

**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE
ELCHE**

**ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE ORIHUELA
GRADO EN INGENIERÍA AGROALIMENTARIA Y
AGROAMBIENTAL**



**Efecto de altas concentraciones de K^+ sobre la
absorción de arsénico en plantas de *Arabidopsis
thaliana* L.**

**TRABAJO FIN DE GRADO
DICIEMBRE-2015**

Autor: David Costa García

Tutor: Maria Angeles Botella Marrero

Tutor: Francisco Rubio Muñoz

Título: Efecto de altas concentraciones de K^+ sobre la absorción de arsénico en plantas de *Arabidopsis thaliana* L

Title: Effect of high K^+ concentration on arsenic absorption in *Arabidopsis thaliana* L. plants

Resumen: El arsénico es un elemento tóxico para los seres vivos, presente a altas concentraciones en ciertas zonas agrícolas, como en la India. El arsénico, muy similar al fosfato, es absorbido por la planta por los sistemas de transporte de fosfato. En resultados previos del grupo donde se ha realizado este Trabajo Fin de Grado se ha observado que las altas concentraciones de K^+ dan lugar a deficiencia de fosfato, y cabría esperar que también redujeran la acumulación de arsénico. Para comprobar esta hipótesis se ha estudiado el efecto de altas concentraciones de K^+ en plantas de *Arabidopsis* cultivadas en presencia de arsénico. Los resultados muestran que el K^+ disminuye la toxicidad por arsénico, aunque este efecto positivo del K^+ parece ser más complejo que la simple disminución de la acumulación de arsénico en la planta.

ABSTRACT

Arsenic is a toxic element for living beings, present at high concentrations in certain agricultural areas, such as India. Arsenic, similar to phosphate, is absorbed by the plant for the phosphate transport systems. Previous results from the group where this work has been carried out, indicated that high concentrations of K^+ lead to phosphate deficiency, therefore, it would be expected also to reduce the accumulation of arsenic in plants. To test this hypothesis it has been studied the effect of high concentrations of K^+ in *Arabidopsis* plants grown in the presence of arsenic. The results show that the K^+ decreased the arsenic toxicity, although this positive effect of K^+ appears to be more complex than simply reducing the accumulation of arsenic in the plant.

Palabras clave: arsénico, potasio, fosfato, *Arabidopsis*, toxicidad

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a mi directora M^a Ángeles Botella y codirector Francisco Rubio, por su profesionalidad, dedicación, y ayuda que me han aportado para realizar este Trabajo Fin de Grado.

Al departamento de nutrición mineral del CEBAS-CSIC, en el que durante el tiempo que estuve me sentí uno más, y con los que aprendí mucho.

A mis amigos, tanto los que conocí en la carrera como fuera, de los que saco que, uno solo puede hacer grandes cosas, pero si está acompañado serán mil veces mejores, y el tiempo invertido habrá sido más ameno.

Y por último, a mi familia que me ha enseñado que con trabajo se consiguen cosas muy grandes.



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Importancia del fosforo.	9
1.2. Importancia del potasio.	10
1.3. El arsénico en la agricultura.	13
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS	16
3.1. Material vegetal utilizado y condiciones de cultivo	16
3.2. Desarrollo de los experimentos	18
3.3. Determinación de la composición mineral	19
4. RESULTADOS	20
DISCUSIÓN.....	30
5. CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA.....	35



1. INTRODUCCIÓN

Además de oxígeno, dióxido de carbono y agua, las plantas requieren al menos 14 elementos minerales para una nutrición adecuada. Son los denominados elementos esenciales (Marschner, 1995; Mengel and col., 2001). La ausencia de alguno de ellos reduce el crecimiento de las plantas.

Estos elementos se dividen en dos categorías macronutrientes como son: nitrógeno (N), fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), y micronutrientes: cloro (Cl), boro (B), hierro (Fe), manganeso (Mn), cobre (Cu), zinc (Zn), níquel (Ni), y molibdeno (Mo), esta distinción no tiene implicación cualitativa, ya que todos ellos son igualmente esenciales, sino que refleja las concentraciones relativas halladas en los tejidos o que son necesarias en las soluciones nutritivas.

El efecto benéfico que sobre el crecimiento de las plantas produce la adición al suelo de elementos minerales, cenizas de plantas o cal, así como el efecto tóxico que produce la sal sobre los mismos cultivos, se conocen en agricultura desde hace más de 2000 años. Sin embargo, la función de los elementos minerales como nutrientes en el crecimiento de las plantas todavía era motivo de controversia científica. A finales del siglo XVIII, De Saussure (1767-1845), estudio tanto la fotosíntesis como la absorción de nutrientes, introdujo nuevas técnicas y métodos que lo convirtieron en uno de los pioneros en el análisis de los elementos de las plantas; a él se debe la idea de que algunos de estos elementos puedan ser indispensables, pero no todos (Azcón and Talon, 2008).

En la misma época, S. Sprengel (1787-1859), en Alemania, enunció la hipótesis de que un suelo podía ser improductivo desde el punto de vista agrícola, por la ausencia exclusiva de los elementos esenciales convirtiéndose así en el precursor de la ley del mínimo. Por los mismos años el químico y agrónomo francés J.B. Boussingault estudiaba la relación entre la fertilización de los suelos, la absorción de los nutrientes y el rendimiento de los cultivos. Boussingault, además descubrió que las legumbres tienen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico, hecho corroborado después por la identificación de las bacterias fijadoras en los nódulos de las raíces de estas plantas. En esa época surgió también la figura de J. Sachs, famoso botánico alemán que en 1880, demostró por primera vez que las plantas podían crecer y desarrollarse en soluciones nutritivas totalmente carentes de suelo, lo que dio lugar a las líneas de investigación que

hoy día siguen vigentes. La contribución de Von Liebig supuso el abandono definitivo de la teoría aristotélica del humus (1848). Este hecho supuso un rápido aumento del uso de fertilizantes minerales. A finales del siglo XIX en Europa se usaban grandes cantidades de potasa, superfosfato y posteriormente nitrógeno inorgánico con el fin de mejorar el crecimiento y productividad de los cultivos. Von Liebig llegó a la conclusión que los elementos como N, P, Ca, Mg, Si, Na, Fe, eran indispensables para el crecimiento de las plantas, sin embargo esa conclusión surgió más de la observación y la especulación, que de la precisión de experimentos realizados. Por este motivo en el siglo XIX se realizaron muchos experimentos sobre la composición mineral de diferentes plantas crecidas en diferentes suelos. A principios del siglo XX se llegó a la conclusión ni la presencia ni la concentración de un elemento mineral son criterio para establecer si es esencial o no. En consecuencia, la concentración mineral de los diferentes suelos no permite establecer si un elemento mineral es esencial o no. Partiendo de esta premisa se realizaron experimentos en agua y en arena suprimiendo ciertos elementos minerales. Con lo que se caracterizó de forma más precisa su papel en el metabolismo de las plantas (Azcón and Talon, 2008).

Para que estos elementos fueran considerados esenciales debían cumplir tres criterios.

- En ausencia del elemento mineral considerado, la planta es incapaz de completar su ciclo vital.
- La función que desempeña dicho elemento no puede ser desempeñada por ningún otro mineral de reemplazo.
- El elemento debe estar directamente implicado en el metabolismo, por ejemplo como componente de una molécula esencial en la planta, o ser necesario en una fase metabólica precisa, como por ejemplo una reacción enzimática.

De esta forma los macronutrientes son elementos constituidos de las biomoléculas estructurales, tales como proteínas, lípidos, o carbohidratos, o actúan como osmolitos (Azcón and Talon, 2008).

Hoy día, existen áreas geográficas con baja disponibilidad de estos elementos minerales esenciales, por lo que han de ser suplidos mediante el aporte de fertilizantes para obtener una mayor producción en las cosechas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que esto puede tener efectos adversos ya que el uso de fertilizantes en la agricultura puede contribuir a la contaminación del medio ambiente. El aumento de la demanda de estos elementos minerales esenciales debido al continuo crecimiento de la población mundial, así como la expansión de la agricultura a zonas menos productivas, ha aumentado el coste de los fertilizantes y disminuido el uso eficiente de los mismos (Rengel and Damon, 2008).

Independientemente de los efectos beneficiosos de la aplicación de estos fertilizantes, los costes económicos y medioambientales de su aplicación (WHITE and BROADLEY, 2003; Dreyer and Uozumi, 2011) hacen necesario optimizar la eficiencia en su uso. Esto se puede conseguir a través de una mejora en las prácticas de la gestión de los fertilizantes y/o genéticamente, usando cultivos que adquieran y/o utilicen los elementos minerales de una forma más eficaz (Rengel and Damon, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Dreyer and Uozumi, 2011).

De forma global, la materia vegetal que se recoge en los cultivos contiene 75, 14 y 60 millones de toneladas de nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K) respectivamente. Mientras que la aplicación de N y P se encuentra en niveles muy similares a los que son retirados del suelo por los cultivos (80 y 14 millones de toneladas respectivamente), el K^+ se aplica a un nivel bastante inferior, reponiendo solo el 35% del K^+ retirado (Römheld and Kirkby, 2010), valores que pueden llegar a ser mucho menores en países en vías de desarrollo.

1.1. Importancia del fósforo.

El fósforo es un elemento esencial en los cultivos que forma parte de moléculas tan importantes como el ATP y los ácidos nucleicos. Las plantas absorben fósforo activamente y sólo en su forma H_2PO_4^- y HPO_4^{2-} , siendo la absorción del segundo mucho más lenta.

La deficiencia de fósforo tiene un notable impacto en el crecimiento de los cultivos. Dada la gran movilidad dentro de las plantas, los síntomas de carencia se detectan primero en las hojas más viejas, que senescen prematuramente. El contenido de fósforo en las hojas de plantas deficientes puede estar muy por debajo de 0.1%. El contenido normal en hojas varía mucho entre especies con un intervalo de 0.05-0.3% de fósforo, expresado sobre materia seca (Villalobos, 2009).

El P es también parte de la fitina, que es la principal forma de almacenamiento de fósforo en la semilla. Alrededor del 50% del fósforo total en las semillas de las leguminosas y del 60 al 70% en los cereales se almacena como fitina o compuestos muy parecidos. Un mal suplemento de P puede reducir el tamaño, número y viabilidad de las semillas.

El fósforo del suelo existe en forma de fosfato y nunca en forma libre, y puede encontrarse en forma orgánica o mineral. Las formas minerales a su vez pueden encontrarse en la solución del suelo y en la fracción sólida.

La solución del suelo contiene fósforo en muy pequeñas concentraciones, entre 0.1 y 1 ppm, lo que fuerza a su renovación conforme las plantas lo absorben, es decir, la extracción de fósforo determina el paso a la solución de formas fijadas o precipitadas.

