

RESTAURACIÓN DEL CRECIMIENTO RADICAL POR NUTRIMENTOS INORGÁNICOS EN *Arabidopsis thaliana* L. EXPUESTA A CROMO

Restoration of Root Growth Using Inorganic Nutrients in *Arabidopsis thaliana* L. Exposed to Chromium

Ortiz-Castro R.¹, Martínez-Trujillo M.^{1‡}, López-Bucio J.², Cervantes C.² y Carreón-Abud Y.¹

RESUMEN

La entrada del cromo (Cr VI) en las raíces de las plantas ocurre mediante un sistema de transporte activo; no obstante, existe poca información sobre el mecanismo específico involucrado. En este trabajo se ha establecido un sistema *in vitro* para estudiar el efecto del Cr sobre el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana* con el propósito de brindar información novedosa acerca del papel de los nutrientes en la respuesta de la raíz al Cr. En *A. thaliana*, el tratamiento con dicromato de potasio 200 μ M inhibió el crecimiento de la raíz primaria. Para evaluar el efecto de diferentes nutrientes minerales en la reversión de los efectos causados por el dicromato sobre la raíz, se utilizó una línea transgénica de *A. thaliana* que contiene el promotor del gen *AtCycB1;1* que codifica para una ciclina mitótica, fusionado al gen reportero de la β -glucuronidasa (*uidA*). Las plantas que expresan esta construcción genética (*AtCycB1;1::uidA*) se cultivaron en medio Murashige-Skoog (MS) sólido con nutrientes minerales y sacarosa, suplementado con concentraciones de fosfato, sulfato o nitrato de 10 mM o 15 mM, con y sin 200 μ M de dicromato de potasio. El crecimiento de la raíz primaria se restableció en gran medida por fosfatos y sulfatos (84 y 63%, respectivamente) pero no por nitratos, lo que sugiere una relación fisiológica en la toma por la raíz de estos nutrientes con el dicromato. La restauración del crecimiento de la raíz primaria mostró una correlación directa con la actividad mitótica en los meristemos de las raíces, revelada por la expresión del marcador *AtCycB1;1::uidA*, lo que sugiere que la inhibición del crecimiento de la raíz causada por el dicromato afecta, principalmente, a la división.

Palabras clave: división celular, plantas, metales, fosfatos, sulfatos.

SUMMARY

Cr (VI) uptake by roots occurs through an active transport system, but there is little information on the specific mechanism involved in this process. Using the model plant *Arabidopsis thaliana*, an *in vitro* bioassay was devised to study the effects of Cr on root growth to obtain novel information on the role of nutrient interactions in root responses to Cr. In *A. thaliana*, a 200 μ M concentration of potassium dichromate inhibited primary root growth. To evaluate the effects of different mineral nutrients in root response to Cr, we analyzed the responses of *A. thaliana* transgenic plants that express the *AtCycB1;1* promoter fused to the β -glucuronidase (*uidA*) reporter gene. Plants expressing the *AtCycB1;1::uidA* construct were grown in MS-agar medium (Murashige-Skoog) supplied with 10 or 15 μ M concentrations of phosphate, sulfate and nitrate, with and without 200 μ M dichromate. Primary root growth in 200 μ M dichromate was largely restored by phosphate and sulfate treatments (84 and 63%, respectively), but not by nitrates; this suggests a physiological relationship of these nutrients with root growth responses to dichromate. Restoration of primary root growth by nutrients directly correlated with normal mitotic activity in the root meristem, as revealed by expression of the marker *AtCycB1;1::uidA*, suggesting that primary root growth is inhibited by dichromate mainly because it affects cell division.

Index words: cellular division, plants, metals, phosphates, sulfates.

¹Facultad de Biología, ² Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 58040 Morelia, Michoacán, México.

