



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología



**“Estudio del efecto del ácido fólico sobre el desarrollo de
la raíz de *Arabidopsis thaliana*”**

Tesis que presenta:
p.Q.F.B. JUAN ANGEL AYALA RODRÍGUEZ

Para obtener grado de:
Químico Farmacobiólogo

Director de tesis:
Doctor en Ciencias José López Bucio

Co-director de tesis:
Maestro en Ciencias Salvador Barrera Ortiz

Morelia, Mich., mayo del 2017

Es bueno amar tanto como se pueda, porque ahí radica la verdadera fuerza, y el que mucho ama realiza grandes cosas y se siente capaz, y lo que está hecho con amor está bien hecho.

Vincent van Gogh.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D. en C. José López Bucio y co-asesoría del M. en C. Salvador Barrera Ortiz. Para su realización se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, concesión No. 24315), dentro del proyecto 177775.

Agradecimientos

Para mis padres Rosa Rodríguez y José Ayala, porque un padre no es aquel que da la vida, eso sería demasiado fácil, sino el que da todo su amor para poderte ver feliz; y en especial a mi mamá por cada consejo que me dio y mostrarme el mejor camino, gracias por ser mi guía te amo.

Para mi hermano Jonathan Ayala, porque después de todo, tengo que agradecerte que me hiciste más fuerte.

Para mi familia en general, por su compañía y por su apoyo en cada situación que se me ha presentado en mi vida.

Para el D. C. José López Bucio, por aceptarme en el laboratorio bajo su asesoría y brindarme su confianza, el apoyo y todas las herramientas para la realización de este trabajo, así como la dedicación que me brindó.

Para el M. C. Salvador Barrera Ortiz por invitarme a elaborar este proyecto, además de brindarme su tiempo, la paciencia dedicada a enseñarme las técnicas necesarias y su asesoría para realizar este trabajo, ya que sin su ayuda no se hubiera logrado desarrollar de esta manera el proyecto, muchas gracias.

Para mi comité revisor de tesis, D. C. Martha García, D. C. León Ruíz, D. C. Asdrúbal Aguilera, D. C. Raúl Cortez y D. C. Ernesto García; por acceder amablemente a ser parte de mi comité de evaluación y por sus sugerencias en la revisión de este trabajo.

Para mis compañeros del laboratorio, Lichina, Lupis, Sara, Edith, Viri, Marina, Bricia, Pedro, Aarón, Kiran, Carlos, Gustavo, Melisa, Amira y Alejandro, por la amistad que me brindaron, los consejos, las experiencias vividas y por la ayuda que me proporcionaron, porque gracias a todo eso me ayudaron a culminar este trabajo. Muchas gracias.

Para mis amigos, porque más que amigos fueron mis hermanos y mis confidentes; a Mateo ya que él fue el que me ayudo en mis días más oscuros y vivió este proceso de aprendizaje de cerca, fuiste tú el que me dio ese consejo que necesitaba escuchar, ese apoyo que nunca dejo que me derrumbara, muchas gracias. Y sobre todo a ustedes que me ayudaron a ser mejor persona y nunca rendirme, Jessie, Mario, Armando, Mariela y Dulce; muchas gracias por todo lo vivido porque sin ustedes esta travesía hubiera sido muy pesada y aburrida, gracias por su tiempo, sus consejos, y cada momento vivido que ayudaron a formar a esta persona. Porque dicen que tu segunda familia son tus amigos y no lo dudo, los amo.

Y por último solo me resta decir gracias a la vida, porque a pesar de que es corta, es necesario romper las reglas, perdonar rápidamente, besar lentamente, amar de verdad, reír incontrolablemente y nunca lamentarse nada de lo que te hizo sonreír.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
2. ANTECEDENTES	5
2.1. La raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
2.1.1. La raíz primaria	5
2.1.2. Las raíces laterales	7
2.2. Nicho de células madre	8
2.3. Las vitaminas	10
2.3.1. El ácido fólico (AF) y los folatos	11
2.4. Vías de señalización hormonal	14
2.4.1. Las auxinas: reguladores maestros del crecimiento vegetal.....	15
2.4.2. El ácido jasmónico (AJ) y los jasmonatos	17
2.5. La señalización de TOR y su relación con auxinas	18
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1. Objetivo general	23
5.2. Objetivos particulares.....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS	24
6.1. Material biológico y compuestos con actividad biológica	24
6.2. Condiciones de crecimiento	24
6.3. Análisis del crecimiento vegetal	25
6.4. Actividad histoquímica <i>uidA</i> y microscopía de contraste de fases	26
6.5. Tinción de yoduro de propidio y microscopía confocal.....	27
6.6. Análisis de micrografías	27
7. RESULTADOS	29
7.1. El ácido fólico (AF) modifica la arquitectura de la raíz	29

7.2. El ácido fólico (AF) regula los programas de división y elongación celular en la raíz	33
7.3. La expresión de factores de transcripción del nicho celular se modifica en respuesta al ácido fólico (AF).....	36
7.4. El ácido fólico (AF) estimula la maduración de primordios de raíces laterales mediante un mecanismo auxínico.....	38
7.5. La señalización de auxinas media los efectos del ácido fólico (AF) sobre la arquitectura de la raíz	41
7.6. El ácido jasmónico (AJ) está implicado en el efecto del ácido fólico (AF) sobre el crecimiento de <i>Arabidopsis</i>	43
7.7. TOR regula el crecimiento y el desarrollo vegetal por un mecanismo que involucra al ácido fólico (AF)	45
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES.....	52
10. REFERENCIAS.....	53

Índice de Figuras

Figura 1. Organización celular en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	7
Figura 2. Desarrollo de la raíz lateral.....	8
Figura 3. El nicho de células madre	9
Figura 4. Estructura de los folatos	13
Figura 5. Fenotipo de la mutante de <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>moots koom2</i> (<i>mko2</i>) afectada en la biosíntesis de folatos..	14
Figura 6. Componentes clave en la percepción y señalización de auxinas... ..	16
Figura 7. Regulación de la traducción de proteínas por TOR y auxinas.....	20
Figura 8. Efecto del ácido fólico sobre el crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
Figura 9. Efecto del ácido fólico (AF) sobre el crecimiento de <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	32
Figura 10. Respuesta al ácido fólico (AF) de las líneas transgénicas pPRZ1:GUS, pCYCD6;1::GFP y <i>CycB1;1::uidA</i>	34
Figura 11. Respuesta al ácido fólico (AF) de la línea transgénica pAtEXP7::GUS.....	35
Figura 12. Efecto del ácido fólico (AF) en la expresión de pPLT1:CFP, pPLT2:CFP, pSHR:GFP, pSCR:H2B:YFP y pWOX5:GFP	37
Figura 13. Efecto del ácido fólico (AF) en el desarrollo de raíces laterales en <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
Figura 14. Respuesta al ácido fólico (AF) de DR5:GFP en la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
Figura 15. Efecto del ácido fólico (AF) en las mutantes de la ruta de señalización de auxinas <i>arf7/arf19</i> , <i>slr1</i> y <i>tir1-1/afb1-5/afb2-5</i>	42
Figura 16. Respuesta al ácido fólico (AF) de pLOX2:FLUC/GUS en el follaje de <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
Figura 17. Efecto del ácido fólico (AF) en las mutantes de la ruta de señalización del ácido jasmónico <i>jar1</i> , <i>myc2-1</i> y <i>myc2-2</i>	45
Figura 18. Respuesta al ácido fólico (AF) de la línea transgénica pLDζ2:GUS	46
Figura 19. Efecto del ácido fólico (AF) en la línea transgénica inducible por estradiol (EST) <i>tor-es1</i>	47

