



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Biología

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Área temática: Fisiología y Genética Vegetal

Efecto de mutaciones en la vía de señalización
auxínica y auxinas exógenas sobre la expresión de
los genes que codifican enzimas SACAROSA
FOSFATO SINTASA en *Arabidopsis thaliana* L.

Tesis que presenta

BIÓL. AMANDA ORTIZ CALDERON

Que para obtener el título profesional de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Directores de Tesis:

Dr. Miguel Martínez Trujillo

Dr. Aarón Giovanni Munguía Rodríguez

Morelia, Mich., Abril de 2022

 **FACULTAD
DE
BIOLOGIA**
U.M.S.N.H



El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de **Genética y Microbiología** de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del **Dr. Miguel Martínez Trujillo** y el **Dr. Aarón Giovanni Munguía Rodríguez**, contando con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y la coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

AGRADECIMIENTOS

Estos han sido dos años llenos de retos, sueños y metas por cumplir, acompañados de una gran pandemia, ahora entiendo que es un buen momento para reflexionar y agradecer a todos los que en momentos de crisis te brindan su apoyo.

A mi familia, en especial a mis padres, agradezco que sean mi pilar, que me han convertido en una persona de bien y me han guiado con sus enseñanzas en este camino llamado vida. Gracias por alentarme a convertirme en una mejor persona e ir más allá de mis límites. Sinceramente son los mejores padres que alguien puede tener.

A mi pareja, Diego Andrés, agradezco toda la amabilidad, determinación y amor que se debe tener para apoyar a alguien que decide emprender un camino hacia la ciencia. Tu apoyo a lo largo de todo este tiempo ha sido invaluable, gracias por no dejarme caer.

A mi asesor, el Dr. Miguel Martínez Trujillo, agradezco la confianza, disposición, amabilidad y conocimiento que me ha brindado desde aquel momento en el que comencé mi servicio social en este bello laboratorio.

A mi co-asesor, el Dr. Aarón Giovanni Munguía Rodríguez, agradezco infinitamente todos los días que me privilegió con su conocimiento, su apoyo, amabilidad y comprensión; siento que me faltó tiempo para aprender de usted.

A mi comité sinodal, la Dra. Yazmín Carreón Abud, la Dra. Patricia Ríos Chávez y el Dr. Randy Ortiz Castro, agradezco que me han permitido aprender de ustedes a lo largo de cada tutorial, donde me han guiado con cada valioso comentario y experiencia propia.

A mis queridos compañeros de laboratorio, Dra. Ángeles y M.C. Sandy, se quedarán en mi corazón todos aquellos momentos en los que compartimos alegrías y tristezas y nos apoyamos en el laboratorio. Gracias a ustedes aprendí mucho y puedo decir que no hay mejor ambiente para trabajar.

Gracias a la UMSNH y al CONACyT por la gran oportunidad brindada.

ÍNDICE GENERAL

Tabla de contenido

ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. Arabidopsis thaliana como modelo experimental	2
2.2. Estructura y desarrollo de la raíz de A. thaliana	3
2.3. Estructura y desarrollo de la flor de A. thaliana	5
2.4. Estructura y desarrollo del fruto de Arabidopsis	6
2.5. La sacarosa	8
2.5.1. La síntesis de sacarosa en plantas.....	8
2.5.2. Enzimas involucradas en la síntesis de sacarosa	10
2.5.3. Familia de genes que codifican enzimas que sintetizan sacarosa	10
2.5.4. Genes <i>SPS</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
2.6. Las auxinas y otros reguladores del crecimiento vegetal	14
2.6.1. Funciones de las auxinas y su transporte	15
2.6.2. La percepción y la señalización por auxinas	17
2.6.3. Líneas mutantes afectadas en la vía de señalización de las auxinas	19
2.7. Relación carbohidrato-auxina	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	22
5.1. Objetivo General	22
5.2. Objetivos particulares	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS	23
6.1. Material biológico	23
6.1.1. Mutantes en la vía de señalización de auxinas	23
6.1.2. Líneas reporteras de la síntesis de sacarosa	23

6.2. Métodos.....	23
6.2.1. Desinfección de semillas	23
6.2.2. Condiciones generales del crecimiento de las plantas.....	24
6.2.3. Generación de plantas mutantes en la ruta de señalización de auxina con expresión de las construcciones genéticas <i>AtSPS1F::uidA</i> , <i>AtSPS2F::uidA</i> , <i>AtSPS3F::uidA</i> y <i>AtSPS4F::uidA</i>	24
6.2.4. Tinción histoquímica de GUS.....	25
6.2.5. Análisis de los estadios de desarrollo en los primordios de la raíz para las cuatro líneas reporteras <i>SPS</i> presentes en <i>A. thaliana</i> y la línea <i>DR5::uidA</i>	26
6.2.6. Suplementación de auxinas de forma exógena	26
6.2.7. Fotografía	26
7. RESULTADOS	27
7.1. Expresión de los genes reporteros <i>SPS</i> en el fondo genético de líneas mutantes afectadas en la vía de señalización de las auxinas.	27
7.2. Efecto de las auxinas en la expresión de los genes <i>SPS</i> de <i>A. thaliana</i>	35
7.3. Efecto de auxinas exógenas en el crecimiento y desarrollo de la línea <i>35S::YUCCA4</i>	40
8. DISCUSIÓN	42
8.1. Existen diferencias en el patrón de expresión de los genes <i>SPS</i> de <i>A. thaliana</i> bajo los diferentes fondos mutantes de la vía de señalización auxínica.	42
8.2. El crecimiento de las plantas en diferentes concentraciones de auxinas exógenas sensibiliza a las líneas reporteras <i>SPS</i> y la mutante <i>35S::YUCCA4</i> de <i>A. thaliana</i> , lo que posteriormente origina una mayor emergencia de raíces laterales.	46
9. CONCLUSIONES.....	49
REFERENCIAS.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema completo y estructuras que conforman el organismo modelo de <i>A. thaliana</i>	2
Figura 2. Estructura de la raíz de <i>A. thaliana</i>	4
Figura 3. Etapas de desarrollo para la formación de los primordios de las raíces laterales en <i>A. thaliana</i>	5
Figura 4. Estructuras florales en <i>A. thaliana</i>	6
Figura 5. Partes del fruto de <i>A. thaliana</i>	7
Figura 6. Estructura química de la sacarosa.....	8
Figura 7. Síntesis de sacarosa.....	9
Figura 8. Árbol filogenético de la familia de genes <i>SPS</i>	11
Figura 9. Expresión de los genes <i>SPS</i> de <i>A. thaliana</i>	13
Figura 10. Principales reguladores del crecimiento vegetal.....	14
Figura 11. Transporte de auxinas.....	16
Figura 12. Distribución de los transportadores <i>PIN</i> y auxina en la raíz.....	17
Figura 13. Señalización de auxinas.....	18
Figura 14. Líneas mutantes de auxinas y sus efectos en el desarrollo y crecimiento de plantas de <i>A. thaliana</i>	19
Figura 15. Desinfección de semilla y crecimiento de las plántulas.....	24
Figura 16. Generación de las cruzas.....	25
Figura 17. Efecto de las mutaciones en la vía de señalización auxínica en cruza con la línea reportera <i>SPS1F::uidA</i> en <i>A. thaliana</i> para diferentes partes de la planta.....	28
Figura 18. Efecto de las mutaciones en la vía de señalización auxínica en cruza con la línea reportera <i>SPS2F::uidA</i> presente en <i>A. thaliana</i> para cinco diferentes partes de la planta analizadas.....	30
Figura 19. Efecto de las mutaciones en la vía de señalización auxínica en cruza con la línea reportera <i>SPS3F::uidA</i> de <i>A. thaliana</i> , para diferentes partes de la planta.....	32
Figura 20. Efecto de las mutaciones en la vía de señalización auxínica en cruza con la línea reportera <i>SPS4F::uidA</i> presente en <i>A. thaliana</i> , para diferentes partes de la planta.....	34
Figura 21. Crecimiento representativo de las líneas reporteras <i>SPS</i> presentes en <i>A. thaliana</i> al suplementar de manera exógena IAA.....	35
Figura 22. Expresión de los los cuatro genes <i>SPS</i> presentes en <i>A. thaliana</i> cuando se suplementó IAA.	36
Figura 23. Representativa de crecimiento para los genes <i>SPS</i> de <i>A. thaliana</i> al suplementar NAA.....	37
Figura 24. Efecto del NAA en la expresión de los genes <i>SPS</i> en <i>A. thaliana</i>	38

Figura 25. Efecto del IAA en el crecimiento y desarrollo de plantas de <i>A. thaliana</i> 35S::YUCCA4.....	40
Figura 26. Efecto de NAA sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de 35S::YUCCA4	41
Figura 27. Tendencia del cambio en el patrón de expresión de los genes <i>SPS</i> en cruza con las mutantes de señalización de auxinas.....	44
Figura 28. Representación del comportamiento fenotípico las líneas reporteras <i>SPS</i> al añadir IAA/NAA.....	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Antecedentes del patrón de expresión de los cuatro genes <i>SPS</i> de <i>A. thaliana</i>	13
---	----

RESUMEN

Los azúcares y las fitohormonas son moléculas involucradas en todos los procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas. Se sabe que los azúcares son capaces de modular la expresión de diversos genes relacionados con la síntesis de auxinas. Sin embargo, poco se sabe sobre cómo las auxinas influyen sobre la síntesis de azúcares. Es por ello que evaluamos el efecto que pueden llegar a tener las auxinas sobre la expresión de los genes que codifican las enzimas SACAROSA FOSFATO SINTASA (SPS) de *Arabidopsis thaliana* involucrados en la biosíntesis de sacarosa, la cual es el principal producto de la fotosíntesis en plantas.

Para lo anterior, se utilizaron líneas mutantes afectadas en la vía de señalización de auxinas, así como una línea sobre productora de esta hormona, las cuales fueron cruzadas con las cuatro líneas reporteras de los genes *SPS*. Posteriormente, se realizaron tinciones histoquímicas para evaluar la expresión de los genes reporteros en diferentes partes de la planta. De igual manera, se analizó el cambio en el patrón de expresión de las líneas *SPS* suplementando dos auxinas de forma exógena (NAA y IAA). Además, se evaluaron los estadios de crecimiento y desarrollo de los primordios de raíces laterales de las líneas reporteras, teniendo como referencia la línea reportera de auxinas *DR5:uidA*.

Los resultados obtenidos sugieren que, en general, los genes *SPS1* y *SPS3* en cruza con las cinco mutantes de señalización de auxinas, son aquellos que muestran un mayor cambio en su patrón de expresión para los diferentes tejidos analizados. Sin embargo, adicionalmente a ello, en *SPS1* se observó que cuando se presenta un incremento en la producción de auxinas su expresión disminuye. Al suplementar NAA se incrementó de manera homogénea la expresión de los genes *SPS1*, *SPS2* y *SPS4*; aunque disminuyó en hoja para *SPS3*. Así mismo, al suplementar IAA el incremento de expresión fue homogéneo para los cuatro genes. Lo anterior es importante porque permite indagar la función de las auxinas sobre la expresión de genes involucrados en la producción de carbohidratos en las plantas, como la sacarosa.

Palabras clave: Carbohidratos, Fitohormonas, Genes vegetales, IAA, NAA.

ABSTRACT

Sugars and phytohormones are molecules involved in all processes of plant growth and development. It is known that sugars are able of modulating the expression of several genes related to auxin synthesis, However, little is known about how auxins may be influencing sugar synthesis. Due to this situation, we decided to evaluate the effect that auxin can have on the expression of *SPS* genes present in *A. thaliana* which are also involved in sucrose biosynthesis, the main product of photosynthesis in plants.

Thus, mutant plants affected in the auxin signaling pathway were used, as well as a line that over produces this hormone. These lines were crossed with the four reporter lines of *SPS* genes. Subsequently, we carry out histochemical staining to evaluate the expression of the four reporter genes in different parts of the plant. In the same way, we analyzed if there was a modification in the expression pattern of the *SPS* genes by supplementing two exogenous auxins (NAA and IAA). Besides, we evaluated the reporter's lines root primordia growth and developmental stages, taking as reference the auxin reporter's line *DR5:uidA*.

Our results suggest that, in general, the genes *SPS1* and *SPS3* crossed with the five auxin signaling mutants were those that showed a greater modification in their expression pattern in the different tissues analyzed. However, it was observed that when the auxin production increased in *SPS1*, its expression decreased. On the other hand, when supplementing NAA, the expression of the genes *SPS1*, *SPS2* and *SPS4* increased homogeneously; but decreased in leaf for the gene *SPS3*. On the same way, when supplementing IAA, the four genes expression increased homogeneously. The previous results are important because they allow us to investigate the roll of auxins on the expression of genes involved in the production of carbohydrates in plants, such as sucrose.

1. INTRODUCCIÓN

La sacarosa es el principal azúcar de transporte en las plantas que contribuye a su crecimiento y desarrollo. Este carbohidrato se sintetiza en el citoplasma a partir de precursores triosa fosfato que provienen del cloroplasto. En la etapa final de la síntesis participan enzimas SACAROSA FOSFATO SINTASA (SPS), de las cuales hay cuatro tipos en *Arabidopsis thaliana* (Lutfiyya *et al.* 2007). En nuestro grupo de trabajo se ha determinado que la expresión conferida por los promotores de los genes que codifican estas enzimas es específica, aunque con traslapes en órganos y tejidos, lo que sugiere una regulación final del proceso de síntesis de sacarosa, promovida por la expresión de estos genes; dicha expresión ha sido documentada principalmente en hoja, pero de igual manera se ha encontrado expresión en raíz y flor (Solís-Guzmán *et al.* 2017). A partir de la sacarosa, la planta puede generar glucosa y fructosa, las cuales son transportadas y utilizadas en los tejidos consumidores de la planta; además de las funciones energéticas de estos azúcares, se ha encontrado su participación en varios procesos de señalización, entre ellos la floración (Ruan *et al.* 2014).

Por otro lado, las fitohormonas, entre ellas incluidas las auxinas, son reguladores del crecimiento vegetal junto a las citocininas, giberelinas, el ácido abscísico y el etileno, principalmente. Estos grupos se encargan de modular los diversos patrones y procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas. Las auxinas son sintetizadas en el follaje joven y el meristemo de la raíz de la planta y posteriormente transportadas a tejidos específicos (Ljung *et al.* 2009). Las hormonas vegetales tienen uno o más receptores que transmiten la señal a través de vías o redes de señalización hasta llegar a incidir en la expresión de genes en la mayoría de los casos.

La mutación de los genes puede producir proteínas inactivas o constitutivas que modifican las vías de señalización, y alteren finalmente un proceso del desarrollo, por lo que es de interés determinar el efecto de estos reguladores del crecimiento vegetal en la expresión de los genes *SPS*. Aunque hay estrategias que se basan en la aplicación exógena de estas hormonas, sus efectos no necesariamente son los que ocurren en la planta en condiciones normales, ya que la cantidad y distribución de estos compuestos están reguladas en los tejidos y órganos (Taiz y Zeiger 2006). Las auxinas, principalmente el ácido indol-3-acético (IAA), es el que participa en más procesos del crecimiento y desarrollo en plantas. En nuestro grupo contamos con varias mutantes de la vía de señalización de auxinas en *Arabidopsis thaliana*, que permitirán determinar su efecto en la expresión de los genes que codifican enzimas *SPS*.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo experimental

Arabidopsis thaliana es una planta del grupo de las angiospermas. Es una planta vascular, y debido a sus características, es considerada un organismo modelo para el estudio de distintos campos en la biología. Entre estas cualidades podemos destacar un tamaño pequeño, flores numerosas, un ciclo de vida corto, autopolinización, alta fecundación, y gran producción de semillas (hasta 10,000 por planta); además, es una de las plantas de las que se conoce por completo su genoma, ya que este ha sido secuenciado completamente; y se determinó que tiene 25,498 genes que codifican para proteínas de 11,000 familias (Meinke *et al.* 1998). Pertenece a la familia *Brassicaceae*, en las que están incluidas especies como la mostaza (género *Sinapis*), el rábano (*Raphanus sativus*) y la coliflor (*Brassica oleracea*). Es una planta silvestre que está adaptada a un rango geográfico muy grande, es anual y crece no más de 30 cm, y su ciclo de vida es de aproximadamente 6-8 semanas hasta la producción de la semilla madura (Meyerowitz y Somerville, 1994). Gracias a que es un organismo que ha sido muy estudiado se ha generado un gran número de líneas mutantes y transgénicas para investigación.



Figura 1. Esquema completo y estructuras que conforman el organismo modelo de *A. thaliana*. A) Planta en estado adulto. B) Corola C) Pétalos D) Sépalos E) Androceo F) Gineceo G) Silicua H, I) Interior de la Silicua J, K) Semilla. (Tomado de Pirola *et al.* 2018)

2.2. Estructura y desarrollo de la raíz de *A. thaliana*

La raíz es el órgano de la planta que se encuentra en el suelo, encargado de la absorción agua y nutrientes, brindar anclaje y explorar el medio. El sistema radicular de *A. thaliana* es de tipo pivotante y está conformado por la raíz primaria, un conjunto de raíces laterales y, en ocasiones, de raíces adventicias. Las raíces laterales son originadas en el periciclo y pueden variar en número y fenotipo dependiendo de las condiciones del medio. Además, se ha documentado que requieren de una respuesta a un gradiente de auxinas para su formación. En la raíz de *A. thaliana* las células madre son las encargadas de originar todos los tejidos del meristemo de la raíz (Di Mambro y Sabatini 2018).

La raíz de *A. thaliana* está compuesta por cuatro capas externas: la epidermis, la corteza, la endodermis y el periciclo, que se establecen en una estructura cilíndrica. En el interior de la raíz se encuentra el sistema vascular, que se compone a su vez por el xilema y floema; el primero es el encargado de distribuir compuestos inorgánicos y agua; y el segundo, de la distribución de compuestos orgánicos como los carbohidratos. En conjunto se menciona que ambos conforman la estele de la raíz (Du y Scheres 2018)

De manera longitudinal, la raíz se puede dividir en tres partes: la zona meristemática, donde las células madre se encuentran ubicadas en la punta conformando un nicho y se encargan de generar células hijas; y las cuales, posteriormente, pasan a la zona de división y elongación celular, donde son sometidas a un conjunto de divisiones celulares y, por último, pasan a la zona de diferenciación celular, ante la cual pierden la capacidad de división para finalmente alcanzar la madurez y su función (Figura 2). El trabajo conjunto de estas 3 zonas determina el tamaño del meristemo de la raíz. La zona meristemática es además la encargada de formar la cofia (Di Mambro *et al.* 2018).

La raíz de *A. thaliana* ha sido ampliamente utilizada para diferentes estudios en los campos de la Biología, debido a que es una raíz simple que además permite una fácil observación de los resultados obtenidos en observación macroscópica y microscópica.

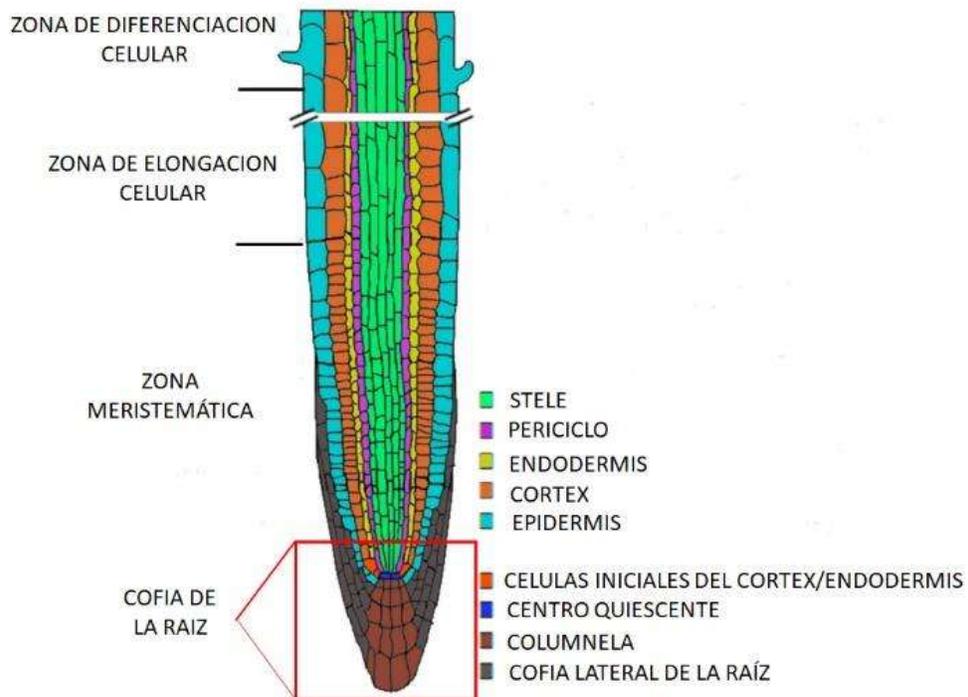


Figura 2. Estructura de la raíz de *A. thaliana*. Se muestran las 3 zonas que conforman longitudinalmente a la raíz: zona meristemática, la cual a su vez incluye la cofia; la zona de elongación celular y la zona de diferenciación celular. De igual manera se muestran las capas que conforman al sistema radicular del exterior al interior: epidermis, corteza, endodermis, periciclo y estele. (Tomado y modificado de De Smet *et al.* 2015).

