methylome analysis reveals an important role for epigenetic changes in the regulation of the *Arabidopsis* response to phosphate starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(52), E7293–E7302. <https://doi.org/10.1073/pnas.1522301112>
- Yu, H., Chin, M., Yuan, T., Bian, H., Remer, L. a., Prospero, J. M., ... Zhao, C. (2015). The Fertilizing Role of African Dust in the Amazon Rainforest: A First Multiyear Assessment Based on CALIPSO Lidar Observations. *Geophysical Research Letters*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/2015GL063040>
- Zhang, Z., Liao, H., & Lucas, W. J. (2014). Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 56(3), 192–220. <https://doi.org/10.1111/jipb.12163>
- Zhang, Z., Zheng, Y., Ham, B. K., Chen, J., Yoshida, A., Kochian, L. V., ... Lucas, W. J. (2016). Vascular-mediated signalling involved in early phosphate stress response in plants. *Nature Plants*, 2(4), 1–9. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2016.33>
- Zhu, X. F., Wang, Z. W., Wan, J. X., Sun, Y., Wu, Y. R., Li, G. X., ... Zheng, S. J. (2015). Pectin enhances rice (*Oryza sativa*) root phosphorus remobilization. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 1017–1024. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru461>
- Zhu, Y., Yan, F., Zörb, C., & Schubert, S. (2005). A link between citrate and proton release by proteoid roots of white lupin (*Lupinus albus* L.) grown under phosphorus-deficient conditions? *Plant and Cell Physiology*, 46(6), 892–901. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci094>
- Zobel, R. W., & Waisel, Y. (2010). A plant root system architectural taxonomy: A framework for root nomenclature. *Plant Biosystems*, 144(2), 507–512. <https://doi.org/10.1080/11263501003764483>

## X. ANEXOS

### Información A1: Condiciones UPLC-HRMS

Las muestras secas se disolvieron en 50 µL de disolvente (5% metanol, 95% H<sub>2</sub>O + 0.1% ácido fórmico), se agitaron en vortex 30 segundos y se centrifugaron (3 min. a 12,000 g). Se transfirieron 20 µL a placas de 96 pocillos para su análisis.

Se prepararon curvas de calibración de 0.1 a 100 µM en el mismo disolvente para la cuantificación por estándares externos.

Se empleo un método UPLC-MS/MS (análisis dirigido) en el sistema Acquity UPLC – Synapt HDMS (ver Tabla adjunta). 5 µL de muestra fueron inyectados en una columna de fase reversa (RP) Acquity UPLC HSS-T3 de 100 mm con tamaño de partícula de 1.8 µm. La fase A consistió en H<sub>2</sub>O + 0.1% de ácido fórmico y la fase B de metanol + 0.1% de ácido fórmico. El gradiente consistió en un segmento



isocrático de 2.5 minutos a 1% de fase B (donde son separados los analitos) seguido de una fase de lavado de 2.5 min a 99% de fase B y un periodo de equilibrio de 2 minutos a 1% de fase B. El MS se operó en modo ESI- utilizando un método MS/MS para filtrar y detectar los analitos a baja energía de colisión con focalización del TOF para maximizar la señal (*Enhanced duty cycle*) del ion precursor o de un fragmento específico. El equipo fue operado usando el software MassLynx (v4.1). La integración de picos y cuantificación de analitos se realizó utilizando Skyline.

---

#### 1. Condiciones de la cromatografía líquida (en inglés)

---

Column: Acquity UPLC HSS T3 1.8 $\mu$ m 100 mm

Instrument: Acquity UPLC

Injection Volume 5  $\mu$ L

Phase A: 100% H<sub>2</sub>O + 0.1% formic acid

Phase B: 100% Methanol + 0.1% formic acid

Gradient:

Time(min)	Flow Rate	%A	%B	Curve
Initial	0.3	99	1	Initial
2.5	0.3	99	1	6
2.6	0.3	1	99	6
4	0.3	1	99	6
4.01	0.3	99	1	6
6	0.3	99	1	6

---

#### 2. Condiciones de la espectrometría de masas (en inglés)

---

Instrument: Synapt G1 Q-TOF

Polarity: ES-

Analyser: V Mode

Capillary (kV): 2.6

Sampling Cone: 40.0

Extraction Cone: 4.0

Source Temperature (°C): 100

Desolvation Temperature (°C): 500

Cone Gas Flow (L/Hr): 0.0

Desolvation Gas Flow (L/Hr): 600.0

Trap CE: 6

Transfer CE: 4

Method: Scheduled targeted MS/MS with EDC for each precursor or a specific fragment

---

## Información A2. Condiciones MALDI-MSI (en inglés)

### Sample Preparation for MALDI-MSI

The root samples placed over on nylon membranes were dried at room temperature for 10 minutes. CHCA matrix at 3.6 mg·mL<sup>-1</sup> was applied until a homogenous layer was formed over the roots and the membrane (600  $\mu$ L for each plate with 7 to 8 roots), using a microsprayer with a flux of 50  $\mu$ L·min<sup>-1</sup> and 600 L/h of nitrogen as desolvation gas.