[‡]Autor responsable (codigogenetico@gmail.com)

INTRODUCCIÓN

El Cr es un elemento de transición ubicado en el grupo VI-B de la tabla periódica. En su forma hexavalente (Cr VI) se encuentra asociado con oxígeno

para formar el cromato (CrO_4^{2-}) o el dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$). La abundancia del Cr en la corteza terrestre varía de 100 a 300 $\mu\text{g g}^{-1}$, sin embargo, la inadecuada disposición de desechos provenientes de procesos industriales tales como el curtido de pieles y la producción de aceros refractarios, lo han convertido en un contaminante del aire, el suelo y el agua (Cervantes *et al.*, 2001). La *A. thaliana* se ha utilizado como un modelo para determinar los efectos de factores ambientales sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas, ya que su corto ciclo de vida y el conocimiento de su genoma hacen que esta especie sea un sistema adecuado para el estudio de los efectos del Cr sobre el desarrollo vegetal. La raíz de *A. thaliana* tiene una estructura relativamente simple, los diferentes tejidos que la componen se originan de un grupo de células mitóticamente activas localizadas en el meristemo de la raíz (Dolan *et al.*, 1993). En un trabajo previo, Ortíz-Castro *et al.* (2006) señalaron que el dicromato tiene un efecto dual en plantas de *Arabidopsis* dependiendo de su concentración en el medio ya que, mientras el tratamiento con concentraciones de 100 μM tiene un efecto estimulador en el crecimiento de la raíz y el follaje, concentraciones de 200 μM o mayores inhiben el crecimiento de la raíz primaria, afectan la producción del follaje y producen un amarillamiento de las hojas.

El cromato y el dicromato poseen una similitud geométrica y de carga con algunos aniones esenciales, lo cual puede afectar la nutrición mineral. Por ejemplo, algunos de los efectos inhibitorios (a concentraciones mayores a 100 μM) en el crecimiento de la raíz y del follaje podrían ser causados por la competencia del Cr con nutrientes minerales esenciales mediante su unión a los transportadores. La entrada del Cr (VI) en las raíces de las plantas ocurre mediante un transporte activo (Skeffington *et al.*, 1976), pero se carece de pruebas concluyentes del mecanismo específico involucrado. Una manera de evaluar la especificidad de los sistemas de transporte por diferentes elementos es mediante la identificación de las características morfológicas de la raíz que puedan ser utilizadas como marcadores de toxicidad y analizar los efectos que causan la combinación del Cr con otros minerales.

El fosfato y sulfato son similares a la geometría de los aniones que forman el Cr (VI), por lo que se plantea la posibilidad de que el Cr pueda penetrar a la raíz a través de los transportadores de estos nutrientes y causar un efecto negativo sobre el crecimiento de la

raíz. El nitrato, no obstante que posee una carga negativa, tiene una geometría diferente a los aniones del Cr (VI) por lo tanto fue útil como control negativo en este trabajo. Con la secuenciación del genoma de *A. thaliana* se ha determinado que existe una familia de al menos 13 genes que codifican transportadores de fosfato, algunos de los cuales se expresan en la raíz (Poirier y Bucher, 2002). Se han descrito también 12 genes que codifican para transportadores de sulfato, dos de los cuales se ha encontrado que se expresan en la raíz (Leustek, 2002). Se conocen 5 genes que codifican transportadores de nitratos (Crawford y Forde, 2002).

En este trabajo se estableció un sistema *in vitro* para evaluar el efecto del Cr (VI) en el desarrollo de la raíz de *A. thaliana*. Uno de los efectos más claros del Cr consistió en la inhibición del crecimiento de la raíz primaria; este efecto se utilizó como marcador fenotípico para estudiar la especificidad de las respuestas de la raíz al Cr. Para determinar si la inhibición del crecimiento de la raíz primaria estaba correlacionada con la inhibición de la actividad mitótica, se utilizó una línea transgénica de *A. thaliana* que contiene el promotor del gen *AtCycB1;1* que codifica para una ciclina mitótica, fusionado al gen reportero de la β -glucuronidasa (*uidA*) (Colón-Carmona *et al.*, 1999). El análisis histoquímico de la actividad del gen reportero *uidA* permitió detectar de manera temporal y espacial a las células que en ese momento estaban entrando a la fase de mitosis. Para determinar si nutrientes minerales similares en carga y geometría con compuestos de Cr (VI) pueden interferir con la toxicidad de éste (restaurando el crecimiento de la raíz primaria y la actividad mitótica), se utilizó el dicromato de potasio en diferentes combinaciones de compuestos de fosfato, sulfato y nitrato, para además aportar información sobre el transporte de Cr (VI) en plantas y las interacciones de este metal con los nutrientes utilizados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó la línea transgénica *CycB1;1::uidA* de *A. thaliana* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), la cual lleva fusionado el promotor de la ciclina mitótica *CycB1;1* de *Arabidopsis* al gen reportero *uidA* (Jefferson *et al.*, 1987) que codifica la enzima β -glucuronidasa. Las semillas fueron desinfectadas durante 10 min mediante tratamiento superficial con etanol al 95% (v/v) y por 15 min con solución al 6% de hipoclorito de sodio suplementada con Tritón X-100 al 0.01%. Las semillas