Las raíces laterales son importantes porque le permiten a la planta un mayor reconocimiento y exploración del medio. Como se mencionó anteriormente, las raíces laterales, conocidas por sus siglas en inglés como LR, son originadas a través de las células del periciclo mediante una serie de divisiones celulares coordinada, la cual terminará por formar los primordios. Los primordios continúan su crecimiento a lo largo de las demás capas de la raíz primaria, hasta originar el establecimiento de un nuevo meristemo apical, que a su vez regula el crecimiento y desarrollo de las raíces laterales (Raya-González *et al.* 2012)

Acorde a lo reportado por Malamy y Benfey (1997), existen 7 etapas para el desarrollo de los primordios de la raíz (Figura 3). Etapa I: el primordio está conformado por 8 a 10 células pequeñas del periciclo orientadas longitudinalmente. Etapa II: se encuentra conformado por dos capas que surgen de una división periclinal. Etapa III: la capa externa del primordio se divide nuevamente, originando así que el primordio se conforme de 3 capas. Etapa IV: cuando el primordio se conforma ahora de 4 capas de células orientada longitudinalmente. Etapa V: cuando el primordio se encuentra a la mitad de la corteza de la raíz primaria. Etapa 6:

cuando el primordio ha crecido hasta la epidermis de la raíz primaria. Etapa VII: cuando el primordio se encuentra a punto de emerger de la raíz primaria (Malamy y Benfey 1997).

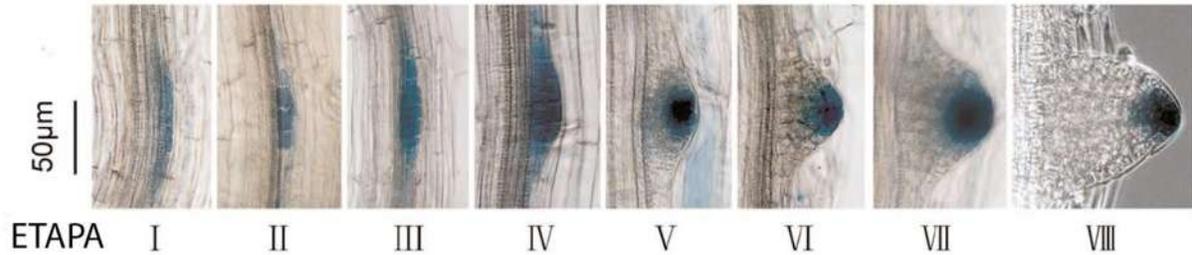


Figura 3. Etapas de desarrollo para la formación de los primordios de las raíces laterales en *A. thaliana*. Acorde a lo descrito por Malamy y Benfey (1997), han sido descritas 7 etapas para la formación de primordios de la raíz en *A. thaliana*. (Tomado y modificado de Yao *et al.* 2013).

2.3. Estructura y desarrollo de la flor de *A. thaliana*

Las flores suelen presentar diversos patrones, colores, texturas, formas y tamaños. Sin embargo, toda flor presenta como base órganos estériles rodeando a los órganos reproductores. Gracias a la secuenciación completa del genoma de *A. thaliana*, se ha permitido indagar sobre aspectos relevantes del crecimiento y desarrollo de las flores: se han desvelado rutas genéticas y bioquímicas, conocidas frecuentemente como “vías de floración” y en las cuales se incluyen aspectos como el fotoperiodo y algunos de los genes y cascadas de señalización que se ven implicados de forma directa e indirecta, y que desencadenan los diversos tiempos de floración o patrones de crecimiento (Irish 2010).

El desarrollo del meristemo floral comienza cuando las células del meristemo apical del brote llevan a cabo diversos procesos de diferenciación, entre los que se producen yemas axilares y hojas. Dependiendo de las señales ambientales que la planta perciba, el meristemo apical se convertirá en una inflorescencia. En *A. thaliana*, dicho meristemo produce a su vez meristemas secundarios conocidos como meristemas florales que dan origen a más inflorescencias a lo largo de la etapa madura de la planta. Además, para la formación de la flor es importante la señalización de las auxinas mediada por transportadores PIN, ya que generan señales posicionales para el establecimiento del gineceo, lo que al final conlleva a la diferenciación de los estambres y carpelos (Amasino 2010; Dong y Østergaard 2019).

En la flor de *A. thaliana* surgen 4 verticilos (Figura 4). El primero de ellos está compuesto por 4 sépalos; el segundo se compone por 4 pétalos que se sitúan alternamente con los sépalos. El tercero se compone de 6 estambres; y el último se conforma con el gineceo, compuesto a su vez, de dos carpelos fusionados. Lo anterior ocurre en al menos 13 estadios desde la formación del meristemo apical del brote (Irish 2010).

Diversos genes se ven involucrados en el proceso de formación y senescencia de estructuras florales en *A. thaliana*. Por ejemplo, el desarrollo de una hoja a una inflorescencia necesita que ciertas combinaciones de genes de identidad floral se expresen de manera ectópica, como es el caso del factor de transcripción *WUSCHEL* (*WUS*), el cual es un activador floral que, a su vez, puede ser reprimido de forma indirecta por el factor de transcripción *PERIANTHIA* (*PAN*) que induce la expresión de genes que reprimen directamente a *WUS*. Aunado a lo anterior, se ha documentado que gracias líneas sobre productoras de auxina los estambres pueden cubrir el alto requerimiento que necesitan de auxina para su desarrollo (Dong *et al.* 2019).

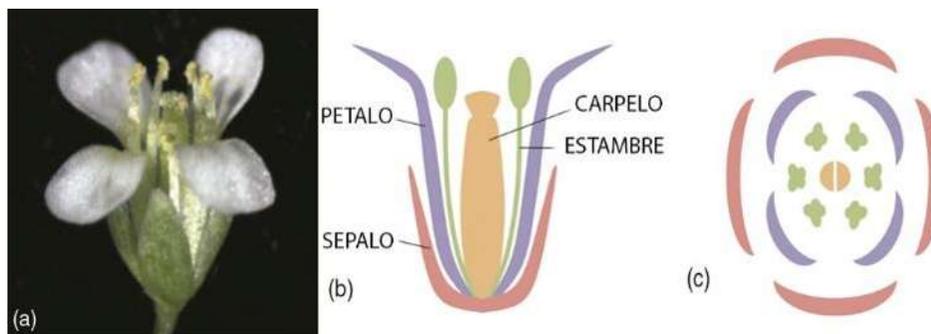


Figura 4. Estructuras florales en *A. thaliana*. a) flor madura b) Verticilos florales de *A. thaliana* c) Diagrama floral vista superior de los verticilos. (Tomado y modificado de Irish *et al.* 2010).

2.4. Estructura y desarrollo del fruto de Arabidopsis

El fruto es un derivado del gineceo (parte femenina de la planta), proveniente de la fertilización del óvulo con el polen. El óvulo es el encargado de formar la semilla y el ovario de formar el fruto, que es la estructura encargada de proteger las semillas en desarrollo, proporcionarles nutrientes y contribuir a su dispersión. Existe una gran variedad de frutos en las angiospermas; de manera específica, *A. thaliana* presenta silicuas, las cuales son de tipo seco dehiscente (Figura 5). Dichas silicuas están conformadas por dos valvas que se fusionan con un septum central mediante un margen valvular que se conforma de un tejido específico. Estos tejidos, y por ende

el fruto, requieren hormonas como las giberelinas y auxinas para continuar con su desarrollo (Gómez *et al.* 2014).

El proceso de desarrollo de la silicua se puede dividir en dos fases: la primera incluye desde el momento de la fertilización hasta un establecimiento del tamaño y dimensiones de la silicua; y el segundo, implica la fase de maduración y senescencia que termina con la dehiscencia de las valvas y la dispersión de semillas (Mizzotti *et al.* 2018)

Diversos genes y factores de transcripción se han visto involucrados para la formación y senescencia del fruto en *A. thaliana*. Por ejemplo, se ha mencionado que la diferenciación de la valva es necesaria para la dehiscencia de las semillas de la vaina. Cuando los frutos maduran, la expresión de genes como *SHATTERPROOF1 (SHP1)* y *SHP2* está limitada al margen de la valva; estos genes activan los factores de transcripción *bHLH*, *ALCATRAZ (ALC)* e *INDEHISCENT (IND)*. Poco antes de la dispersión de semillas, *IND* activa al transportador de auxinas *PIN3* que lleva auxina al margen de la valva. Dicha auxina es requerida para la dehiscencia del fruto (Dong *et al.* 2019).

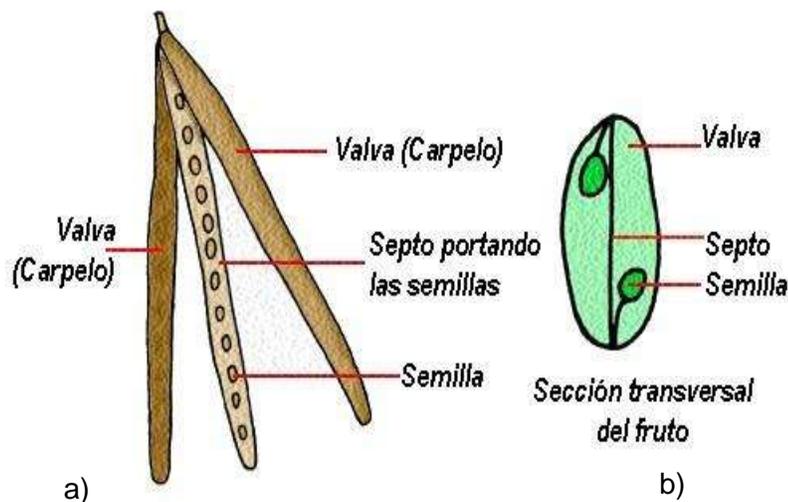


Figura 5. Partes del fruto de *A. thaliana*. a) Partes de la silicua madura donde las valvas son las dos cubiertas exteriores; el septo o septum, el tabique que contiene a las semillas; y las semillas quienes serán la siguiente generación. b) Corte transversal del fruto donde se observa la disposición espacial del septo y las semillas. (Tomado de García-Breijo *et al.* 2003).

2.5. La sacarosa

La sacarosa (Figura 6) es el principal producto de la fotosíntesis y de transporte de nutrientes en la mayoría de las plantas y es exportada de las hojas a todos los tejidos heterótrofos (Curatti *et al.* 1998). Se le ha atribuido un papel en almacenamiento de energía, ya que gracias a ella las plantas pueden obtener otros monosacáridos más sencillos como la glucosa y fructosa. Lo que a su vez permite que, por medio del exceso de glucosa, cuando va más allá de las necesidades de la planta, se pueda almacenar como almidón en raíces y semillas (Khan Academy 2017).

Además de su función como almacén de energía, los azúcares tienen un papel como moléculas que generan cambios en la expresión de genes y modulan diversos procesos fisiológicos en las plantas; es por ello que se les ha atribuido un papel como moléculas de señalización (Rolland *et al.* 2006).

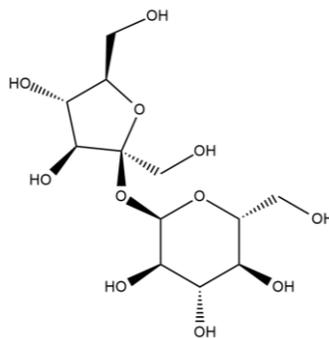


Figura 6 Estructura química de la sacarosa. Fórmula química $C_{12}H_{22}O_{11}$. Está formada por alfa-glucopiranososa y beta-fructofuranosa. El carbono 1 de la glucosa está unido al carbono 2 de la fructosa, por lo que el tipo de enlace presente es 1-2 glucosídico. Presenta grupos funcionales hidroxilos (-OH) y carbonilos.

2.5.1. La síntesis de sacarosa en plantas

La síntesis de sacarosa está confinada al citosol (Figura 7), debido a la estricta separación en compartimentos de las enzimas implicadas. La síntesis inicia a partir de triosas fosfato provenientes del cloroplasto, las cuales al combinarse forman hexosas, en una ruta altamente regulada, principalmente por inhibición alostérica de las enzimas por los productos de la reacción (Ruan *et al.* 2014).

La sacarosa se transporta a través del tejido del floema, al cual se descarga por proteínas transportadoras de membrana específicas; una vez que se encuentra dentro del tejido del floema, se moviliza junto con otros compuestos orgánicos por el flujo de masas. En los tejidos donde se utiliza, la enzima SPS rompe a la sacarosa

para producir UDP-glucosa (UDP-Glu) y fructosa, o es hidrolizada por una invertasa para producir glucosa y fructosa, permitiendo el uso de los monosacáridos para la producción de energía y la síntesis de celulosa, almidón, fructosano, proteínas y compuestos antioxidantes (Ruan *et al.* 2014).

La enzima SPS cataliza la penúltima reacción en la ruta biosintética de la sacarosa, a partir de UDP-Glu y de fructosa 6 fosfato (Fru-6-P) para obtener sacarosa-6-fosfato (Suc-6-P) (Lunn *et al.* 1990). Otra enzima que sintetiza sacarosa es la sacarosa sintasa, la cual se ve implicada en la degradación de sacarosa (Winter & Huber, 2000), mientras que en la reacción catalizada por la SPS y la remoción rápida del fosfato, hace que la reacción por sacarosa fosfato fosfatasa sea prácticamente irreversible (Huber & Huber, 1996).

Es importante recalcar que la sacarosa es de vital importancia para la planta porque a partir de ella se pueden obtener monosacáridos más sencillos de asimilar (Ruan *et al.* 2014).

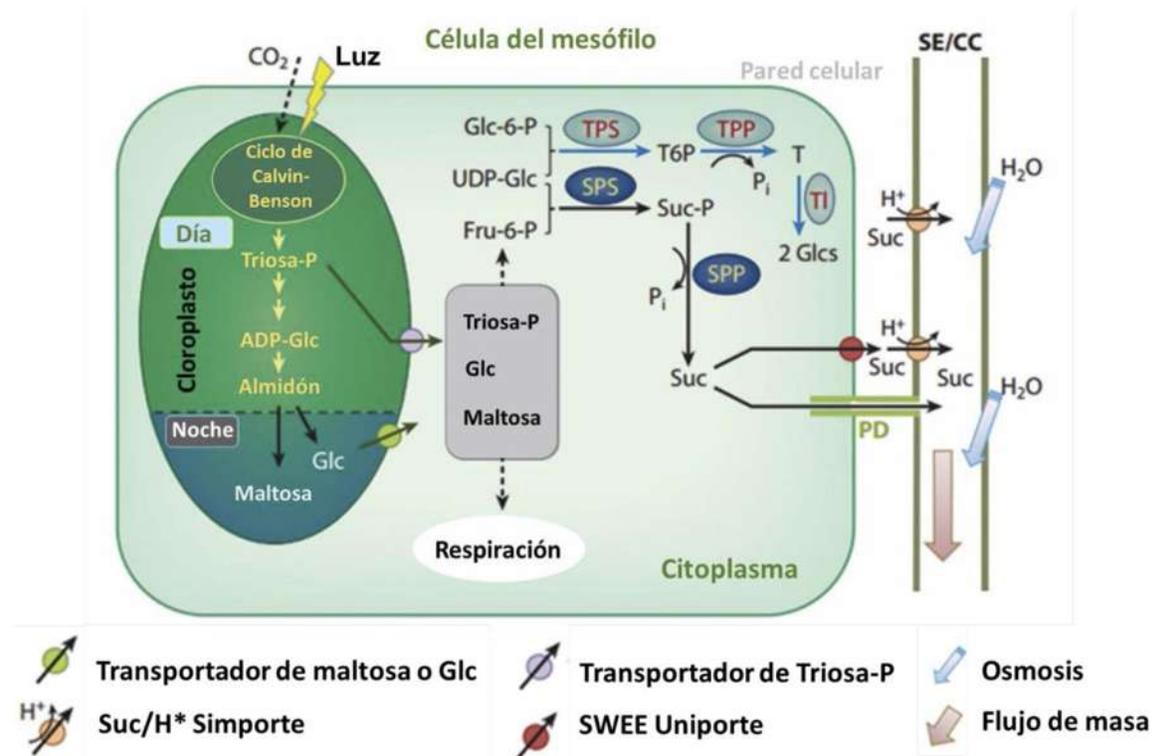


Figura 7. Síntesis de sacarosa. La síntesis de sacarosa comienza en las hojas de la planta, el cual es un órgano fotosintético. Durante el día, las hojas fijan el CO₂ para posteriormente producir triosas fosfatos dentro del cloroplasto; éstas son exportadas al citoplasma o pueden servir también para la síntesis de UDP-Glu, lo cual servirá por otra parte para la síntesis de almidón dentro del cloroplasto. Durante la noche, el almidón es degradado a glucosa o maltosa para su exportación al citoplasma. Mediante la HEXOQUINASA, la glucosa puede ser fosforilada para formar FRUCTOSA-6-FOSFATO por la GLUCOSA-6-FOSFATO ISOMERASA. La enzima SACAROSA FOSFATO SINTASA (SPS) utiliza FRUCTOSA-6-FOSFATO y UDP-Glu como medio para producir SACAROSA-FOSFATO (Suc-P), la cual se convierte en sacarosa mediante la FOSFATASA SACAROSA-FOSFATO (SPP). La sacarosa se carga en el floema (Modificada de Ruan 2014).

2.5.2. Enzimas involucradas en la síntesis de sacarosa

En el metabolismo de sacarosa se ven involucradas al menos 9 enzimas: fructoquinasa, hexoquinasa, invertasa, fosfoglucomutasa, fosfoglucosa isomerasa, SuSy (sacarosa sintasa), SPS, SPP (sacarosa fosfato fosfatasa) y UDPGP (UDP glucosapirofosforilasa). Sin embargo, se ha mostrado principal interés en las últimas cuatro, debido a que estas contribuyen más a la síntesis de sacarosa que a la degradación de la misma en comparación con las otras enzimas.

De estas cuatro enzimas, se ha recabado más información de SuSy, mientras que hay menos información para la caracterización e identificación de los genes que codifican a las enzimas SPS, SPP y UDPGP. Tanto SPP como SPS están codificadas, como se mencionó con anterioridad, por pequeñas familias de genes. En el caso de UDPGP, solo se ha demostrado que existen uno o dos genes en plantas. Las enzimas SuSy, SPS y SPP se han detectado en plantas y en bacterias, mientras que UDPGP se detecta en plantas y animales (Jiang, *et al.* 2015).

La enzima SPS es clave en la vía de biosíntesis de sacarosa, dado que cataliza uno de los pasos importantes en el proceso de síntesis de este azúcar en plantas. Se sabe que con la sobreexpresión de los genes de *SPS* en *Arabidopsis thaliana* se aumenta significativamente la síntesis de sacarosa en ciertos tejidos de la planta, lo que conduce a cambios en los fenotipos de la misma, como el aumento en biomasa, lo que promueve el crecimiento y el metabolismo del carbono (Volkert *et al.* 2014).

2.5.3. Familia de genes que codifican enzimas que sintetizan sacarosa

Los azúcares regulan la expresión de muchos genes en plantas a nivel transcripcional. En *A. thaliana*, los azúcares inducen o reprimen la expresión de más de 1,800 genes (Córdoba *et al.* 2015).

Existen 4 familias distintas de genes relacionados con el metabolismo de la sacarosa: *SuSy*, *SPS*, *SPP* y *UDPGP*, las cuales, a su vez, se encuentran subdivididas (Jiang *et al.* 2015). En el caso particular de los 4 genes *SPS* presentes en *A. thaliana*, estos pueden ser agrupados en 3 familias diferentes *SPSA1* y *SPSA2*, *SPSB* y *SPSC* (Figura 8). Sin embargo, aún no se tiene bien detallado la función de cada uno de éstos. Las familias *SPSA1* y la *SPSC* son las isoformas que mayormente están presentes en las hojas (Volkert *et al.* 2014).