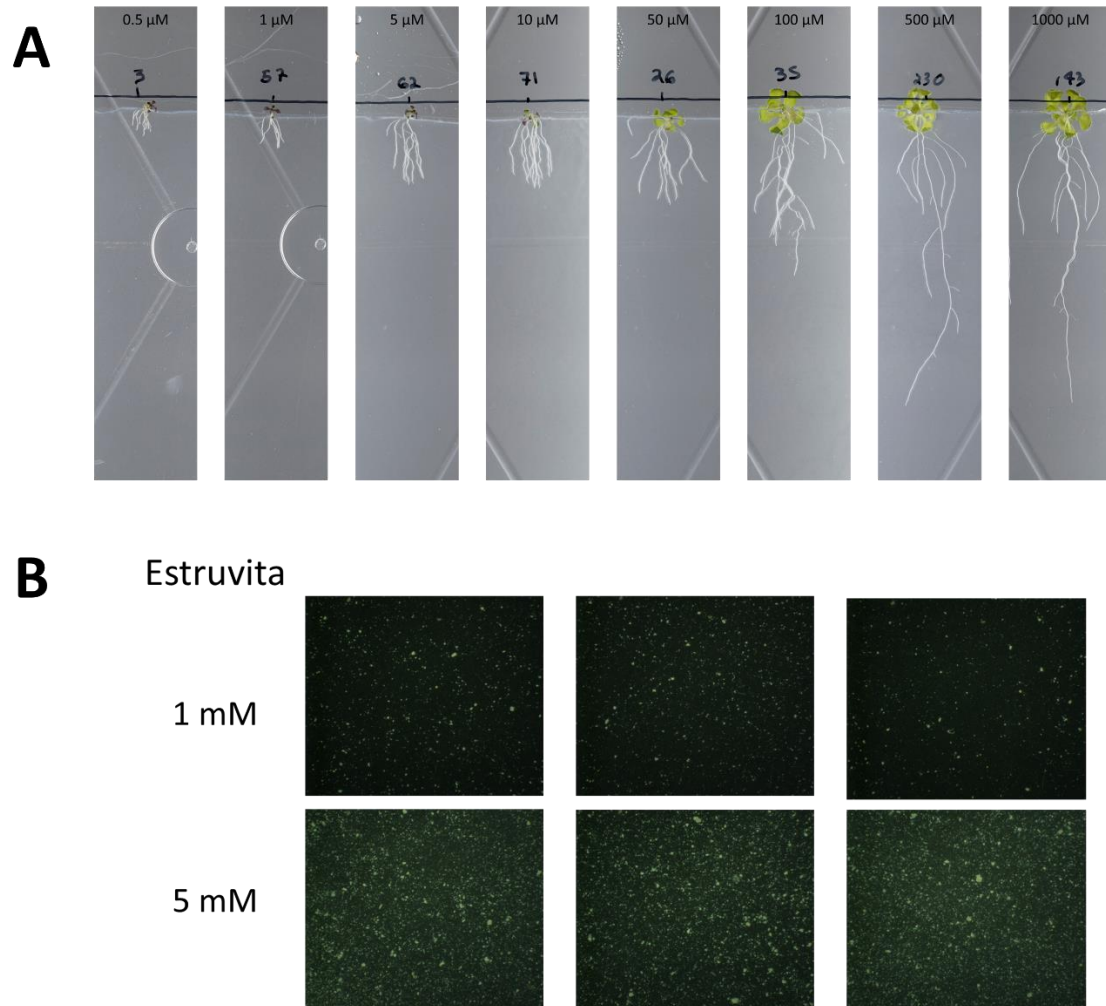
## MALDI-MSI analysis and data treatment

Samples covered with MALDI matrix were analyzed by MALDI-Mass-Spectrometry-Imaging (MALDI-MSI) using a Synapt™ HDMS (G1; Waters Corporation, Massachusetts, USA) operating with a Nd:YAG laser. All the analyses were performed in negative ionization with a  $m/z$  resolution of 9,000 FWHM (V-mode) and a spatial resolution of 50 or 25  $\mu\text{m}$ . Standard solutions and initial *A. thaliana* roots were analyzed in MS-profiling mode to choose an adequate adduct of the analyte for MS/MS analysis. MS/MS methods were manually optimized for each analyte to study their distribution in samples by filtering a specific adduct at the quadrupole, fragmenting the ion and using an *Enhanced Duty Cycle* (EDC) on the pusher to increase sensitivity on a selected fragment. In the optimized methods, the laser energy was 350 (arbitrary units), with a firing rate of 200 Hz during 2 seconds of analysis per scan and one scan per pixel and data was acquired with a lower limit of 100  $m/z$ . The  $[2((M - \text{H}_2\text{O}) - \text{H} + \text{Na}) - \text{H}]^-$  adducts of malate or citrate were selected as precursors and filtered at the quadrupole with a mass offset of  $\pm 2$   $m/z$ .

Malate was analyzed by filtering the  $m/z$  274.98 as precursor, using a CE of 12 eV in the transfer cell and 12 eV in the trap cell and the pusher was focused (EDC) on the 115.0611 fragment. The  $m/z$  391.18 was used as precursor for the analysis of citrate and fragmented with 18 eV and 14 eV at the transfer and trap cells, respectively, and the EDC was focused (EDC) on the 111.0761 fragment.