RESUMEN

El ácido fólico es una vitamina (AF) precursora del tetrahidrofolato, cofactor esencial en los organismos que actúa como acarreador de unidades de un carbono en reacciones enzimáticas. En las plantas su función en el crecimiento y desarrollo se desconoce por lo que dilucidar su posible mecanismo de acción es una de las metas de las investigaciones en biología del desarrollo. La morfogénesis vegetal está coordinada por diversas fitohormonas, moléculas pequeñas derivadas de varias rutas metabólicas e incluyen a las auxinas, citocininas, etileno, ácido abscísico, y ácido giberélico, entre los que se encuentran reguladores críticos de la morfogénesis de la raíz. En este trabajo se emplearon estrategias farmacológicas, e histoquímicas y de microscopía confocal para determinar los procesos de señalización por los cuáles el ácido fólico modula el crecimiento y desarrollo vegetal. El de ácido fólico se suministró en concentraciones de 25 a 125 μ M inhibe la elongación de la raíz primaria e induce la formación de raíces laterales en una manera dependiente de la concentración. Un análisis con genes reporteros del ciclo celular (*pCycD6;1::GFP* y *CycB1:uidA*), de la zona meristemática (*PRZ1:uidA*) y de la expansión celular (*Exp7:uidA*) mostró que el ácido fólico promueve la división celular pero disminuye la elongación de las células, los cambios en la expresión de dichos marcadores está relacionado con un aumento en la expresión del gen reportero de respuesta a auxinas *DR5:GFP* en los tejidos vasculares de la raíz primaria, mientras que las mutantes en varios genes de la señalización de auxinas (*tir1/afb1/afb2* [receptores], *slr1* [represor] and *arf7/arf19* [factores de transcripción]) mostraron que esta ruta de señalización es esencial para la formación de raíces laterales y el acortamiento de la raíz primaria inducidos por el ácido fólico. El análisis de la expresión de genes que codifican factores de transcripción requeridos para el mantenimiento del nicho de células madre de la raíz como *PLT1*, *PLT2*, *SHR*, *SCR* y *WOX5* mostró efectos represores del ácido fólico. Adicionalmente, una construcción con un antisentido de *TOR1*, sugiere que el ácido fólico actúa por un mecanismo alterno a este regulador

central del crecimiento. Los resultados sugieren que el ácido fólico modifica la arquitectura de la raíz influenciando las rutas de señalización de auxinas y TOR, afectando la expresión de factores de transcripción encargados del mantenimiento del nicho de células madre, regulando así la división y la elongación celular.

Palabras clave: Auxinas, TOR, raíces laterales, nicho de células madre, factores de transcripción.

ABSTRACT

Folic acid (FA) vitamin is a precursor of tetrahydrofolate, which is an essential cofactor in almost all forms of life, acting as a carrier for one-carbon units in enzymatic reactions. Its role in plant growth and development is just emerging and its mechanism of action remains to be characterized. Plant morphogenesis is coordinated by phytohormones, a structurally unrelated group of small molecules derived from various metabolic pathways including auxins, cytokinins, ethylene, abscisic acid, and gibberellic acid, amongst of which are the critical regulators of root morphogenesis. In this work, we employed pharmacological, histochemical and confocal microscopy strategies to characterize the signaling mechanism by which folic acid modulates root growth and development. Folic acid supplementation (25-125 μ M) inhibits primary root elongation and induces lateral root formation in a concentration-dependent manner. An analysis with reporter genes of cell cycle (*pCycD6;1::GFP* and *CycB1:uidA*), meristematic zone (*PRZ1:uidA*) and cell expansion (*Exp7:uidA*) showed that folic acid promotes cell division but prevented cell elongation, and this correlated with increased expression of auxin-responsive *DR5:GFP* gene in the vascular tissue of primary roots, while mutants defective in auxin signaling (*tir1/afb1/afb2* [receptors], *slr1* [repressor] and *arf7/arf19* [transcription factors]) showed that this signaling pathway is essential for lateral root formation and primary root shortening induced by the vitamin. An analysis of expression of genes encoding transcription factors required for maintenance of the root stem cell niche like *PLT1*, *PLT2*, *SHR*, *SCR* and *WOX5* indicated the repressing effect of folic acid. Finally, a construction with an antisense of *TOR1*, proved that folic acid acts by an alternative mechanism to this central regulator of growth. Taken together, our results suggest that the mechanism of FA activity modulating root architecture involves auxin and TOR signaling pathways in addition to transcription factors responsible for the maintenance of the stem cell niche regulating in this way cell division and elongation.

Key words: Auxin, TOR, lateral roots, stem cell niche, transcription factors

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas al ser organismos que realizan la fotosíntesis productores primarios de los ecosistemas, proporcionado diferentes satisfactores a los seres humanos como frutos, semillas, forraje, medicinas, biocombustibles, etc. La raíz es el órgano que, oculto en el suelo, proporciona soporte estructural a los tejidos aéreos y permite la captación de agua y nutrientes vitales para el crecimiento vegetal. De esta manera, la supervivencia de la planta depende de un crecimiento, desarrollo y función radicular apropiada.

La raíz generalmente se encuentra inaccesible y su simple observación requiere de métodos invasivos. Adicionalmente, el sistema radicular de muchas especies vegetales es altamente complejo haciendo muy difícil la caracterización de los mecanismos de desarrollo. El estudio de la raíz ha avanzado enormemente a través del uso de *Arabidopsis thaliana*, ya que esta plantas tiene una organización celular muy simple y puede ser crecida en cajas de Petri o sobre medios de cultivo con una formulación de nutrientes similar a la del suelo. Entender el crecimiento y el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis* nos permitirá diseñar y extrapolar estrategias para incrementar la producción vegetal en el campo y optimizar el uso de insumos para la agricultura.

La raíz manifiesta un programa de crecimiento indeterminado, que le permite adecuarse al medio ambiente cambiante y sobrevivir en condiciones adversas. En particular, los genes que participan en la síntesis de folatos desempeñan una función esencial para el correcto funcionamiento de las estructuras proliferativas de la raíz, los meristemas. Los folatos son una familia de compuestos con variaciones en el estado de oxidación, la longitud de la cadena lateral de glutamato y las unidades de carbono unidas a la molécula grupos metilos. Estos compuestos funcionan como acarreadores de un grupo metilo en reacciones

enzimáticas para formar aminoácidos, purinas y otras moléculas, pero se conoce muy poco sobre su participación en la biología del desarrollo vegetal donde las rutas de señalización de auxinas y TOR tienen un papel central debido a que ambas regulan una gran cantidad de procesos relacionados al crecimiento.

2. ANTECEDENTES

2.1. La raíz de *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Brassicaceae*, siendo el organismo modelo más ampliamente usado en investigaciones sobre biología molecular y desarrollo en plantas (Toloti *et al.*, 2015). La raíz de *Arabidopsis thaliana* está formado por una raíz primaria de la cual emergen raíces laterales, y éstas se ramifican sucesivamente para extender la superficie exploratoria; tanto la raíz primara como las raíces laterales forman en su capa más externa (la epidermis) pelos radicales, los cuales magnifican la superficie de absorción de agua y nutrientes necesarios para la planta. El crecimiento de la raíz primaria, así como la morfología de los pelos radicales, la elongación de las células y la estructura del meristemo apical son marcadores biológicos fáciles de analizar para identificar nuevos mecanismos de señalización en plantas (Scheres y Wolkenfelt, 1998; Ortiz-Castro y López-Bucio, 2010).

2.1.1. La raíz primaria

En la raíz primaria, las células producidas por las células madre iniciales en el meristemo apical de la raíz (*Root Apical Meristem*, RAM, por sus siglas en inglés) progresan a través de tres fases distintas del desarrollo en su camino a la madurez (Fig. 1a). En la zona meristemática, las células se dividen múltiples veces. En la zona de elongación, pierden su habilidad para dividirse e incrementan en longitud. Finalmente, en la zona de diferenciación, las células adquieren sus

características y funciones especializadas (Scheres *et al.*, 2002; Petricka *et al.*, 2012).

La actividad mitótica en el meristemo disminuye con el incremento en la distancia del nicho de células madre, hasta que las células finalmente salen del ciclo celular en la frontera del meristemo, este sitio es conocido como zona de transición y se encuentra entre la zona meristemática y la zona de elongación (Fig. 1a) (Beemster y Baskin, 1998). Además de las zonas previamente mencionadas, la raíz primaria está constituida de varios tejidos, por lo que es posible distinguir varias capas en la misma, comenzando en la parte más interna con el tejido vascular y finalizando en la parte más externa con la epidermis (Fig. 1b-c).