se lavaron 3 veces con agua tridestilada estéril y se incubaron en oscuridad a 4 °C durante 24 h en la misma solución. Las semillas fueron colocadas en cajas de Petri con el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) 0.5X suplementado con sacarosa al 2% y agar para plantas (Phytotechnology laboratorios A111) al 0.7% (p/v). El pH se ajustó a 5.7 después de la adición del agar. Las cajas con las semillas en germinación se incubaron de manera vertical para favorecer el crecimiento de las raíces sobre la superficie del medio y medir el crecimiento de la raíz primaria. Las condiciones de crecimiento fueron: temperatura 28 °C, fotoperiodo de 12 h de luz ($300 \mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 12 h de oscuridad. A los seis días de crecimiento las plántulas fueron transferidas a diferentes medios con suplementos de nutrientes inorgánicos. Las concentraciones de fosfatos, sulfatos y nitratos en el medio MS 0.5X fueron de 0.62 mM, 0.76 mM y 19.7 mM, respectivamente. Los tratamientos de sulfato, fosfato y nitrato fueron establecidos mediante la adición al medio de sulfato de potasio (K_2SO_4), fosfato monobásico de potasio (K_2HPO_4) o nitrato de potasio (KNO_3), respectivamente, en concentraciones de 10 mM o 15 mM. Los tratamientos establecidos se presentan en el Cuadro 1.

Las plantas se dejaron crecer durante seis días adicionales posteriores al trasplante a una temperatura de 28 °C, con un fotoperiodo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Al término de este periodo se midió la longitud de la raíz primaria en plantas crecidas verticalmente.

Análisis histoquímico de la actividad de β -glucuronidasa

La actividad de la β -glucuronidasa se determinó mediante el sustrato x-gluc (Phytotechnology laboratorios X877) que produce una coloración azul al dimerizarse. El procedimiento fue el siguiente: a) las plantas de *A. thaliana* *CycB1;1::uidA* de cada tratamiento se procesaron para el análisis histoquímico de la actividad de β -glucuronidasa incubándolas 12 h en una solución al 0.1% de 5-bromo-4-cloro-3-indolil, β -D-glucurónido (x-gluc), en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH = 7) conteniendo 2 mM (0.59 g L^{-1}) de ferrocianuro de potasio (0.59 g L^{-1}) y 2 mM (0.65 g L^{-1}) de ferricianuro de potasio; b) las plantas se clarificaron con HCl 0.24 N en metanol al 20% (v/v) y se incubaron a 62 °C por 60 min. Se substituyó la solución con NaOH al 7% (p/v) en etanol al 60% y se incubaron por 20 min a temperatura ambiente;

Cuadro 1. Medios utilizados para el crecimiento de plantas de *A. thaliana*.

	Suplemento de Fosfato de K			Suplemento de Sulfato de K			Suplemento de Nitrato de K		
	- - - - - mM - - - - -								
Medio MS 0.5X	0	10	15	0	10	15	0	10	15
Medio MS 0.5X + 200 mM de dicromato de K	0	10	15	0	10	15	0	10	15

MS = (Murashige y Skoog, 1962).

c) las plantas se deshidrataron con tratamientos de etanol al 40%, 20% y 10% (v/v) por un periodo de 24 h cada vez; d) las plantas se fijaron en etanol al 5% (v/v) y glicerol al 50% (v/v). Las plantas se colocaron en portaobjetos de vidrio y se sellaron con barniz comercial. Estas preparaciones semipermanentes se utilizaron para el análisis histoquímico de β -glucuronidasa en el microscopio.

Las raíces de *A. thaliana* fueron observadas en un microscopio compuesto Axiostar Zeiss Plus. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital Sony Cybershot DSC-S75 adaptada al microscopio y procesadas con el programa Zeiss AxioVision 4AC.

Se obtuvieron los promedios e intervalos de confianza ($\alpha = 0.05$) y se realizaron los análisis de varianza y pruebas de significación de Tukey ($\alpha = 0.05$). Para cada tratamiento se utilizaron 10 plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos del Cr (VI) en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *A. thaliana* pueden ser estudiados en un sistema *in vitro* utilizando medio MS-agar como sustrato. Ortiz-Castro *et al.* (2006) establecieron que la concentración de 200 μM de dicromato es suficiente para inhibir el crecimiento de la raíz primaria.