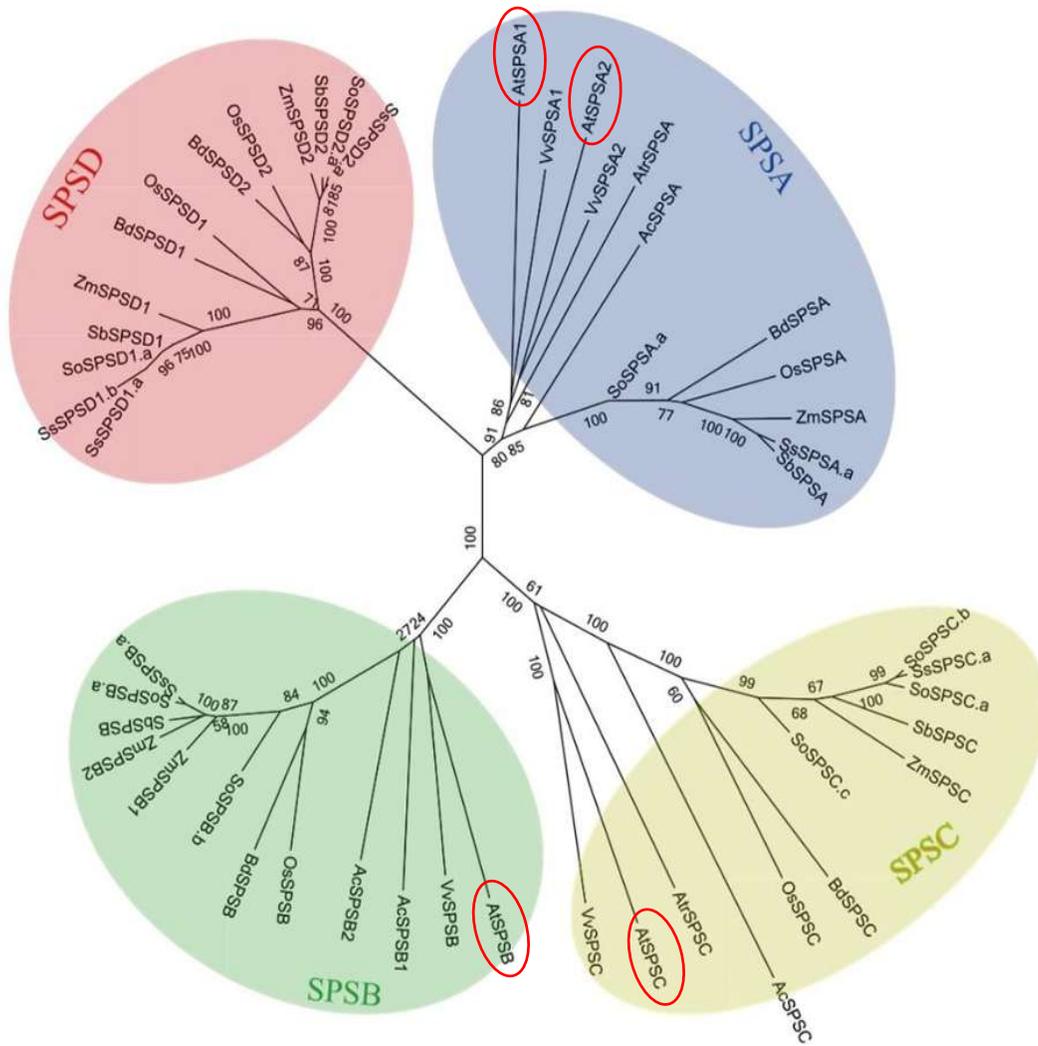


Figura 8. Árbol filogenético de la familia de genes SPS. Se muestra la distribución evolutiva de las 4 familias de genes SPS presentes en diversas especies vegetales. Acorde a lo circulado en rojo se pueden identificar las 3 familias de las que forman parte los 4 genes SPS de *A. thaliana*, en donde los genes *AtSPS1F* y *AtSPS2F* se encuentran en la familia SPSA; el gen *AtSPS3F* en la familia SPSB y el gen *AtSPS4F* en la familia SPSC (tomado y modificado de Ma *et al.* 2020).

2.5.4. Genes SPS en *Arabidopsis thaliana*

Previo a la secuenciación de genomas de plantas, los científicos creían que existía un gen que codificaba para la enzima SPS para cada especie. Actualmente se conocen familias de genes que codifican para enzimas SPS presentes en diferentes especies de plantas, acorde a lo mencionado anteriormente. *Arabidopsis thaliana* contiene 4 genes SPS únicos, que codifican para enzimas SPS, los cuales son: *AtSPS1F*, *AtSPS2F*, *AtSPS3F* y *AtSPS4F*.

La evidencia sugiere que diferentes eventos de duplicación de genes ocurrieron en varios puntos durante la evolución, tanto antes como después de la división monocotiledónea/dicotiledónea. Lo anterior pudo originar enzimas con diferencias funcionales y divergencia en las secuencias de genes. Evolutivamente, estas cuatro enzimas se agrupan de la siguiente manera: las dos primeras (*AtSPS1F* Y *AtSPS2F*) se agrupan exclusivamente con enzimas SPS de dicotiledóneas, mientras que las otras dos (*AtSPS3F* Y *AtSPS4F*) se pueden encontrar con enzimas SPS tanto de dicotiledóneas como de monocotiledóneas (Lutfiyya *et al.* 2007).

Es importante mencionar que la expresión de los genes *SPS* puede estar regulada por respuestas a señales o estímulos ambientales, tales como el estrés osmótico, que ocasiona un mayor número de raíces laterales; o como la sequía, que ocasiona que la raíz primaria se vuelva más larga (Lutfiyya *et al.* 2007; Solís-Guzmán *et al.* 2017).

Se ha reportado la expresión de los genes *SPS* en plantas transgénicas usando los marcadores moleculares *uidA::GFP*, y se ha demostrado que la expresión de *AtSPS1F*, *AtSPS2F* y *AtSPS3F* se aprecia a nivel de la columnela y estele de la raíz, lo que sugiere la existencia de ciclos de síntesis y degradación de la sacarosa en órganos consumidores. De forma distinta, se ha observado que el gen *AtSPS4F* se encuentra implicado en el desarrollo de los embriones (Solís-Guzmán *et al.* 2017).

De igual manera, se han generado mutantes dobles y triples de los genes *SPS* de *A. thaliana*, lo que ha permitido determinar que algunos genes *SPS*, como en el caso de *SPS1*, *SPS3* y *SPS4*, en ausencia total de la expresión de los otros genes *SPS* pueden garantizar un desarrollo normal de la semilla, germinación y subsecuente desarrollo de la planta por sí solos. Sin embargo, no es el caso observado para el gen *SPS2* (Bahaji *et al.* 2015).

El patrón general de expresión de los genes *SPS*, en tejidos y órganos ha sido reportado con anterioridad por nuestro grupo de trabajo, encontrando un traslape y diferenciación en su expresión (Tabla 1, Figura 9), lo que sugiere que, efectivamente, existe una regulación fina en el proceso de síntesis de sacarosa dentro de la planta.

Genes	Volkert <i>et al.</i> (2014)	Solís-Guzmán <i>et al.</i> (2017)
<i>AtSPS1F</i>	Hojas cotiledonares y verdaderas. Tallo.	Hojas cotiledonares y verdaderas. Tallo. Estele de la raíz. Columnela.
<i>AtSPS2F</i>	Raíz.	Hojas cotiledonares y verdaderas. Estele de la raíz. Columnela.
<i>AtSPS3F</i>	Hojas cotiledonares. Tallo.	Estele de la raíz. Columnela.
<i>AtSPS4F</i>	Hojas cotiledonares y verdaderas. Tallo.	Tallo apical. Embriones

Tabla 2. Antecedentes del patrón de expresión de los cuatro genes *SPS* de *Arabidopsis thaliana*.

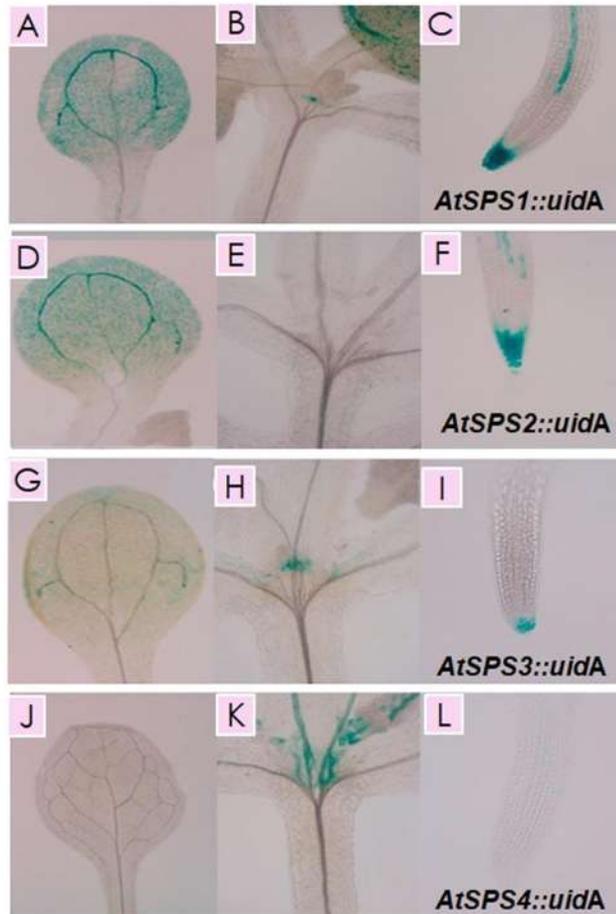


Figura 9. Expresión de los genes *SPS* de *A. thaliana*. Se muestran imágenes representativas para los cuatro genes *SPS* presentes en *A. thaliana* en 3 partes diferentes de la planta. A-C) Indican hoja, meristemo del tallo y raíz para *SPS1::uidA*, D-F) Representativas de *SPS2::uidA*, G-I) Representativas de *SPS3::uidA* y J-L) Representativas de *SPS4::uidA* (Ortiz-Calderón, tesis de licenciatura, 2019).

2.6.1. Funciones de las auxinas y su transporte

Las auxinas son de gran importancia en muchos aspectos del desarrollo de la planta, ya que están involucradas en su ciclo de vida y participan en múltiples procesos morfogénicos (Garay-Arroyo *et al.*, 2014) incluyendo la formación y emergencia de raíces laterales, la organización del meristemo, la respuesta gravitrópica, la división y expansión celular, la regulación ante las respuestas a la luz, la arquitectura general de la raíz y del follaje, la formación de los órganos y el desarrollo vascular, y la dominancia apical, entre otros (Teale *et al.* 2006; Benjamins y Scheres 2008).

Las auxinas se sintetizan en el ápice del follaje, hojas jóvenes y el meristemo de la raíz. Son moléculas muy pequeñas que una vez sintetizadas son distribuidas a través del cuerpo de la planta, donde son requeridas para varios procesos (Davies 2010). La principal auxina sintetizada por las plantas es el AIA. La AIA es la hormona más estudiada; es sintetizada mediante el triptófano de forma dependiente e independiente y adquiere dos formas químicas dependiendo del pH del ambiente: la forma sin disociar AIAH que se encuentra a pH ácido y el AIA que se encuentra a pH neutro (Figura 10). Los niveles de AIA son regulados mediante síntesis, degradación, inactivación y transporte. (Munguía-Rodríguez y Martínez-Trujillo, 2018; Beltrán-Peña *et al.* 2015).

La respuesta auxínica es el resultado de una regulación compleja de varios factores, los cuales incluyen: la expresión diferencial de genes que codifican enzimas involucradas para la síntesis de auxina, las proteínas de la vía de señalización y las proteínas transportadoras. Los transportadores polares permiten el flujo de auxinas de manera específica en los diferentes estadios de crecimiento en plantas. Los conjuntos libres de auxinas se modifican por conjugación y separación en compartimentos (Megías *et al.* 2019). Por lo tanto, la actividad de las auxinas está regulada por su biosíntesis, su transporte y su señalización.

El transporte de auxinas puede ser protagonizado por dos vías fisiológicas distintas (Figura 11). Estas vías de transporte se encuentran separadas: a) la primera es a través del floema (no polar), de forma unidireccional del ápice a la base, y se da de manera más rápida a larga distancia junto con los azúcares que la planta produce y no necesita de transportadores; b) la segunda vía es de célula a célula (polar), por lo que este transporte es más lento y se da en distancias cortas, y a diferencia del no polar, implica un gasto energético. El transporte y la distribución específica de auxinas permite regular algunos procesos importantes: el desarrollo embrionario, el mantenimiento de meristemos, las respuestas a estímulos ambientales, etc. (Michniewicz *et al.* 2007; Beltrán-Peña *et al.* 2015).

de crecimiento adecuado, de manera que si este gradiente se interrumpiera se provocaría el colapso del meristemo de la raíz llevando a la muerte de la planta. (Muroyama y Bergmann 2019; Munguía-Rodríguez *et al.* 2018).

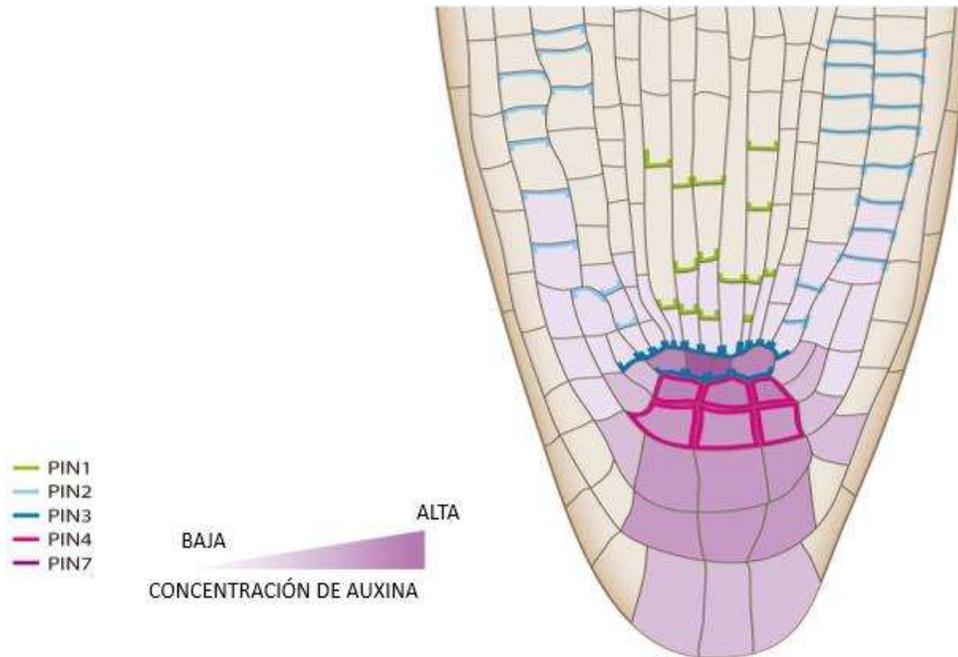


Figura 12. Distribución de los transportadores PIN y auxina en la raíz. Se muestra la distribución de los transportadores PIN en la raíz de *Arabidopsis thaliana* donde además se puede observar que la concentración más alta de auxinas está representada por un tono morado más fuerte debajo del centro quiescente que contiene células madre lo que demuestra que el flujo de auxina a largas distancias es indispensable. (Modificado de Muroyama y Bergmann 2019).

2.6.2. La percepción y la señalización por auxinas

Como se mencionó previamente, las auxinas tienen la capacidad de regular cada aspecto dentro del crecimiento y desarrollo de las plantas. Sin embargo, para que estas puedan desencadenar dichas respuestas se ven involucrados diversos factores dentro de sus cascadas de percepción y señalización. Primeramente, podemos encontrar a cada uno de los 6 receptores de auxinas en *A. thaliana*, también conocidos como proteínas F-BOX TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1) y proteínas relacionadas AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN 1, 2, 3, 4, 5 (AFB1–5). La unión que se presente dependiendo del receptor y/o proteína asociada y auxinas será fundamental para la especificidad del sustrato. Además, los receptores TIR1/AFBS participan como subunidad del complejo de ubiquitina ligasa (SCF) (Calderón-villalobos *et al.* 2010).

Podemos encontrar también a los represores transcripcionales de auxinas (AUX/IAAS), los cuales a niveles bajos de auxinas evitan la unión de la ARN

polimerasa a los factores de respuesta a auxinas (ARF), que son un grupo de factores de transcripción que regulan a los genes de respuesta a auxinas mediante su unión a los promotores, ya sea activando o reprimiendo la expresión de genes (Dharmasiri *et al.* 2005; Santner *et al.* 2009). De igual manera tenemos a las proteínas activadoras de ubiquitina (ligasas), las cuales se encargan de detectar, unir la ubiquitina, conectar con la proteína destino y finalmente poliubiquitinar a los represores (AUX/IAAs) vía el proteosoma 26S. (Munguía-Rodríguez *et al.* 2018; Santner *et al.* 2009; Dharmasiri *et al.* 2005).

Habiendo mencionado los factores involucrados se tiene entonces que, en condiciones normales a niveles bajos de auxina, los promotores para la expresión de genes se encuentran secuestrados por los represores AUX/IAA. Cuando los niveles de auxina se incrementan, esta actúa como un estabilizador entre los complejos co-receptores y represores lo que permite la ubiquitinación de estos últimos, y su posterior degradación. Por lo tanto, los ARFS son liberados y se unen a los genes que contienen elementos de respuesta temprana a auxinas (TGTCTC) en sus promotores, para así activar o reprimir la transcripción (Figura 13) (Hayashi, *et al.*, 2012).

El gran número de genes *AUX/IAA* y *ARF* en *Arabidopsis* (23 y 29, respectivamente) indica que la respuesta a auxinas es muy compleja, dependiendo tanto de sus niveles endógenos como de la especificidad y la fuerza de la interacción entre diferentes grupos de proteínas (Calderón-Villalobos *et al.* 2012).

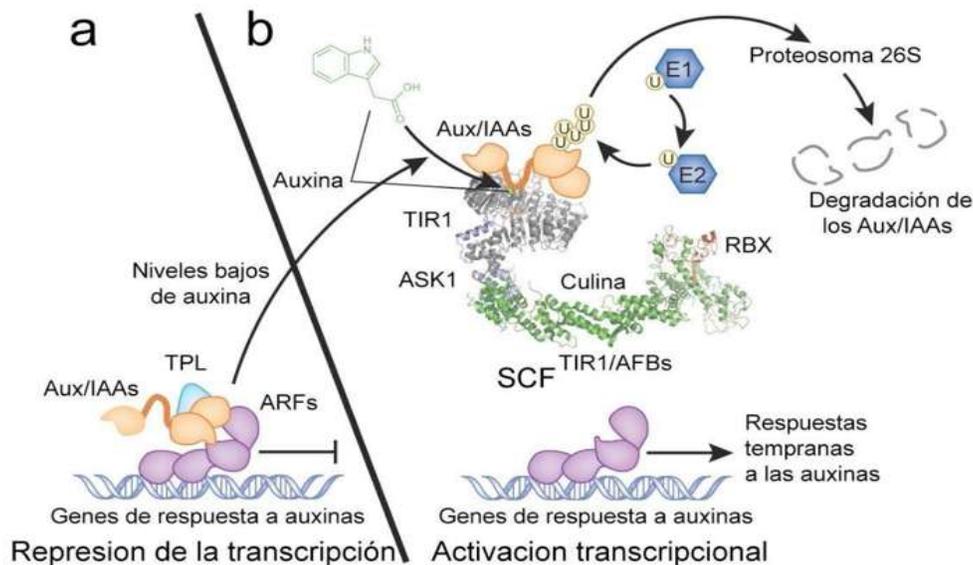


Figura 13. Señalización de auxinas. a) Muestra lo que sucede a bajos niveles de auxina: la transcripción que es dependiente de los factores de respuesta a auxina (ARF) se reprime mediante Aux/IAA y el co-represor TOPLESS. b) Muestra como a altos niveles de auxina se permite la formación del complejo SCFTIR1-Aux/IAA, para llevar a cabo la ubiquitinación de proteínas Aux/IAA y su posterior degradación, lo que permite a los ARFs activar la transcripción de genes que son regulados por auxinas. (Tomado y modificado de Santner *et al.* 2009).

2.6.3. Líneas mutantes afectadas en la vía de señalización de las auxinas

Es importante identificar las posibles consecuencias de alterar alguno de los factores involucrados en la biosíntesis señalización o transporte de auxinas. Cualquier modificación de su homeóstasis conlleva a cambios fenotípicos de gran relevancia; algunos de ellos se han podido observar mediante el uso de mutantes, tanto en aquellas en que se produce una sobre-expresión de auxinas (*superroot1*), como en aquellas en que su transporte se ha visto alterado (*pin1*), o en los que se ha reprimido la síntesis de auxina (*wei8tar2*), lo que demuestra que cualquier cambio que pueda modificar las concentraciones o la distribución de auxina en plantas, puede ser importante, e incluso mortal (Figura 14) (Paque y Weijers 2016).