La relación entre fósforo absorbido y fósforo en solución depende de la capacidad de adsorción del suelo y se denomina poder amortiguador o fijador. Un poder amortiguador alto indica una buena capacidad del suelo para reponer el P de la solución que vaya consumiendo el cultivo. Si el poder amortiguador es bajo, la concentración de fósforo en la solución podrá ser alta, pero la capacidad del suelo para reponerlo conforme lo adsorba el cultivo estará limitada. Esto significa que cuando un suelo tenga poder fertilizante alto, se deberá aplicar dosis de fósforo altas, ya que si no es así solo se desplazará a formas fijas (Villalobos, 2009).

Las plantas responden a la disponibilidad de fosfato en el suelo, activando diversos sistemas de adquisición y transporte de este nutriente. Cuando el fosfato es

limitante se dispara una cascada señalización que comienza con la activación de los factores de transcripción PHR1 y PHL1. Estos factores se unen a promotores de genes implicados en la respuesta de la planta a la baja disponibilidad de fósforo, regulándolos (Rubio *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2010). Entre estos genes se encuentran los que codifican sistemas de entrada de alta afinidad de fósforo así como de transporte de fósforo a la parte aérea. La línea de *Arabidopsis* mutantes nulos en estos genes, *phr1 phl1*, que se ha empleado en este trabajo, es deficiente en la activación de esta cascada de señalización de bajo fósforo y en última instancia presenta bajas concentraciones internas de fósforo, e incluso deficiencia del mismo.

1.2. Importancia del potasio.

El consumo global de potasio aumentó de media un 4,4% por año en el periodo 1999-2005 (IFA 2005). Tomando como ejemplo el arroz, 4-8 t ha⁻¹ de grano suponen la retirada de 56-112 Kg de potasio del suelo (Yang and col., 2004), se estima que la demanda anual de potasio que se necesitará en el año 2025 ascenderá a 9-15 Mt, o lo que es lo mismo, aproximadamente 1,7 veces el requerimiento de K⁺ de 1990 (Dobermann and col., 1998). Aunque las reservas globales parece que son suficientes para cientos o incluso miles de años de agricultura (Sheldrick and col., 1985), la rentabilidad de la producción agrícola en suelos marginales o en condiciones de estrés biótico y abiótico dependerá, cada vez más, de una mejora en el uso eficiente del potasio y de los otros nutrientes (Rengel and Damon, 2008).

Un ejemplo de esta demanda, lo tenemos en el continente asiático. Actualmente, alrededor de un cuarto de los suelos cultivables y tres cuartas partes de los arrozales en China son deficientes en potasio (Yang and col., 2004). Experimentos a largo plazo realizados en cinco países asiáticos indicaron un balance negativo de potasio en cultivos de arroz. Por ejemplo, en el delta del río Mekong, en Vietnam, estos balances negativos llegaban a valores de -86 kg ha⁻¹ y año. Otro ejemplo claro lo encontramos en el suroeste de Australia, donde la incidencia de la deficiencia de potasio en cultivos de trigo ha aumentado de forma constante, con dos tercios de los suelos cultivados avocados al agotamiento del potasio debido a la retirada continua de este elemento en el grano y la paja (Rengel and Damon, 2008).

El desarrollo de variedades de plantas cultivadas que dispongan de una capacidad de absorción de potasio incrementada, podría contribuir a aumentar el uso

eficiente del K^+ y a reducir los efectos negativos derivados de la fertilización, que cada vez son más importantes y tienen consecuencias socioeconómicas y medioambientales (Medrano, 2004). La caracterización de los sistemas relacionados con la absorción de potasio por parte de la planta, será de gran utilidad para obtener nuevas variedades de plantas cultivadas más eficientes en el uso del potasio (Fedoroff and col., 2010).

El K es un componente de los minerales feldespato y mica, que es liberado muy lentamente por meteorización. La fracción más activa del potasio se encuentra en minerales secundarios de las arcillas (caolinita, illita, vermiculita) o en mucha menor proporción, en la materia orgánica, ocupando una posición fijada o fácilmente intercambiable con la solución. La concentración de potasio en la solución suele estar entre 0.2 y 10 (meq/l), y es ahí donde las plantas del suelo son capaces de absorberlo.

En general el potasio se desplaza muy poco en el suelo, y las pérdidas por lixiviación son pequeñas o muy pequeñas en suelos con alto contenido de arcilla.

Las plantas deben tomar el K desde la solución del suelo, donde las concentraciones del mismo varían entre 0,1 mM y 1 mM de K (Maathuis, 2009). Esto contrasta con la concentración de K en el citoplasma celular, que se mantiene constante en torno a un valor de 100 mM. La elevada demanda de K por parte de la planta ha de estar en consonancia con una eficiente absorción y transporte hacia la parte aérea.

El K puede suponer hasta el 10% del peso seco de una planta, por lo que, como se ha mencionado anteriormente, es considerado como un macronutriente (Leigh and Jones, 1984). En cuanto a las funciones del K en las plantas, éste juega un papel biofísico y bioquímico fundamental. Al estar cargado positivamente y ser tan abundante, es un estabilizador de moléculas cargadas negativamente como los ácidos nucleicos y las proteínas (Figura 1.1).

El K muestra una alta movilidad en las plantas, transportándose entre raíz y parte aérea por el xilema y el floema, y dentro de la parte aérea de unas hojas a otras (Karley and col., 2009). Éste, se acumula en la vacuola, lo que permite los movimientos de la planta, tales como la apertura y cierre de los estomas, el movimiento de las hojas, y otros tropismos de las plantas que se producen por la presión de turgor (Maathuis and Sanders, 1996; Philippar and col., 1999) (Figura 1.1). La presión osmótica originada por la acumulación de K es también utilizada para conducir la expansión celular y de las hojas (Maathuis and Sanders, 1996; Ruan and col., 2001; Elumalai and col., 2002). El K

también es considerado un osmolito compatible que contribuye al mantenimiento del estado hídrico de la planta, lo que es fundamental en la mayoría de estreses abióticos (Mahouachi and col., 2006).

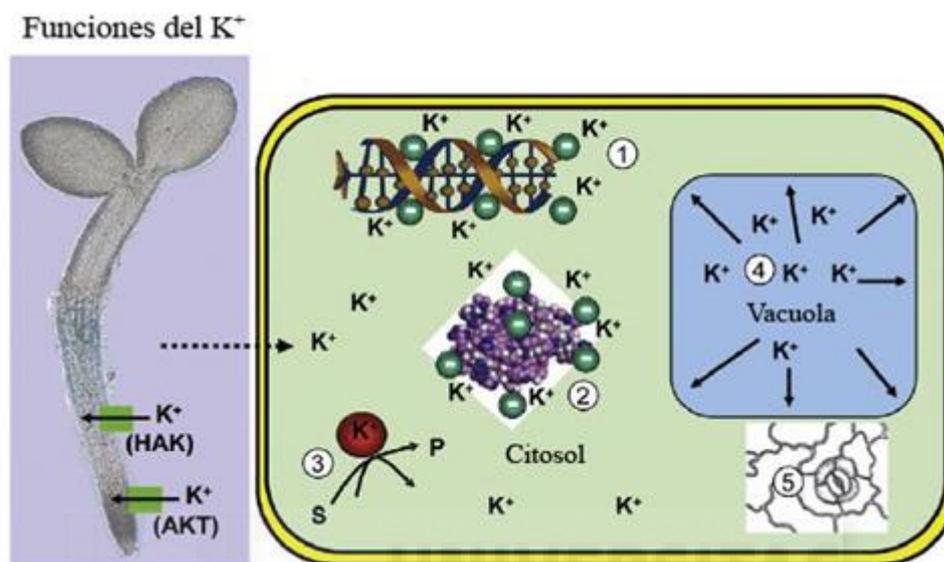


Figura 1.1. Funciones del K⁺. El K⁺ se absorbe a través de los transportadores (HAK) y canales (AKT). Dentro de la planta, las características intrínsecas del K⁺ lo hacen idóneo para neutralizar las cargas negativas de los ácidos nucleicos (1) y las proteínas (2). Además, el K⁺ activa enzimas específicas (3) actuando como cofactor en reacciones enzimáticas entre el sustrato (S) y el producto (P). Al ser el principal catión en las vacuolas (4), el K⁺ genera presión de turgor al arrastrar agua, para proporcionar una estructura definida y conducir la expansión celular, el crecimiento de la planta y los movimientos de ésta, como la regulación de la apertura y cierre de los estomas (5). (Modificado de Maathuis 2009).

El K es necesario para las reacciones metabólicas por su capacidad de activar numerosas enzimas (Figura 1.1). Las concentraciones más altas de K se encuentran en tejidos jóvenes en desarrollo y órganos reproductores, indicando su importancia en el metabolismo celular y en el crecimiento. In vitro, la activación enzimática se lleva a cabo a concentraciones de 50-100 mM de K, unos valores que están de acuerdo con los determinados en el citoplasma celular (Maathuis and Sanders, 1993; Walker and col., 1996b; Britto and Kronzucker, 2008). La unión del K a las enzimas se realiza en su forma deshidratada, probablemente coordinado con 6 oxígenos que derivan de grupos carboxilo, carbonilo e hidroxilo y moléculas de agua (Maathuis, 2009). Esta unión es muy selectiva, y el K no puede ser sustituido por otros iones similares como el Na⁺ o el

Li. De entre las enzimas que se activan por K encontramos varias isoformas de la pirofosfatasa (PPasa) vacuolar que acumula protones en el lumen de la vacuola. Además hay otras enzimas relacionadas con el metabolismo del carbono como la piruvato quinasa, la fosfofructoquinasa, y la ADP-glucosa almidón sintasa (Marschner, 1995) que también se activan por K. La síntesis de proteínas mediada por el ribosoma es otro proceso clave que requiere altas concentraciones de K (Maathuis and Sanders, 1994; Rodríguez-Navarro and Rubio, 2006). Por otro lado, el aumento de K genera un aumento en la fotosíntesis, y un transporte más efectivo de fotoasimilados y compuestos amino nitrogenados hacia órganos reproductores vía floema.

El estatus del K en la planta puede afectar también al metabolismo a través de la regulación transcripcional y postranscripcional de los genes que codifican enzimas metabólicas (Amtmann and Armengaud, 2009; Armengaud and col., 2009). También se ha descrito la acumulación de azúcares reductores y la absorción de ácidos orgánicos y aminoácidos cargados negativamente como una consecuencia directa de la deficiencia de K (Amtmann and col., 2008).

El K también juega un papel importante en la señalización del estrés (Römheld and Kirkby, 2010; Wang and Wu, 2010), ya que la deficiencia de K induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y ácido jasmónico (JA), relacionadas con la tolerancia a enfermedades y plagas, así como la producción de etileno y auxinas. Por todo ello, la optimización del estado nutricional de K es importante para reducir los efectos negativos de los distintos tipos de estrés, tanto bióticos como abióticos (Amtmann and col., 2008; Troufflard and col., 2010).