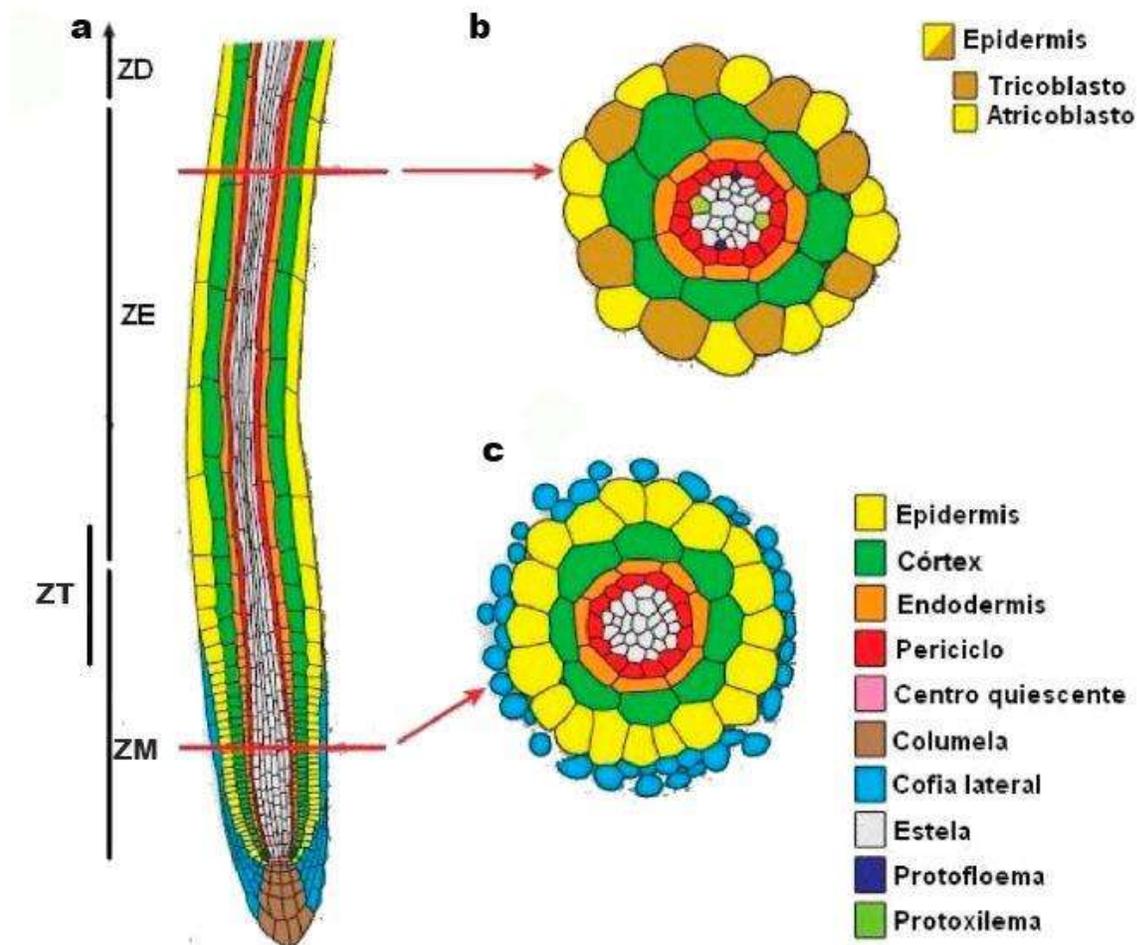


Figura 1. Organización celular en la raíz primaria de *A. thaliana*. **a)** La organización proximal-distal de la raíz se origina a partir del proceso repetitivo de división y expansión celular a partir de cuatro tipos de células madre iniciales, las cuales están inmediatamente adyacentes a las células del centro quiescente mitóticamente inactivas: las células iniciales de la cubierta lateral de la raíz/epidermis, las células iniciales de la columela, las células iniciales del córtex/endodermis, las células iniciales de la vasculatura. Zona meristemática (ZM), zona de elongación (ZE), zona de diferenciación (ZD) y zona de transición (ZT). **b)** Sección transversal de la raíz en la zona de diferenciación donde se muestra la posición de los tricoblastos y atricoblastos del tejido epidérmico y la localización en la estela del protoxilema y el protofloema que dan origen a los tejidos vasculares maduros xilema y floema respectivamente. **c)** Sección transversal en la ZM mostrando la organización radial de las filas celulares (Modificado de Overvoorde *et al.*, 2010).

La vasculatura vegetal (estela) incluye los vasos del xilema y el floema que transportan agua y nutrientes (xilema) hacia el follaje y fotosintatos (floema) hacia la raíz (Dolan *et al.*, 1993). Las capas celulares del córtex y la endodermis se derivan de las células iniciales del córtex/endodermis donde los factores de transcripción SHR y SCR son necesarios para que dicha diferenciación ocurra (Di Laurenzio *et al.*, 1996; Helariutta *et al.*, 2000).

Las células de la capa lateral de la raíz o cofia lateral y la columela forman una capa de células de protección que continuamente se sustituyen conforme avanza la exploración del suelo. Las células de la columela también sirven como sensores de gravedad, lo cual permite que la raíz primaria crezca en profundidad (Dolan *et al.*, 1993; Petricka *et al.*, 2012). La epidermis es la envoltura más externa de la raíz, siendo en este tejido donde ocurre un proceso de diferenciación celular del cual se originan los pelos radiculares. Una célula epidérmica en contacto con dos células del córtex se desarrollará como una célula de pelo radicular (tricoblasto), mientras que una célula epidérmica adyacente a una sola célula del córtex será una célula no formadora de pelo radicular (atricoblasto) (Fig. 1b) (Tominaga-Wada *et al.*, 2011).

2.1.2. Las raíces laterales

Las raíces laterales se forman en la zona de diferenciación de la raíz primaria a partir de células del periciclo, las cuales se localizan adyacentes a los polos del xilema (Fig. 2a). Un subgrupo de esas células fundadoras son estimuladas para

dividirse y formaran un primordio (Blakely y Evans, 1979). Las raíces laterales se originan con esas primeras divisiones celulares anticlinales de las células fundadoras durante la primera etapa del desarrollo del primordio de la raíz lateral. Posterior a esta primera etapa, se han descrito siete estadios que culminan con la emergencia de la raíz lateral (Fig. 2b) (Malamy y Benfey, 1997). Después de emerger, el meristemo apical de la raíz lateral se activa y comienza a crecer. Para dar origen al sistema radicular de *Arabidopsis*, las raíces laterales surgen iterativamente a lo largo de la raíz primaria donde las raíces laterales más viejas se posicionan en la parte más distal del meristemo de la raíz primaria, en tanto que las más jóvenes se encuentran más cerca de este (Dubrovsky *et al.*, 2006). Este proceso es regulado por auxinas activando el ciclo celular en las células fundadoras a través de proteínas de la familia de las ciclinas (Himanen *et al.*, 2002; Vanneste *et al.*, 2005; Sanz *et al.*, 2011).

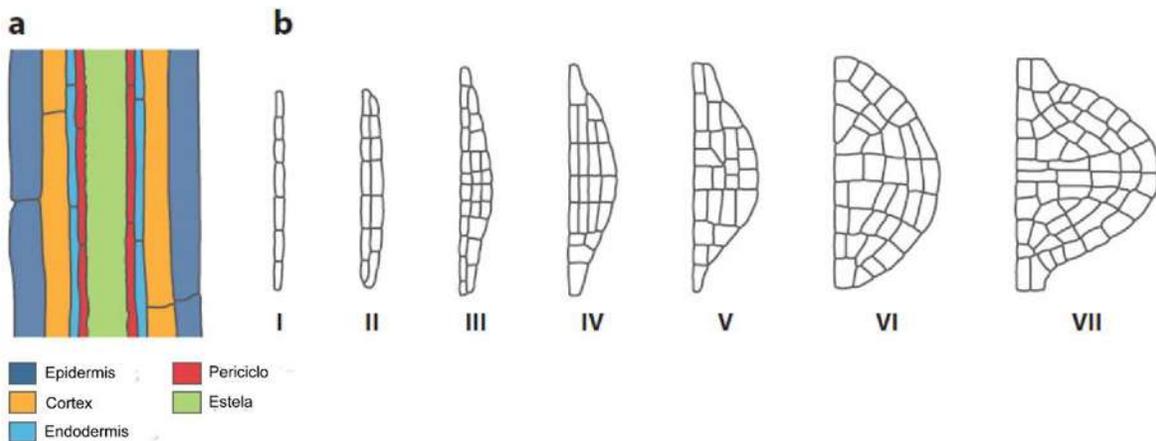


Figura 2. Desarrollo de la raíz lateral. **a)** Esquema de la zona de diferenciación, mostrando el eje longitudinal de la raíz primaria. Las raíces laterales se forman en la capa de células del periciclo mediante divisiones anticlinales. **b)** Etapas de desarrollo de la raíz lateral. En la etapa I, el primordio surge como resultado de divisiones en el periciclo. Durante la etapa II, las células de la etapa I se dividen periclinamente para formar otra capa. Para la etapa III, la forma de domo del primordio de la raíz lateral es evidente debido a divisiones periclinales de la capa más externa. Los primordios son de tres, cuatro, o cinco capas visibles en la etapa III, IV y V, respectivamente. En la etapa V, las células de todas las capas experimentan divisiones anticlinales para generar un primordio que comienza a empujar a través de la capa del cortex de la raíz primaria. En las etapas VI y VII el meristemo se consolida y la nueva raíz emerge y activa su crecimiento (Adaptado de Petricka *et al.*, 2012).