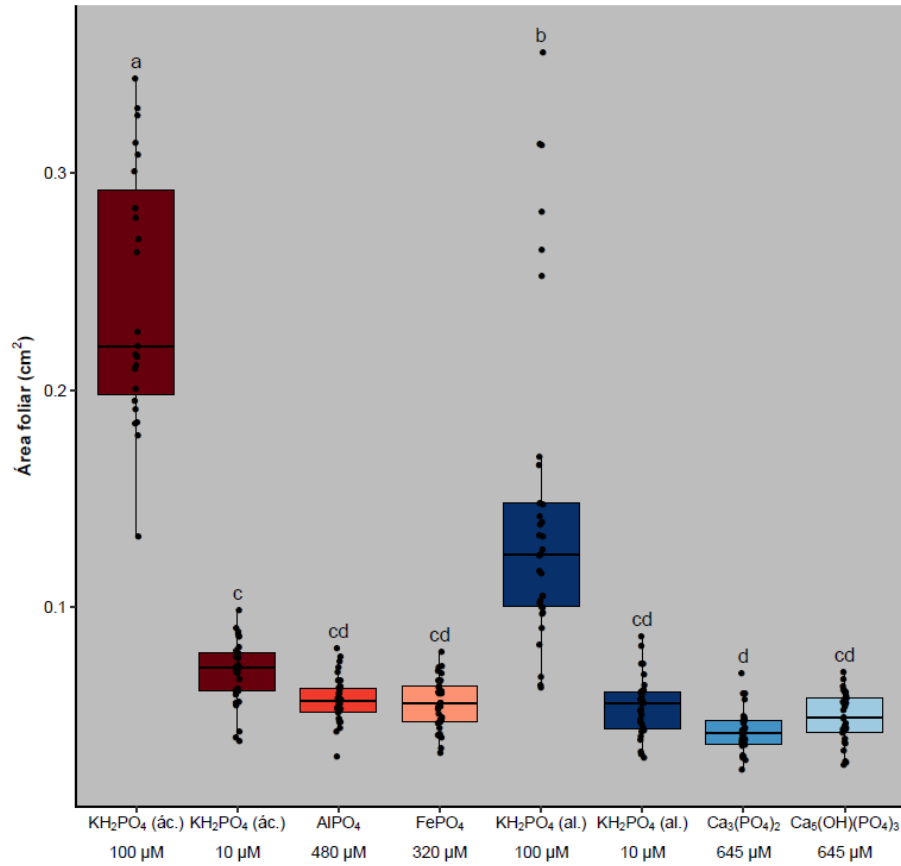
Digital pictures of the plates were imported into the MALDI Imaging Pattern Creator software to select the region of interest for analysis. For roots, an area of 9  $\text{mm}^2$  (4 x 2.5 mm) around the root's apices was selected. The mass-spectrometer was piloted using MassLynx (v4.1) and the MSI data was analyzed using the HDImaging software (v1.4) to reconstruct 2-D ion density maps (software from Waters Corporation).

**Figura A1. Sistema *in vitro* a base de goma gellan**



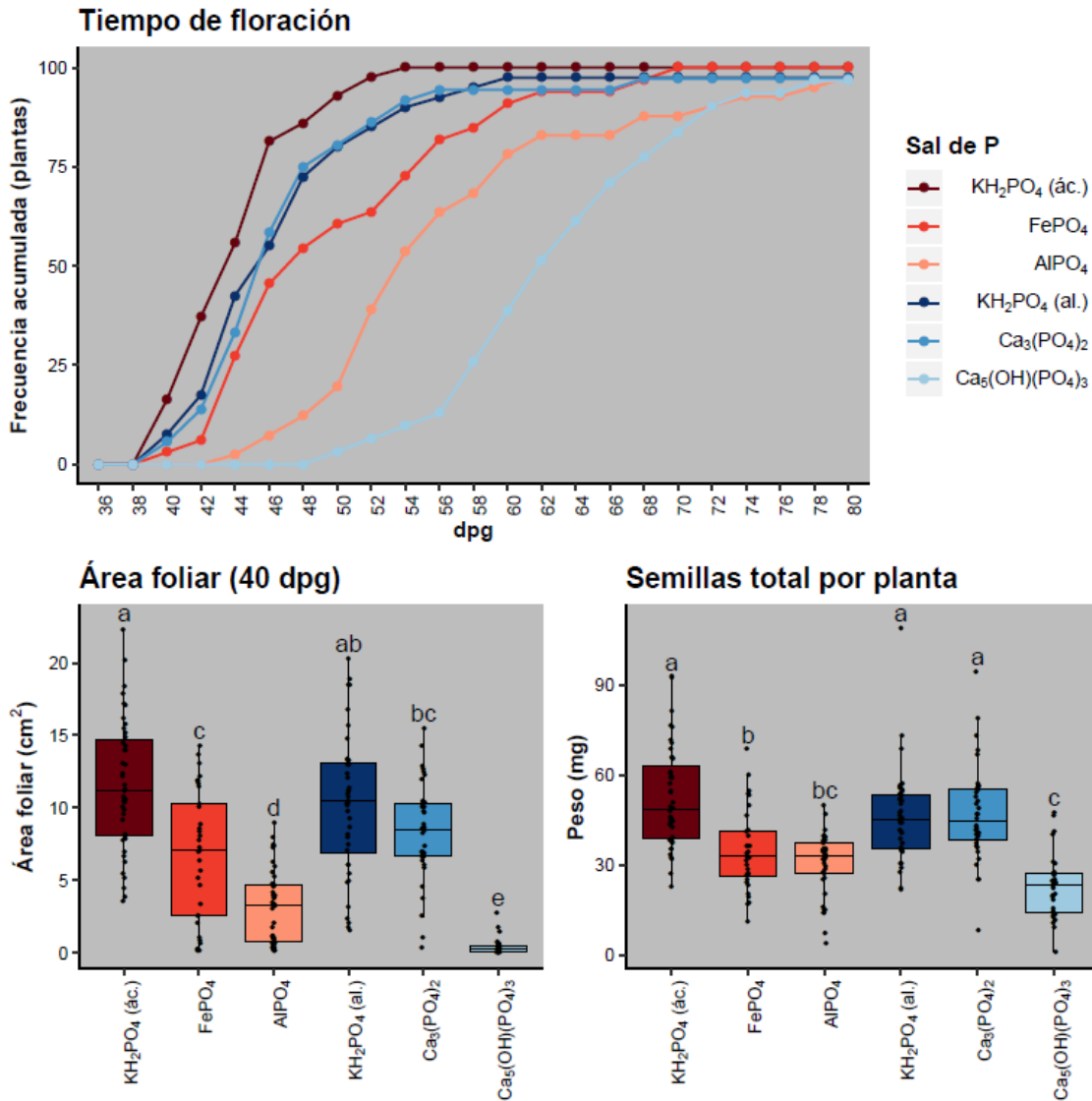
**(A)** Plantas de 24 dpv representativas de cada tratamiento de P (0.5 – 1000  $\mu\text{M}$ ) en la cinética para la validación del sistema *in vitro*.  
**(B)** Distribución en gel de estruvita, una sal insoluble de P, a concentraciones de 1 y 5 mM.