1.3. El arsénico en la agricultura.

El arsénico es uno de los metales más tóxicos que se encuentran en los suelos, y se deriva tanto de fuentes naturales y antropogénicas (Tmaki and Frankenberger, 1992; Fitz and Wenzel, 2002; Nordstrom, 2002; Oremland and Stolz, 2003). El arsénico se puede solubilizar en el agua contenida en el suelo, exponiendo a efectos tóxicos tanto a plantas, animales como a seres humanos (Nickson *et al.*, 1998; Hartley and Meharg-Whitaker, 2002; Go' Gómez *et al.*, 2004; Katz y Salem, 2005).

En los suelos, los más abundantes especies de arsénico es arseniato (Tamaki and Frankenberger, 1992;. Brown et al, 1999). Su toxicidad se debe a la similitud química

del As con el fosfato, lo que permite que el As entre en la planta mediante el sistema de transporte Pi alta afinidad (Meharg and Macnair, 1990,1991b, 1992b) y altere el metabolismo (Clarkson and Hanson, 1980; Raghothama, 1999; Fitz and Wenzel, 2002). El sistema de transporte de alta afinidad de Pi es inducido por ausencia de Pi, y la absorción de As es altamente dependiente de la cantidad de P disponible en el suelo (Bielecki. 1973; Ragthama, 1999).



2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo central del presente Trabajo Fin de Grado es el estudio del efecto del K sobre la toxicidad debida a arsénico en las plantas. Para ello se utilizan 2 líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* L., línea silvestre (WT), y línea mutante *phl1*, *phr1*, cultivadas en sistema hidropónico con solución nutritiva bajo condiciones controladas y sometidas a distintos tratamientos de K, y As.

Para desarrollar este objetivo se han cultivado las plantas en sistema hidropónico con soluciones nutritivas en una cámara de cultivo bajo condiciones controladas de temperatura, humedad e intensidad lumínica.

Las plantas de las líneas silvestres (WT) y mutantes (*phl1 phr1*) se cultivaron durante 35 días en solución control (en presencia de 1,4 mM K y sin arsénico). Tras este periodo de crecimiento se sometieron las plantas a los distintos tratamientos de K (1.4 y 20 mM) y arsénico (0.05 y 0.1 mM) durante 10 días. A continuación se determinaron distintos parámetros fisiológicos como son el peso seco de la parte aérea y la raíz y las concentraciones internas de K, Ca, Mg, P, y As

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material vegetal utilizado y condiciones de cultivo

El trabajo experimental se ha realizado con dos líneas de *Arabidopsis thaliana* L., la líneas silvestres WT, y línea mutante phr1 phl1.

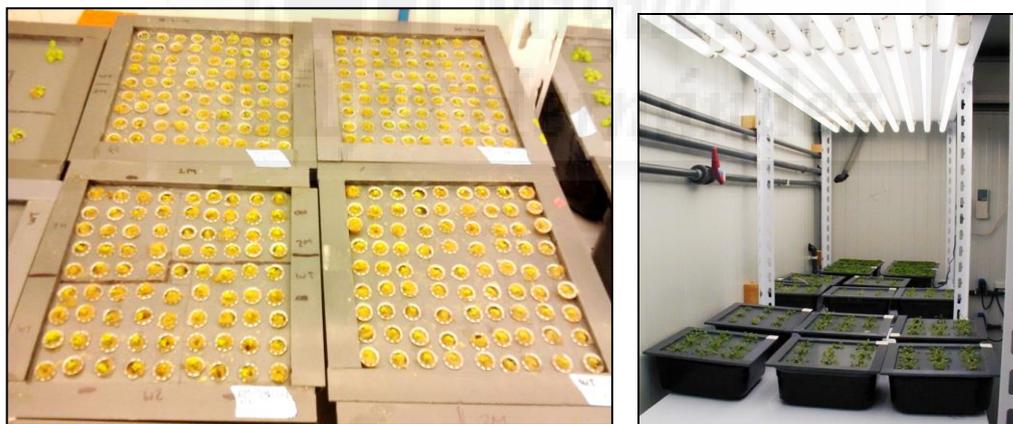
Las semillas de las distintas plantas fueron esterilizadas superficialmente en cabina de flujo laminar (TELSTAR Mini-H) con una mezcla desinfectante de etanol al 70%, seguido de lejía comercial al 20% y SDS al 10%, durante 15 minutos. Posteriormente se lavaron cuatro veces con agua esterilizada y resuspendieron en agua esterilizada, pasando en oscuridad 48 horas a 4 0C.

Una vez esterilizadas las semillas se germinaron sobre lana de roca, material inerte que permite un fácil crecimiento de la raíz a través del mismo. La lana se insertó en microtubos eppendorf de 1,5 mL cortados por la parte inferior, los cuales se esterilizaron en autoclave posteriormente. A continuación, se insertaron en planchas de PVC de 361 cm², a las que previamente se habían realizado perforaciones con el diámetro de los microtubos. Dichas planchas se encajaron sobre cubetas de 2,5 L de solución nutritiva cuya composición se muestra en la (Tabla 3.1.). El pH se ajustaba a 5,6 (rango 5,6-6,5) debido a que durante el tiempo de desarrollo de las plántulas, se liberan sustancias carbonatadas que hacen subir el pH y sería imposible la absorción de los nutrientes de la solución. La solución nutritiva se cambiaba cada 7 días con el consiguiente ajuste de pH.

Tabla 3.1. Composición de la disolución nutritiva 1/5 Hoagland modificada.

Compuesto	Concentración	Compuesto	Concentración
KCl	1,4 mM	MnSO ₄	1 μM
Ca (NO ₃) ₂	1,4 mM	ZnSO ₄	1 μM
Ca (H ₂ PO ₄) ₂	0,1 mM	CuSO ₄	0,5 μM
MgSO ₄	0,35 mM	H ₂ MoO ₄	0,1 μM
CaCl ₂	50 μM	NiSO ₄	0,1 μM
H ₃ BO ₃	12,5 μM	Fe-EDDHA	10μM

El desarrollo de las plántulas se llevó a cabo en cultivo hidropónico, en una cámara de cultivo en condiciones controladas, como se observa en la (Fotografías 3.1. y 3.2.) Se fijó un fotoperiodo de 8 horas de luz.



Fotografías 3.1 y 3.2. Detalle de los sistemas de crecimiento de *A. thaliana* en cultivo hidropónico y cámara de cultivo con iluminación y humedad controlada.

La temperatura y la humedad relativa fueron de 25 °C y 65 % respectivamente. Como sistema de iluminación se emplearon tubos fluorescentes (Philips TLD 36/W 83, Sylvania F 36WGRO), consiguiendo una densidad homogénea de flujo de fotones de 150 μmol m⁻² s⁻¹.

3.2. Desarrollo de los experimentos

Cuando las plantas tenían 35 días, se aplicaron durante 10 días los siguientes tratamientos (Figura 3.1):

- 1.4 mM de K + 0.05 mM de P
- 1.4 mM de K + 0.05 mM de P + 0.05 mM de As
- 1.4 mM de K + 0.05 mM de P + 0.1 mM de As
- 20 mM de K + 0.05 mM de P + 0.05 mM de As
- 20 mM de K + 0.05 mM de P + 0.1 mM de As

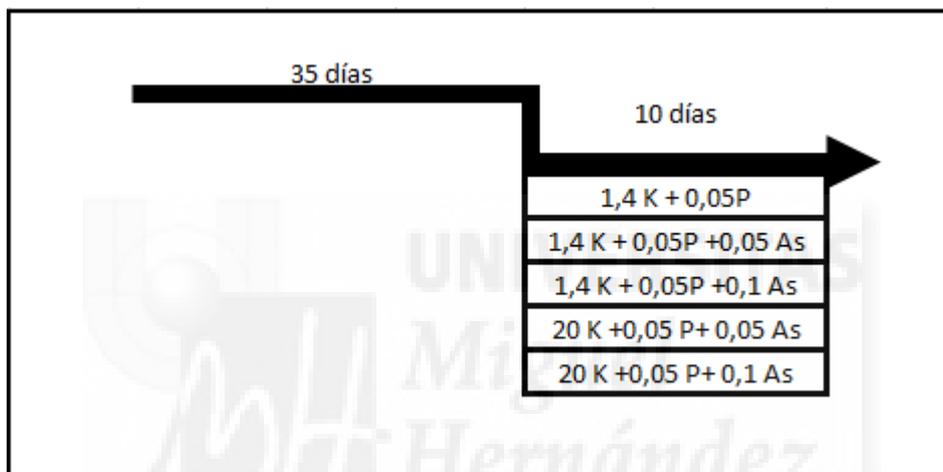


Figura 3.1. Desarrollo del experimento completo en sus distintas fases de evolución, para las tres líneas de investigación (WT, *phr1 phl1*).

Al final de los experimentos, se separó la parte aérea de la raíz de todas las plantas, lavándose la raíz en solución fría para eliminar los cationes del apoplasto y se determinaron los pesos frescos. El material se secó a continuación en una estufa a 65 °C durante 4 días y se halló el peso seco.



Ilustración 1

Fotografías 3.3.. En la foto se observan las plantas a los 44 días. En la distintas soluciones.

3.3. Determinación de la composición mineral

El material vegetal seco se guardó en una estufa a 65°C para la posterior determinación de la composición mineral. Se realizó una digestión nítrico-perclórica (2:1), pesando 0,1 g de material vegetal y en su defecto la cantidad de material vegetal obtenida, a lo que se adicionaron 3 ml de ácido nítrico-perclórico. Seguidamente, se colocaron en un digestor a 90°C durante 1 hora, tras ello se elevó la temperatura a 120°C durante 4 horas. A continuación se aumentó a 180°C durante 2 horas y finalmente a 200°C entre 4 y 6 horas hasta la decoloración de la muestra y volumen final inferior a 0,5 ml.

Posteriormente y después de enfriarse, se enrasó con agua destilada hasta 25 ml en las muestras de 0,1 g de material vegetal y hasta 10 ml cuando la muestra tenía un peso inferior a 0,1g. Por último, se determinaron las concentraciones de nutrientes en un espectrofotómetro de emisión atómica (Perkin-Elmer modelo ICP 5500).