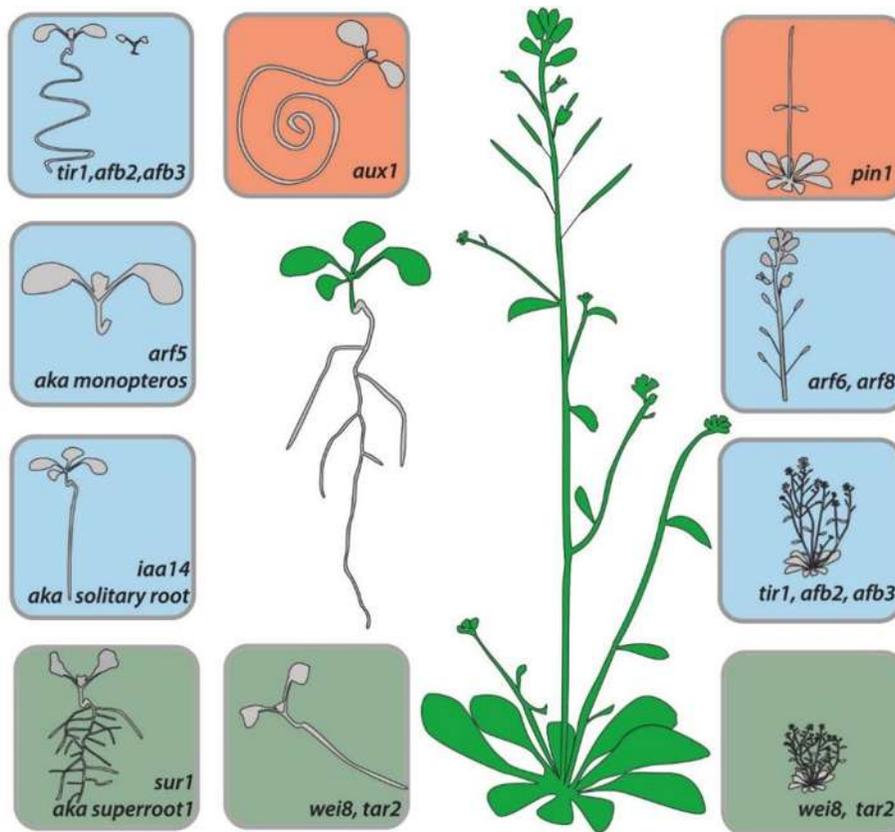


Figura 14. Líneas mutantes de auxinas y sus efectos en el desarrollo y crecimiento de plantas de *A. thaliana*. Al centro de color verde, se puede observar el desarrollo adecuado de una plántula y una planta adulta silvestre tanto en la arquitectura de la raíz como en el tallo y hojas. Por otra parte, las imágenes en recuadros nos muestran los distintos mutantes para la homeostasis de auxinas, donde las mutantes con afectación de biosíntesis de auxina se representan con los cuadros marrones, en las que *sur1* es sobre-expresor y *wei8tar2* no produce síntesis de auxinas. Los recuadros azul claro muestran el crecimiento de mutantes afectadas en la señalización de auxinas: mutados en el *arf5*, en un inhibidor de transcripción de auxina llamado *iaa14* (forma raíces solitarias) y en co-receptores de auxina (*tir1, afb2, afb3*). Los cuadros verdes nos muestran el desarrollo y crecimiento de plántulas con mutantes en transportadores tanto de influjo (*aux1*) como de eflujo de auxina (*pin1*). (Tomado de Paque y Weijers 2016).

2.7. Relación carbohidrato-auxina

La planta depende de muchos estímulos ambientales que se encuentran determinando su crecimiento y desarrollo a lo largo de toda su vida. Existen muchos trabajos en los cuales se ha descrito cómo diferentes azúcares generan cambios en la señalización de auxinas. Un ejemplo de ello es que la sacarosa se encuentra implicada en la afectación de la biosíntesis y distribución de auxinas, llegando incluso a incrementar la biosíntesis del IAA de manera particular. Lo anterior es de suma importancia debido a que las auxinas se ven implicadas en casi todos los procesos de crecimiento y desarrollo dentro de la planta. Sin embargo, es poco lo que se sabe acerca de cómo las auxinas pueden influir en la biosíntesis de azúcares, así como en la expresión de genes involucrados en la síntesis de sacarosa como los genes *SPS* (Robert 2019; García-González *et al.* 2021).

A pesar de ello, se ha visto que existe una relación entre el papel que desempeñan las auxinas y los azúcares dentro de la planta. Es debido a ello que la planta puede regular de una manera más fina diversos procesos dentro de su crecimiento y desarrollo: la formación del fruto y la semilla, así como la arquitectura radicular. Por ejemplo, la morfogénesis del fruto es una actividad para la cual la planta requiere auxinas, pero a su vez esto da origen a un alto flujo de azúcares para cubrir los requerimientos energéticos del embrión. Aunado a ello, la comunicación entre auxina-sacarosa desempeña un balance para la correcta división y expansión celular en la semilla. Por otro lado, cuando la sacarosa se encuentra presente en el medio de crecimiento se ha visto un incremento en la emergencia de pelos radiculares, lo que permite una mejor absorción de nutrientes e incremento en la superficie de la raíz. Sin embargo, estos pelos radiculares necesitan de auxinas para continuar su crecimiento. Otro ejemplo es que el transportador de eflujo de auxinas PINFORMED 2 (PIN2) está involucrado en el crecimiento de la raíz, pero está regulado entre otros aspectos externos por la disponibilidad de nutrientes (García-González *et al.* 2021).

De manera específica, durante sus primeros estadios de crecimiento el embrión se encarga de producir auxinas para poder crecer mediante división y elongación celular. Sin embargo, también requerirá las auxinas para incrementar su capacidad de atraer hidratos de carbono desde la hoja. Lo anterior será la base para cubrir sus requerimientos energéticos en todos los procesos durante el desarrollo del fruto. Debido a ello, existen auxinas como el NAA (ácido 1-naftalenacético) que son utilizadas exclusivamente para incrementar el tamaño del fruto y con ello generar mayores ganancias económicas en campos agrícolas (Fichet 2019).

Como se menciona anteriormente, a las auxinas se les atribuye un papel fundamental para la atracción de hidratos de carbono. Para ello, las auxinas, por

ellas mismas o por medio de las giberelinas, tienen la capacidad de generar la síntesis de enzimas que permitan desdoblar a la molécula de sacarosa en monosacáridos más simples de asimilar y los cuales son la fuente de energía para todos los procesos de crecimiento y desarrollo. Un ejemplo de ello son los azúcares necesarios para la síntesis de la pared celular, la cual es constituida por polímeros de glucosa que en conjunto forman moléculas de celulosa y a su vez fibrillas de celulosa (Garay-Arroyo *et al.* 2014).

Algunos otros ejemplos del papel que fungen en conjunto las auxinas y los azúcares son que, al haber una exportación de auxinas y afluencia de azúcares de manera conjunta, se activa el crecimiento de segundos brotes en el crisantemo, ya que gracias a ello se rompe la dominancia apical para poder dar origen a más meristemas florales (Sun *et al.* 2021).

De igual manera, se sabe que al presentarse una alteración en la homeóstasis de auxinas los granos de arroz suelen tener menor o mayor tamaño. Se ha visto que al regular una menor expresión del gen *OsYuc11*, el cual está involucrado en el metabolismo de AIA, se genera una menor acumulación de almidón, generando granos más pequeños (Zhang *et al.* 2021). Por otra parte, al aplicar AIA de manera exógena los niveles de sacarosa se incrementan, ya que a su vez aumentan los niveles de expresión génica de sus transportadores, lo que conlleva a un mayor tamaño de los granos de arroz (Deng *et al.* 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

La sacarosa en diafonía con las auxinas, modulan diversos procesos dentro de las plantas. Se ha caracterizado que los azúcares generan cambios dentro del metabolismo, transporte y la señalización de auxinas. Sin embargo, se desconoce el efecto endógeno de las auxinas sobre la expresión de genes que codifican enzimas SPS.

4. HIPÓTESIS

La alteración en la vía de señalización de las auxinas modificará la expresión de los genes que codifican enzimas SPS en *Arabidopsis thaliana*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Caracterizar el efecto de la alteración de la vía de señalización de auxinas en la expresión de los genes que codifican enzimas SPS en *Arabidopsis thaliana* L.

5.2. Objetivos particulares

- ▶ Determinar el efecto de mutaciones de la vía de señalización de auxinas en la distribución de la expresión conferida por los promotores de los genes *SPS* en los tejidos y órganos, utilizando un gen reportero.
- ▶ Determinar el efecto de las auxinas exógenas en los patrones de expresión de los genes *SPS*.
- ▶ Caracterizar la expresión de los genes *SPS* en etapas de floración y fructificación.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico

6.1.1. Mutantes en la vía de señalización de auxinas

tir1afb2afb3 (Parry *et al.* 2009), contiene mutaciones en tres genes que codifican receptores de auxinas. *axr1-3* (*iaa17*) (Lincoln *et al.* 1990), contiene una mutación en gen *IAA17* que codifica un represor de auxinas. *arf7arf19* (Okushima *et al.* 2007), contiene mutaciones en *arf7* y *arf19* que codifican factores de transcripción de respuesta a auxinas. *aux1-7* (Pickett *et al.* 1990), contiene una mutación en un gen que codifica un transportador de auxina. *35S::YUCCA4* (Munguía-Rodríguez *et al.* 2020), codifica para monooxigenasas de flavina las cuales se implican en la biosíntesis de auxinas, por lo que contiene una mutación que incrementa la biosíntesis de éstas.

6.1.2. Líneas reporteras de la síntesis de sacarosa

AtSPS1F::uidA, *AtSPS2F::uidA*, *AtSPS3F::uidA*, *AtSPS4F::uidA* (Solís-Guzmán *et al.* 2017). Contienen los promotores de los genes *SPS* unidos al gen reportero *uidA* (GUS).

6.2. Métodos

6.2.1. Desinfección de semillas

Las semillas se desinfectaron superficialmente por medio de lavados en agitación con 700 µl de hipoclorito de sodio (NaClO₃) al 20% (v/v de agua), seguido de etanol (C₂H₅OH) al 96% (v/v de agua) durante 5 minutos. Una vez retirada esta última solución se realizaron 3 enjuagues con agua desionizada estéril y las semillas fueron suspendidas en 1 ml de la misma dentro de tubos Eppendorf. Por último, se colocaron en refrigeración a 4°C en oscuridad por 48 horas para promover y homogeneizar su germinación (Figura 15).

6.2.2. Condiciones generales del crecimiento de las plantas

Las semillas fueron germinadas en medio MS 0.2x (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 0.6%, agar para plantas al 1% (w/v) (Phytotechnology Laboratories) y pH 7. Las plantas se crecieron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 18 h de luz ($300 \mu\text{M m}^2 \text{s}^{-1}$) y 6 h de oscuridad, con una humedad de 70-75%, orientadas en posición vertical para permitir el crecimiento del sistema radical sobre el medio a un ángulo de 65° (Figura 15).

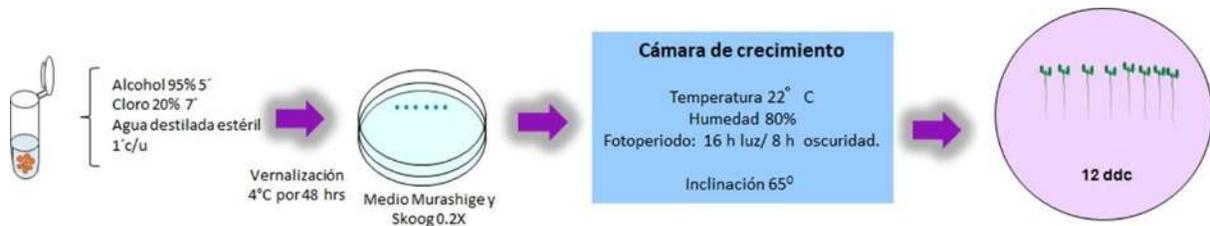


Figura 15. Desinfección de semilla y crecimiento de las plántulas. De acuerdo a lo descrito acorde a materiales y métodos.

6.2.3. Generación de plantas mutantes en la ruta de señalización de auxina con expresión de las construcciones genéticas *AtSPS1F::uidA*, *AtSPS2F::uidA*, *AtSPS3F::uidA* y *AtSPS4F::uidA*.

Las cruces se realizaron polinizando manualmente las flores de las plantas mutantes con polen de las líneas reporteras. Las flores completamente desarrolladas de las líneas transgénicas reporteras fueron cortadas y sus estambres fueron separados del resto de la flor; se pusieron en contacto las anteras con el estigma de la planta mutante cubriendo con polen su superficie, proceso que con el tiempo nos dio origen a una silicua (fruto) con semillas denominadas generación filial 1 (F1). Se seleccionaron las plantas F1 que mostraron expresión y fenotipo del gen reportero *uidA* y se propagaron hasta producir semillas, llamadas generación F2; donde las semillas fueron cosechadas, sembradas y analizadas para determinar la segregación de la expresión del gen reportero y el fenotipo de la planta mutante (planta madre). Las plántulas con expresión de *uidA* y fenotipo mutante fueron crecidas en sustrato para producir la F3. Por último, se seleccionaron las plantas que mostraron el 100% de las semillas con expresión del gen reportero y que además mostraron el fenotipo mutante (Figura 16).

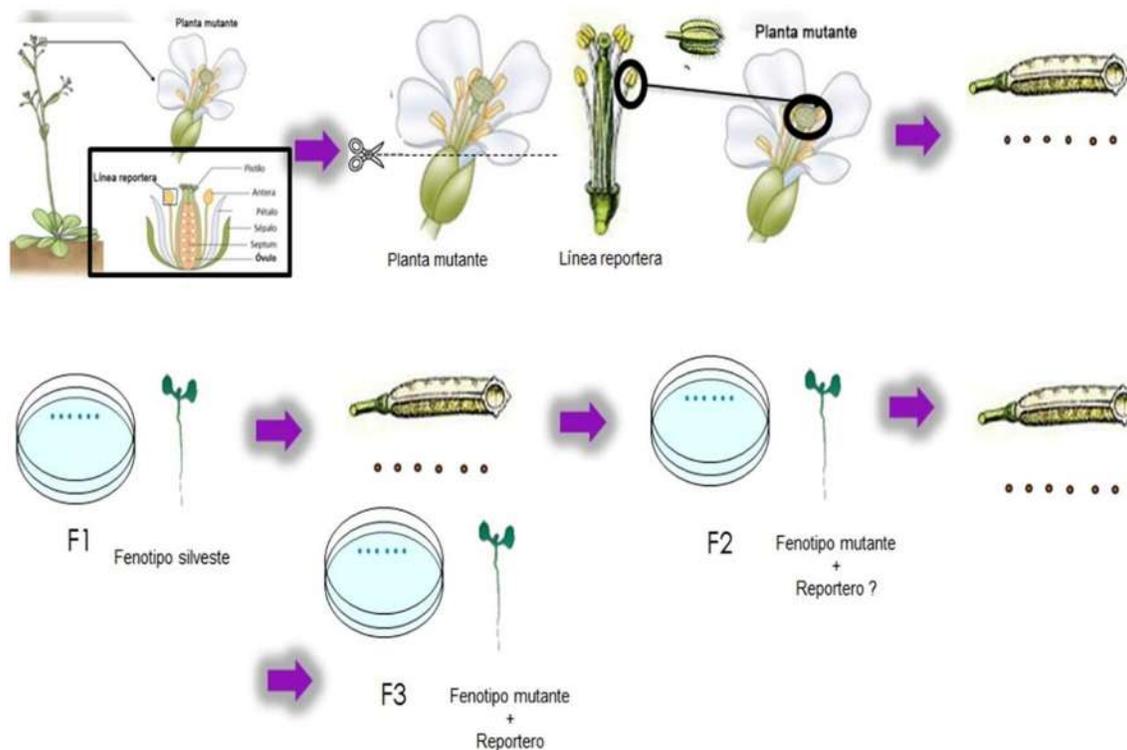


Figura 16. Generación de las cruzas. De acuerdo a lo descrito acorde a materiales y métodos se generaron cruzas entre las cuatro líneas reporteras *SP5* y las líneas mutantes de la señalización de auxinas.

6.2.4. Tinción histoquímica de GUS

Las plantas con el gen reportero *uidA* (Jefferson *et al.* 1987) fueron incubadas con el sustrato X-Gluc 0.1% (5-bromo-4-cloro-3-indol β -D-glucuronido) en solución amortiguadora de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH 7.0) con 2 mM de ferrocianuro de potasio y 2 mM de ferricianuro de potasio, durante 12 horas a 37 °C. Las plantas se clarificaron y fijaron con 0.24 N HCl en metanol 20% (v/v) durante 60 min a 62 °C. La solución se sustituyó por NaOH 7% (v/v) en etanol 60% (v/v) durante 20 min a temperatura ambiente. Las plantas se hidrataron con tratamientos de etanol a 40, 20 y 10% (v/v) sucesivamente por 20 min en cada período. Finalmente, se substituyó el etanol con glicerol 50% (v/v). Las diferentes partes de la planta así procesadas se incluyeron en portaobjetos para su análisis al microscopio (Malamy y Benfey 1997).

6.2.5. Análisis de los estadios de desarrollo en los primordios de la raíz para las cuatro líneas reporteras SPS presentes en *A. thaliana* y la línea DR5::uidA

Las semillas de cada una de las cuatro líneas reporteras y de la línea DR5::uidA fueron desinfectadas y sembradas con base en lo descrito anteriormente. Una vez transcurridos los 12 días de crecimiento, se les realizó una tinción histoquímica para posteriormente analizar con la ayuda del microscopio estereoscópico el estadio de crecimiento de los primordios de la raíz, categorizándose del 1 al 7 de acuerdo a lo descrito por Malamy y Benfey (1997).

6.2.6. Suplementación de auxinas de forma exógena

De manera adicional a lo descrito anteriormente en los apartados de desinfección de semillas y condiciones generales de crecimiento de las plantas, se suplementaron al medio MS de forma manual dos auxinas: AIA y NAA. Dichas auxinas fueron suplementadas a cinco diferentes concentraciones: 0.12 μM , 0.25 μM , 0.5 μM , 0.75 μM y 1 μM . Lo anterior se llevó a cabo con las cuatro líneas reporteras SPS y la línea sobre-expresora 35S::YUCCA4; incluyéndose además un control.

6.2.7. Fotografía

El análisis de las plántulas (hoja, meristemo del tallo y meristemo de la raíz), así como los primordios de la raíz, se realizó con un microscopio estereoscópico marca Zeiss. Las imágenes fueron captadas con una cámara digital adaptada al microscopio marca SONY modelo DSCS75 y se procesaron con el software Axio Vision 4AC.

El análisis de flor y fruto, así como la plántula a diferentes concentraciones de AIA y NAA se realizaron con lupa estereoscópica marca Zanzeigen. Las imágenes fueron captadas con una cámara digital adaptada al microscopio marca SONY modelo MU1000 y se procesaron con el software AMSCOPE.

7. RESULTADOS

7.1. Expresión de los genes reporteros *SPS* en el fondo genético de líneas mutantes afectadas en la vía de señalización de las auxinas.

El marcador *SPS1F::uidA* permitió determinar la expresión conferida por el promotor del gen *SPS1* de *A. thaliana* en las diferentes partes de la planta. Esta expresión se evaluó en un fondo silvestre y en plantas mutantes en genes de la ruta de señalización de las auxinas. La coloración azul muestra los sitios de expresión. En la figura 17 se presentan imágenes representativas de los resultados obtenidos, de los que se puede destacar lo siguiente:

La expresión conferida por *SPS1* en las hojas, característica del fondo silvestre (control), se mantiene en varias mutantes, con excepción de *aux1-7* alterada en un transportador de auxina, lo que sugiere que el transporte de esta hormona en la hoja altera la expresión conferida por este gen. Además, también se pierde la expresión en la línea sobreexpresora que incrementa la concentración endógena de auxina (*35S::YUCCA*).

Para el tallo, en la región donde se forman los brotes de las hojas la expresión en la mutante *aux1-7*, a diferencia de lo que ocurre en las hojas maduras, la expresión de *SPS1* es más acentuada, lo que puede estar relacionado a que en estos sitios jóvenes hay una mayor síntesis de auxina. De igual forma a lo que ocurre en las hojas maduras, en la línea con mayor concentración de auxina, *35S:YUCCA4*, se pierde la expresión. En la raíz, la mayor expresión de *SPS1* en el ápice, característica del fondo silvestre, se pierde en la mutante *aux1-7*, sugiriendo que también en este órgano el transporte de auxina está influyendo en la expresión de este gen. Nuevamente, en la mutante con mayor concentración de auxina, *35S:YUCCA4*, no se encontró expresión.