**Figura A2. Optimización de las concentraciones de las sales insolubles de P en el sistema *in vitro***



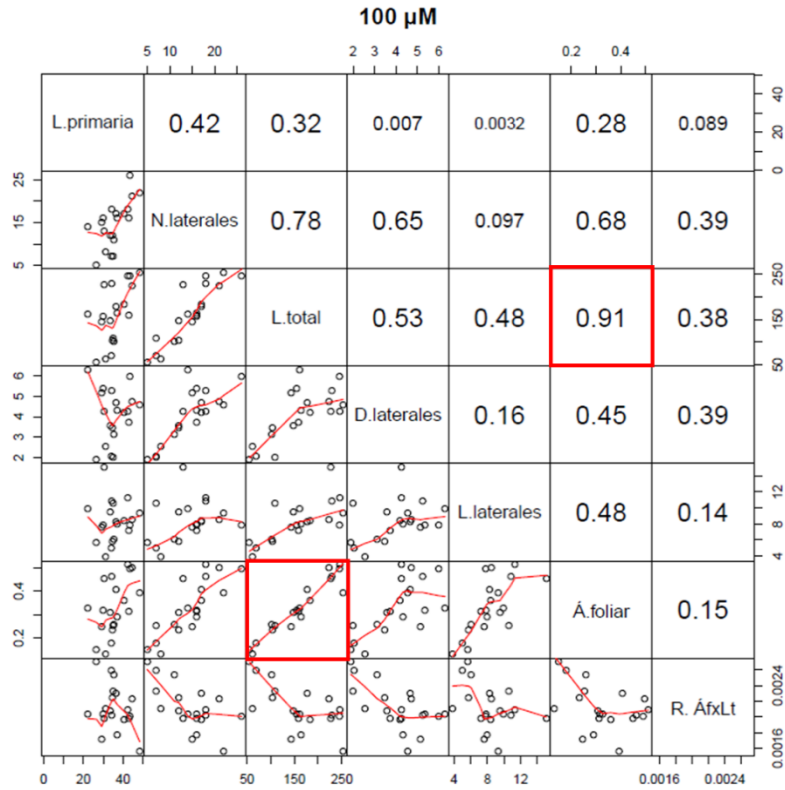
Se utilizaron únicamente plantas silvestres de *Arabidopsis*, tomándose los datos de área foliar a los 25 dpg. Se evaluaron las sales de fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), fosfato de aluminio (AlPO<sub>4</sub>), fosfato de hierro (FePO<sub>4</sub>), fosfato tricálcico [Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] e hidroxiapatita [Ca<sub>5</sub>(OH)(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]. Los tonos rojizos representan a los tratamientos dispuestos a pH = 4.50 y los tonos azules a pH = 8.0. Los grupos estadísticos se encuentran representados con letras y fueron determinados mediante ANOVA-Tukey HSD (valor de p < 0.05, n = 23-33).

**Figura A3. Optimización de las concentraciones de las sales insolubles de P en el sistema de hidroponía en sustrato**



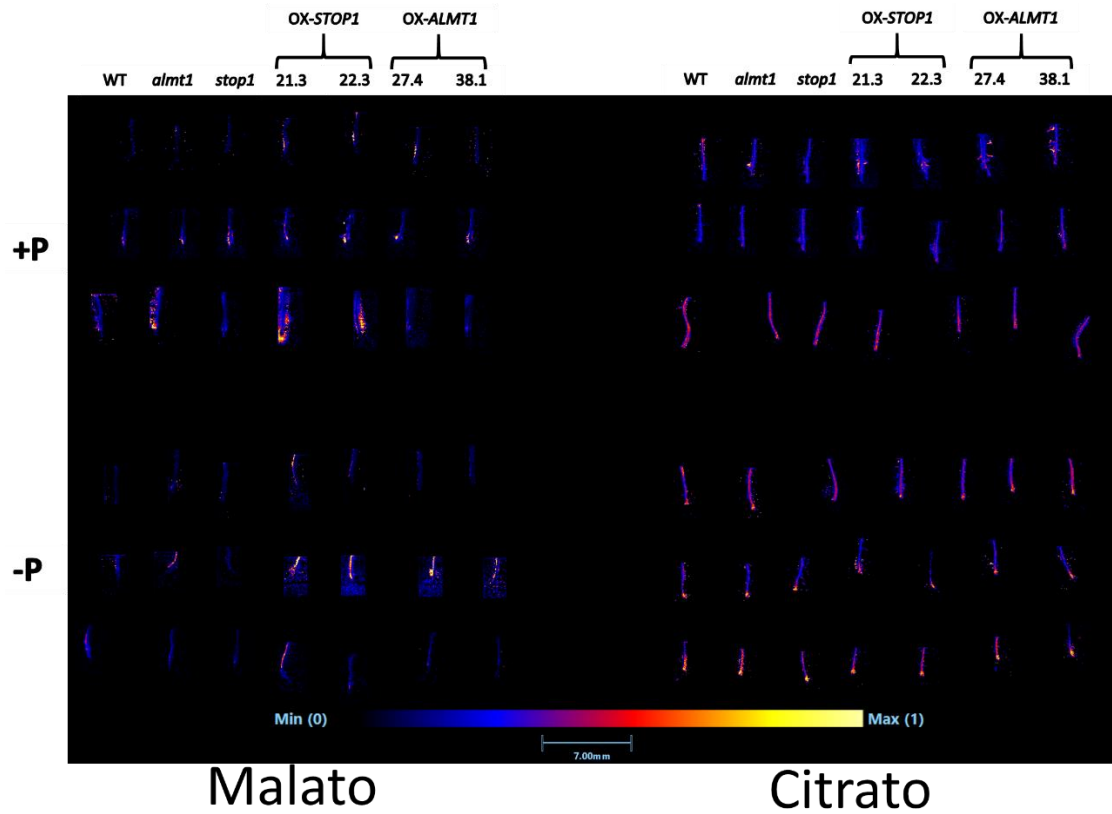
Se utilizaron únicamente plantas silvestres de Arabidopsis. Se evaluaron las sales de fosfato monopotásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), fosfato de aluminio (AlPO<sub>4</sub>), fosfato de hierro (FePO<sub>4</sub>), fosfato tricálcico [Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>] e hidroxiapatita [Ca<sub>5</sub>(OH)(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>] a concentración de 1 mM con respecto al volumen de sustrato. Los tonos rojizos representan a los tratamientos dispuestos a pH ácido y los tonos azules a pH neutro/ alcalino. Los grupos estadísticos se encuentran representados con letras y fueron determinados mediante ANOVA-Tukey HSD (valor de p < 0.05); n = 31-43. Este experimento se llevó a cabo en invernadero en el periodo de marzo-junio del 2018.