4. RESULTADOS

Se ha estudiado el efecto de distintas concentraciones de K y As sobre el crecimiento y composición mineral de dos líneas de *Arabidopsis thaliana* L., silvestre (WT) y mutante (*phr1 phl1*). Ésta última presenta una mutación en los genes *PHR1* y *PHL1* que codifican factores de transcripción que activan diversos genes implicados en la respuesta a la deficiencia de fosfato (Rubio *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2010). La línea mutante *phr1 phl1* es deficiente en la nutrición de fosfato cuando éste está presente a bajas concentraciones debido a una alteración en diversos sistemas de transporte de fosfato. Los tratamientos se han aplicado con la intención de que el crecimiento de las plantas no estuviera excesivamente afectado. Después de 34 días de crecimiento en la solución control (1,4 mM K + 0,05 mM P), las plantas se sometieron durante 10 días a los siguientes tratamientos, como se indica en la sección de material y métodos:

- 1,4 mM K + 0,05 mM P
- 1,4 mM K + 0,05 mM P + 0,05mM As
- 1,4 mM K + 0,05 mM P+ 0,1mM As
- 20 mM K + 0,05 mM P + 0,05m As
- 20 mM K + 0,05 mMP + 0,1 mM As

4.1. Efecto del K y del As sobre el crecimiento

El peso seco de la parte aérea se presenta en la Figura 4.1. En el tratamiento control (1,4 mM K + 0,05 mM P) el peso seco de la parte aérea fue mayor en la línea WT (0,075 g.planta⁻¹) que en la línea mutante *phr1 phl1* (0,049 g.planta⁻¹). Cuando el medio contenía 1,4 K + 0,05 As se produjo una disminución de peso seco de la parte aérea de un 35% en la línea WT, mientras que no se observan diferencias en la línea mutante *phr1 phl1*. Al aumentar la concentración de As a 0,1 mM, disminuyó el peso seco de la parte aérea de ambas líneas, un 57% en WT y un 20% en *phr1 phl1*. Este resultado indica que con arsénico en la solución nutritiva el crecimiento de la parte aérea de la línea *phr1 phl1* fue menos afectado que el de la línea silvestre.

Cuando en el medio el nivel de potasio era de 20 mM, tanto con 0,05 como con 0,1 mM de As, disminuyó el efecto negativo del As en las plantas WT, ya que aumentó

el peso seco de la parte aérea, sin embargo éste disminuyó en la línea *phr1 phl1*, al compararlas con 1,4 mM K.

Con respecto a la raíz, el peso seco fue bastante mayor en la línea WT (0,014 g.planta⁻¹) que en la mutante (0,0076 g.planta⁻¹). Igual que ocurría con la parte aérea con 0,05 mM de As se produjo un descenso en el peso de la raíz de la línea silvestre, pero no de la mutante, mientras que con el nivel más alto de As disminuyó el peso de la raíz de ambas líneas.

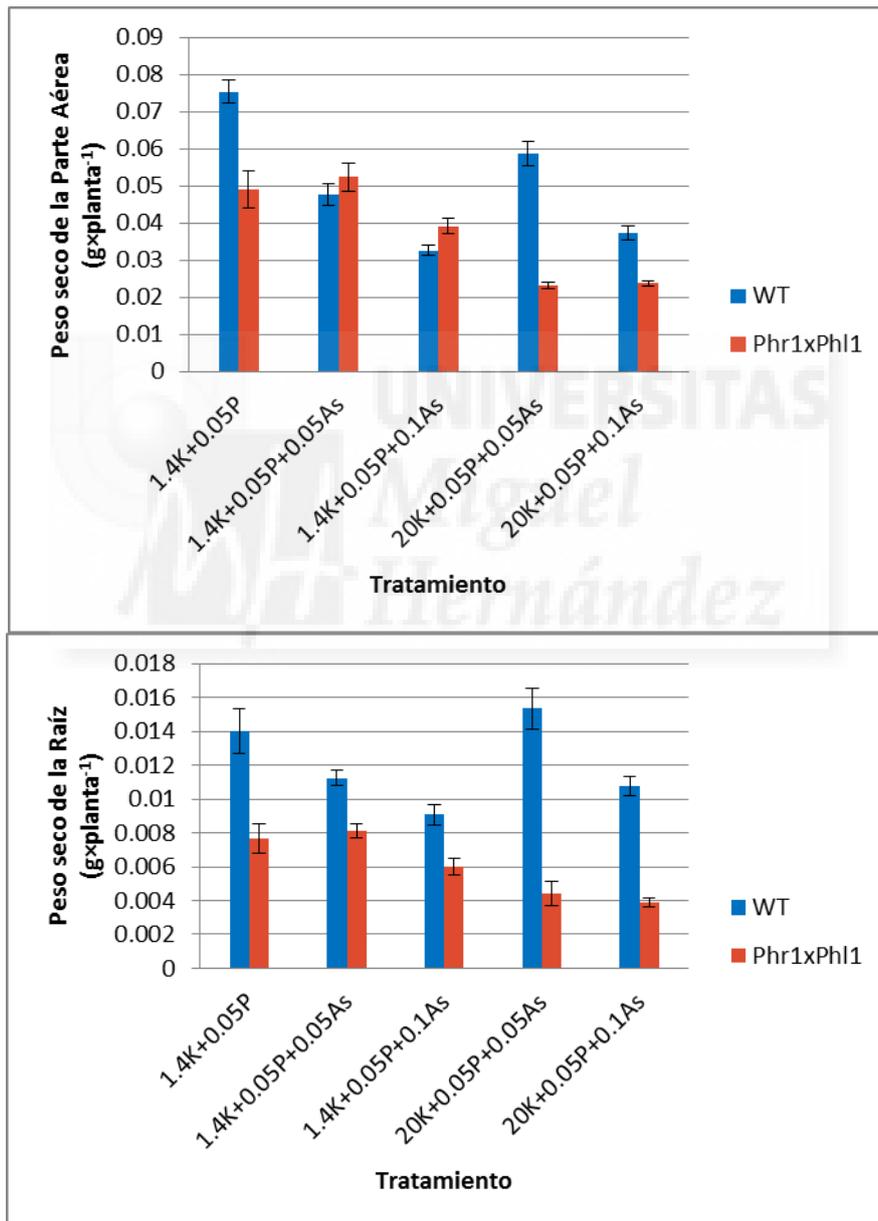


Figura 4.1. Peso seco (g.planta⁻¹) de la parte aérea y de la raíz de las plantas de las líneas WT y *phr1 phl1* sometidas a distintos tratamientos de K (1,4 y 20 mM) y As (0,05 y 0,1 mM). Se presenta la media de 4 plantas por tratamiento y las barras de error representan el error estándar.

Al aumentar la concentración de K en la solución nutritiva a 20 mM aumentó el peso seco de la raíz de la línea WT, es decir disminuyó el efecto negativo del As con los dos niveles de As, llegando incluso a ser igual que el control con 0,05 mM As en el medio. Sin embargo, en la línea *phr1 phl1* al aumentar el K, disminuyó el peso seco de la raíz con los dos niveles de As.

4.1 Concentración de K, Ca, Mg, P y As en la planta

- **Concentración de K.**

Con el tratamiento control (1,4 mM de K⁺ y 0,05 de P) la concentración de K⁺ en la parte aérea (Figura 4.2) fue similar en la línea silvestre (37,4 mg.g⁻¹PS) y en la mutante (34,4 mg.g⁻¹PS). La presencia de As en el medio con 1,4 mM de K tuvo un efecto diferente en las dos líneas de Arabidopsis, pues redujo la concentración de K en la parte aérea de la línea silvestre, un 30 % (con 0,05 mM As) y un 43.3 % (con As 0,1 mM), pero no afectó significativamente a la línea mutante.

Como cabría esperar, con el tratamiento de 20 mM de K la concentración de éste aumentó significativamente en ambas líneas y con las diferentes concentraciones de arsénico. En los tratamientos con As se puede apreciar que el aumento en la concentración de K en el medio dio lugar a un mayor incremento en la concentración de K en la línea silvestre que en la mutante. Comparando las dos líneas, con 0,05 mM As no se apreciaron diferencias entre las dos líneas, pero con 0,1 mM As, la concentración de K en la parte aérea fue ligeramente mayor en la mutante.

En cuanto a la concentración de K en la raíz, igual que ocurría en la parte aérea en el tratamiento control, resultó similar en las dos líneas (33,2 mg.g⁻¹PS, en la WT y 32 mg.g⁻¹PS, en la *phr1 phl1*). La presencia de As (0,05 y 0,1 mM) afectó de manera diferente a ambas líneas, ya que redujo la concentración de K en la línea silvestre, pero no en la mutante.

El aumento del nivel de K en el medio a 20 mM dio lugar a un incremento en la concentración de K en la raíz de ambas líneas, pero este aumento fue menor que en la parte aérea. Cuando en el medio había As, el K en la raíz aumentó más en la línea silvestre que en la mutante, al igual que ocurrió en la parte aérea, con respecto al

tratamiento con 1.4 mM K. Sin embargo, la concentración de K resulto similar con 20 mM de K y 0.05 mM As en las dos líneas de Arabidopsis, mientras que con As 0.1 mM el nivel de K fue mayor en la línea *phr1 phl1*.

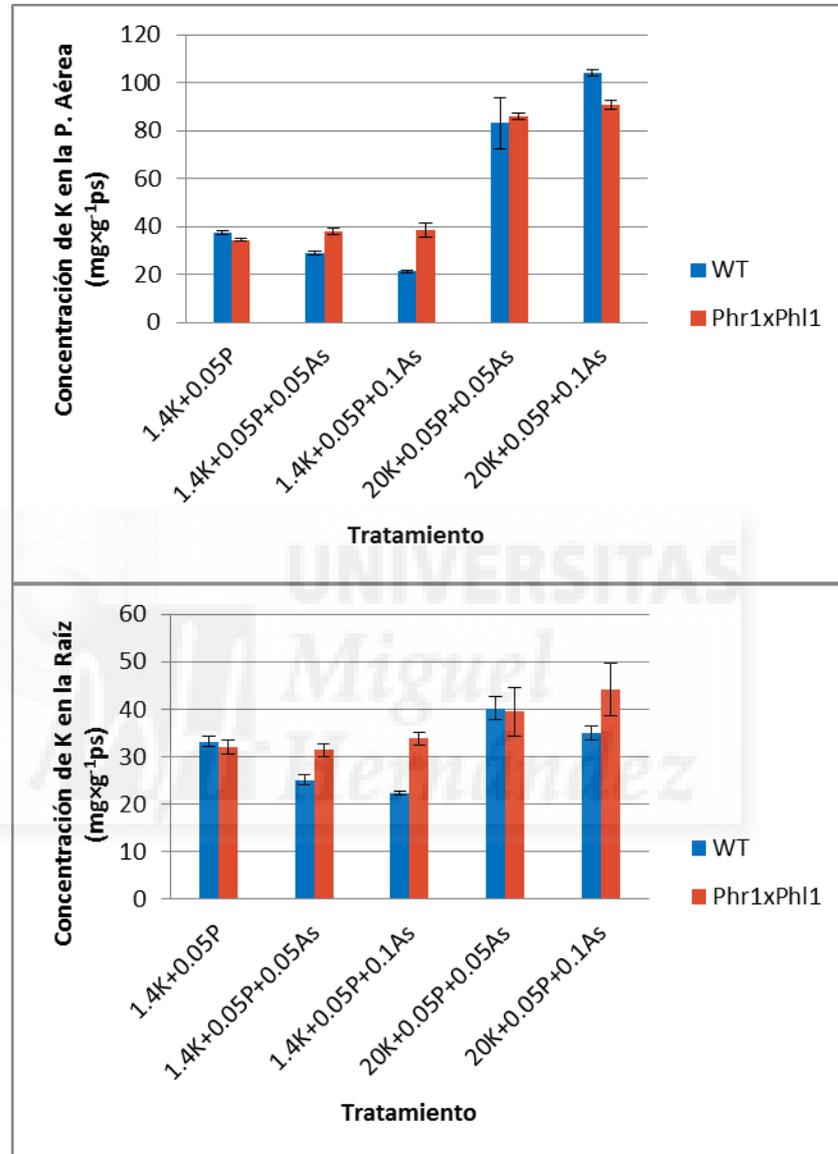


Figura 4.2. Concentración de K ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$) en parte aérea y raíz de plantas de las líneas WT y *phr1 phl1* sometidas a distintos tratamientos de K (1.4 y 20 mM) y As (0.05 y 0.1 mM). Se presenta la media de 4 plantas por tratamiento y las barras de error representan el error estándar.