Para tener un mayor conocimiento de la especificidad de las respuestas de la raíz al Cr (VI) e identificar posibles interacciones de éste con algunos nutrientes minerales, se realizaron bioensayos en los que se estudió el efecto restaurador de la adición de fosfato, sulfato o nitrato al medio de cultivo de las plantas. La adición de fosfato de potasio en concentraciones de 10 mM o 15 mM al medio MS 0.5X con dicromato 200 μM , restauró el crecimiento de la raíz primaria en 63 y 84%, respectivamente; dichos resultados se obtuvieron

utilizando el control sin fosfato de potasio (Figura 1). En contraste, el sulfato de potasio restauró el crecimiento en aproximadamente el 50% con ambas concentraciones (Figura 2). Sin embargo, el nitrato sólo tuvo un efecto pequeño restaurando el crecimiento cerca de 5% en los medios suplementados con este ion (Figura 3). El efecto diferencial de los iones sugiere que existe especificidad en las relaciones fisiológicas con el dicromato. Es posible que el mecanismo sea competitivo (por la geometría de los aniones) por los sitios activos o receptores de los transportadores; al haber mayor concentración de sulfato y fosfato es menor el efecto tóxico del Cr (VI), por lo tanto mayor el crecimiento de la raíz; lo cual no ocurre con el anión nitrato. La especificidad de los aniones estudiados también se refuerza con los resultados obtenidos en estudios de inhibición del crecimiento de la raíz primaria causados por el cobre, que en concentración de 90 μM inhibe completamente el crecimiento de la raíz primaria. En este caso, la adición de fosfato y sulfato no revierten el crecimiento de la raíz primaria en plantas de *A. thaliana* (Vargas *et al.*, 2007). La interacción de

otros aniones con el fosfato se ha reportado en plantas silvestres de *Arabidopsis*, en las que el incremento en la concentración de fosfato, hasta alcanzar 10 mM, disminuye la toxicidad causada por el arseniato, valorada como la emergencia de los cotiledones en la germinación en 80% (Lee *et al.*, 2003).

Se han reportado interacciones de arseniato, sulfato y fosfato en la mitocondria de levadura debido a uniones indiscriminadas (Cortés *et al.*, 2000). La relación fisiológica del fosfato y el sulfato con el dicromato, así como del fosfato con el arseniato, tienen como particularidad la similitud de la geometría de los aniones y de las cargas, lo que permite sugerir que existe un sitio de unión común de estos aniones con otras moléculas, que podría darse a nivel de los transportadores que participan en la toma de nutrientes.

Se ha demostrado que el transporte de Cr (VI) en bacterias ocurre por un sistema de transporte de sulfato (Hryniewicz *et al.*, 1990) y en levaduras se ha sugerido que éste ocurre por un transportador de aniones no específico, el cual transporta sulfato y fosfato (Borst-