**Figura A4. Correlación entre variables de arquitectura radicular y área foliar en el sistema *in vitro***



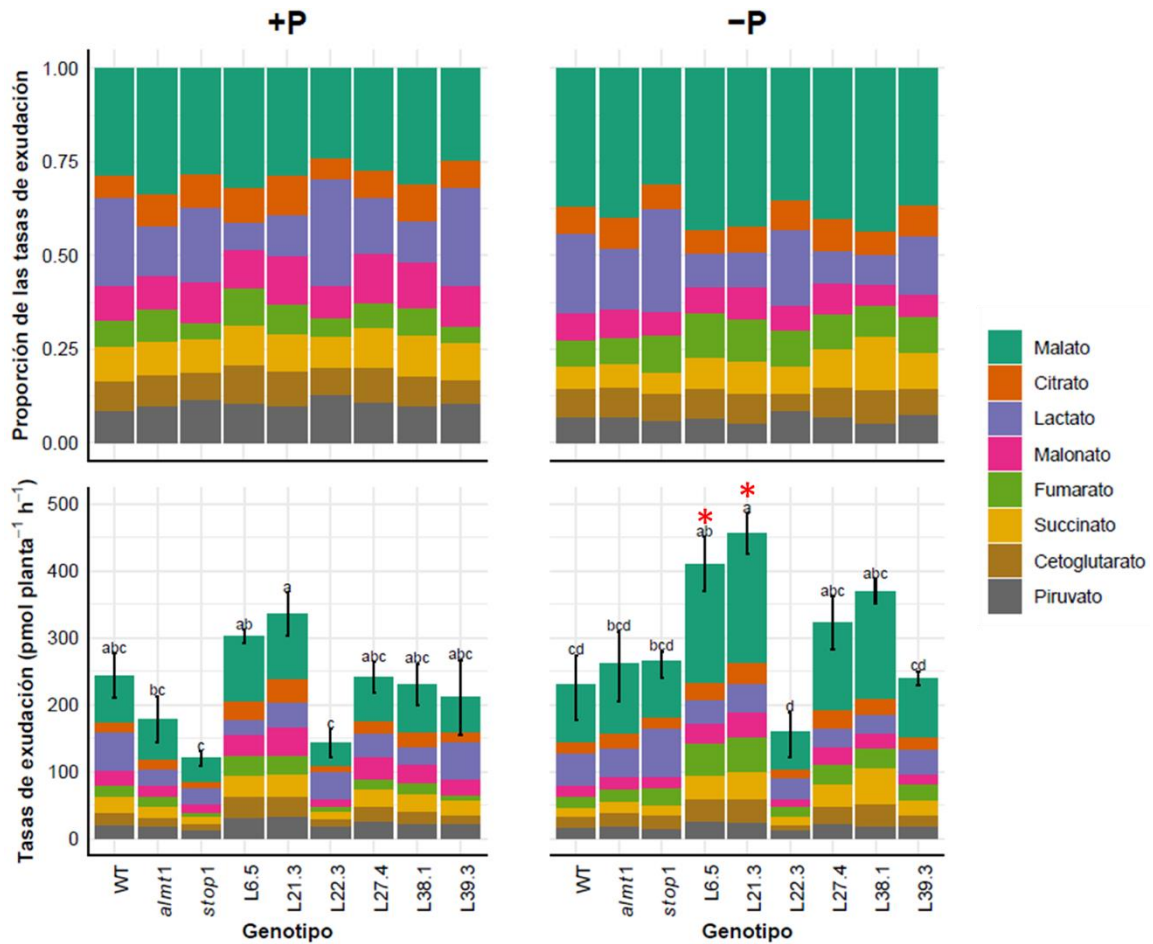
Correlación entre las variables de arquitectura de raíz y área foliar de plantas crecidas con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 24 dpq. Este gráfico de correlaciones es representativo de las concentraciones de P de 50-1000  $\mu\text{M}$ , e indica la correlación importante que existe en caja entre el área foliar y la longitud total del sistema radicular (enmarcado en rojo). Las unidades para cada variable son similares a las de las Figuras 5 y 7A. Para el análisis de correlación se utilizó un modelo lineal, y se presenta el coeficiente ajustado de correlación de Pearson  $R^2$ . L.primaria= Longitud de raíz primaria; N.laterales= Número total de raíces laterales; L.total= Longitud total del sistema radicular; D.laterales= Número promedio de raíces laterales por cm de raíz principal; L.laterales= longitud promedio de raíces laterales; Á.foliar= área foliar; R. ÁfxLt = Radio entre área foliar y longitud total del sistema radicular.