En la flor, la expresión en el fondo silvestre es notable, pero no así en las diferentes mutantes, lo que sugiere que la expresión conferida por *SPS1* en este órgano es más sensible a los cambios de auxina ocasionados por las mutaciones en la vía de señalización. En las mutantes *35S:YUCCA4* y *axr1-3* la expresión solo se observó en la unión del eje floral. En el fruto, por experiencias anteriores, ha sido difícil encontrar la expresión conferida por *SPS1*, posiblemente porque los tiempos del desarrollo en que ocurre esta expresión son muy específicos y breves; y, en esta ocasión, no fue posible detectarla.

En general, la mayor afectación en los patrones de expresión conferida por *SPS1* se encontró cuando se afecta el transporte de auxina, como lo demuestran

los resultados con la mutante *aux1-7*. Y, al parecer, también un incremento general en la concentración endógena de esta hormona disminuye la expresión de este gen.

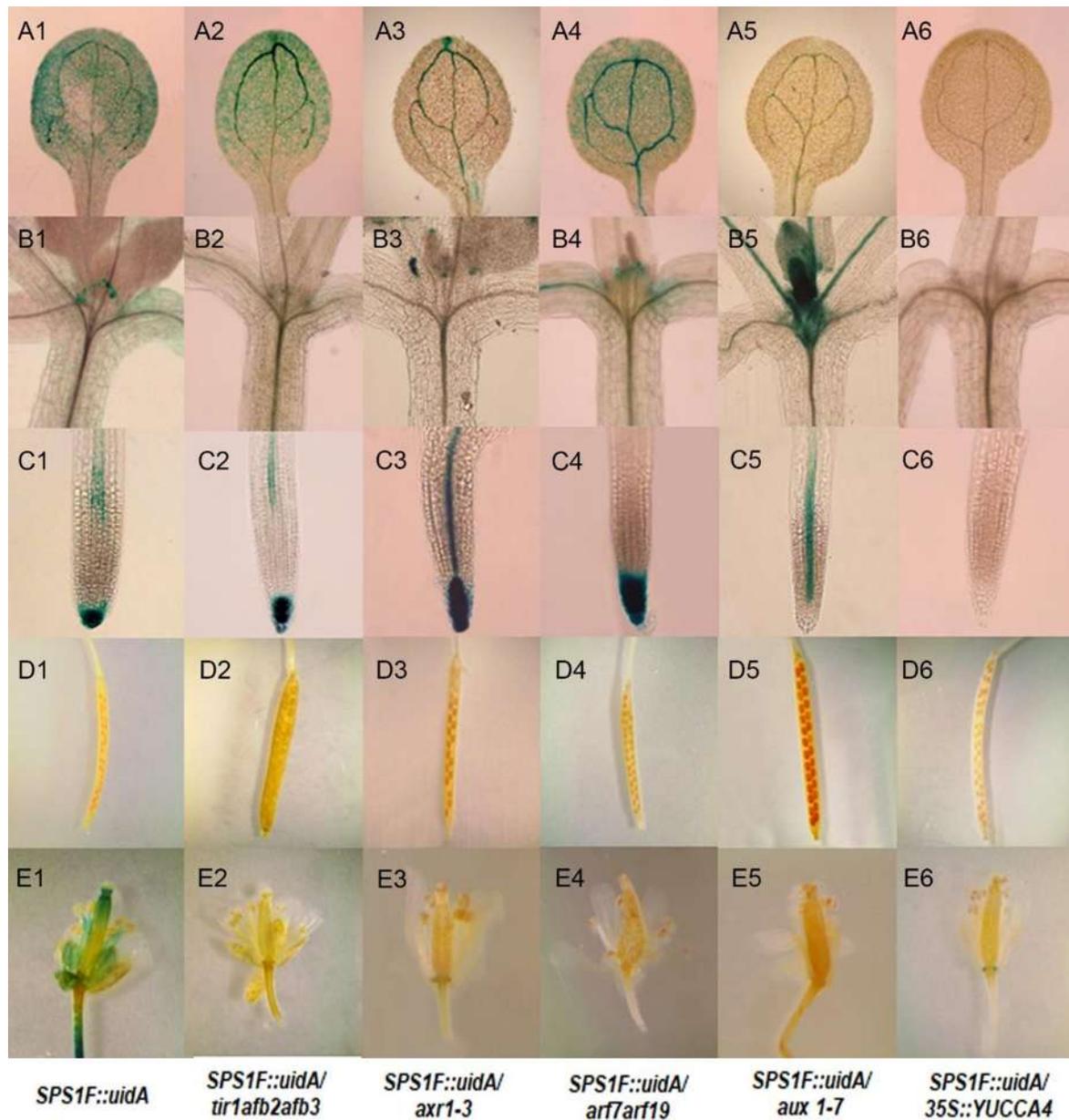


Figura 17. Efecto de las mutaciones en la vía de señalización auxínica en cruza con la línea reportera *SPS1F::uidA* en *A. thaliana* para diferentes partes de la planta. Semillas de *A. thaliana* fueron germinadas y a los 12 de crecimiento se realizó la tinción acorde a lo descrito en materiales y métodos. Posteriormente se transfirieron a sustrato y se llevaron a un estadio adulto donde se recolectó flor y fruto para su análisis por métodos histoquímicos. A1-A6) Hoja cotiledonar. B1-B6) Meristemo del tallo. C1-C6) Meristemo de la raíz. D1-D6) Fruto. E1-E6) Flor.

El marcador *SPS2F::uidA* permitió determinar la expresión conferida por el promotor del gen *SPS2* de *A. thaliana* en las diferentes partes de la planta. Esta expresión se evaluó en un fondo silvestre y en plantas mutantes en genes de la ruta de señalización de las auxinas. La coloración azul muestra los sitios de expresión. En la figura 18 se presentan imágenes representativas de los resultados obtenidos, de los que se puede destacar lo siguiente:

Para la hoja, la expresión en el fondo silvestre se presentó, aunque de forma débil, con pequeños incrementos en las cruzas con *tir1afb2afb3*, *aux1-7* y *axr1-3* en el ápice y nervadura de la hoja.

En los brotes del tallo no se encontró expresión en el fondo silvestre ni en las diferentes mutantes, lo que ha sido una constante con otros reportes de nuestro grupo de trabajo.

En el meristemo apical de la raíz, del cual el gen *SPS2::uidA* es característico en su expresión, la expresión se presentó, además del fondo silvestre, en la crusa con *axr1-3*, en el que además se generó un cambio en dicho patrón. Esto sugiere que la inactivación del represor IAA17 no interfiere con la expresión de *SPS2*.

En el caso de la flor, la expresión del gen mostró una disminución en la expresión de manera general con respecto al control silvestre, presentándose solo en el eje floral en la unión al pedicelo para 3 de las 5 cruzas: *arf7arf19*, *35S::YUCCA4* y *tir1afb2afb3*.

Para el fruto, fue evidente la expresión del gen en la zona de unión del pedicelo y la valva en 4 de las 5 cruzas. Solo la crusa con *aux1-7* no mostró expresión.

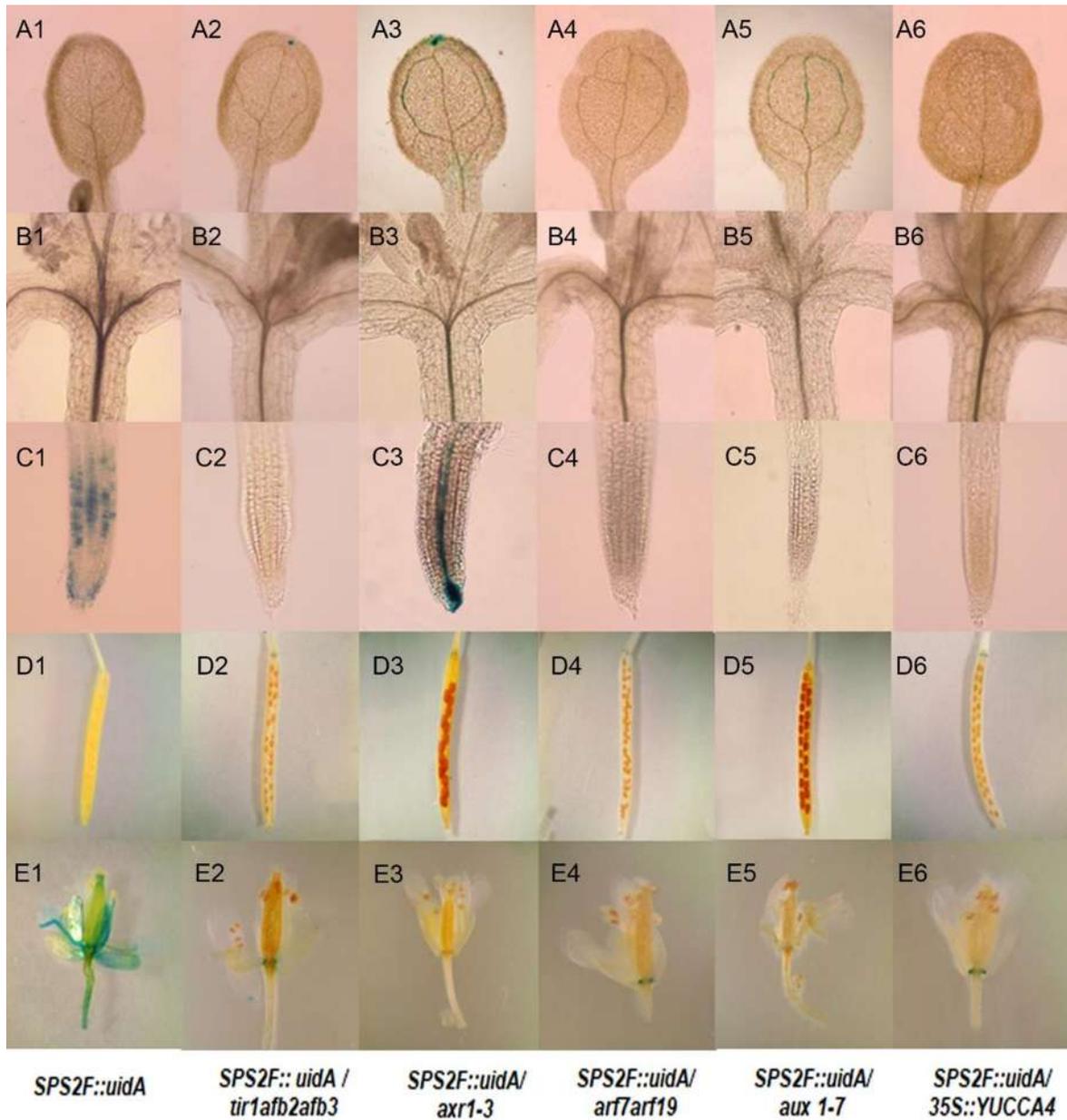


Figura 18. Efecto de las mutaciones en la vía de señalización auxínica en cruza con la línea reportera *SPS2F::uidA* presente en *A. thaliana*, para cinco diferentes partes de la planta analizadas. Semillas de *A. thaliana* fueron germinadas y a los 12 de crecimiento se realizó tinción acorde a lo descrito en materiales y métodos. Posteriormente se transfirieron a sustrato y se llevaron a un estadio adulto donde se recolectó flor y fruto para su análisis por métodos histoquímicos. A1-A6) Hoja cotiledonar. B1-B6) Meristemo del tallo. C1-C6) Meristemo de la raíz. D1-D6) Fruto. E1-E6) Flor.

El marcador *SPS3F::uidA* permitió determinar la expresión conferida por el promotor del gen *SPS3* de *A. thaliana* en las diferentes partes de la planta. Esta expresión se evaluó en un fondo silvestre y en plantas mutantes en genes de la ruta de señalización de las auxinas. La coloración azul muestra los sitios de expresión. En la figura 19 se presentan imágenes representativas de los resultados obtenidos, de los que se puede destacar lo siguiente:

La expresión del gen *SPS3F::uidA* es característica a lo largo de la nervadura de la hoja. Además, se observó que en las cruzas *axr1-3*, *arf7arf19* y *35S::YUCCA4* la expresión se extendió al ápice de la hoja.

En los brotes del tallo hay una expresión débil en el control de fondo silvestre, que fue menos notable en las mutantes *arf7arf19* y *tir1afb2fb3*. En cambio, en *axr1-3* la expresión se incrementó.

En la raíz, en el fondo silvestre el gen *SPS3F::uidA* se expresa en la columnela y el centro quiescente. De manera adicional a ello, *35S::YUCCA4* y *axr1-3* mostraron expresión a lo largo de los haces vasculares, lo que puede tener relación con el aumento de auxina, ya que en *axr1-3* está inactivo el represor IAA17 y en *35S::YUCCA4* hay una mayor cantidad de auxina endógena.

Para el fruto, se observó un aumento y cambio del patrón de expresión en las cruzas; donde en *axr1-3* se presentó en la parte final superior de las valvas y en *tir1afb2fb3* y *35S::YUCCA4* en la unión del pedicelo a las valvas.

Para la flor se logró ver que la expresión fue diferencial entre cruzas y entre las partes de la flor en cuestión. De manera única en *tir1afb2fb3* se presentó expresión en los filamentos de los estambres, los pétalos y a lo largo del pedicelo, siendo así la que más se asemeja a la planta control. En *arf7arf19* y *35S::YUCCA4* la expresión se percibió en el pedicelo y la unión del eje floral. En *aux1-7* la expresión solo se distinguió en el gineceo, y fue indetectable para *axr1-3*.

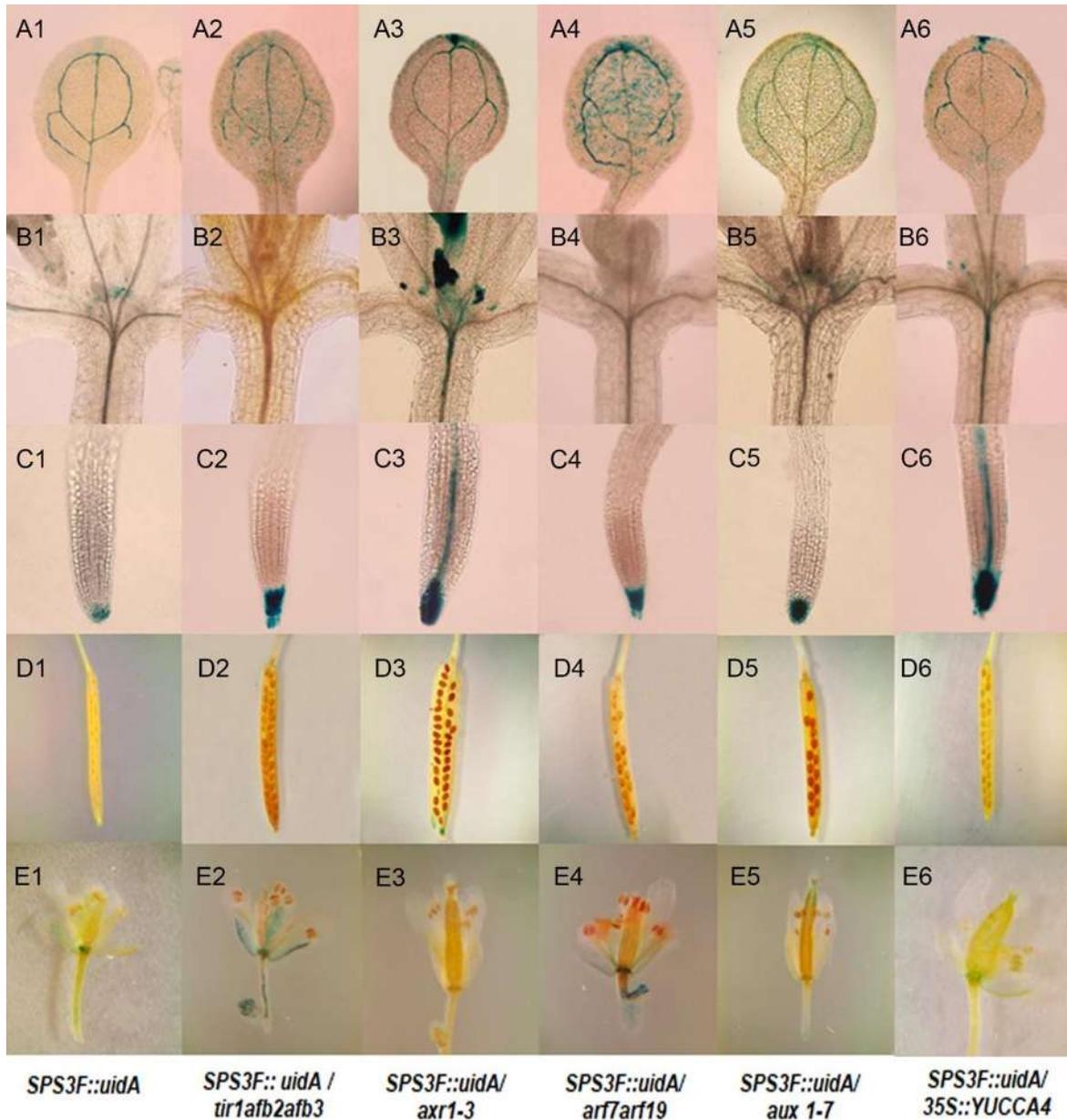


Figura 19. Efecto de las mutaciones en la vía de señalización auxínica en cruz con la línea reportera *SPS3F::uidA* de *A. thaliana*, para diferentes partes de la planta. Semillas de *A. thaliana* fueron germinadas y a los 8 de crecimiento se realizó tinción acorde a lo descrito en materiales y métodos. Posteriormente se transfirieron a sustrato y se llevaron a un estadio adulto donde se recolectó flor y fruto para su análisis por métodos histoquímicos. A1-A6) Hoja cotiledonar. B1-B6) Meristemo del tallo. C1-C6) Meristemo de la raíz. D1-D6) Fruto. E1-E6) Flor.

El marcador *SPS4F::uidA* permitió determinar la expresión conferida por el promotor del gen *SPS4* de *A. thaliana* en las diferentes partes de la planta. Esta expresión se evaluó en un fondo silvestre y en plantas mutantes en genes de la ruta de señalización de las auxinas. La coloración azul muestra los sitios de expresión. En la figura 20 se presentan imágenes representativas de los resultados obtenidos.

Volkert y colaboradores, en el 2014, mencionaron la expresión del gen *SPS4F::uidA* en la hoja. Sin embargo, Solís-Guzmán y colaboradores en el 2017 no la reportan. En nuestro trabajo, las cruzas con *35S::YUCCA4* y *aux1-7* mostraron similitud a lo reportado por Volkert, mientras que las otras 3 cruzas a lo reportado por Solís-Guzmán. De cualquier forma, la expresión, cuando se presentó, fue poco notable.

La expresión del gen *SPS4F::uidA* es característica del meristemo del tallo, lo que se puede observar en 4 de nuestras cruzas, a excepción de *axr1-3* en que se encuentra inactivado el represor IAA17.

Para el meristemo de la raíz, no ha sido documentada la expresión del gen *SPS4F::uidA* en el fondo silvestre. Sin embargo, logramos percibir una expresión débil para las cruzas *axr1-3*, *aux1-7* y *35S::YUCCA4*.

El gen *SPS4F::uidA* es el único gen *SPS* de *A. thaliana* en que se ha reportado expresión en los embriones. No obstante, por comunicación personal (Solís-Guzmán) esto ocurre en pocas muestras analizadas. En nuestra craza con *arf7arf19* se encontró la expresión en algunas semillas en desarrollo dentro del fruto. En *35S::YUCCA4* la expresión se presenta en la unión del pedicelo y la valva. Para las otras 3 cruzas no se observó expresión.

En el caso de la flor, en 3 de nuestras cruzas se observó una disminución de la expresión del gen, mientras que en la craza de *arf7arf19* se dio una expresión en las semillas en desarrollo, los filamentos de los estambres y la unión al meristemo floral. En la craza de *35S::YUCCA4* la expresión se presentó en los filamentos de los estambres y el pistilo.