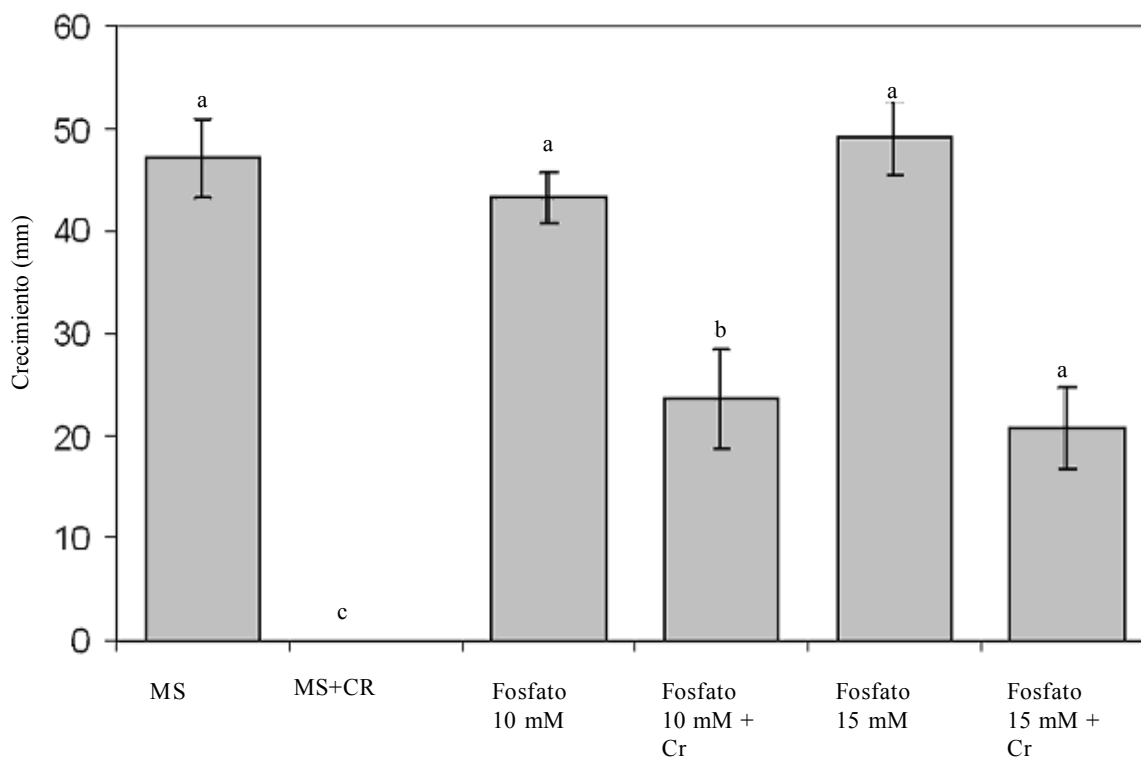


Figura 1. Efecto del fosfato en la restauración del crecimiento de la raíz primaria inhibido por dicromato. Se crecieron plantas de *Arabidopsis CycB1;1::uidA* en medio Murashige y Skoog (MS 0.5X) y a los 6 días después de la germinación se transfirieron a medios MS 0.5X suplementados con 10 mM o 15 mM de fosfato de potasio (Na_2HPO_4), con y sin 200 μM de dicromato de potasio. Las plantas permanecieron por 6 días adicionales y se midió el crecimiento de la raíz primaria. Los valores representan el promedio de 10 plantas, con el intervalo de confianza para $\alpha = 0.05$. Las letras representan las diferencias significativas calculadas con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

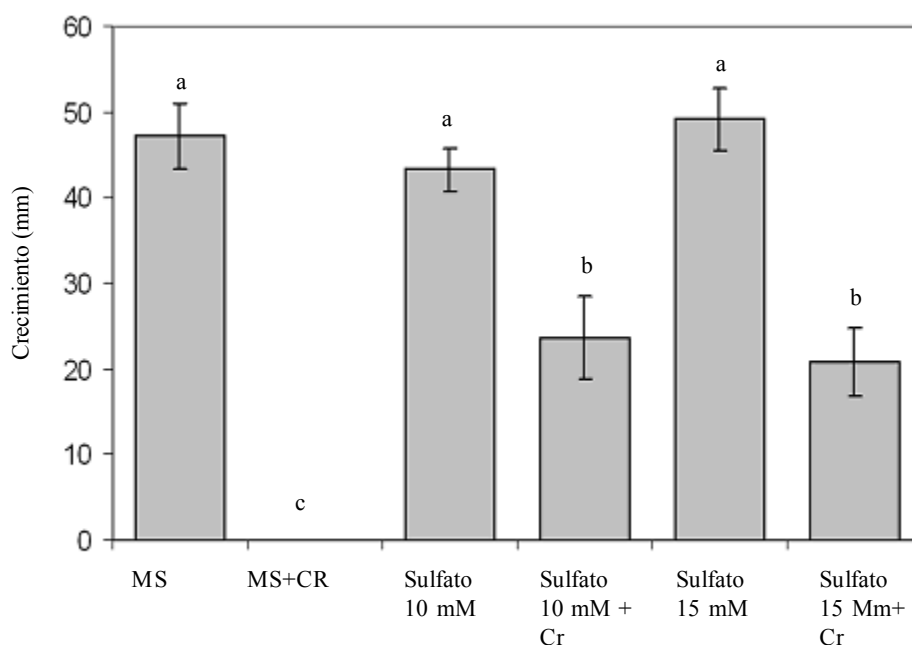


Figura 2. Efecto del sulfato en la restauración del crecimiento de la raíz primaria inhibido por dicromato de potasio. Se crecieron plantas de *Arabidopsis CycB1;1::uidA* en medio Murashige y Skoog (MS 0.5X) y los 6 días después de la germinación se transfirieron a medios MS 0.5X suplementados con 10 mM o 15 mM de sulfato de potasio (K_2SO_4), con y sin 200 μM de dicromato de potasio. Las plantas permanecieron por 6 días adicionales y se midió el crecimiento de la raíz primaria. Los valores representan el promedio de 10 plantas y el intervalo de confianza para $\alpha = 0.05$. Las letras representan las diferencias significativas calculadas con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