2.2. Nicho de células madre

El meristemo apical de la raíz (RAM) aporta nuevas células para el crecimiento de la raíz y está constituido por las células iniciales (células madre) que rodean el centro quiescente (QC, por sus siglas en inglés), un grupo de células que no se dividen. Las células iniciales y el QC en conjunto forman el nicho de células madre (Fig. 3), un concepto similar al que opera en animales (Spradling *et al.*, 2001; Scheres, 2007). Las células proliferativas generan filas que se extienden a lo largo del eje longitudinal de la raíz y forman las distintas capas de tejidos.

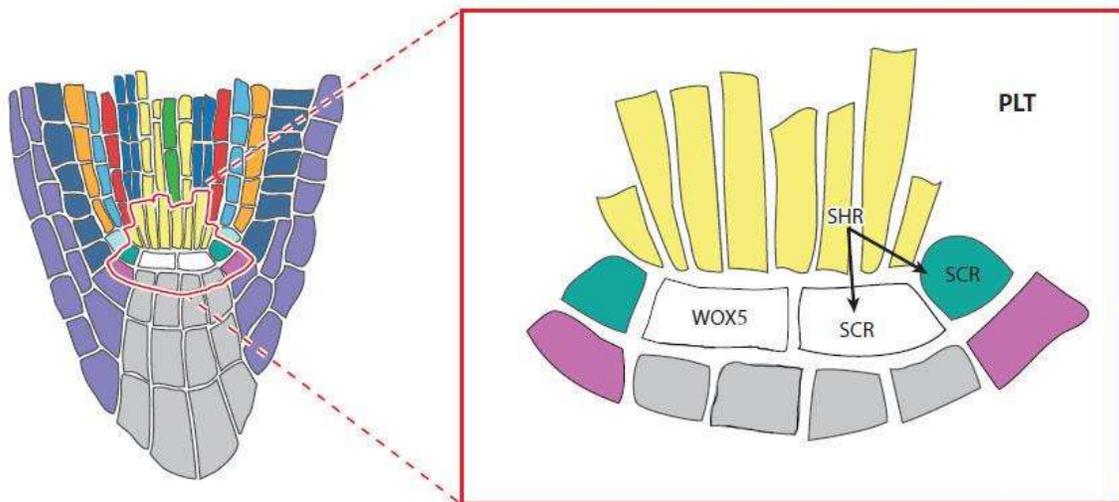


Figura 3. El nicho de células madre. La región magnificada muestra el nicho de células madre y sus interacciones. El gen SHR se expresa en la estela y se mueve al interior del centro quiescente y las células iniciales del córtex/endodermis, para interactuar con el factor transcripcional SCR, en tanto que WOX5 mantiene la identidad de las células madre a su alrededor. La expresión de los genes PLTs en todo el nicho también mantiene la identidad del centro quiescente y de las células madre (Adaptado de Petricka *et al.*, 2012).

El centro quiescente es esencial para la especificación del nicho de células madre y el mantenimiento del estado indiferenciado de la raíz (van den Berg *et al.*, 1997). La identidad de esta zona se distingue por dos rutas paralelas, la ruta PLETHORA (PLT) y la ruta SHORT ROOT (SHR)/ SCARECROW (SCR) (Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007). La pérdida de la función de esos genes resulta en un mal funcionamiento del centro quiescente y un crecimiento determinado de la raíz. Los genes *PLTs* codifican para factores de transcripción de

la familia del dominio AP2 (Galinha *et al.*, 2007), en tanto que los genes *SHR* y *SCR* codifican para factores de transcripción de la familia GRAS [GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1-3 (RGA) y *SCR*] (Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004). Los niveles más altos de las proteínas PLTs se encuentran en el nicho de células madre, donde promueven la división celular (Fig. 3) (Galinha *et al.*, 2007). El factor transcripcional *SHR* se mueve de la estela hacia las capas de células adyacentes para activar la transcripción de *SCR* (Helariutta *et al.*, 2000; Levesque *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2007). La expresión de *SCR* en el centro quiescente mantiene la identidad de las células madre a través de un mecanismo celular autónomo (Fig. 3) (Sabatini *et al.*, 2003), ya que las células producen una señal que se transporta al centro quiescente (van den Berg *et al.*, 1997). Esta señal puede ser el factor de transcripción *WOX5*, el cual se expresa en el centro quiescente, requerido para prevenir la división celular y conservar la identidad del CQ actuando corriente abajo de *SHR* y *SCR* (Fig. 3) (Sarkar *et al.*, 2007).

2.3. Las vitaminas

Las vitaminas son esenciales para mantener el crecimiento, el metabolismo y la función fisiológica normal de todos los organismos (He *et al.*, 2017). Comprenden un grupo diverso de moléculas orgánicas, las cuales se dividen en liposolubles e hidrosolubles; las primeras son antioxidantes importantes, como por ejemplo el tocoferol (vitamina E), en tanto que las segundas (o sus compuestos derivados) actúan como cofactores de múltiples enzimas indispensables para el metabolismo celular (Smith *et al.*, 2007). Hasta la fecha, se sabe que la producción de algunos de estos cofactores es regulada por señales durante el desarrollo, lo cual refleja la importancia de estos compuestos en las funciones fisiológicas de los animales y de las plantas (Belanger *et al.*, 1995; Jabrin *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2007). En particular, los folatos han demostrado tener una función central durante el

crecimiento vegetal por lo que a continuación se describen aspectos importantes de estos compuestos.

2.3.1. El ácido fólico (AF) y los folatos

El aislamiento, identificación estructural y síntesis del AF tomó lugar en el año de 1941, lo cual condujo al uso terapéutico generalizado de esta vitamina hidrosoluble para el tratamiento de la anemia megaloblástica. Uno de los más importantes descubrimientos de salud pública del siglo pasado, fue que el suplemento de ácido fólico reduce el riesgo de defectos en el tubo neural humano. Durante los siguientes años, los aspectos básicos del metabolismo del AF fueron investigados estableciéndose así su función bioquímica (Zempleni *et al.*, 2007). El AF y sus derivados son llamados colectivamente folatos (vitamina B9). Los humanos y animales son incapaces de producir folatos *de novo* y por lo tanto dependen de adquirirlos a través de los alimentos, especialmente de las plantas (Blancquaert *et al.*, 2010).

La molécula del tetrahidrofolato (THF) es la forma activa de los folatos, es una molécula compuesta de pterina, p-aminobenzoato y glutamato (Fig. 4a). El anillo pterina existe naturalmente en las formas dihidro (Fig. 4b) y tetrahidro, siendo esta última la que presenta actividad de cofactor. En el AF, el anillo pterina está completamente oxidado, pero puede ser reducido por la vía del dihidrofolato a THF. Varias unidades de un carbono (C_1) pueden unirse enzimáticamente a las posiciones N5 y/o N10 del THF (Fig. 4c); entonces, los folatos C_1 sustituidos resultantes son enzimáticamente interconvertibles y sirven como donadores de C_1 para varias reacciones de biosíntesis de diversos compuestos como aminoácidos (metionina, glicina y serina), purinas, timidilato, pantotenato y la formilmetionina del RNA de transferencia (Cossins, 2000; Hanson y Roje, 2001; Hanson y Gregory III, 2011).