• **Concentración de Ca**

La concentración de Ca se presenta en la (Figura 4.3.) Como se puede observar, las plantas control (1.4 mM K) tienen una concentración de Ca en la parte aérea similar en las líneas silvestre y mutante. Los tratamientos con As y 1.4 mM K, solo redujeron la concentración de Ca en la parte aérea de la línea silvestre (con As 0.1 mM) y no afectaron a la línea mutante.

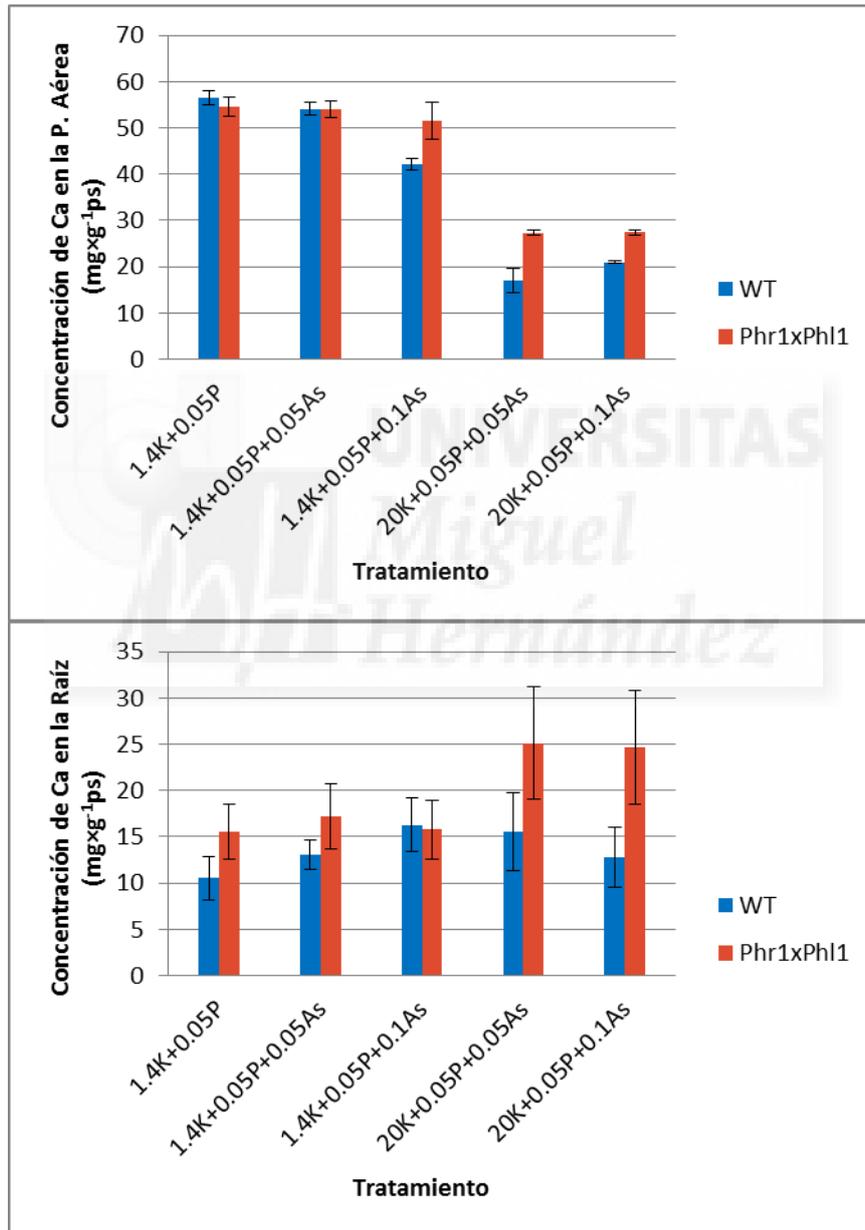


Figura 4.3.. Concentración de Ca en parte aérea y raíz de plantas de las líneas WT y *phr1 phl1* sometidas a distintos tratamientos de K (1.4 y 20 mM) y As+2 (0.05 y 0.1 mM). Se presenta la media de 4 plantas por tratamiento y las barras de error representan el error estándar.

Al aumentar el potasio a 20 mM, tanto con 0,05 como 0,1 mM de As, se produjo un descenso de la concentración de Ca tanto en la línea WT como en la mutante *phr1 phl1*, siendo mayor el efecto en la primera.

En cuanto a la raíz, aunque las diferencias no fueron significativas, la concentración de Ca fue mayor en la línea mutante que en la silvestre. En general, con K 1,4 mM, el As no afectó significativamente la concentración de Ca en la raíz de las dos líneas estudiadas.

Al aumentar el K a 20mM se encontraron diferencias significativas, ya que en la línea WT la concentración de Ca en la raíz no varió, mientras que aumentó en la línea mutante, con las dos concentraciones de As 0.05 y 0.1 mM.

- **Concentración de Mg**

La concentración de Mg en la parte aérea con el tratamiento control fue de (56,5 mg.g⁻¹PS) en la línea silvestre y de (54,5 mg.g⁻¹PS) en la mutante (Figura 4.4.). Los tratamientos de As aplicados con un nivel de K 1.4 mM no afectaron a la concentración de Mg en la parte aérea de ninguna de las líneas.

Como cabría esperar, al aumentar el K en el medio hasta 20 mM con los dos niveles de As aplicados, se produjo una disminución en la concentración de Mg en la parte aérea de ambas líneas de Arabidopsis, siendo este efecto más acusado en la línea WT que en la *phr1 phl1*. Este efecto del K también fue similar en el caso de la concentración de Ca en la parte aérea.

En cuanto a la raíz, en el tratamiento control, aunque la concentración de Mg fue mayor en la línea mutante, este efecto no fue significativo. Cuando en la solución nutritiva 1.4 mM K se añadió As, se produce un ligero aumento en la concentración de Mg en ambas líneas, aunque este efecto solo fue significativo en la línea WT.

Al aumentar la concentración de K a 20 mM en la disolución, no se produjo un efecto significativo sobre la concentración de Mg en la raíz. Sin embargo, cabría comentar que ésta fue mayor en la línea mutante que en la silvestre.

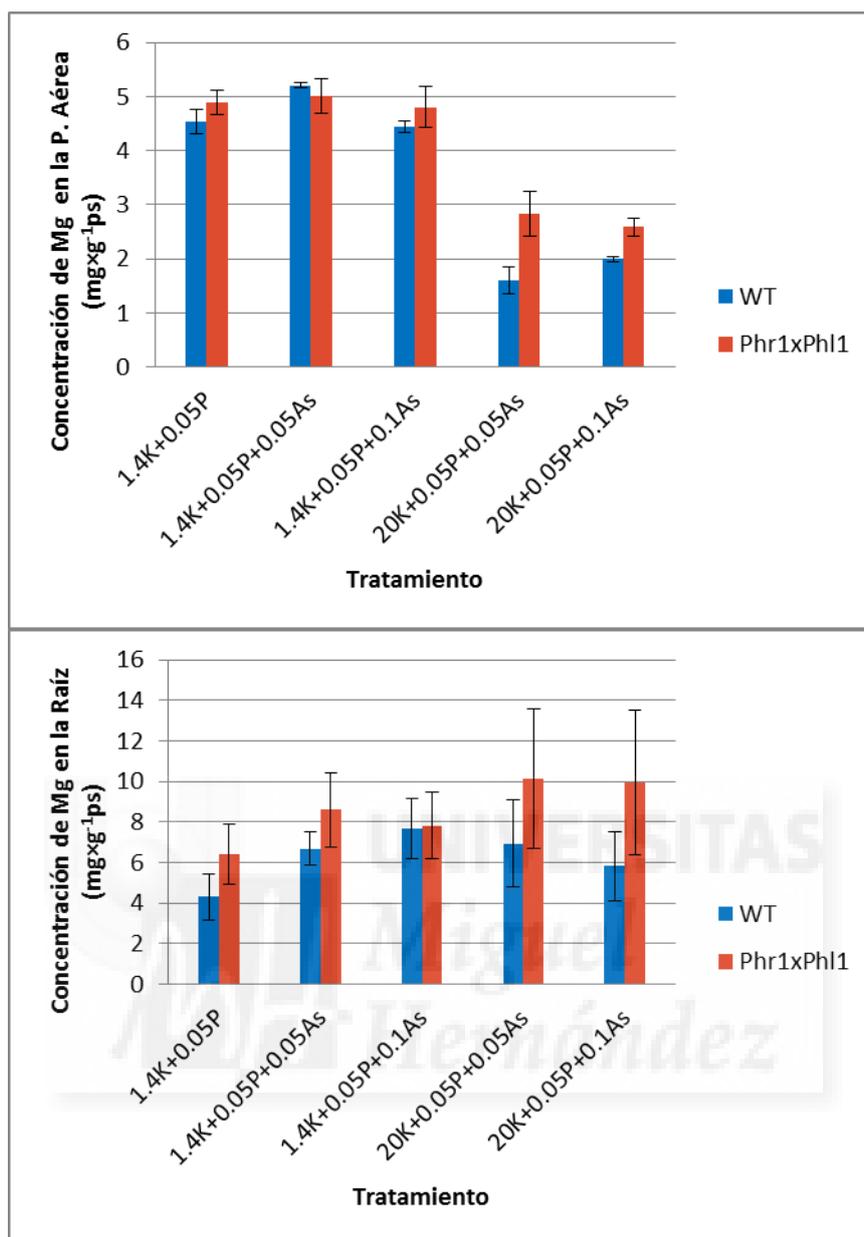


Figura 4.4. Concentración de Mg ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$) en parte aérea y raíz de plantas de las líneas WT y *phr1 phl1* sometidas a distintos tratamientos de K (1.4 y 20 mM) y As (0.05 y 0.1 mM). Se presenta la media de 4 plantas por tratamiento y las barras de error representan el error estándar.