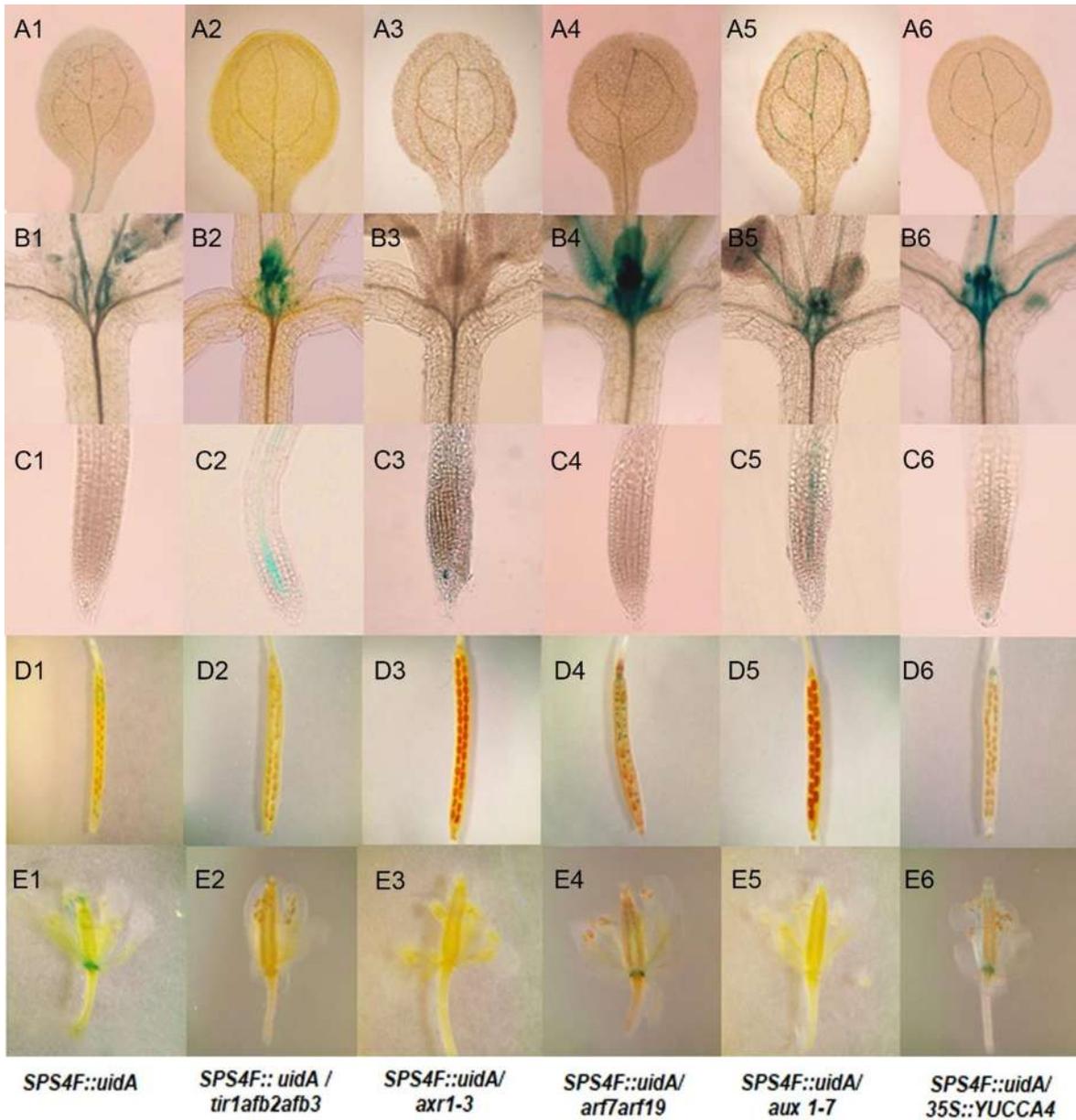


Figura 20. Efecto de las mutaciones en la vía de señalización auxínica en cruza con la línea reportera *SPS4F::uidA* presente en *A. thaliana*, para diferentes partes de la planta. Semillas de *A. thaliana* fueron germinadas y a los 8 de crecimiento se realizó tinción acorde a lo descrito en materiales y métodos. Posteriormente se transfirieron a sustrato y se llevaron a un estadio adulto donde se recolectó flor y fruto para su análisis por métodos histoquímicos. A1-A6) Hoja cotiledonar. B1-B6) Meristemo del tallo. C1-C6) Meristemo de la raíz. D1-D6) Fruto. E1-E6) Flor.

7.2. Efecto de las auxinas en la expresión de los genes *SPS* de *A. thaliana*

En las secciones anteriores de resultados, se analizó el efecto de mutaciones en la vía de señalización de auxinas en la expresión conferida por los promotores de los genes *SPS* de *A. thaliana* usando el gen reportero *uidA* (GUS). En estos casos se puede alterar la concentración endógena de auxina o bien su distribución, lo cual es un escenario más natural con relación a los suplementos de auxina de manera exógena. No obstante, los experimentos de adición de hormonas proporcionan información adicional y son complementarios a los estudios con mutantes, por lo que también se realizaron.

En los medios de cultivo en que crecieron las plantas de *Arabidopsis* se adicionaron, de forma separada, dos tipos de auxinas, ácido indol acético (IAA) y ácido naftalenacético (NAA), en diferentes concentraciones. Al suplementar IAA de manera exógena se puede destacar lo siguiente: se observó una afectación en el fenotipo, con una disminución de la longitud de la raíz primaria y un incremento en el número de pelos radiculares y de raíces laterales de una manera dependiente de la concentración de la hormona (Figura 21).



Figura 21. Crecimiento representativo de las líneas reporteras *SPS* presentes en *A. thaliana* al suplementar de manera exógena IAA. Acorde a materiales y métodos las semillas de las cuatro líneas reporteras fueron desinfectadas y sembradas en medio MS al cual además se le añadió IAA en 5 concentraciones: 0 µM, 0.12 µM, 0.25 µM, 0.5 µM, 0.75 µM y 1 µM.

La expresión de los genes *SPS* al adicionar IAA se presenta en la figura 22. De forma particular, para el gen *SPS1F::uidA* en las concentraciones más bajas (0.12 μ M y 0.25 μ M) no se logró observar expresión del gen en ningún órgano de la plántula, pero posteriormente en las concentraciones más altas (0.5 μ M, 0.75 μ M y 1 μ M) se logró percibir un incremento en la expresión del gen en las hojas. Para el gen *SPS2F::uidA*, *SPS3F::uidA* y *SPS4F::uidA* la expresión de cada gen se hace más evidente, conforme la dosis se incrementa para la raíz, hoja y el meristemo del tallo respectivamente (Figura 22).

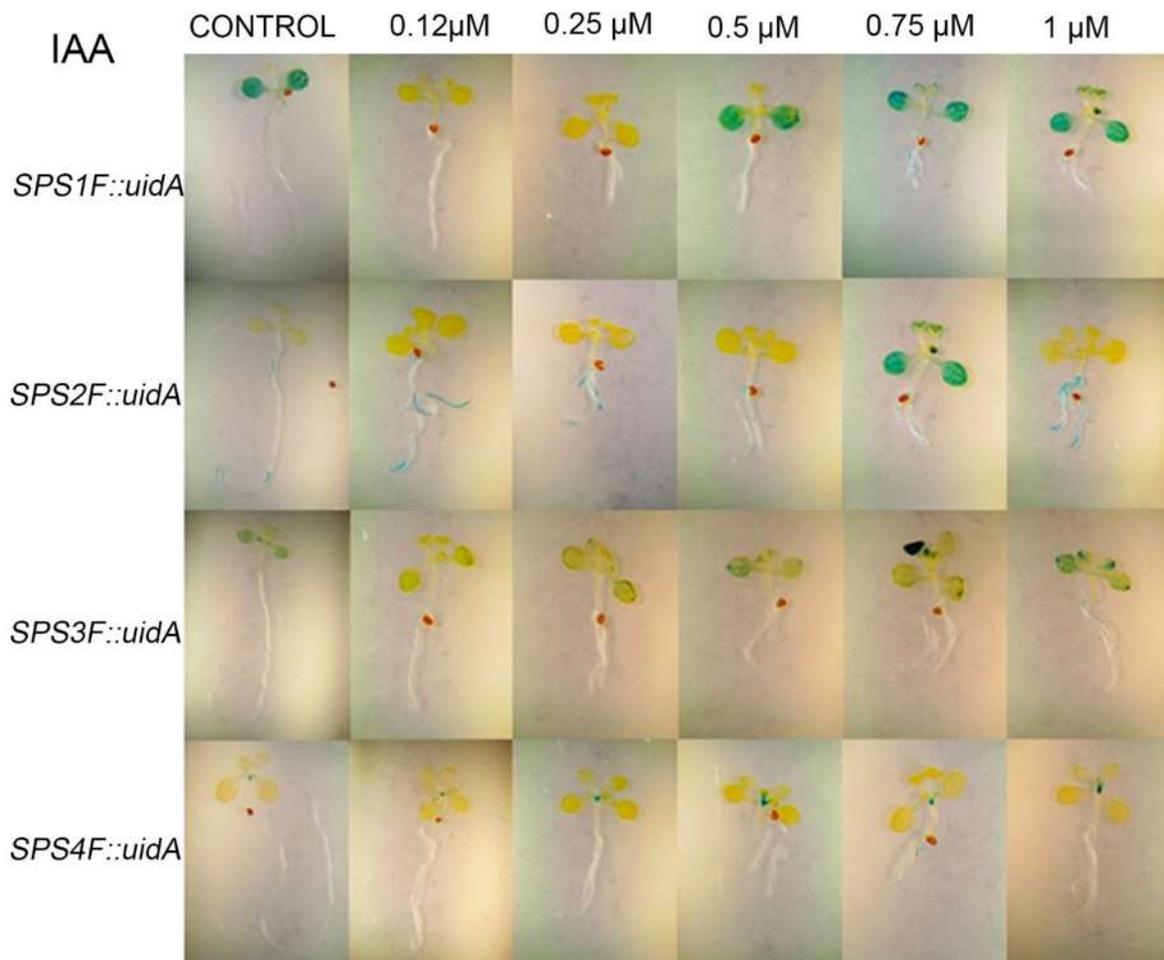


Figura 22. Expresión de los cuatro genes *SPS* presentes en *A. thaliana* cuando se suplementó IAA. Al medio MS se le añadieron 5 concentraciones diferentes de IAA: 0 μ M, 0.12 μ M, 0.25 μ M, 0.5 μ M, 0.75 μ M y 1 μ M y en él posteriormente se sembraron semillas de las líneas reporteras *SPS* de *A. thaliana*. De izquierda a derecha se muestra el incremento de las concentraciones de IAA.

Al suplementar NAA de manera exógena, los resultados fueron los siguientes:

De manera general, fenotípicamente se observa que a manera que la dosis suplementada se incrementa, la longitud de la raíz primaria decrece y aumenta el número de pelos radiculares y raíces laterales, de manera similar a lo observado con IAA (Figura 23).



Figura 23. Representativa de crecimiento para los genes *SPS* de *A. thaliana* al suplementar NAA. Se desinfectaron y sembraron semillas suplementando la auxina NAA de manera exógena a cinco concentraciones: 0 μM , 0.12 μM , 0.25 μM , 0.5 μM , 0.75 μM y 1 μM . Lo anterior acorde a lo descrito en materiales y métodos.

En lo referente a la expresión (Figura 24), en los cuatro genes se observó un cambio de expresión en comparación con la planta control. Para *SPS1F::uidA* y *SPS2F::uidA* la expresión del gen en raíz aumenta conforme la concentración es más alta (0.75 μM y 1 μM). Para el gen *SPS3F::uidA*, la expresión disminuye en hojas y aumenta en el meristemo del tallo a manera dosis dependiente. Mientras que para *SPS4F::uidA*, se logra observar una expresión en el meristemo de la raíz y raíces laterales, lo cual no ha sido documentado como algo característico del gen; además de que se muestra un incremento de expresión en el meristemo del tallo en las concentraciones más elevadas (0.75 μM y 1 μM).

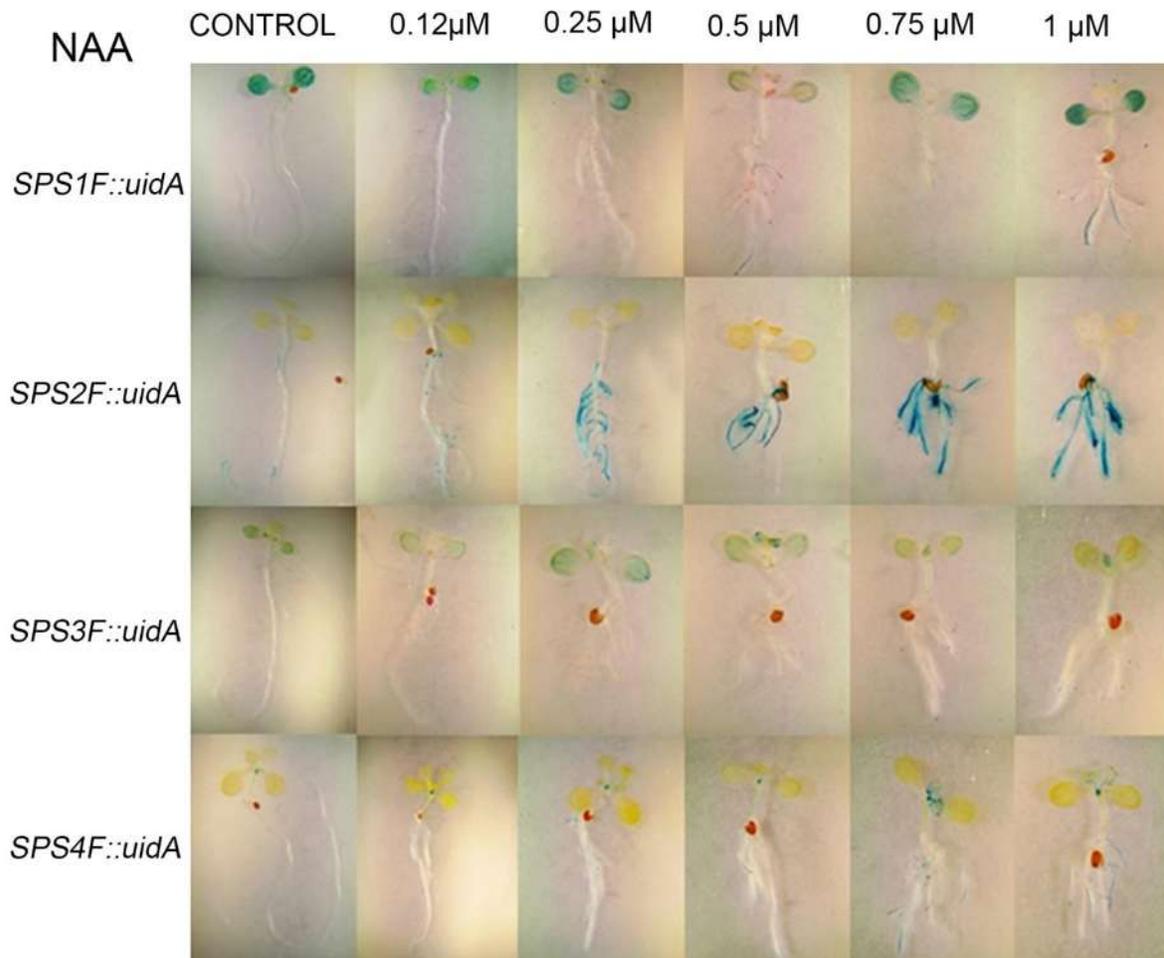


Figura 24. Efecto del NAA en la expresión de los genes *SPS* en *A. thaliana*. Acorde a materiales y métodos se sembraron semillas de las cuatro líneas reporteras *SPS* de *A. thaliana* en medio MS suplementado con 5 diferentes concentraciones de NAA: 0 μ M, 0.12 μ M, 0.25 μ M, 0.5 μ M, 0.75 μ M y 1 μ M. A los 12 días de crecimiento fueron teñidas por métodos histoquímicos y posteriormente analizadas al microscopio. El incremento de las concentraciones está representado de izquierda a derecha para cada una de las líneas reporteras *SPS*.

Con base en nuestros resultados, se puede observar que el patrón de expresión de los genes *SPS* es diferente cuando las auxinas se aplican de manera exógena con relación a cuando se presenta una mutación específica en la vía de señalización de auxina, lo cual era de esperarse. Mientras que en una mutante se afecta ya sea la recepción de la hormona, un factor de transcripción, un represor de transcripción o el transporte, que conllevan a una modificación específica en la cantidad y distribución de la auxina, en la aplicación exógena la auxina está presente en un exceso y puede imponerse sobre el mecanismo de señalización. Es

decir, las células y sus genes al estar en contacto con suficiente auxina, tienen una respuesta en esas condiciones. Se puede sugerir que, al final de cuentas, los promotores de los genes *SPS1* y *SPS2* incrementan su expresión cuando hay suficiente auxina, mientras que *SPS3* y *SPS4* no se ven afectados de manera notable con el incremento de auxina.

En las secciones anteriores, se observó que en el caso de *SPS1::uidA/35S::YUCCA4* hubo una disminución de expresión del gen reportero; mientras que en *SPS1::uidA* al suplementar NAA y IAA se observó un incremento de expresión del mismo. Lo mismo sucede con *SPS2::uidA/35S::YUCCA4* donde se pierde la expresión del gen en raíz y por el contrario; con IAA y NAA incrementa, siendo más notorio para NAA. En teoría, esperaríamos que en la línea sobre expresora *35S::YUCCA4* también se incrementara la expresión de *SPS1* y *SPS2*; sin embargo, hay que considerar que el incremento de auxina en *35S::YUCCA4* es en los sitios de síntesis y todavía se requiere el transporte de la hormona para llegar a las otras partes de la planta.

En la línea *SPS3::uidA/35S::YUCCA4* (Figura 19) la expresión del gen no tiene cambios notables con relación al control, lo que se confirma con la expresión conferida por el promotor de *SPS3* en los medios suplementados con IAA y NAA. En cambio, en la línea *SPS4::uidA/35S::YUCCA4* (Figura 20) hay un incremento en la expresión en los brotes del tallo, al igual que cuando hay suplementos de IAA y NAA, lo cual es concordante; y, adicionalmente, en los medios suplementados con las hormonas también se incrementa la expresión en la raíz.

De manera general, se puede concluir que la expresión conferida por los promotores de los genes *SPS1* y *SPS2* se ve incrementada de forma notable con la presencia exógena de auxinas, mientras que los incrementos son más débiles para la expresión conferida por los promotores *SPS3* y *SPS4*. Estos efectos fueron más acentuados con NAA con respecto a IAA, debido posiblemente a la mayor estabilidad de NAA.

7.3. Efecto de auxinas exógenas en el crecimiento y desarrollo de la línea *35S::YUCCA4*

Para conocer el efecto de las auxinas exógenas en el desarrollo de la línea sobre productora de auxinas *35S::YUCCA4*, se adicionaron diferentes concentraciones de IAA y NAA a los medios de crecimiento (0 μM , 0.12 μM , 0.25 μM , 0.5 μM , 0.75 μM y 1 μM). Los resultados obtenidos muestran que al añadir IAA, la longitud de la raíz primaria disminuyó y aumentó el número de pelos radiculares y las raíces laterales. (Figura 25).

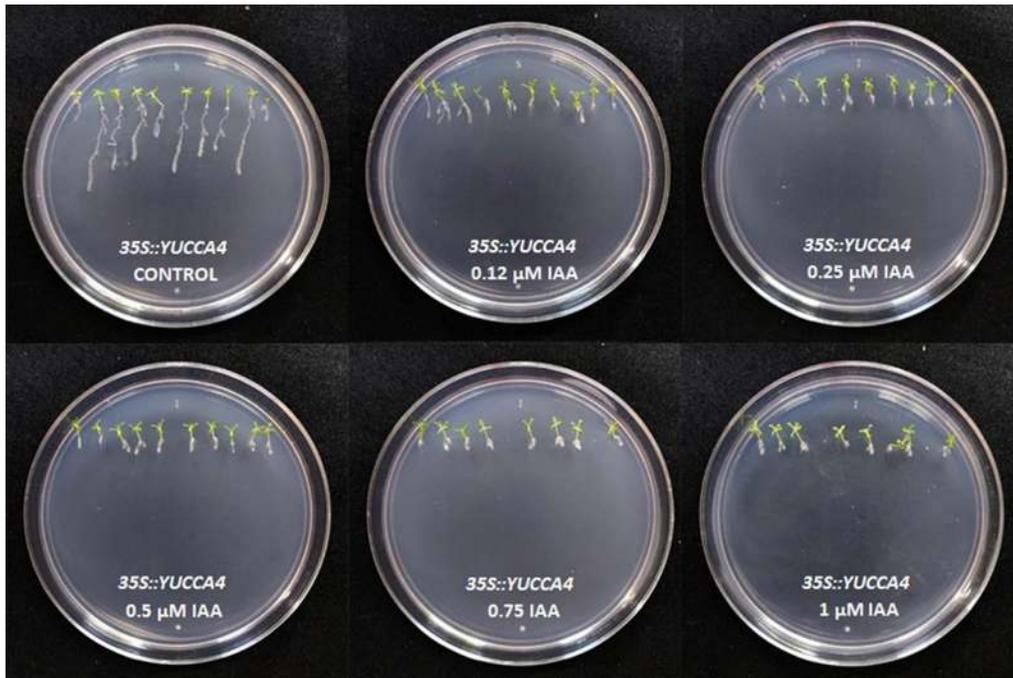


Figura 25. Efecto del IAA en el crecimiento y desarrollo de plantas de *A. thaliana 35S::YUCCA4*. Se desinfectaron y sembraron semillas de la línea mutante de la vía de señalización de auxinas *35S::YUCCA4* en medio MS al cual le fue añadido la auxina IAA a diversas concentraciones: : 0 μM , 0.12 μM , 0.25 μM , 0.5 μM , 0.75 μM y 1 μM , donde además se incluyó un control. Todo lo anterior se hizo en base a lo descrito en materiales y métodos.