**Figura A5. MALDI-MSI de raíces de plantas en tratamientos de suficiencia y deficiencia de P**



Se muestra el triplicado de las imágenes MALDI\_MSI obtenidas de cada uno de los genotipos para citrato y malato, en tratamientos de suficiencia (+P) y deficiencia (-P) de fósforo. En todos los casos, el acomodo de las raíces de las plantas es, de izquierda a derecha: WT, *almt1*, *stop1*, L21.3, L22.3, L27.4 y L38.1. Las escalas de intensidad y longitud son similares para todas las imágenes.

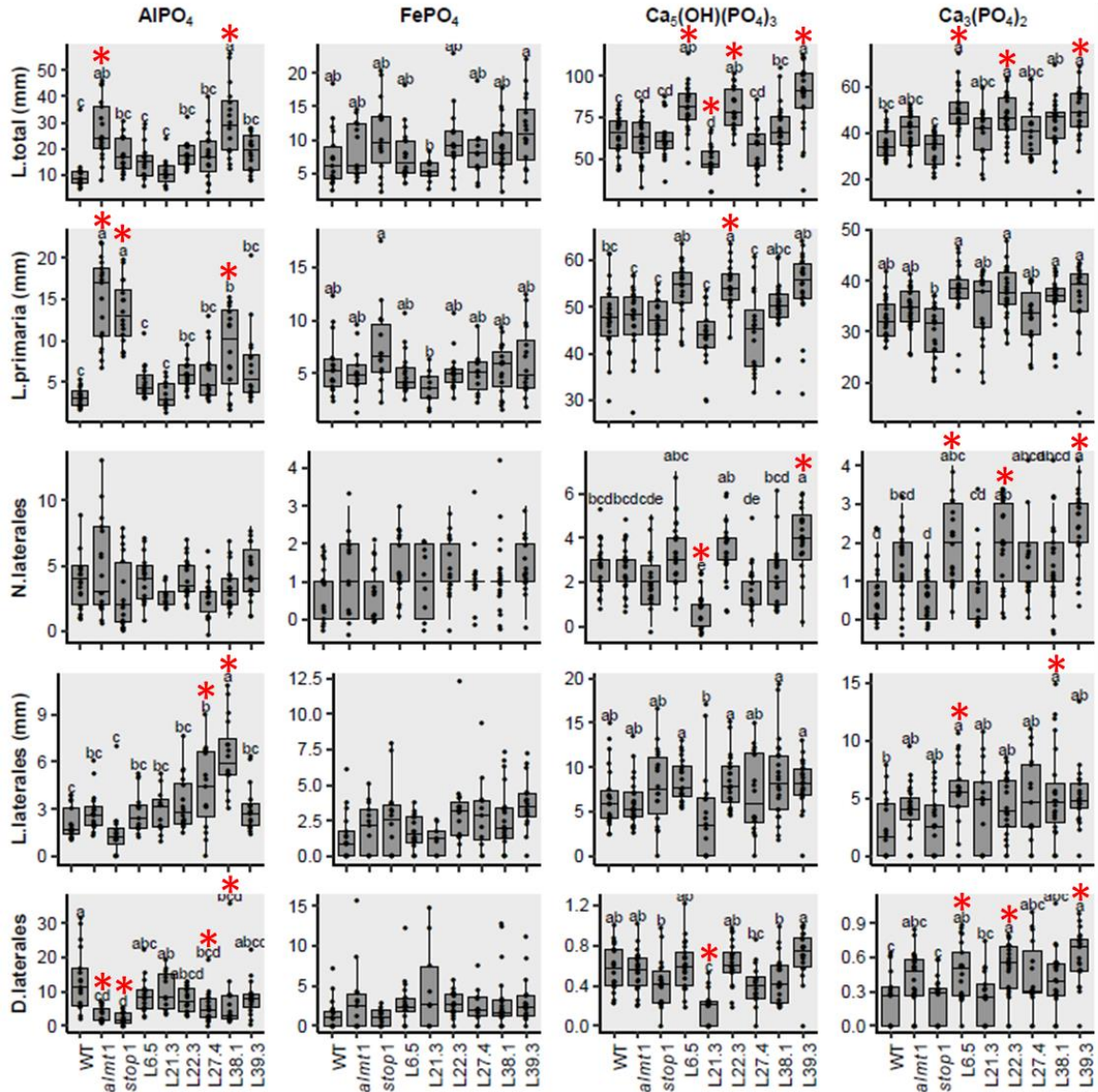
**Figura A6. Gráficos de barras apiladas de tasas de exudación de ácidos orgánicos**



Los gráficos superiores muestran las proporciones de las tasas de exudación de cada ácido orgánico con respecto a la tasa de exudación total cuantificada. Los gráficos inferiores muestran la sumatoria de las tasas de exudación de los ocho ácidos orgánicos. En estos últimos, las barras de error representan el SEM (n=4) de los carboxilatos exudados totales. Los grupos estadísticos se encuentran representados con letras y fueron determinados mediante ANOVA-Tukey HSD (valor de  $p < 0.05$ ). Los contrastes se realizaron independientemente para cada tratamiento. Los asteriscos rojos (\*) indican las tasas de exudación de los genotipos que difieren significativamente de la de las plantas silvestres en cada tratamiento. Líneas sobreexpresantes de *STOP1*: L6.5, L21.3 y L22.3; líneas sobreexpresantes de *ALMT1*: L27.4, L38.1 y L39.3.