- **Concentración de P**

La concentración de P en la planta se presenta en la (Figura 4.5). Resulta interesante ver los resultados de las concentraciones de P en la planta ya que en todos los tratamientos, la concentración de P en la solución nutritiva ha permanecido constante.

De esta forma observamos que en la parte aérea en el tratamiento control, y en ausencia de arsénico, existe una gran diferencia de concentración entre las líneas silvestre y mutante, siendo 3.6 y 2.9 ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{PS}$), respectivamente. Este resultado confirma que la línea mutante tiene alterada la nutrición de fosfato. Como consecuencia de la mutación en los factores de transcripción *PHR1* y *PHL1*, se interrumpe la cascada de señales de respuesta a bajo suministro de fosfato. Así, en la planta mutante, en presencia de una concentración que casi es limitante como 0,05 mM P, no se inducen apropiadamente los sistemas de transporte de fosfato y la planta presenta una baja concentración de fosfato en la parte aérea y sufre de deficiencia del mismo. Al introducir 0,05 y 0,1 mM de arsénico en la solución nutritiva se aprecia que hay un descenso pronunciado de la concentración de P de la línea silvestre. Donde con 0,05 mM de As se igualan las concentraciones de fosfato de ambas líneas y al aumentar a 0,1 mM, se incrementa la concentración de P en la línea mutante, con respecto al control. Con 20 mM K, no hubo cambios significativos en la concentración de P en la parte aérea de ninguna de las líneas.

En cuanto a la raíz es de destacar que en el tratamiento control la concentración de P es inferior a los tratamientos con As. Al introducir As 0.05 mM, con respecto al tratamiento control, se aprecia un incremento de la concentración de P en la raíz de línea silvestre y en la línea mutante, sin existir diferencias significativas con respecto a 0,05 y 0,1 mM de As.

Con la solución nutritiva 20 mM K+ 0,05 mM As, los resultados son similares a la concentración de 1,4 de K, mientras que con 20 mM K+ 0,1 mM de As, se observa un incremento en la concentración de P en la raíz con respecto a los tratamientos anteriores, pero no una diferencia entre líneas.

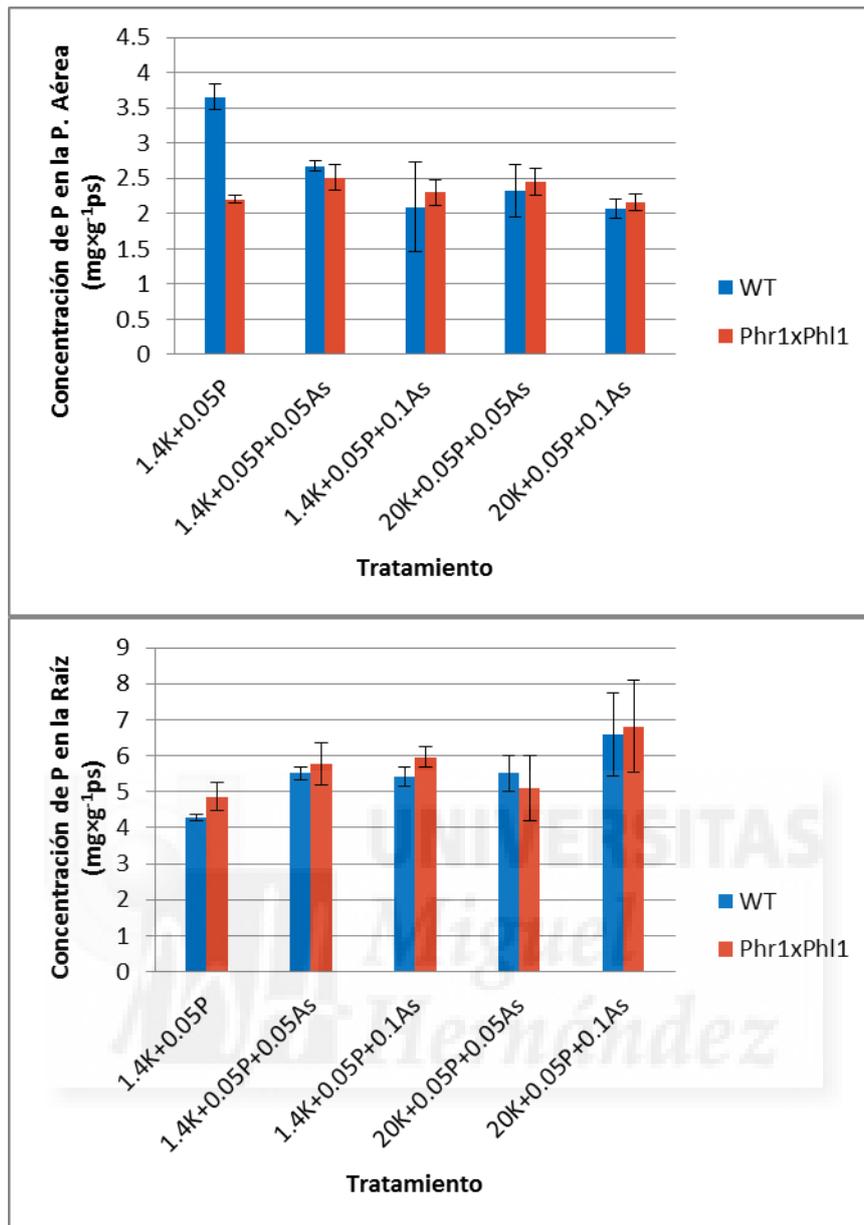


Figura 4.5. Concentración de P ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{PS}$) en parte aérea y raíz de plantas de las líneas WT y *phr1 phl1* sometidas a distintos tratamientos de K (1.4 y 20 mM) y As (0.05 y 0.1 mM). Se presenta la media de 4 plantas por tratamiento y las barras de error representan el error estándar.

• **Concentración de As**

La concentración de As se presenta en la Figura 4.6. En este caso no se presentan datos para el tratamiento control, ya que la disolución del control no lleva As.

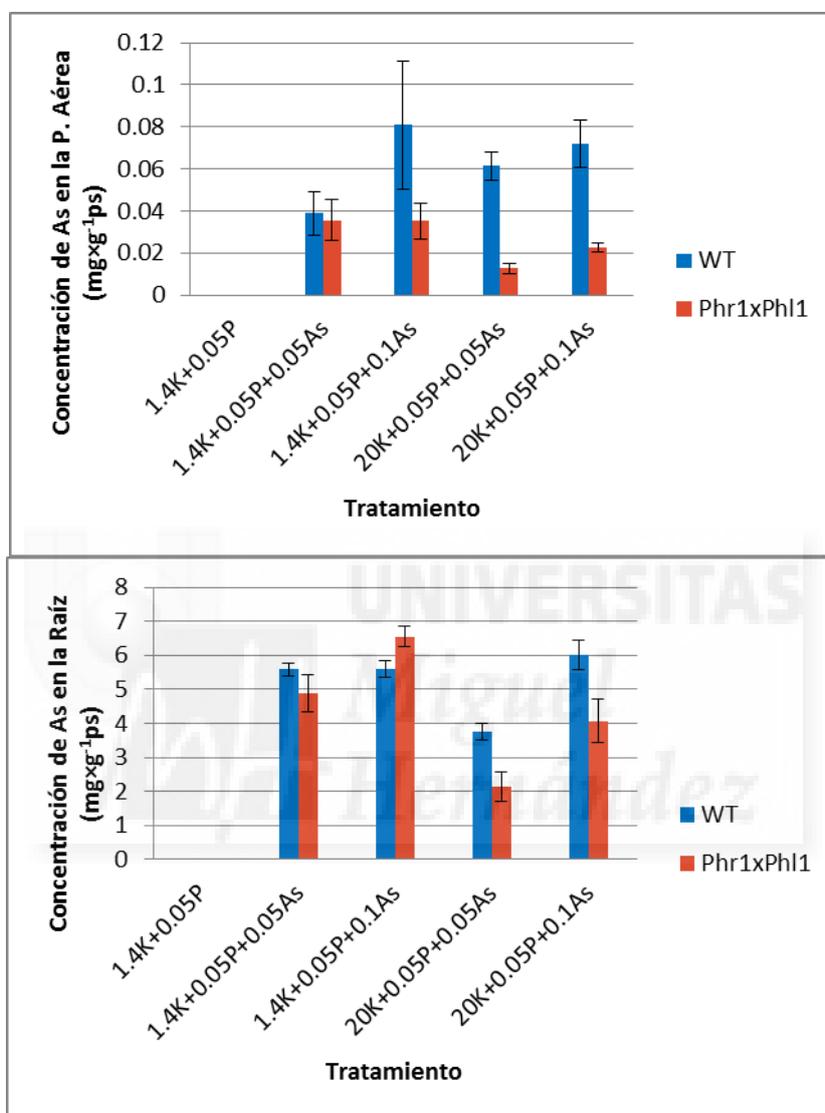


Figura 4.6. Concentración de P (mg.g⁻¹PS) en parte aérea y raíz de plantas de las líneas WT y *phr1 phl1* sometidas a distintos tratamientos de K (1.4 y 20 mM) y As (0.05 y 0.1 mM). Se presenta la media de 4 plantas por tratamiento y las barras de error representan el error estándar.

En la parte aérea, con los tratamientos de As, se observa como con 1,4 mM K + 0,05 mM As, las concentraciones de As son similares en ambas líneas, siendo ligeramente mayor la concentración en la línea WT. Esta diferencia se incrementa al

aumentar el As a 0,1 mM, llegando a ser la diferencia entre líneas más del doble, siendo 0,08 (mg.g⁻¹PS) en WT y 0,03 (mg.g⁻¹PS) en la línea mutante.

En los tratamientos con 20 mM de K⁺, aun se incrementa más la diferencia entre las dos líneas. En la línea WT la concentración de As fue de 0,061 y 0,071 (mg.g⁻¹PS), con los tratamientos de 0,05 mM y 0,1 mM de As, respectivamente. En cambio en la línea mutante esta concentración fue de 0,012 y 0,022(mg.g⁻¹PS), con los mismos tratamientos mencionados. Al comparar las dos líneas con K 20 mM, la concentración de As en la parte aérea resultó más del doble en la línea silvestre que en la línea mutante.