Una característica que ocurre naturalmente en los folatos es la susceptibilidad a la ruptura foto-oxidativa del enlace C9-N10 que une a la pterina y el p-aminobenzoato (Fig. 4a). Esa fotolabilidad inherente es la razón de la necesidad de los humanos y los animales para el suplemento continuo de folatos; siendo el AF (un folato no natural) el que ha sido empleado en humanos para satisfacer dicha demanda (Scott *et al.*, 2000; Blancquaert *et al.*, 2010; Hanson y Gregory III, 2011). Una cadena corta de residuos de glutamato adicionales (hasta aproximadamente seis) es típicamente agregada al primer glutamato. Esta cola de poliglutamato es importante para la función de los folatos debido a que las enzimas dependientes de folatos generalmente tiene mayor afinidad por la forma de poliglutamato, mientras que los transportadores de folatos son más afines a la forma de monoglutamato. De esta manera, se regula la actividad del cofactor y su transporte de membrana (Suh *et al.*, 2001). Sin embargo, debido a que el poliglutamato promueve la unión a las enzimas dependientes de folatos y los folatos son más estables a la ruptura oxidativa cuando están unidos que cuando están libres, la poliglutamilación puede indirectamente aumentar la estabilidad de los folatos (Suh *et al.*, 2001; Hanson y Gregory III, 2011).

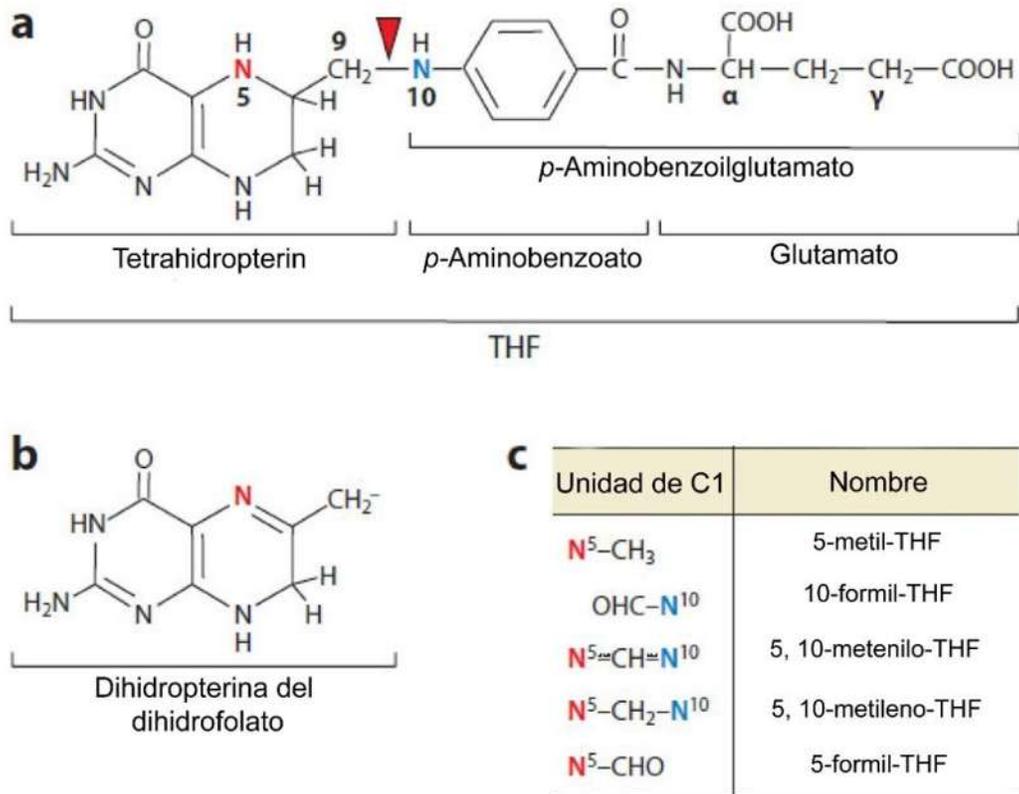


Figura 4. Estructura de los folatos. **a)** Estructura química del tetrahidrofolato (THF), la forma monoglutámica. La punta de flecha en rojo marca el enlace C9-N10 oxidativamente lábil. La cola de poliglutamato se une en el carbono carboxílico y del glutamato que forma la estructura básica de la molécula. **b)** Anillo dihidropterina del dihidrofolato. **c)** Los distintos sustituyentes de un carbono (C₁) del THF (Modificado de Hanson y Gregory III, 2011).

Los precursores de los folatos, la pterina y el p-aminobenzoato se sintetizan en el citosol y los cloroplastos, respectivamente; en tanto que el ensamble final de los folatos ocurre en la mitocondria y su distribución se lleva a cabo en toda la célula vegetal (Neuburger *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1997). Actualmente se conoce la ruta de biosíntesis de los folatos (Hanson y Gregory III, 2011), y recientemente Reyes-Hernández y colaboradores (2014) aislaron una mutante de *Arabidopsis thaliana*, afectado en dicha ruta a la cual denominaron *moots koom2* (*mko2*, “raíz corta” en Maya) (Fig. 5a). Dicha mutante presenta crecimiento determinado en la raíz primaria (Fig. 5b) y alteraciones en la morfogénesis de los primordios de raíces laterales (Fig. 5c). La secuencia de la mutante permitió la identificación de una mutación puntual en el gen *FOLYLPOLYGLUTAMATE SYNTHETASE1*, el cual

codifica para una enzima de la biosíntesis de folatos. La identificación de este gen de la biosíntesis del AF y su fenotipo en el programa de crecimiento de la raíz nos motivó a profundizar más sobre el mecanismo por el cual los folatos regulan el crecimiento radicular.

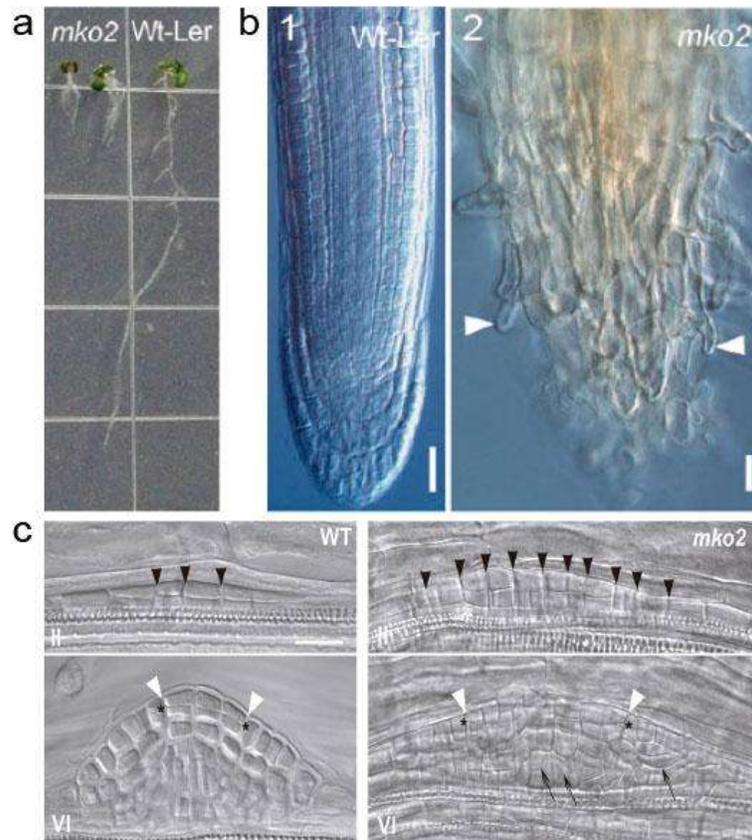


Figura 5. Fenotipo de la mutante de *Arabidopsis thaliana mooks koom2 (mko2)* afectada en la biosíntesis de folatos. a) Crecimiento *in vitro* de plántulas de la mutante (*mko2*) y silvestre (*Ler*). b) Punta de la raíz primaria de *Ler* y *mko2*. c) Primordios de raíces laterales en *Ler* y *mko2* (Adaptado de Reyes-Hernández *et al.*, 2014).