Cuando se añadió NAA, se observó una afectación en el fenotipo a manera dosis dependiente para la raíz y la hoja. Dicha afectación representó en la raíz una disminución de la longitud de la raíz primaria y a la vez conllevó al incremento de pelos radiculares y de raíces adventicias. Para la hoja desencadenó un menor vigor en las dosis más altas 0.75 μM y 1 μM (Figura 26).

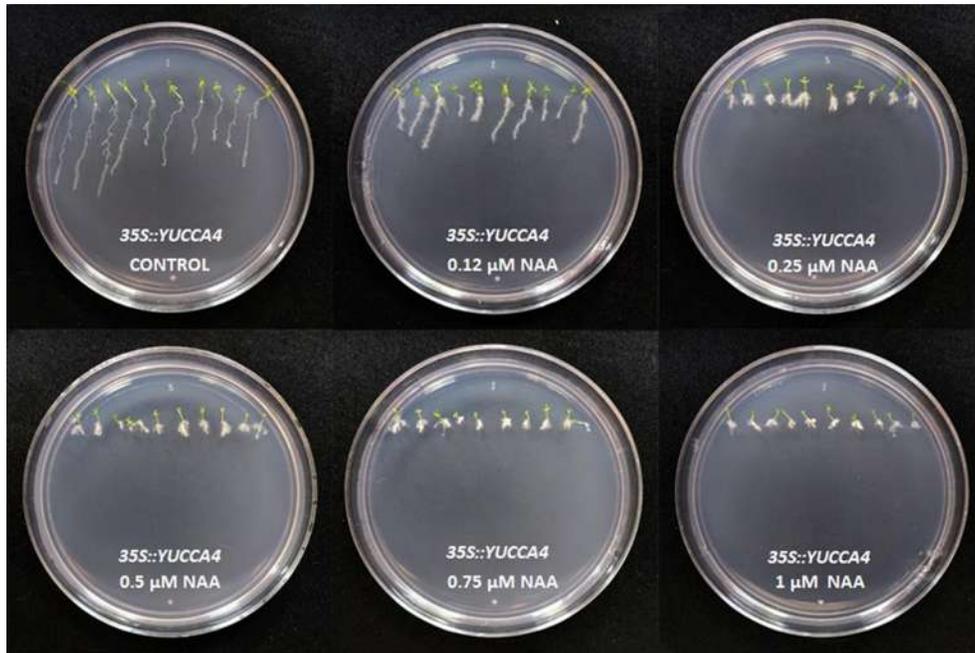


Figura 26. Efecto de NAA sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de 35S::YUCCA4. Semillas de 35S::YUCCA4 fueron desinfectadas y sembradas en medio MS al cual se le suplementó la auxina NAA de manera exógena a cinco concentraciones: 0 μM , 0.12 μM , 0.25 μM , 0.5 μM , 0.75 μM y 1 μM incluyendo además un control. Lo anterior se hizo acorde a lo descrito en materiales y métodos.

8. DISCUSIÓN

Las plantas poseen una gran plasticidad fenotípica entre las características que les permiten sobrevivir. Gracias a ello, tienen la posibilidad de adaptarse a su medio y las condiciones cambiantes y desafiantes que se les presentan, tanto de manera biótica como abiótica (Forbe y Lorenzo 2001). Se ha reportado que la sacarosa está involucrada en diferentes aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas; y, aunado a ello, se sabe que responde ante diversos tipos de estrés, como el frío y el estrés osmótico (Lutfiyya *et al.* 2007; Solís-Guzmán *et al.* 2017). Adicionalmente, y de manera específica, la enzima SPS es la pieza clave que regula la asimilación del carbono y la repartición de fotoasimilados entre la sacarosa y el almidón (Choudhury *et al.* 2008).

La comprensión y el análisis de las fitohormonas ha permitido llevar a cabo el mejoramiento de las condiciones asociadas al crecimiento y desarrollo de las plantas; incluidos la producción de diferentes metabolitos secundarios, los tiempos de crecimiento, la reacción ante agentes patógenos e inclusive procesos específicos como la maduración de frutos y la fotosíntesis. Esto ha permitido que se potencialice el proceso de cultivo ante las problemáticas agrícolas actuales y la demanda mundial de alimentos (Alcántara-Cortes *et al.* 2019).

Para profundizar en el efecto que generan las mutaciones en la vía de señalización auxínica sobre la biosíntesis de sacarosa y, a su vez, cómo esto afecta el crecimiento y desarrollo de plantas de *A. thaliana*, se analizó el cambio del patrón de expresión conferido por los promotores de los genes *SPS* utilizando una fusión al marcador genético *uidA*. De esta forma se generaron cruza entre las 4 líneas reporteras de genes *SPS* y diferentes líneas mutantes de la señalización de auxinas, incluida una línea sobreexpresora de la hormona. Así mismo, se analizó el efecto que genera la aplicación de auxinas exógenas, en diferentes concentraciones, en el patrón de expresión de los genes *SPS*.

8.1. Existen diferencias en el patrón de expresión de los genes *SPS* de *A. thaliana* bajo los diferentes fondos mutantes de la vía de señalización auxínica.

Hay varios trabajos en los cuales se ha constatado el efecto que los azúcares ejercen sobre los diferentes aspectos implicados en la regulación de auxinas. En el caso particular de *A. thaliana*, se ha documentado que al suplementar el medio de crecimiento con sacarosa hay un incremento en los niveles de auxinas y su transporte polar (Lilley *et al.* 2012). De igual manera, la sacarosa promueve la señalización y el metabolismo de auxinas en respuesta a varios estímulos

ambientales como la deficiencia de hierro (Lin *et al.* 2016). Sin embargo, poco ha sido estudiado respecto a cómo las auxinas pueden influir en la expresión de diversos factores que conlleven a una regulación de azúcares como la sacarosa.

Los resultados descritos en este trabajo describen la caracterización del patrón de expresión de diferentes cruzas realizadas entre los 4 genes *SPS* y las mutantes de la vía de señalización de auxinas (Figura 27).

La familia de genes *SPS* ha sido identificada en varias especies de plantas, entre las que se pueden incluir especies de interés comercial como el arroz (*Oryza sativa*), el cual presenta 5 genes *SPS*; el maíz (*Zea Mays*) con 7 genes *SPS* (Lutfiyya *et al.* 2007); y el banano (*Musa acuminata*) con un gen *SPS* (Choudhury *et al.* 2008), entre otros.

A. thaliana presenta 4 genes *SPS*. Previamente se determinó que al silenciarse un solo gen en *A. thaliana* no se compromete la viabilidad de la planta. Sin embargo, al producirse mutantes dobles, triples y cuádruples se mostraron cambios que contribuyeron de manera negativa a diferentes procesos de crecimiento y desarrollo. Lo anterior demuestra que los 4 genes *SPS* de *A. thaliana* trabajan de manera conjunta y que, a pesar de que presentan traslapes de su expresión en los diferentes órganos y tejidos, se encuentran regulando el proceso de síntesis de sacarosa. Además, se ha mencionado que en caso de que alguno no presente las condiciones para expresarse, de alguna manera alguno de sus homólogos puede llegar a suplir su función, permitiendo así la sobrevivencia de la planta (Bahaji *et al.* 2015).

Aunado a lo anterior, se ha estudiado el patrón de expresión y función conferida por dichos genes en diferentes contextos. A pesar de ello, hasta la fecha y pese a su importancia, no se han llevado a cabo suficientes investigaciones previas sobre el efecto que las auxinas desencadenan sobre los azúcares y en la expresión de los genes *SPS*.

En nuestra búsqueda, encontramos un reporte que hace alusión sobre cómo las auxinas, de manera específica dos factores de transcripción (ARF7 y ARF8), influyen en la expresión del transportador de sacarosa *RhSUC2* durante la abscisión de pétalos en la rosa; logrando modular con ello el diámetro de la flor y los pétalos de manera positiva, así como los tiempos de abscisión de la flor. Los autores mencionan, además, que la respuesta de *RhSUC2* puede variar dependiendo del estadio de desarrollo del órgano o tejido en presencia de auxina. Lo que en conjunto nos da un preámbulo de como las auxinas influyen en el transporte de sacarosa y desencadenan cambios en la planta (Liang *et al.* 2020).

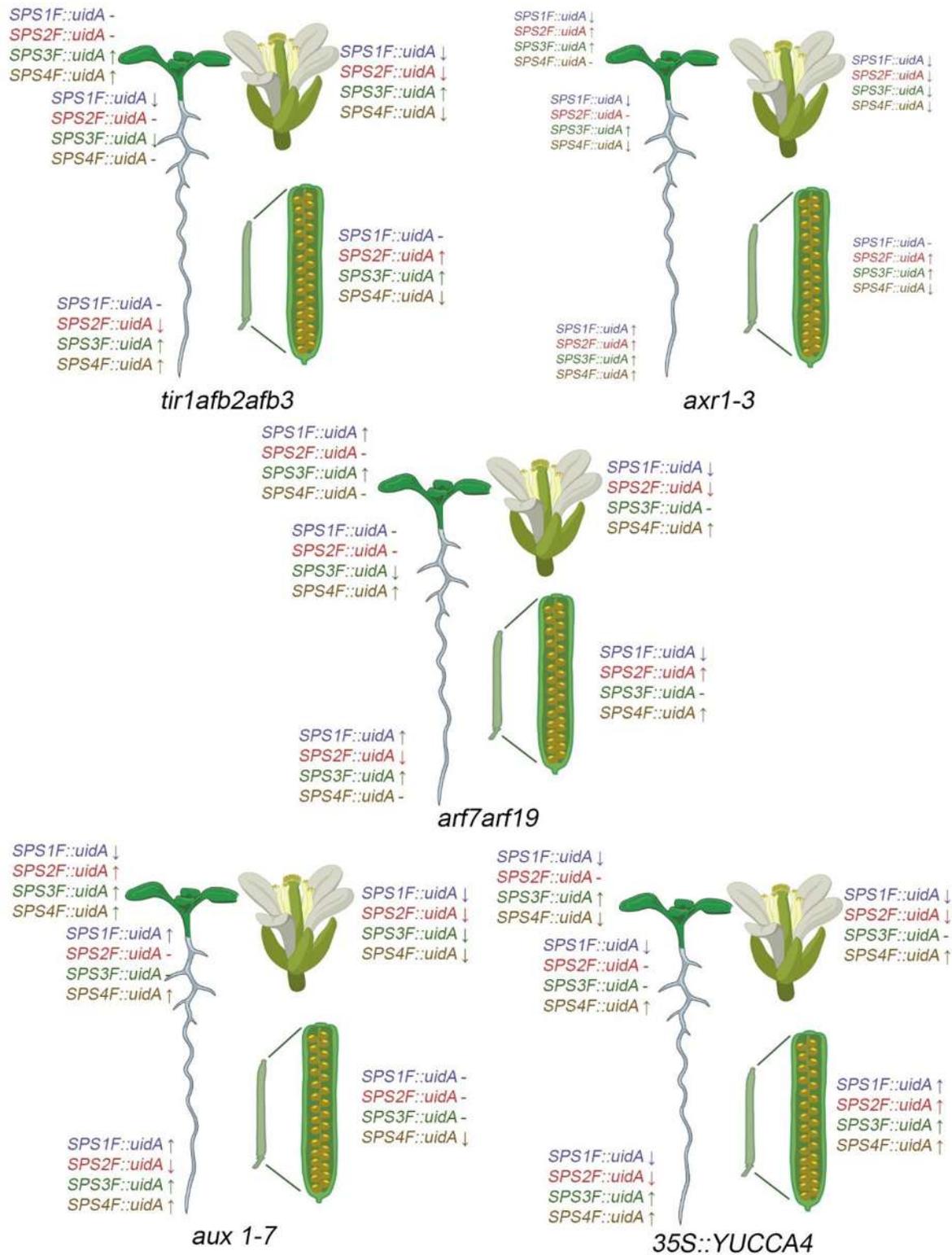


Figura 27. Tendencia del cambio en el patrón de expresión de los genes SPS en cruz con las mutantes de señalización de auxinas. Se realizaron tinciones histoquímicas conforme a lo mostrado en el apartado de resultados para nuestras cruza obtenidas. ↑= Se logró observar un incremento de expresión. -= la expresión fue similar al control. ↓= Se logró observar una disminución de expresión de los genes.

Lo anterior puede ser trasladado a nuestros resultados, en donde podemos mencionar que, aunque *RhSUC2* es un factor implicado en el transporte de sacarosa, es probable que las auxinas también desencadenen cambios similares en factores involucrados en el proceso de biosíntesis de la misma, como los genes *SPS*, y que de igual manera la respuesta pueda variar dependiendo del órgano involucrado, su etapa de desarrollo y, posiblemente, el gen *SPS* en cuestión; de esta forma, se obtendría algo similar a lo demostrado con *RhSUC2*, en donde su expresión disminuyó en los capullos de la flor, pero se incrementó en la flor adulta ante el efecto de las auxinas (Liang *et al.* 2020). Esto es concordante con la variación entre los cambios del patrón de expresión de las cruzas generadas entre las líneas reporteras de los diferentes genes *SPS* con *arf7arf19*. Sin embargo, aún se requieren más estudios en donde se pueda analizar la expresión de nuestras cruzas a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo de los tejidos y órganos analizados a fondo.

También se ha reportado que varios ARF (*ARF1*, *ARF2*, *ARF7* y *ARF19*) contribuyen a la abscisión del meristemo floral en *A. thaliana*, pero que, en conjunto, los tratamientos de auxinas con sacarosa retrasan la abscisión acelerada de la flor. Con ello se explicaría la razón de que en algunas de nuestras cruzas la expresión de las líneas reporteras se presentó en la unión del pedicelo al eje floral y la unión del pedicelo a la valva en el fruto (Ellis *et al.* 2005).

Se ha documentado la inhibición de la síntesis de sacarosa en tratamientos con IAA en el fruto del banano debido a la inhibición de la β -amilasa, pero no de la actividad *SPS* como tal. Sin embargo, en nuestros resultados podemos observar que en algunas de nuestras cruzas, como lo fue el caso de nuestra línea reportera *SPS1F::uidA* y la línea sobreproductora de auxinas *35S::YUCCA4*, la expresión de *SPS* disminuyó, lo que podría sugerir que, al menos en el caso de *Arabidopsis* en tratamientos con determinada concentración de IAA, la síntesis de sacarosa mediante la participación de *SPS* también se ve afectada negativamente (Choudhury *et al.* 2008).

Es importante mencionar que el banano sólo posee un gen *SPS* y que lo que observamos en *SPS1F::uidA/35S::YUCCA4* arroja resultados similares al mostrar una disminución en la expresión del gen. Sin embargo, debido a lo anterior, no necesariamente este comportamiento se replicó con los otros genes *SPS*, ya que el gen *SPS1F::uidA* es el gen *SPS* principal y a juzgar por nuestros resultados es el gen *SPS* que parece estar presente en el banano, debido a que conforme a lo observado posiblemente la función y estructura entre ambos genes *SPS* son muy similares y por lo tanto muestran patrones de comportamiento parecidos.

Aunado a lo anterior, en el banano también se observó que en tratamientos de IAA en diferentes partes de la planta se estimuló levemente la síntesis de sacarosa vía el gen *SPS*, lo que nos ayuda a entender lo ocurrido en nuestras líneas donde hay un incremento en la expresión de los 4 genes *SPS* de *A. thaliana*, de manera débil o muy similar a la planta control en la mayoría de los casos (Choudhury *et al.* 2008).

Por otra parte, el tomate es el claro ejemplo de cómo en una misma especie un ARF diferente puede desencadenar una respuesta contraria. En esta planta se ha mencionado que ARF4 regula de manera negativa la expresión de genes dependientes de auxinas, lo que es similar a nuestros resultados de tinción en la flor y fruto de *SPS1F::uidA/arf7arf19*, donde a pesar de no ser el mismo ARF, los resultados sugerirían que varios ARF desencadenan un efecto negativo en la síntesis de sacarosa. Por otro lado, un gen que codifica para ARF6 del tomate puede regular de manera positiva diferentes procesos mediante la expresión de genes implicados en ello, como el metabolismo de la clorofila, la fotosíntesis, el incremento de los niveles de diferentes azúcares como la fructosa, sacarosa y glucosa en el desarrollo del fruto. Esto se logró observar en nuestra investigación con un incremento de expresión leve para el fruto de *SPS2F::uidA/arf7arf19* y el tallo y flor de *SPS4F::uidA/arf7arf19*. Lo anterior sugeriría que, al igual que sucede en otras especies vegetales, en *A. thaliana* las cruces con la mutante doble de *arf7arf19* desencadenaron respuestas positivas y negativas en la expresión de los genes *SPS* dependiendo del gen en cuestión (Yuan *et al.* 2019; Mishra *et al.* 2021).

8.2. El crecimiento de las plantas en diferentes concentraciones de auxinas exógenas sensibiliza a las líneas reporteras *SPS* y la mutante *35S::YUCCA4* de *A. thaliana*, lo que posteriormente origina una mayor emergencia de raíces laterales.

Se ha documentado que diferentes auxinas juegan un papel muy importante en la emergencia de las raíces laterales, ya que estimulan su formación; un ejemplo de ello son el IAA y NAA. De igual manera, se ha podido confirmar lo anterior al utilizar inhibidores de transporte polar de auxinas, generando con ello un menor número de raíces laterales en dichas plantas. De manera concordante, se ha reportado que plantas con alguna mutación que le confiera un incremento en los niveles de auxinas, originan una mayor emergencia de raíces laterales. De manera contraria, plantas con algún déficit en el transporte, señalización o percepción de auxinas como las líneas *axr1*, *aux1*, *tir3* y *arf7/arf19* muestran un menor número de raíces laterales (Raya-González *et al.* 2012).

Lo descrito anteriormente concuerda con nuestros resultados al añadir de forma exógena los dos diferentes tipos de auxinas a diferentes concentraciones, en donde se observó que, a manera dosis dependiente, se dio un incremento en el número de raíces laterales para las líneas reporteras *SPS* y la línea mutante *35S::YUCCA4* (Figura 28).

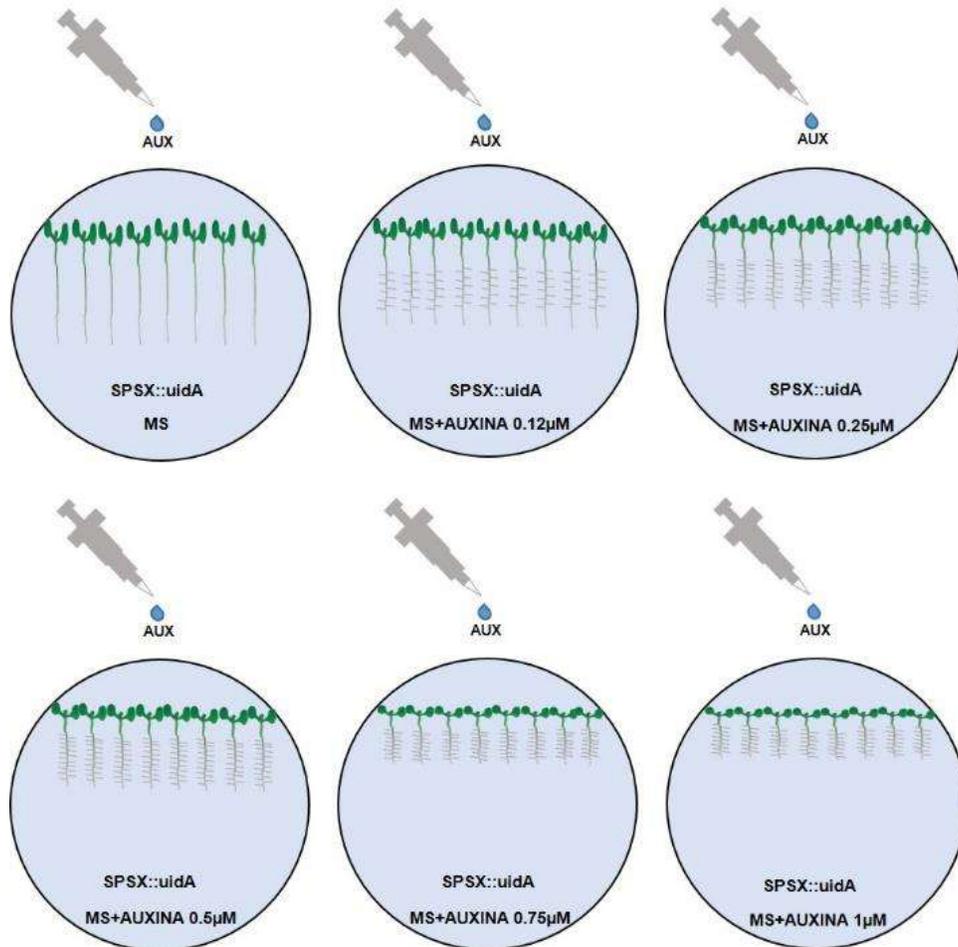


Figura 28. Representación del comportamiento fenotípico las líneas reporteras *SPS* al añadir IAA/NAA. Conforme a lo descrito en materiales y métodos fueron suministradas 2 auxinas de manera exógena a las líneas reporteras *SPS* de *A. thaliana*, en donde se observó un incremento en el número de raíces laterales a manera dosis dependiente.