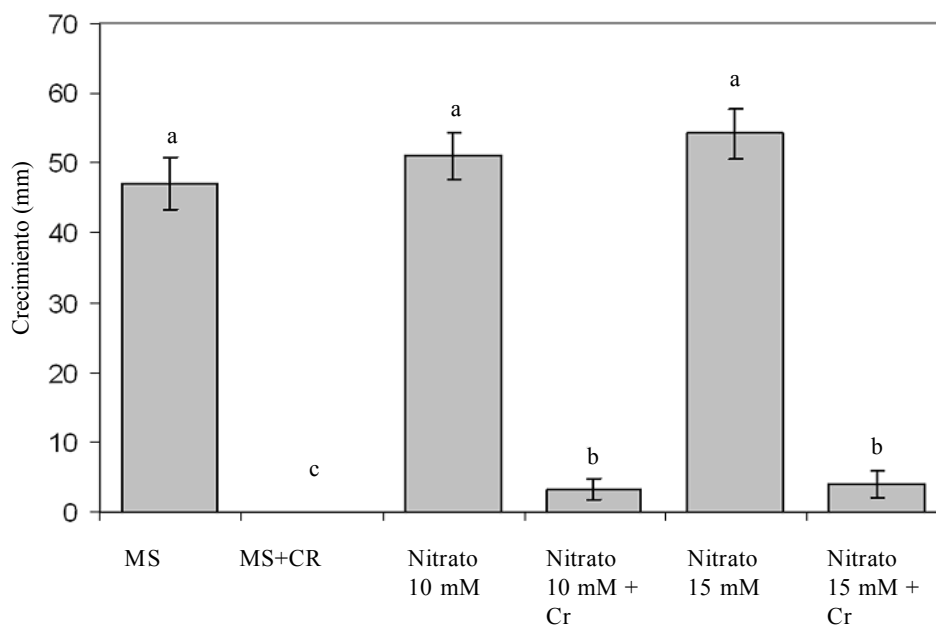


Figura 3. Efecto del nitrato en la restauración del crecimiento de la raíz primaria inhibido por dicromato. Se crecieron plantas de *Arabidopsis CycB1;1::uidA* en medio Murashige y Skoog (MS 0.5X) y a los 6 días después de la germinación se transfirieron a medios Murashige y Skoog (MS 0.5X) suplementados con 10 mM o 15 mM de nitrato de potasio (KNO_3), con y sin 200 μM de dicromato de potasio. Las plantas permanecieron por un periodo adicional de 6 días y se midió el crecimiento de la raíz primaria. Los valores representan el promedio de 10 plantas y el intervalo de confianza para $\alpha = 0.05$. Las letras representan las diferencias significativas calculadas con la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

Pauwels, 1981). Mediante el uso de medios de cultivo con diferentes fuentes de azufre, se demostró que el sistema de transporte de sulfatos es utilizado para incorporar cromato en *Candida* sp., y en cierto grado en *Saccharomyces cerevisiae* (Pepi y Baldi, 1992). En plantas se tiene poco conocimiento sobre la forma en que el Cr (VI) entra a la raíz; se ha sugerido que dicho proceso se realiza mediante un sistema de incorporación de sulfato (Shewry y Peterson, 1974). En un estudio cinético realizado con frondas vegetativas de *Spirodela polyrhiza* se encontró que el sulfato y cromato tienen un comportamiento que sugiere que estos compuestos compiten por los transportadores de sulfato disponibles (Kaszycki *et al.*, 2005). Se ha observado que la presencia de Cr (VI) puede disminuir la incorporación de Ca, K, Mg, P y Cu en plantas de soya y de *Salsola kali*, sin embargo, en estos trabajos no se puede diferenciar el efecto específico en la interferencia del Cr (VI) en la incorporación de nutrientes del efecto tóxico causado por éste (Turner y Rust 1971; Gardea-Torresdey *et al.*, 2005). Los resultados permiten deducir que el fosfato y el sulfato disminuyen el efecto tóxico causado por el dicromato al restaurar el crecimiento de la raíz primaria; además sugieren que la entrada de Cr (VI) a la raíz ocurre por transportadores de sulfato que aportan información que sugiere que la incorporación puede ocurrir también mediante transportadores de fosfato.