Con respecto a la raíz, sucede lo contrario, con 1.4 mM K la concentración de As es mayor que con 20 mM K, en ambas líneas de Arabidopsis. Por ejemplo, en el tratamiento con 0.05 mM As, la concentración de As disminuyó en la línea WT de 5,6 a 3,8 mg.g⁻¹PS, al aumentar el K en el medio, y en la mutante de 4,9 a 2,14 mg.g⁻¹PS. Al aumentar a 0,1 mM de As la diferencia entre tratamientos variando el K⁺, se aprecia menos.

DISCUSIÓN

El arsénico es un elemento tóxico para los seres vivos. Es muy similar al fosfato y entra en la planta a través de los transportadores de fosfato (MEHARG and MACNAIR, 1992; Catarecha *et al.*, 2007). En el mundo existen ciertas zonas especialmente contaminadas por arsénico, que pueden ser a su vez grandes productoras de alimentos. El arsénico de estos suelos agrícolas se acumula en la planta y en última instancia pasa a la cadena alimenticia humana, produciendo importantes efectos negativos sobre la salud (Verbruggen *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Intentar reducir la contaminación de estos suelos es muy complejo y económicamente costoso. Por ello, es necesario buscar soluciones que den lugar a una menor acumulación de arsénico en los cultivos. Se requiere en primer lugar caracterizar los sistemas de acumulación de arsénico en la planta y como podría reducirse la entrada del mismo. Esto podría hacerse a través de estrategias basadas en prácticas culturales o mediante la obtención de variedades en las que la acumulación de arsénico estuviera disminuida.

En la literatura se ha descrito una interacción en la nutrición de K y fosfato (Fageria, 2001). Por otra parte, en el grupo en donde se ha desarrollado este Trabajo Fin de Grado se trabaja en la nutrición de potasio y la interacción de la misma con la nutrición de otros elementos esenciales como el fósforo. En experimentos preliminares se había observado que el cultivo de plantas con altas concentraciones de K daba lugar a una disminución de la concentración interna de fosfato en los tejidos vegetales, que en algunos casos podía incluso dar lugar a deficiencia del mismo. Ya que el arsénico entra en la planta a través de los transportadores de fosfato (Meharg and Macnair, 1992; Catarecha *et al.*, 2007), se formuló la hipótesis de que las altas concentraciones de K podían también disminuir la acumulación de arsénico en la planta, reduciendo así la toxicidad de este elemento, algo que también se sugiere en otros trabajos publicados.

Para comprobar esta hipótesis, en el presente Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo un experimento en el que se ha estudiado la toxicidad por arsénico en condiciones de suministro normal de K (1,4 mM K⁺) y en condiciones de alto K (20 mM). Se ha caracterizado el crecimiento de la planta y las concentraciones internas de K, P, Ca, Mg y As tras un periodo de crecimiento de las plantas en soluciones sin arsénico (control) y con dos niveles del mismo (0,05 y 0,1 mM). Se han empleado dos líneas de *Arabidopsis*, la silvestre (WT) y una línea mutante (*phr1 phl1*) (Rubio *et al.*, 2001; Bustos *et al.*, 2010). La línea mutante *phr1 phl1* se ha empleado para profundizar en el estudio del efecto de altas concentraciones de K sobre los mecanismos de entrada de fosfato y arsénico. Esta línea, al ser deficiente los mecanismos de señalización de la respuesta a bajo fosfato, es deficiente en ciertos sistemas de absorción y transporte a la parte aérea de fosfato, y posiblemente también de arsénico.

Los datos de pesos secos de parte aérea y raíz mostrados en la (Figura 4.1) reflejan la toxicidad debida a la presencia de arsénico. En las plantas WT se observa que la presencia de arsénico disminuye el peso seco de parte aérea y raíz y que la presencia de 20 mM K reduce este efecto negativo del arsénico. La explicación a estos resultados de toxicidad no es sencilla. Si se observan las concentraciones de arsénico (Figura 4.6) se puede concluir que en la parte aérea, el incremento de K a 20 mM aumenta la concentración de arsénico. En la raíz, 20 mM K disminuye la concentración de arsénico cuando está presente a 0,05 mM, pero no tiene efecto cuando está presente a 0,1 mM. Por lo tanto, los datos de concentración de arsénico por si solos no explican el incremento de tolerancia a arsénico debida a la presencia de alto K. Solamente en la raíz

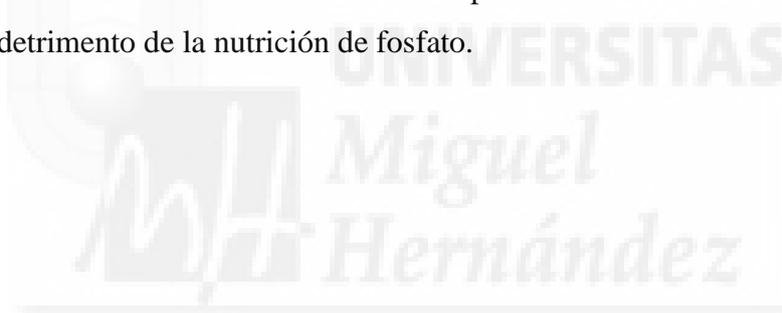
de las plantas crecidas en 0.05 mM arsénico la presencia de 20 mM K⁺ disminuye la concentración de arsénico.

Si nos centramos ahora en las plantas mutantes *phr1 phl1*, los efectos son distintos a los observados en las plantas WT. En primer lugar se observa que en situación control, la planta mutante es más pequeña que la silvestre. Esto puede ser debido a una deficiencia en la nutrición de fósforo, ya que esta línea muestra casi la mitad de fósforo en la parte aérea que la WT (Figura 4.5). Al cultivar esta línea en presencia de 0,05 mM As, no se observa reducción del crecimiento de la planta. Esto podría ser debido a que esta línea, al ser deficiente en la entrada de fósforo, también mostraría una menor entrada de arsénico, y por lo tanto mayor tolerancia. Sin embargo, los datos de la (Figura 4.6) muestran que esta línea acumula la misma concentración de arsénico que la WT. Por otra parte, al aumentar el arsénico a 0,1 mM, disminuye el crecimiento, pero no aumenta la acumulación de arsénico. Por último, en esta línea mutante, la presencia de altas concentraciones de K no mejoran el crecimiento, por el contrario lo empeoran, mientras que estas plantas cultivadas en alto K muestran una menor acumulación de arsénico. Por lo tanto, explicar la sensibilidad a arsénico de esta línea mutante basándonos en los datos de acumulación del mismo no es posible.

Merece la pena destacar que cuando en el medio hay 20 mM de K, la concentración de arsénico en la planta mutante *phr1 phl1* disminuye considerablemente, lo que no ocurre en las WT. Esto podría ser debido a que el sistema por el que entra el arsénico en la planta mutante es distinto al sistema por el que entra en la WT. Mientras que en la planta mutante el sistema de entrada de arsénico es sensible a alto K, en la planta WT es insensible. Que los sistemas de entrada de arsénico en la planta WT y mutante sean distintos parece lógico, ya que en la mutante no están inducidos ciertos transportadores de fósforo, al faltar la cascada de regulación mediada por PHR1 PHL1. Sin embargo, esta menor acumulación de arsénico en las plantas mutantes en presencia de alto K no da lugar a una mayor tolerancia al arsénico. Por otra parte tampoco se observan diferencias en el efecto del alto K sobre la concentración de fósforo en las plantas WT y mutante. Por todo esto, no se puede concluir que la reducción de la acumulación de arsénico en la planta mutante da lugar a tolerancia a este tóxico y habría que buscar una explicación alternativa.

Las concentraciones de Ca y Mg en parte aérea y raíz, en general no resultaron afectadas por el As. Al aumentar el nivel de K, si disminuyó la concentración de Ca más en la línea WT que en la mutante. Por lo tanto los datos de Ca y Mg tampoco dan luz sobre la toxicidad por arsénico observada en la (Figura 4.1).

Explicar todos estos resultados con los datos disponibles es complejo ya que en este estudio participan varios factores. Por un lado, la toxicidad por As, por otro el efecto de alto K y por último el efecto de la mutación *phr1 phl1*. Parece existir una interacción entre estos tres factores y encontrar una explicación para los resultados de crecimiento que se observan en la (Figura 1) podría ayudar a entender la nutrición de fosfato en las plantas, la toxicidad por arsénico y posibles soluciones a la misma. Por ejemplo, una posible práctica cultural para disminuir la acumulación de arsénico en ciertas plantas podría ser el aumento de la fertilización de fosforo y de potasio. Otra posibilidad sería generar variedades con una mayor selectividad fosfato/arsénico de los sistemas de entrada de fosfato. Estas variedades permitirían una menor acumulación de arsénico sin detrimento de la nutrición de fosfato.



5. CONCLUSIONES

- Los datos de pesos secos de parte aérea y raíz de las plantas de Arabidopsis reflejan la toxicidad debida a la presencia de arsénico. En las plantas WT el arsénico disminuyó el peso seco de parte aérea y raíz y el tratamiento con 20 mM K redujo este efecto negativo del arsénico. Sin embargo, los datos de concentración de arsénico por si solos no explican el incremento de tolerancia a arsénico debida a la presencia de alto K.
- En condiciones control, las plantas mutantes son más pequeña que las silvestre, lo que se debería a una deficiencia en la nutrición de fosforo, ya que esta línea muestra casi la mitad de fosforo en la parte aérea que la silvestre.
- La línea mutante en presencia de 0,05 mM As, no redujo su crecimiento. A pesar de tener alterada la absorción de P, y por lo tanto se esperaría que también la de As, esto no fue debido a una menor acumulación de As.
- En la línea mutante *phr1 phl1*, las altas concentraciones de K dieron lugar a una menor acumulación de arsénico, sin embargo esto no dio lugar a un mejor crecimiento.
- Con 20 mM de K, las diferencias en la concentración de arsénico entre la línea mutante *phr1 phl1*, en la que disminuyó considerablemente y la WT, en la que no cambió, indicaría que el sistema por el que entra el arsénico en la planta mutante es distinto al sistema por el que entra en la WT.
- El efecto de los distintos tratamientos sobre el crecimiento de las dos líneas estudiadas no puede ser explicado únicamente con las concentraciones de As en la planta. Sin embargo, parece existir una interacción entre estos los tres factores estudiados (toxicidad de As, alto K y mutación *phr1 phl1*) y profundizar en estos estudios podría ayudar a entender la nutrición de fosfato en las plantas, la toxicidad por arsénico y posibles soluciones a la misma.