2.4. Vías de señalización hormonal

Las plantas exhiben una flexibilidad de desarrollo única que le permite adaptarse a las condiciones ambientales en constante cambio. Para lograr esta adaptabilidad, las plantas son capaces de mantener poblaciones de células madre (indiferenciadas o pluripotenciales) permanentes y formar nuevos órganos durante

el ciclo de vida vegetal. Las moléculas de señalización llamadas fitohormonas, tales como las auxinas citocininas, ácido abscísico, brasinoesteroides, etileno, giberelinas, ácido jasmónico y estrigolactonas coordinan estos procesos del desarrollo (Vanstraelen y Benková, 2012). Por su relación con la biología de la raíz; a continuación se describen los aspectos generales de dos de estas fitohormonas: las auxinas y los jasmonatos, haciendo mayor énfasis en su mecanismo de señalización.

2.4.1. Las auxinas: reguladores maestros del crecimiento vegetal

La principal auxina de las plantas es el ácido indolacético (AIA), el cual ha sido implicado en cada aspecto del crecimiento y el desarrollo (Santner *et al.*, 2009). El AIA es sintetizado a partir del triptófano a través de al menos dos rutas: la vía de la triptamina y la vía del ácido indol-3-piruvico (Strader y Bartel, 2008). Adicionalmente, estudios en maíz (*Zea mays*) y *Arabidopsis* indican que el AIA también puede ser sintetizado directamente a partir del indol evitando la formación del triptófano en el proceso (Woodward y Bartel, 2005). Una vez sintetizadas, las auxinas son distribuidas en toda la planta a través de un sofisticado sistema de transporte célula a célula (Vieten *et al.*, 2007). Las respuestas celulares a las auxinas incluyen cambios metabólicos en la expresión de genes (Badescu y Napier, 2006). Para orquestar estas respuestas, las auxinas emplean un mecanismo de proteólisis conservado (la ruta proteosoma-ubiquitina), en la cual las proteínas destinadas a la degradación son previamente marcadas con una pequeña proteína llamada ubiquitina. Las proteínas marcadas son reconocidas por el proteosoma y finalmente son degradadas. La ubiquitina es covalentemente conjugada a los sustratos proteicos por la actividad secuencial de tres enzimas: la enzima activadora de la ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de la ubiquitina (E2) y la proteína ligasa de la ubiquitina (E3) (Pickart, 2001). En particular, las E3 más caracterizadas son el complejo SCFs compuesto por las proteínas de CUL1, RBX1, ASK1 y F-box, donde siendo esta última la que determina la especificidad (Deshaies, 1999).

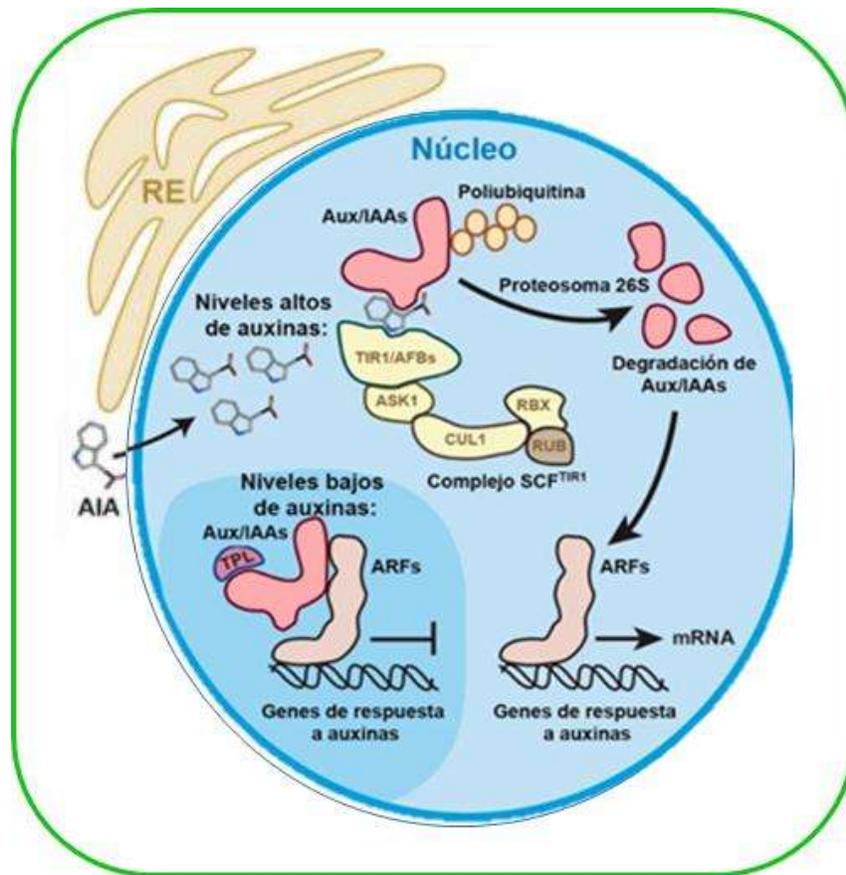


Figura 6. Componentes clave en la percepción y señalización de auxinas. En el núcleo, el ácido indolacético (AIA) se une a sus receptores, las proteínas TRANSPORT INHIBITOR REPOSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB) y a las proteínas auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA). TIR1/AFBs son proteínas F-box que forman parte del complejo SCF^{TIR1}, el cual consiste de cuatro subunidades (TIR1/AFBs, ASK1, CUL1 y RBX). Una proteína adicional, RUB, se une al complejo SCF^{TIR1} para regular su función. Las proteínas TIR1/AFBs y Aux/IAAs funcionan como co-receptores para el AIA. Cuando los niveles de AIA son bajos (fondo azul más oscuro), las proteínas Aux/IAAs forman heterodímeros con los factores de respuesta a auxinas (ARFs) para reprimir la transcripción de genes. La proteína TOPLESS (TPL) funciona como un co-represor transcripcional para los Aux/IAAs. Sin embargo, cuando los niveles de AIA son altos, la unión del AIA a sus co-receptores toma como blanco a las proteínas Aux/IAAs para su degradación por el proteosoma 26S, lo cual conduce a la des represión de la regulación transcripcional de los ARFs y la expresión de genes de respuesta a auxinas (Modificado de Ljung, 2013).

El gen *TIR1* codifica una proteína F-box que interactúa directamente con las proteínas Aux/IAAs y dicha unión es incrementada por las auxinas (Gray *et al.*, 2001; Dharmasiri *et al.*, 2003; Kepinski y Leyser, 2004). Además los 5 genes *AFBs* codifican para proteínas F-box, de la misma familia que *TIR1* con funciones redundantes (Parry *et al.*, 2009; Ljung, 2013). Por lo tanto, en presencia de

auxinas, las proteínas Aux/IAAs son degradadas por la ruta proteosoma-ubiquitina vía TIR1/AFBs (Mockaitis y Estelle, 2008; Ljung, 2013). Un mecanismo que modula la actividad del complejo SCF^{TIR1/AFBs} es la modificación de la subunidad CUL1 por RELATED TO UBIQUITIN (RUB), en un proceso denominado “rubilación” (Hotton y Callis, 2008). Cuando no son degradadas por el proteosoma, las proteínas Aux/IAAs se unen y bloquean a los factores de transcripción llamados AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs) y reprimen la transcripción regulada por auxinas con la ayuda de un co-represor llamado TOPLESS (TPL) (Guilfoyle y Hagen, 2007; Szemenyei *et al.*, 2008). Entonces, la señalización de auxinas ocurre cuando el AIA permite la interacción del complejo SCF^{TIR1/AFBs} y las proteínas Aux/IAAs para que estas últimas sean marcadas con ubiquitina y posteriormente sean degradadas por el proteosoma, la liberación de los factores transcripcionales ARF (Fig. 6).

2.4.2. El ácido jasmónico (AJ) y los jasmonatos

La oxilipina denominada ácido jasmónico (AJ) y sus metabolitos, colectivamente conocidos como jasmonatos, son moléculas de señalización en plantas que modulan respuestas a estrés biótico y abiótico así como diversos aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal (Wasternack, 2007). El AJ es sintetizado por la ruta del ácido octadecanoico (Mueller *et al.*, 1993). Una vez sintetizado, puede ser conjugado con isoleucina para formar jasmonoil-isoleucina o convertido al volátil metil-jasmonato (Seo *et al.*, 2001; Staswick y Tiryaki, 2004).