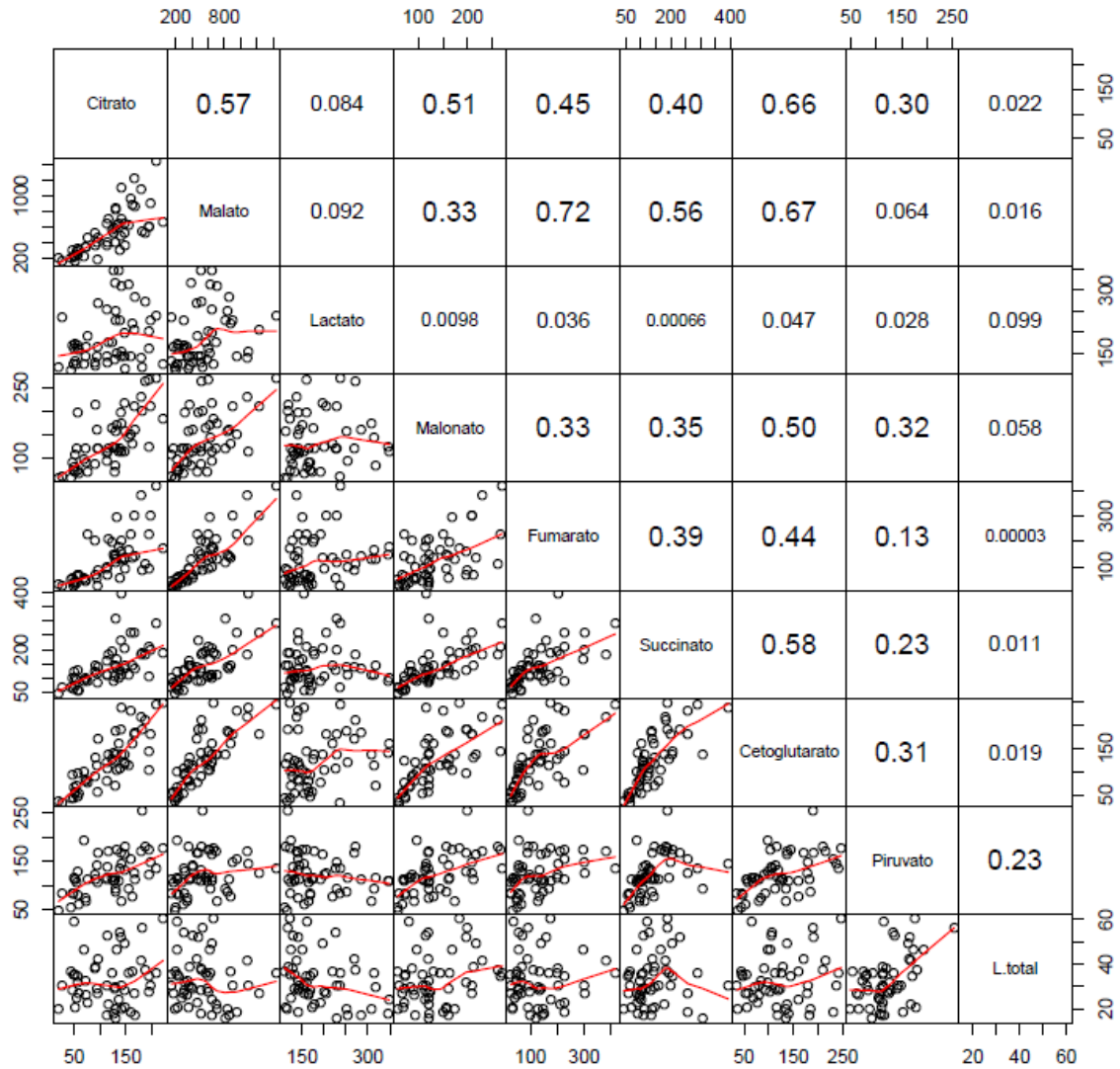


**Figura A7. Análisis de la arquitectura radicular de líneas sobreexpresantes bajo deficiencia de P**



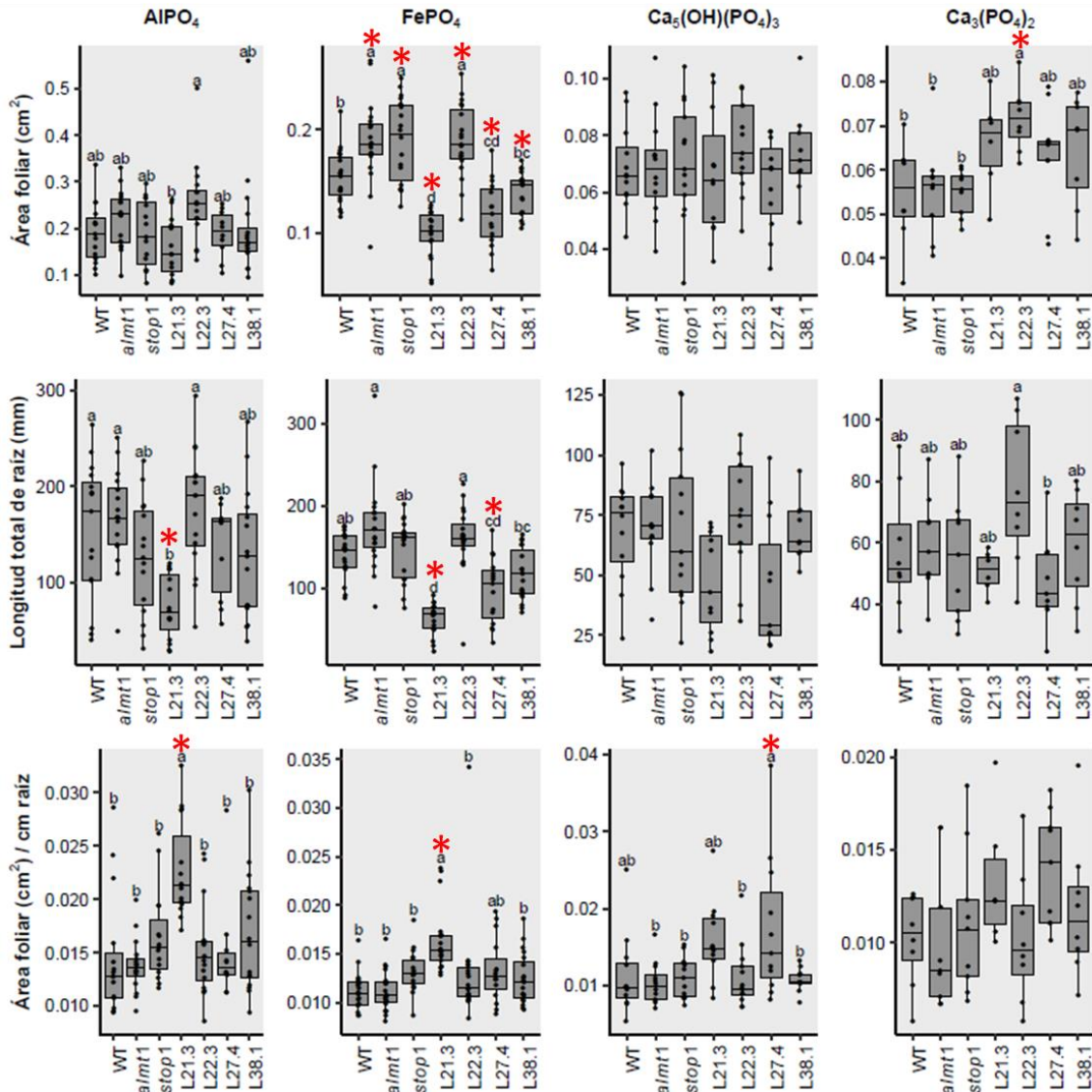
Los grupos estadísticos se encuentran representados con letras y fueron determinados mediante ANOVA-Tukey HSD (valor de  $p < 0.05$ ;  $n = 13-22$ ). Los contrastes estadísticos se realizaron por tratamiento (sal de P). Los asteriscos rojos (\*) indican las medias de los genotipos que difieren significativamente con respecto a las de las plantas silvestres. Líneas sobreexpresantes de *STOP1*: L6.5, L21.3 y L22.3; líneas sobreexpresantes de *ALMT1*: L27.4, L38.1 y L39.3.