Aunado a lo anterior, se ha reportado que en la línea *DR5::uidA* y la mutante *hpr1* (*halted primary root1*) de *A. thaliana* la longitud de la raíz primaria disminuyó al serle suplementada IAA de 10 a 160 nM, con base en la dosis suministrada, lo cual se correlacionó con la formación de pelos radiculares largos en la punta de la raíz debido a la muerte temprana de las células provasculares en *hpr1*. Esto generó un incremento de la expresión en *DR5::uidA* para la columnella de la raíz, lo que indicó

que estas líneas son sensibles a los cambios en los niveles de auxinas (Raya-González *et al.* 2019).

Con base en lo anterior, nuestros resultados sugieren que líneas reporteras *SPS* se afectan al incrementarse la cantidad de auxina en el medio, originándose, posiblemente, la muerte temprana de células provasculares y conllevando a la formación de pelos radiculares. La correlación entre la muerte de las células de la provasculatura con la señalización de auxinas es un tema que apenas comienza a ser investigado. Sin embargo, aunque aún no se ha mencionado cómo puede esto afectar la biosíntesis de sacarosa, nuestros resultados sugieren que al haber un cambio en la cantidad de auxinas conlleva a un efecto en la cantidad de carbohidratos dentro de la planta, lo que pudiera deberse a la muerte de células de la provasculatura, pero los mecanismos o factores involucrados aún necesitan ser descubiertos.

Lo anterior confirma que existe una relación entre los azúcares y las fitohormonas, lo que en conjunto produce cambios dentro de la planta. Se ha que la señalización de auxinas modula el metabolismo del azúcar durante diferentes etapas del desarrollo en distintas especies vegetales. Sin embargo, cuando se presentan concentraciones muy elevadas de auxina, éstas pueden afectar el crecimiento y desarrollo de la planta como sucede en *DR5:uidA* y *hpr1*. Es entonces, cuando posiblemente la planta comienza a sintetizar una mayor cantidad de azúcares para tratar de contrarrestar dicho efecto y poder sobrevivir (Mishra *et al.* 2021).

Por último, logramos observar que a manera dosis dependiente, la expresión de los genes *SPS* en la mayoría de los casos se vio afectada de manera positiva, presentándose un incremento. Sin embargo, en el caso del gen reportero *SPS3F::uidA*, se observó un efecto opuesto entre IAA y NAA, lo puede deberse a que NAA como tal es una auxina sintética y lo que la hace más estable. También puede deberse a su estructura diferente lo que puede hacer que se a una combinación diferente de receptores y active una cascada distinta que no use *SPS3*.

Los resultados anteriores refuerzan la muy amplia y aún no del todo descrita respuesta diferencial que puede existir entre la diafonía auxinas-azúcares en las plantas. Sin embargo, aún existen muchas interrogantes que surgen de éste trabajo y las cuales posteriormente nos permitan comprender de una manera más propia ésta interacción, por lo que se requiere de la realización de estudios que profundicen dicha interacción.

9. CONCLUSIONES

- La expresión conferida por los promotores de los genes *SPS* presenta cambios en algunas mutantes de la vía de señalización de auxinas, sin ser iguales entre los diferentes genes *SPS*, por lo que se sugiere una regulación diferencial.
- Las concentraciones de IAA y NAA exógenas, de manera dependiente de la dosis, reducen el crecimiento de la raíz primaria e incrementan la formación de raíces laterales, tanto en el fondo silvestre como en la mutante sobreexpresora de auxina.
- La exposición a concentraciones crecientes de auxinas exógenas produce un incremento en la expresión de los 4 genes *SPS* de *A. thaliana*, con mayor intensidad en las líneas *SPS1::uidA* y *SPS2::uidA* y, de forma menos notable, en *SPS3::uidA* y *SPS4::uidA*.

REFERENCIAS

- Alcántara-Cortes, J. S., Godoy-Acero, J., Alcántara-Cortés, J. D., & Sánchez-Mora, R. M. (2019). Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, 17(32), 109-129. Retrieved January 07, 2022, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702019000200109&lng=en&tIng=es
- Amasino R. (2010). Seasonal and developmental timing of flowering. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(6), 1001–1013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04148.x>
- Bahaji, A., Baroja-Fernández, E., Ricarte-Bermejo, A., Sánchez-López, Á. M., Muñoz, F. J., Romero, J. M., Ruiz, M. T., Baslam, M., Almagro, G., Sesma, M. T., & Pozueta-Romero, J. (2015). Characterization of multiple SPS knockout mutants reveals redundant functions of the four Arabidopsis sucrose phosphate synthase isoforms in plant viability, and strongly indicates that enhanced respiration and accelerated starch turnover can alleviate the blockage of sucrose biosynthesis. *Plant science: an international journal of experimental plant biology*, 238, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.009>
- Baud, S., Vaultier, M. N., & Rochat, C. (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 55(396), 397-409. doi:10.1093/jxb/erh047
- Beltrán-Peña, E. M., Magaña Dueñas, V., & López Bucio, J. (2015). El transporte de auxinas y su impacto sobre el desarrollo vegetal. *Ciencia Nicolaita*, (64), 22-41. Recuperado a partir de <https://www.cic.cn.umich.mx/cn/article/view/209>
- Benjamins R, Scheres B (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* 59:443-465
- Calderon-Villalobos LI, Tan X, Zheng N, Estelle M (2010) Auxin perception—structural insights *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a005546.
- Choudhury, S. R., Roy, S., & Sengupta, D. N. (2008). Characterization of transcriptional profiles of MA-ACS1 and MA-ACO1 genes in response to ethylene, auxin, wounding, cold and different photoperiods during ripening in banana fruit. *Journal of plant physiology*, 165(18), 1865–1878. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.012>
- Cordoba, E., Aceves-Zamudio, D. L., Hernández-Bernal, A. F., Ramos-Vega, M., & León, P. (2015). Sugar regulation of SUGAR TRANSPORTER PROTEIN 1 (STP1) expression in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, 66(1), 147-159. doi:10.1093/jxb/eru394
- Curatti, L., Folco, E., Desplats, P., Abratti, G., Limones, V., Herrera-Estrella, L., & Salerno, G. (1998). Sucrose-Phosphate Synthase from identification of the gene and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(24), 6776.
- Davies, P.J. (2010) *Plant hormones biosynthesis, Signal Transduction, Action!*. Substantially revised 3rd edition. USA.

- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor *Nature* 435:441-445.
- De Smet, S., Cuypers, A., Vangronsveld, J., & Remans, T. (2015). Gene Networks Involved in Hormonal Control of Root Development in *Arabidopsis thaliana*: A Framework for Studying Its Disturbance by Metal Stress. *International journal of molecular sciences*, 16(8), 19195–19224. <https://doi.org/10.3390/ijms160819195>
- Di Mambro, R., & Sabatini, S. (2018). Developmental Analysis of Arabidopsis Root Meristem. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1761, 33–45. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7747-5_3
- Deng, Y., Yu, Y., Hu, Y., Ma, L., Lin, Y., Wu, Y., Wang, Z., Wang, Z., Bai, J., Ding, Y., & Chen, L. (2021). Auxin-Mediated Regulation of Dorsal Vascular Cell Development May Be Responsible for Sucrose Phloem Unloading in Large Panicle Rice. *Frontiers in plant science*, 12, 630997. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.630997>
- Dong, Y., & Østergaard, L. (2019). Fruit development and diversification. *Current biology: CB*, 29(16), R781–R785. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.07.010>
- Du, Y., & Scheres, B. Lateral root formation and the multiple roles of auxin, *Journal of Experimental Botany*, Volume 69, Issue 2, 5 January 2018, Pages 155–167, <https://doi.org/10.1093/jxb/erx223>
- Ellis, C. M., Nagpal, P., Young, J. C., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., & Reed, J. W. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR1 and AUXIN RESPONSE FACTOR2 regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)*, 132(20), 4563–4574. <https://doi.org/10.1242/dev.02012>
- Fichet, T. (octubre 2019). *Ampliando el conocimiento y usos de las auxinas de síntesis en frutales*. Redagrícola. Online <https://www.redagricola.com/cl/ampliando-el-conocimiento-y-usos-de-las-auxinas-de-sintesis-en-frutales/> Último acceso: 25/11/21 13:09 hrs.
- Forbe, B., & Lorenzo, H. (2001). The nutritional control of root development. *Plant and Soil* 232: 51-68.
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis the *Plant Journal* 29:153-168.
- Garay-Arroyo, Adriana, de la Paz Sánchez, María, García-Ponce, Berenice, Álvarez-Buylla, Elena R., & Gutiérrez, Crisanto. (2014). La Homeostasis de las Auxinas y su Importancia en el Desarrollo de Arabidopsis Thaliana. *REB. Revista de educación bioquímica*, 33(1), 13-22. Recuperado en 13 de mayo de 2020, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-19952014000100003&lng=es&tlng=es.
- García-Breijo, J.F. (2003). *Silicuas*. Online http://www.euita.upv.es/VARIOS/BIOLOGIA/Web_Frutos/Silicuas.htm. Último acceso 23/11/2021 13:44hrs.
- García-González, J., Lacey, J., & Retzer, K. (2021). Dissecting Hierarchies between Light, Sugar and Auxin Action Underpinning Root and Root Hair Growth. *Plants (Basel, Switzerland)*, 10(1), 111. <https://doi.org/10.3390/plants10010111>

- Gómez, M. D., Vera-Sirera, F., & Pérez-Amador, M. A. (2014). Molecular programme of senescence in dry and fleshy fruits. *Journal of experimental botany*, 65(16), 4515–4526. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru093>
- Hayashi K (2012) The Interaction and Integration of Auxin Signaling Components Plant and Cell Physiology 53:965-975.
- Huber, S. C., & Huber, J. L. (1996). ROLE AND REGULATION OF SUCROSE-PHOSPHATE SYNTHASE IN HIGHER PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47, 431-444. doi:10.1146/annurev.arplant.47.1.431
- Irish V. F. (2010). The flowering of Arabidopsis flower development. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 61(6), 1014–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04065.x>
- Jiang, S.-Y., Chi, Y.-H., Wang, J.-Z., Zhou, J.-X., Cheng, Y.-S., Zhang, B.-L., Ramachandran, S. (2015). Sucrose metabolism gene families and their biological functions. *Scientific Reports*, 5(1), 17583. doi:10.1038/srep17583
- Khan Academy. (2017). *Carbohidratos*. <https://es.khanacademy.org/science/ap-biology/chemistry-of-life/properties-structure-and-function-of-biological-macromolecules/a/carbohydrates>. Último acceso: 22/11/21 3:48 hrs.
- Liang, Y., Jiang, C., Liu, Y., Gao, Y., Lu, J., Aiwailli, P., Fei, Z., Jiang, C. Z., Hong, B., Ma, C., & Gao, J. (2020). Auxin Regulates Sucrose Transport to Repress Petal Abscission in Rose (*Rosa hybrida*). *The Plant cell*, 32(11), 3485–3499. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00695>
- Libao, C., Minrong, Z., Zhubing, H., Huiying, L., & Shuyan, L. (2020). Comparative transcriptome analysis revealed the cooperative regulation of sucrose and IAA on adventitious root formation in lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn). *BMC genomics*, 21(1), 653. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07046-3>
- Lilley, J. L., Gee, C. W., Sairanen, I., Ljung, K., & Nemhauser, J. L. (2012). An endogenous carbon-sensing pathway triggers increased auxin flux and hypocotyl elongation. *Plant physiology*, 160(4), 2261–2270. <https://doi.org/10.1104/pp.112.205575>
- Lincoln C, Britton JH, Estelle M (1990) Growth and development of the *axr1* mutants of Arabidopsis. *Plant Cell* 2:1071–1080
- Lin, X. Y., Ye, Y. Q., Fan, S. K., Jin, C. W., & Zheng, S. J. (2016). Increased Sucrose Accumulation Regulates Iron-Deficiency Responses by Promoting Auxin Signaling in Arabidopsis Plants. *Plant physiology*, 170(2), 907–920. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01598>
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G (2009) Sites and homeostatic control of auxin by osinthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant Journal* 28:465-474.
- Lutfiyya, L. L., Xu, N., D'Ordine, R. L., Morrell, J. A., Miller, P. W., & Duff, S. M. (2007) Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants. *J Plant Physiol*, 164(7), 923-933.
- Arabidopsis thaliana sucrose phosphate synthase (SPS) genes are expressed differentially in organs and tissues, and their transcription is regulated by osmotic stress. *Gene*

expression patterns : GEP, 25-26, 92–101.
<https://doi.org/10.1016/j.gep.2017.06.001>

- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development (Cambridge, England)*, 124(1), 33–44.
- Ma, P., Zhang, X., Chen, L., Zhao, Q., Zhang, Q., Hua, X., Wang, Z., Tang, H., Yu, Q., Zhang, M., Ming, R., & Zhang, J. (2020). Comparative analysis of sucrose phosphate synthase (SPS) gene family between *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*. *BMC plant biology*, 20(1), 422. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02599-7>
- Megías M, M. P., Pombal MA. (2019). Atlas de histología vegetal y animal. Tejidos vegetales. Retrieved from <https://mmegias.webs.uvigo.es/>. Última consulta 13/05/2020
- Meinke D.W., Cherry M.J., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M., (1998). *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282: 679-682
- Meyerowitz, E. M., & Somerville, C. R. (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 27(Cold Spring Harbor), 1300. Baud, S., Vaultier, M. N., & Rochat, C. (2004). Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 55(396), 397-409. doi:10.1093/jxb/erh047
- Michniewicz M, Zago M.K., AbasL, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler, M.G, Ohno C, Zhang J, Huang F, Schwab R, Weigel D, Meyerowitz E.M, Luschnig C, Offringa R, Friml J. (2007) Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* 130:1044-1056.
- Mishra, B. S., Sharma, M., & Laxmi, A. (2021). Role of sugar and auxin crosstalk in plant growth and development. *Physiologia plantarum*, 10.1111/ppl.13546. Advance online publication. <https://doi.org/10.1111/ppl.13546>
- Mizzotti, C., Rotasperti, L., Moretto, M., Tadini, L., Resentini, F., Galliani, B. M., Galbiati, M., Engelen, K., Pesaresi, P., & Masiero, S. (2018). Time-Course Transcriptome Analysis of *Arabidopsis* Siliques Discloses Genes Essential for Fruit Development and Maturation. *Plant physiology*, 178(3), 1249–1268. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00727>
- Mollwe, B. & Weijers (2009). *Auxin control of embryo patternin*. Cold Spring Harbor. *Perspectives in Biology* 1(5):a001545
- Munguía-Rodríguez A. G. & Martínez-Trujillo M. (2018). *Las auxinas: síntesis, transporte y señalización*. *Biológicas*, 20 (1): 1–7. Recuperado a partir de <https://biologicas.umich.mx/index.php?journal=biologicas&page=article&op=view&path%5B%5D=279&path%5B%5D=444519>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Muroyama, A., & Bergmann, D. (2019). Plant cell polarity: Creating diversity from inside the box. *Annual review of cell and developmental biology*, 35, 309-336.
- Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A., Tasaka M., (2007) ARF7 and AR19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 118-130.

- Paque, S., & Weijers, D. (2016). Q&A: Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC Biology*, 14(1),67. Doi:10.1186/s12915-016-0291-0
- Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Gray D E, Bennett WM, Estelle M M (2009) Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:22540–22545.
- Pickett FB, Wilson AK, Estelle M (1990) The aux1 mutation of Arabidopsis confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiol* 94:1462–1466.
- Raya-González, J., Ortiz-Castro, R., & López-Bucio, J. (2019). Determinate root development in the halted primary root1 mutant of Arabidopsis correlates with death of root initial cells and an enhanced auxin response. *Protoplasma*, 256(6), 1657–1666. <https://doi.org/10.1007/s00709-019-01409-8>
- Raya-González, J., Pelagio-Flores, R., & López-Bucio, J. (2012). The jasmonate receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and lateral root positioning in Arabidopsis thaliana. *Journal of plant physiology*, 169(14), 1348–1358. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.05.002>
- Robert H. S. (2019). Molecular Communication for Coordinated Seed and Fruit Development: What Can We Learn from Auxin and Sugars?. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 936. <https://doi.org/10.3390/ijms20040936>
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 675-709.
- Roycewicz, P., & Malamy, J. E. (2012). Dissecting the effects of nitrate, sucrose and osmotic potential on Arabidopsis root and shoot system growth in laboratory assays. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1595), 1489–1500. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0230>
- Roy Choudhury, S., Roy, S., Das, R., & Sengupta, D. N. (2008). Differential transcriptional regulation of banana sucrose phosphate synthase gene in response to ethylene, auxin, wounding, low temperature and different photoperiods during fruit ripening and functional analysis of banana SPS gene promoter. *Planta*, 229(1), 207–223. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0821-2>
- Ruan, Y. L. (2014). Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65(1), 33-67.
- Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology* 5(5): 301-307; doi: 10.1038/nchembio.165
- Solís-Guzmán MG, Argüello-Astorga G, López-Bucio J, Ruiz-Herrera LF, López-Meza J, Sánchez-Calderón L, Carreón-Abud Y, Martínez-Trujillo M (2017). Expression analysis of the Arabidopsis thaliana AtSpen2 gene, and its relationship with other plant genes encoding Spen proteins. *Genetics and Molecular Biology* 40(3):643-655.
- Sun, D., Zhang, L., Yu, Q., Zhang, J., Li, P., Zhang, Y., Xing, X., Ding, L., Fang, W., Chen, F., & Song, A. (2021). Integrated Signals of Jasmonates, Sugars, Cytokinins and Auxin Influence the Initial Growth of the Second Buds of Chrysanthemum after Decapitation. *Biology*, 10(5), 440. <https://doi.org/10.3390/biology10050440>
- Taiz L & Zeiger E (2006) *Plant physiology* 6th Ed. Sinauer Associates Inc. Usa.

- Teale WD, Paponov IA, Palme K (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 7:847.
- Volkert, K., Debast, S., Voll, L. M., Voll, H., Schiessl, I., Hofmann, J., . . . Bornke, F. (2014). Loss of the two major leaf isoforms of sucrose-phosphate synthase in *Arabidopsis thaliana* limits sucrose synthesis and nocturnal starch degradation but does not alter carbon partitioning during photosynthesis. *J Exp Bot*, 65(18), 5217-5229. doi:10.1093/jxb/eru282
- Winter, H., & Huber, S. C. (2000). Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35(4), 253-289. doi:10.1080/10409230008984165
- Yao, X., Feng, H., Yu, Y., Dong, A., & Shen, W. H. (2013). SDG2-mediated H3K4 methylation is required for proper Arabidopsis root growth and development. *PloS one*, 8(2), e56537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056537>
- Yoshida, S., Barbier de Reuille, P., Lane, B., Bassel, G. W., Prusinkiewicz, P., Smith, R. S. and Weijers, D. (2014). Genetic control of plant development by overriding a geometric division rule. *Dev. Cell* 29, 75-87. doi:10.1016/j.devcel.2014.02.002
- Yuan, Y., Xu, X., Gong, Z., Tang, Y., Wu, M., Yan, F., Zhang, X., Zhang, Q., Yang, F., Hu, X., Yang, Q., Luo, Y., Mei, L., Zhang, W., Jiang, CZ, Lu, W., Li, Z. y Deng, W. (2019). El factor de respuesta de auxina 6A regula la fotosíntesis, la acumulación de azúcar y el desarrollo de frutos en tomate. *Investigación hortícola* , 6 , 85. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-0167-x>
- Zhang, D., Zhang, M., & Liang, J. (2021). RGB1 Regulates Grain Development and Starch Accumulation Through Its Effect on *OsYUC11*-Mediated Auxin Biosynthesis in Rice Endosperm Cells. *Frontiers in plant science*, 12, 585174. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.585174>