En la señalización por AJ, la fitohormona promueve la degradación de los represores transcripcionales llamados proteínas JAZ, proceso que requiere de la proteína F-box CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1) (Xie *et al.*, 1998; Thines *et al.*, 2007; Katsir *et al.*, 2008). Como se describió en el apartado anterior, las proteínas F-box forman parte de un complejo SCF, el cual promueve la degradación de proteínas por el proteosoma al ser marcados con ubiquitina. Una vez que el receptor SCF^{COI1} promueve la degradación de los represores JAZ, los

factores de transcripción (que se encontraban bloqueados por los represores) son capaces de inducir la transcripción de genes de respuesta al AJ (Lorenzo *et al.*, 2004; Thines *et al.*, 2007; Dombrecht *et al.*, 2007).

2.5. La señalización de TOR y su relación con auxinas

En la década de 1970, se encontró en una muestra de suelo de la isla de Pascua (conocida como Rapa Nui en el idioma local) una cepa de *Streptomyces hygroscopicus*, la cual producía un potente metabolito antifúngico. Este metabolito fue purificado y resultó ser una lactona macrocíclica, la cual fue nombrada rapamicina por su lugar de descubrimiento. Posteriormente, se determinó que la rapamicina inhibe la proliferación de las células de mamíferos y posee propiedades inmunosupresoras. Estas observaciones un tanto extrañas, motivaron una investigación más profunda sobre el modo de acción de la rapamicina.

El blanco farmacológico de la rapamicina (TOR) es una cinasa serina/treonina conservada que regula el crecimiento y el metabolismo celular en respuesta a señales ambientales (Wullschleger *et al.*, 2006). La cinasa TOR de mamíferos (mTOR, mammalian Target of Rapamycin, por sus siglas en inglés) se encuentra en dos complejos multiproteicos distintos en función y estructura: el complejo TOR 1 (TORC1, por sus siglas en inglés) y TORC2 (Zoncu *et al.*, 2011; Shimobayashi y Hall, 2014). mTORC1 es sensible a la rapamicina y regula el crecimiento celular activando la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas (Hara *et al.*, 2002; Loewith *et al.*, 2002). mTORC2 es insensible a la rapamicina y modula el metabolismo celular y la organización del citoesqueleto (Cybulski y Hall, 2009).

Desde su descubrimiento, el gen *TOR* se ha identificado en todos los organismos eucariontes. Muchos de ellos contiene un solo gen *TOR*; sin embargo, en *Saccharomyces cerevisiae* tiene 2 genes y *Leishmania major* tiene 3 genes, respectivamente (Madeira Da Silva y Beverley, 2010). En particular, el genoma de

Arabidopsis contiene un solo gen *TOR* cuya pérdida de la función es letal para la planta (Menand *et al.*, 2002). El mecanismo de acción más ampliamente estudiado de la señalización de TOR es el control del inicio de la traducción de proteínas en levaduras y animales, pero su función está menos entendido en plantas (Bögge *et al.*, 2013).

Recientemente se demostró que TOR actúa a través de la proteína p70 RIBOSOMAL S6 KINASE (S6K) en *Arabidopsis* (Mahfouz *et al.*, 2006). Estudios posteriores mostraron que los polisomas (grupos de ribosomas) forman una plataforma para la fosforilación y activación de S6K dependiente de TOR. Al estar S6K, se asocia con polisomas; cuando TOR llega a ser activada por auxinas, es reclutada a los polisomas, conduciendo a la fosforilación y subsecuente disociación de la S6K activa. A su vez, S6K regula la traducción selectiva de los mensajeros de ácido ribonucleico (mRNAs, Messenger Ribonucleic acid por sus siglas en inglés) conteniendo secuencias reguladoras actuando en *CIS* en la región no traducida 5' (5'UTR, 5 untranslated region, por sus siglas en inglés) (Schepetilnikov *et al.*, 2013). Esas secuencias son marcos de lectura abiertos no traducidos cortos (uORFs, untranslated open reading frames, por sus siglas en inglés) que interrumpen la traducción para que los ribosomas no puedan reiniciar. La presencia de uORFs en aproximadamente el 30% de los mRNAs de *Arabidopsis* indica que este tipo de control transcripcional es usado en plantas; e incluye mRNAs de distintas categorías funcionales como las respuestas a hormonas, señalización de azúcares y el control del ciclo celular (Kim *et al.*, 2007).

Los factores de inicio de la traducción (eIFs) pueden permanecer asociados con los ribosomas corriente abajo de los uORFs para regular el reinicio de la traducción (Roy *et al.*, 2010). En las células animales, los complejos eIF3 sirven como un sitio de acoplamiento para S6K su posterior fosforilación y activación (Holz *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, S6K fosforila a eIF3h en una forma dependiente de TOR conduciendo al polisoma cargado de eIF3h y el reinicio de la

traducción efectivo de los mRNAs conteniendo uORFs en respuesta a auxinas (Fig. 7 abajo) (Schepetilnikov *et al.*, 2013).

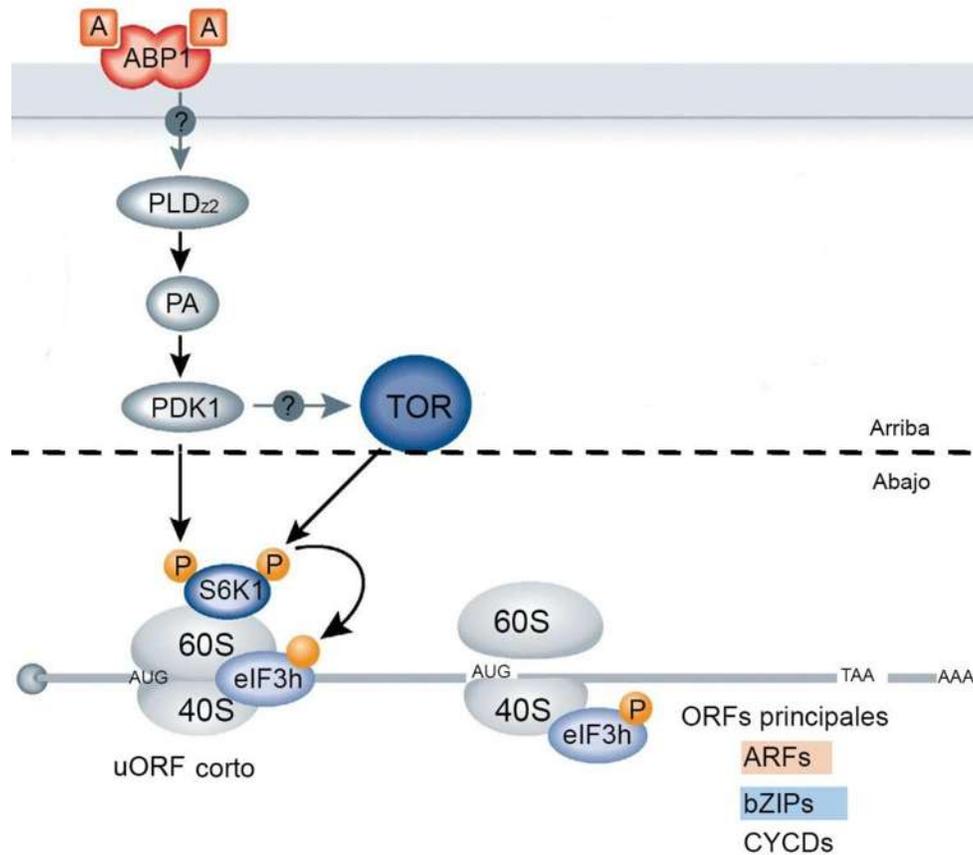


Figura 7. Regulación de la traducción de proteínas por TOR y auxinas. Arriba, el modelo propuesto para la activación de TOR por las auxinas vía el receptor ABP1. A, auxina; PLD_{z2}, fosfolipasa D_{z2}; PA, ácido fosfatídico; PDK1, proteína cinasa dependiente de fosfolípidos. Abajo, esquema del mecanismo por el cual TOR controla la traducción de proteínas en plantas. P, fosfato; S6K, proteína cinasa S6; eIF3h, factor de inicio de la traducción 3h; 60S y 30S, subunidades del ribosoma; uORF pequeño, marco de lectura abierto no traducido corto; ORFs principales, marcos de lectura abiertos principales; ARFs, factores de transcripción de la señalización de auxinas; bZIPs, factores de transcripción relacionados con defensa, estrés y el desarrollo de la flor y la semilla; CYCDs, cinasas dependientes de ciclinas tipo D del ciclo celular. (Adaptado de Bögre *et al.*, 2013).