**Figura A8. Correlación entre cantidad de exudados de distintos ácidos orgánicos y la longitud total de raíz**



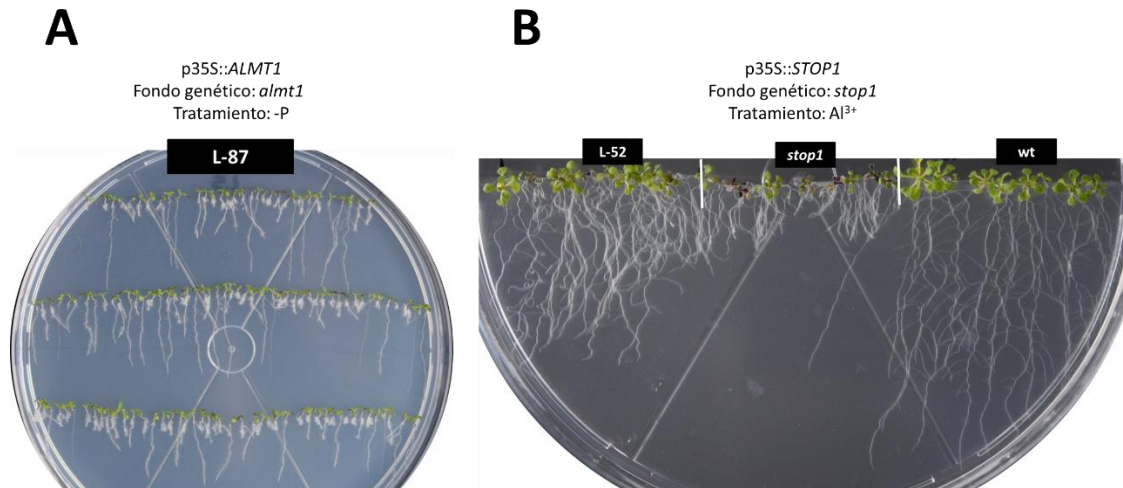
Este gráfico de correlaciones se realizó con todos los datos obtenidos, sin diferenciar en genotipos ni tratamientos. Sin embargo, el análisis se realizó también separando tratamientos (+P y -P) y por cada combinación de tratamiento y genotipo, obteniéndose resultados comparables. Las unidades para los ácidos orgánicos son cantidad (pmol) en el exudado y para la longitud total del sistema radicular (L.total) son cm. Para el análisis de correlación se utilizó un modelo lineal, y se presenta el coeficiente ajustado de correlación de Pearson  $R^2$ .

**Figura A9. Evaluación de la sacarosa sobre la productividad *in vitro* de área foliar**



Se crecieron plantas *in vitro* de manera similar al experimento presentado en la Figura 12, excepto que se redujo la concentración de sacarosa del medio de 1 al 0.2%. Las plantas se evaluaron a los 27 dpv. Los grupos estadísticos se encuentran representados con letras y fueron determinados mediante ANOVA-Tukey HSD (valor de  $p < 0.05$ ). Los contrastes estadísticos se realizaron por tratamiento (sal de P). Los asteriscos rojos (\*) indican las medias de los genotipos que difieren significativamente con respecto a las de las plantas silvestres. Líneas sobreexpresantes de *STOP1*: L21.3 y L22.3; líneas sobreexpresantes de *ALMT1*: L27.4 y L38.1. El n para los distintos tratamientos fue:  $n(AlPO_4) = 10-16$ ,  $n(FePO_4) = 15-19$ ,  $n[Ca_3(PO_4)_2] = 6-9$ , y  $n[Ca_5(OH)(PO_4)_3] = 9-12$ .

**Figura A10. Complementación de *almt1* y *stop1* con los vectores de sobreexpresión**



**(A)** Línea L87 T1 con segregación 3:1 crecida en -P, complementada para *ALMT1*. **(B)** Línea L52 T1 con segregación 3:1 crecida en medio tóxico en Al<sup>3+</sup>, complementada para *STOP1*.