Se realizaron análisis histoquímicos de las raíces de las plantas de la línea *CycB1;1::uidA* mediante microscopía para determinar si la restauración del crecimiento de la raíz primaria causado por los suplementos de fosfato y sulfato fue acompañada por el reestablecimiento de la actividad mitótica. En la Figura 4 se presentan resultados representativos de estos experimentos para el tratamiento de nutrientes en concentración de 10 mM. Las raíces en los medios con dicromato de potasio 200 μ M y con suplementos de fosfato y sulfato presentaron una actividad mitótica similar a las raíces que estuvieron en los medios sin dicromato de potasio. Las plantas que crecieron en medios suplementados con nitrato de potasio no mostraron actividad mitótica y además el ápice de la raíz se diferenció haciéndose más ancho y con células más grandes (Figura 4). Estos resultados sugieren que hay una correlación entre la restauración del crecimiento de la raíz primaria por los nutrientes y el reestablecimiento de la actividad mitótica en el meristemo.

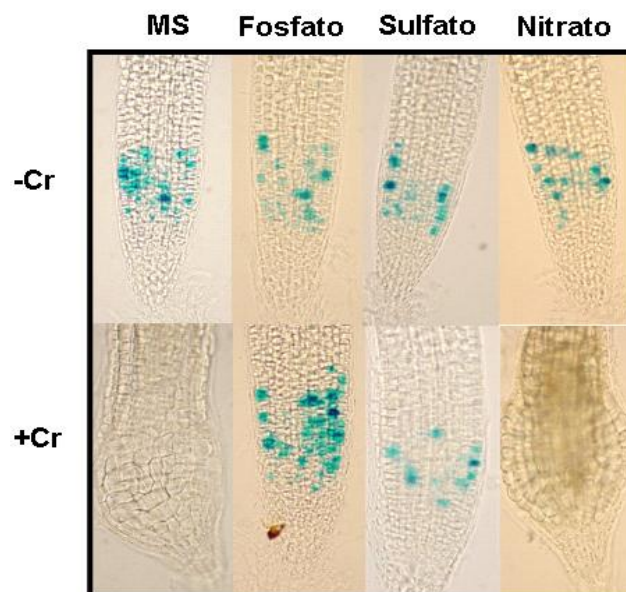


Figura 4. Actividad mitótica del meristemo de la raíz primaria de *A. thaliana CycB1;1::uidA* en medios suplementados con nutrientes. Se crecieron plantas de *Arabidopsis CycB1;1::uidA* durante seis días en medio MS 0.5X y se transfirieron a medios Murashige y Skoog (MS 0.5X) suplementados con 10 mM de fosfato de potasio (Na_2HPO_4), sulfato de potasio (K_2SO_4) y nitrato de potasio (KNO_3), con y sin dicromato de potasio 200 μ M. Las plantas se desarrollaron por seis días más, se procesaron para análisis histoquímico de actividad de β -glucuronidasa, se clarificaron y los montajes semipermanentes y se analizaron al microscopio. Las fotografías fueron tomadas en un aumento de 400X en un microscopio Zeiss Axiostar Plus. Las áreas azules representan las células con actividad mitótica.

CONCLUSIONES

- En *Arabidopsis thaliana*, una concentración de 200 μ M de dicromato de potasio inhibe el crecimiento de la raíz primaria.
- La adición de 10 y 15 mM de fosfato y sulfato al medio de crecimiento de las plantas que contiene dicromato 200 μ M, permitió reestablecer el crecimiento de la raíz primaria. Estos resultados complementan los trabajos previos que sugieren que la entrada del dicromato a la raíz se realiza mediante los transportadores de sulfato y aportan información novedosa que sugiere como otra vía de entrada a los transportadores de fosfato.
- La restauración del crecimiento de la raíz primaria (inhibido por dicromato) por el fosfato y el sulfatos, se relacionan con una actividad mitótica normal en los meristemos de la raíz de las plantas transgénicas de la línea *CycB1;1::uidA*, lo cual prueba que uno de los efectos

del cromo en la inhibición del crecimiento es la alteración del proceso de división celular.