BIBLIOGRAFÍA

- Amtmann, A., and Armengaud, P.** (2009). Effects of N, P, K and S metabolism: new knowledge gained from multi-level analysis. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 275-283.
- Amtmann, A., Troufflard, S., and Armengaud, P.** (2008). The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiol Plant* 133, 682-691.
- Armengaud, P., Sulpice, R., Miller, A.J., Stitt, M., Amtmann, A., and Gibon, Y.** (2009). Multilevel Analysis of Primary Metabolism Provides New Insights into the Role of Potassium Nutrition for Glycolysis and Nitrogen Assimilation in *Arabidopsis* Roots. *Plant Physiology* 150, 772-785.
- Azcón, J., and Talón, M.** (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. 103-107.
- Bielecki, R.L.** (1973). Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 27: 225–252.
- Britto, D.T., and Kronzucker, H.J.** (2008). Cellular mechanisms of potassium transport in plants. *Physiol Plant* 133, 637-650.
- Brown, G.E., Jr., Foster, A.L., and Ostergren, J.D.** (1999). Mineral surfaces. 129-183.
- Bustos R, Castrillo G, Linhares F, Puga MI, Rubio V, Perez-Perez J, Solano R, Leyva A, and Paz-Ares J.** (2010) A Central Regulatory System Largely Controls Transcriptional Activation and Repression Responses to Phosphate Starvation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 6: e1001102
- Catarecha P., Segura, M.D., Franco-Zorrilla, J.M., García-Ponce, B., Lanza, M., Solano, R., Paz-Ares, J., and Leyva, A.** (2007) A Mutant of the *Arabidopsis* Phosphate Transporter PHT1;1 Displays Enhanced Arsenic Accumulation. *The Plant Cell Online* 19: 1123-1133

- Clarkson, D.T., and Hanson, J.B.** (1980). The Mineral Nutrition of Higher Plants. Vol. 31: 239-298
- Cuin, T.A., Miller, A.J., Laurie, S.A., and Leigh, R.A.** (2003). Potassium activities in cell compartments of salt-grown barley leaves. *Journal of Experimental Botany* 54, 657-661.
- Dobermann, A., Cassman, K.G., Mamaril, C.P., and Sheehy, J.E.** (1998). Management of phosphorus, potassium, and sulfur in intensive, irrigated lowland rice. *Field Crops Research* 56, 113-138.
- Dreyer I., and Uozumi N.** (2011) Potassium channels in plant cells. *FEBS Journal* 278: 4293-4303
- Elumalai, R.P., Nagpal, P., and Reed, J.W.** (2002). A Mutation in the Arabidopsis KT2/KUP2 Potassium Transporter Gene Affects Shoot Cell Expansion. *The Plant Cell* 14, 119-131.
- Fageria, V.D.** (2001) NUTRIENT INTERACTIONS IN CROP PLANTS. *Journal of Plant Nutrition* 24: 1269-1290
- Fedoroff, N.V., Battisti, D.S., Beachy, R.N., Cooper, P.J.M., Fischhoff, D.A., Hodges, C.N., Knauf, V.C., Lobell, D., Mazur, B.J., and Molden, D., et al.,** (2010). Radically Rethinking Agriculture for the 21st Century. *Science* 327, 833-834.
- Fitz, W.J., and Wenzel, W.W.** (2002). Arsenic transformations in the soil-rhizosphere-plant system: Fundamentals and potential application to phytoremediation. *J. Biotechnol.* 99: 259–278
- Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erisman, J.W., Bekunda, M., Cai, Z.C., Freney, J.R., Martinelli, L.A., Seitzinger, S.P., and Sutton, M.A.** (2008). Transformation

of the nitrogen cycle: Recent trends, questions, and potential solutions. *Science* 320, 889-892.

Hirel, B., Le Gouis, J., Ney, B., and Gallais, A. (2007). The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* 58, 2369-2387.

Ju, X.T., Xing, G.X., Chen, X.P., Zhang, S.L., Zhang, L.J., Liu, X.J., Cui, Z.L., Yin, B., Christie, P., Zhu, Z.L., et al. (2009). Reducing environmental risk by improving N management in intensive Chinese agricultural systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3041-3046.

Katz, S.A., and Salem, H. (2005). Chemistry and toxicology of building timbers pressure-treated with chromated copper arsenate: A review. *J. Appl. Toxicol.* 25: 1-7.

Leigh, R.A., and Jones, R.G.W. (1984). A Hypothesis Relating Critical Potassium Concentrations for Growth to the Distribution and Functions of This Ion in the Plant-Cell. *New Phytologist* 97, 1-13.

Maathuis, F.J.M. (2009). Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 250-258.

Maathuis, F.J.M., and Sanders, D. (1993). Energization of potassium uptake in *Arabidopsis thaliana* *Planta* 191, 302-307.

Maathuis, F.J.M., and Sanders, D. (1994). Mechanisms of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9272-9276.

Maathuis, F.J.M., and Sanders, D. (1996). Mechanisms of potassium absorption by higher plant roots. *Physiol Plant* 96, 158-168.

- Mahouachi, J., Socorro, A.R., and Talon, M.** (2006). Responses of papaya seedlings (*Carica papaya* L.) to water stress and re-hydration: GroWTh, photosynthesis and mineral nutrient imbalance. *Plant and Soil* 281, 137-146.
- Marschner, H.** (1995). Marschner, H. Mineral Nutrition of higher Plants. 2nd. edition, Academic Press, San Diego, London . 1995
- MEHARG, A.A., MACNAIR, M.R.** (1992) Suppression of the High Affinity Phosphate Uptake System: A Mechanism of Arsenate Tolerance in *Holcus lanatus* L. *Journal of Experimental Botany* 43: 519-524
- Meharg, A.A., and Hartley-Whitaker, J.** (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytol.* 154: 29–43.
- Meharg, A.A., and Macnair, M.R.** (1990). An altered phosphate uptake system in arsenate-tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytol.* 116: 29–35.
- Meharg, A.A., and Macnair, M.R.** (1991a). Uptake, accumulation and translocation of arsenate in arsenate-tolerant and non-tolerant *Holcus lanatus* L. *New Phytol.* 117: 225–231.
- Meharg, A.A., and Macnair, M.R.** (1991b). The mechanism of arsenate tolerance in *Deschampsia cespitosa* (L.) Beauv. and *Agrostis capillaris* L. *New Phytol.* 119: 291–297.
- Meharg, A.A., and Macnair, M.R.** (1992a). Genetic correlation between arsenate tolerance and the rate of influx of arsenate and phosphate in *Holcus lanatus* L. *Heredity* 69: 336–341.
- Meharg, A.A., and Macnair, M.R.** (1992b). Suppression of the high affinity phosphate uptake system: A mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. *J. Exp. Bot.* 43: 519–524.

- Mengel, K., Kirkby, E.A., Kosegarten, H., and Appel, T.** (2001). Principles on plant nutrition (Dordrecht, Kluwer).
- Nickson, R., McArthur, J., Burgess, W., Ahmed, K.M., Ravenscroft, P., and Rahman, M.** (1998). Arsenic poisoning of Bangladesh groundwater. *Nature* 395: 338.
- Nordstrom, D.K.** (2002). Public health. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* 296: 2143–2145.
- Oremland, R.S., and Stolz, J.F.** (2003). The ecology of arsenic. *Science* 300: 939–944.
- Philippar, K., Fuchs, I., Luthen, H., Hoth, S., Bauer, C.S., Haga, K., Thiel, G., Ljung, K., Sandberg, G., Bottger, M., et al.** (1999). Auxin-induced K⁺ channel expression represents an essential step in coleoptile growth and gravitropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 12186-12191.
- plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31: 239–298.
- Raghothama, K.G.** (1999). Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 665–693.
- Rengel, Z., and Damon, P.M.** (2008). Crops and genotypes differ in efficiency of potassium uptake and use. *Physiol Plant* 133, 624-636.
- Rodríguez-Navarro, A., and Rubio, F.** (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *J Exp Bot* 57, 1149-1160.
- Römheld, V., and Kirkby, E.** (2010). Research on potassium in agriculture: needs and prospects. *Plant and Soil* 335, 155-180.
- Ruan, Y.-L., Llewellyn, D.J., and Furbank, R.T.** (2001). The Control of Single-Cellled Cotton Fiber Elongation by Developmentally Reversible Gating of

Plasmodesmata and Coordinated Expression of Sucrose and K⁺ Transporters and Expansin. *Plant Cell* 13, 47-60.

Rubio, V., Linhares, F., Solano, R., Martin, A.C., Iglesias, J., Leyva, A., and 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: 2122-2133

Sheldrick, R.D., Lavender, R.H., Tewson, V.J., and Cobby, J.M. (1985). THE EFFECT ON ANNUAL DRY-MATTER YIELD OF USING A HAND-CONTROLLED MOWER OR A PLOT HARVESTER FOR CUTTING HERBAGE ON SMALL-PLOT TRIALS. *Grass and Forage Science* 40, 103-107.
surfaces and bioavailability of heavy metals: A molecular-scale perspective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 3388–3395.

Tamaki, S., and Frankenberger, W.T., Jr. (1992). Environmental biochemistry of arsenic. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 124: 79–110.

Troufflard, S., Mullen, W., Larson, T., Graham, I., Crozier, A., and Amtmann, A. (2010). Potassium deficiency induces the biosynthesis of oxylipins and glucosinolates in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 10, 172.

Verbruggen, N., Hermans, C., and Schat, H. (2009) Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 364-372

Villalobos, F., Mateos, L., Orgaz F., Fereres, E. (2009). *Fitotecnia: Bases y tecnologías de la producción agrícola*, 314-317.

Walker, D.J., Leigh, R.A., and Miller, A.J. (1996a). Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10510-10514.

Walker, N.A., Sanders, D., and Maathuis, F.J. (1996). High-affinity potassium uptake in plants. *Science* 273, 977-979.

- Wang, Y., and Wu, W.-H.** (2010). Plant Sensing and Signaling in Response to K⁺-Deficiency. *Mol Plant* 3, 280-287.
- WHITE, P.J., and BROADLEY, M.R.** (2003) Calcium in Plants. *Annals of Botany* 92: 487-511
- Yang, X.E., Liu, J.X., Wang, W.M., Ye, Z.Q., and Luo, A.C.** (2004). Potassium internal use efficiency relative to growth vigor, potassium distribution, and carbohydrate allocation in rice genotypes. *Journal of Plant Nutrition* 27, 837-852.
- Zhang, J-L., Flowers, T., and Wang, S-M.** (2010) Mechanisms of sodium uptake by roots of higher plants. *Plant and Soil* 326: 45-60
- Zhao, F.J., Ma, J.F., Meharg, A.A., and McGrath, S.P.** (2009) Arsenic uptake and metabolism in plants. *New Phytologist* 181: 777-794
- Zhao, F-J., McGrath, S.P., Meharg, A.A.** (2010) Arsenic as a Food Chain Contaminant: Mechanisms of Plant Uptake and Metabolism and Mitigation Strategies. In S Merchant, WR Briggs, D Ort, eds, *Annual Review of Plant Biology*, Vol 61, Vol 61, pp 535-559