LITERATURA CITADA

- Borst-Pauwels, G. W. F. H. 1981. Ion transport in yeast. *Biochem. Biophys. Acta* 650: 88-127.
- Cervantes, C., J. Campos-García, S. Devars, F. Corona-Gutiérrez, H. Loza-Tavera, J. C. Torres-Guzmán, and R. Moreno-Sánchez. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *Microbiol. Rev.* 25: 335-347.
- Colón-Carmona, A., R. Yuo, T. Haimovitch-Gal, and P. Doerner. 1999. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.* 20: 503-508.
- Cortés, P., V. Castrejón, J. B. Sampedro, and S. Uribe. 2000. Interactions of arsenate, sulfate and phosphate with yeast mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1456: 67-76.
- Crawford, N. M. and B. G. Forde. 2002. Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In: C. R. Somerville, E. M. Meyerowitz, (eds.). *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists. Rockville, MD, USA.
- Dolan, L., K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poethig, K. Roberts, and B. Scheres. 1993. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-84.
- Gardea-Torresdey, J. L., G. de La Rosa, J. R. Peralta-Videa, M. Montes, G. Cruz-Jiménez, and I. Cano-Aguilera. 2005. Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Arch. Environ. Cont. Tox.* 48: 225-232.
- Hryniewicz, M., A. Sirko, A. Palucha, A. Böck, and D. Hulanicka. 1990. Sulfate and thiosulfate transport in *Escherichia coli* K-12: identification of a gene encoding a novel protein involved in thiosulfate binding. *J. Bacteriol.* 172: 3358-3366.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan. 1987. GUS fusion: α -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907.
- Kaszycki, P., H. Gabryś, K. J. Appenroth, A. Jaglarz, S. Sedziwy, T. Walczak, and H. Koloczek. 2005. Exogenously applied sulphate as a tool to investigate transport and reduction of chromate in the duckweed *Spirodela polyrhiza*. *Plant Cell Environ.* 28: 260-268.
- Lee, D. A., A. Chen, and J. I. Schroeder. 2003. *ars1*, an *Arabidopsis* mutant exhibiting increased tolerance to arsenate and increased phosphate uptake. *Plant J.* 35: 637-646.
- Leustek, T. 2002. Sulfate metabolism. In: C. R. Somerville, E. M. Meyerowitz, (eds.), *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists. Rockville, MD, USA.
- Marzluf, G. A. 1970. Genetic and metabolic controls of sulfate metabolism in *Neurospora crassa*: isolation and study of chromate-resistant and sulfate transport-negative mutants. *J. Bacteriol.* 102: 716-721.
- Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Ortiz-Castro, R., M. Martínez-Trujillo, J. López-Bucio y C. Cervantes. 2006. Modificaciones en el desarrollo de la raíz inducidas por cromo en plantas de *Arabidopsis thaliana*. *Ciencia Nicolaita* 44: 107-120.
- Pepi, M. and F. Baldi. 1992. Modulation of chromium (VI) toxicity by organic and inorganic sulfur species in yeasts from industrial wastes. *BioMetals* 5: 179-185.
- Poirier, Y. and M. Bucher. 2002. Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. In: C. R. Somerville and E. M. Meyerowitz, (eds.). *The Arabidopsis book*. American Society of Plant Biologists. Rockville, MD, USA.
- Vargas-Palomino, L., M. Martínez-Trujillo, R. Ortiz-Castro y J. López-Bucio. 2007. Efecto de metales pesados sobre el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* L. *Ciencia Nicolaita* 49: 101-112.
- Shanker, A. K., C. Cervantes, H. Loza-Tavera, and S. Avudainayagam. 2005. Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.* 31: 739-753.
- Shewry, P. R. and J. P. Peterson. 1974. The uptake of chromium by barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.) *J. Exp. Bot.* 25: 785-797.
- Skeffington, R. A., Shewry, P. R., and P. J. Peterson. 1976. Chromium uptake and transport in barley seedlings (*Hordeum vulgare* L.). *Planta* 132: 209-214.
- Turner, M. A. and R. H. Rust. 1971. Effects of chromium on growth and mineral nutrition of soybeans. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 20: 93-98.