La forma en la que las auxinas activan a TOR no es clara pero se ha propuesto un modelo al respecto. Las respuestas tempranas a auxinas son señalizadas a través de una proteína periférica AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1) localizado en la cara extracelular de la membrana plasmática en la pared celular (Sauer y Kleine-Vehn, 2011). La *Phospholipase D zeta2* (PLD_{z2}) es requerida en la respuesta a

auxinas y se propone que puede ser activada por ABP1 (Li y Xue, 2007). Las PLDs producen al segundo mensajero de señalización, el ácido fosfatídico (PA, phosphatidic acid, por sus siglas en inglés) que en plantas activan a PHOSPHOLIPID-DEPENDENT PROTEIN KINASE 1 (PDK1) (Anthony *et al.*, 2004). PDK1 es un activador de una familia de proteínas cinasas, conocidas como cinasas AGC, incluyendo a S6K y se propone que también puede fosforilar a TOR (Fig. 7 arriba) (Bögge *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

El ácido fólico es una vitamina cuyo función está muy bien documentado en el metabolismo en animales y humanos; sin embargo, se desconoce mucha información sobre su función en la biología del desarrollo en plantas. El sistema radicular es vital para la planta ya que le permite captar agua y nutrientes a la misma. Las fitohormonas regulan cada aspecto en el ciclo de vida en las plantas, en particular las auxinas son esenciales para la formación de la raíz. Recientemente, las auxinas han sido relacionadas con la ruta de señalización de TOR. Lo anterior permite inferir una posible interacción entre el ácido fólico y las vías de señalización de auxinas y TOR en el desarrollo de la raíz.

4. HIPÓTESIS

El ácido fólico regula el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* mediante un mecanismo que implica las rutas de señalización de auxinas y TOR.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar el efecto del ácido fólico (AF) en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* y su relación con las rutas de señalización de auxinas y TOR.

5.2. Objetivos particulares

- Determinar el efecto del ácido fólico en diferentes concentraciones para evaluar la división y elongación celular así como el mantenimiento del nicho de células iniciales en la raíz.
- Evaluar la participación de la vía de señalización de auxinas y los principales reguladores del crecimiento vegetal durante el crecimiento postembrionario de la raíz en respuesta al ácido fólico.
- Analizar el papel de la ruta de señalización TOR en la respuesta radicular al ácido fólico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico y compuestos con actividad biológica

En este trabajo se utilizaron semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0), las líneas transgénicas *pPRZ1:GUS* (Sieberer *et al.*, 2003), *CycB1;1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *pAtEXP7::GUS* (Cho y Cosgrove, 2002), *DR5:GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997), *pLOX2:FLUC/GUS* (Jensen *et al.*, 2002), *pPLD ζ 2:GUS* (Li y Xue, 2007), *pCYCD6;1::GFP* (Sozzani *et al.*, 2010), *DR5:GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003), *pPLT1:CFP* (Galinha *et al.*, 2007), *pPLT2:CFP* (Galinha *et al.*, 2007), *pSCR:H2B:YFP* (Heidstra *et al.*, 2004), *pSHR:GFP* (Helariutta *et al.*, 2000) y *pWOX5:GFP* (Sarkar *et al.*, 2007); así como las mutantes de señalización de auxinas *tir1-1/afb1-5/afb2-5* (Parry *et al.*, 2009), *slr1* (Fukaki *et al.*, 2002), *arf7/arf19* (Okushima *et al.*, 2007), *jar1* (Staswick *et al.*, 1992), *myc2-1* (SALK_061267) y *myc2-2* (SALK_017005); además de una línea de RNAi *tor* inducible por estradiol llamada *tor-es1* (Xiong y Sheen, 2012). Los compuestos con actividad biológica utilizados en este estudio son el ácido fólico (AF, No. Cat. F8758), el ácido jasmónico (AJ, No. Cat. J2500) y el estradiol (EST, No. Cat. E2758). Los tres compuestos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

6.2. Condiciones de crecimiento

Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) por 4 minutos y cloro al 10% (v/v) por 4 minutos en agitación constante a 1400 rpm. Después de cinco lavados con agua desionizada estéril, el material biológico se incubó por 48 horas a 4 °C. Posteriormente, las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de

Petri en medio de cultivo empleado en nuestro laboratorio para el crecimiento de *Arabidopsis thaliana* el cual es una versión modificada del medio Murashige y Skoog diseñado para el crecimiento y análisis de cultivos de tejido de tabaco (Murashige y Skoog, 1962). El medio contiene sacarosa al 0.6% siendo la concentración de azúcar que permite un crecimiento óptimo; sales MS al 20% (sales basales MS, adquiridas en la casa Sigma-Aldrich) de la concentración sugerida (4.3 g/l) del medio MS original, por lo que nos referimos a este medio como MS 0.2X (también lo nombramos medio control); después de un ajuste a pH 7 se agregó fitagar al 1% (Fitagar grado micropropagación, adquirido en la casa Phytechnology) para una consistencia sólida. El estradiol fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO, adquirido en la casa Sigma-Aldrich), el ácido fólico en una mezcla 1:1 de agua desionizada:DMSO y el ácido jasmónico en etanol anhidro (EtOH, comprado en la casa Sigma-Aldrich). Los compuestos en solución se agregaron a los medios en estado líquido (alrededor de 50 °C) a la concentración deseada y las placas control fueron suplementadas con el volumen mayor del solvente usado en los tratamientos. Una vez que el medio solidifica, las semillas se sembraron en la superficie del mismo y las placas se colocaron en una cámara de crecimiento para plantas (Percival Scientific AR-95-L) con un fotoperiodo de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, una intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol m}^2\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 22 °C.

6.3. Análisis del crecimiento vegetal

Diez días después de la germinación, la raíz primaria de las plántulas se midió con una regla (LRP, longitud de la raíz primaria); el número de raíces laterales (NRL) presentes en la raíz primaria desde el ápice hasta la zona de transición entre la raíz y el tallo se registró con ayuda de un estereoscopio (Leica MZ6) a un aumento de 10X; y la densidad de raíces laterales (DRL) se calculó dividiendo el NRL entre la LRP. Los primordios de raíces laterales (PRLs) fueron clasificados y cuantificados de acuerdo a sus etapas del desarrollo como se reportó por Malamy

y Benfey (1997) en plántulas de 4 días después de la germinación. El peso fresco total (PFT), del follaje (PFF) y de la raíz (PFR) de 5 o 10 plántulas se crecieron sobre la misma caja fue medido con una balanza analítica (Ohaus) y se evaluaron tres cajas de cada condición. Las diferencias entre los datos obtenidos de una misma respuesta (LRP, NRL, DRL, PRLs, PFT, PFF y PFR) fueron analizadas con el programa STATISTICA 10.0 (Dell StatSoft, Austin, Texas, USA), mediante pruebas de varianza y significancia Tukey. En las diferentes gráficas, se indica con letras si las medias de los distintos datos difieren significativamente ($p < 0.05$).

6.4. Actividad histoquímica *uidA* y microscopía de contraste de fases

Plántulas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* *pPRZ1:GUS*, *CycB1;1::uidA*, *pAtEXP7::GUS*, *DR5:GUS*, *pLOX2:FLUC/GUS* y *pPLDζ2:GUS* de cuatro días después de la germinación fueron incubadas en cajas para microtítulo con X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucurónido) al 0.1% en un amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 al 0.1 M y un pH de 7) con $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ al 2 mM, durante la noche (con excepción de *pAtEXP7::GUS* y *pPRZ1:GUS*, los cuales fueron incubados 20 minutos y 4 horas respectivamente) a 37 °C (Jefferson *et al.*, 1987). Una vez retirada la solución de X-Gluc se clarificó el tejido con la solución 1 (HCl 0.24 N y metanol al 20% [v/v]) durante 60 minutos a 62 °C, al remover la solución 1 se agregó la solución 2 (NaOH al 7% [m/v] y etanol al 60% [v/v]) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se desechó la solución 2 y el tejido se fijó con tratamientos de etanol al 40, 20 y 10% (v/v) sucesivamente durante 20 minutos cada uno, desechando el tratamiento anterior y sustituyéndolo por el siguiente. El etanol al 10% se retiró para agregar glicerol al 50% (v/v) (Malamy y Benfey, 1997). Las plántulas en la solución de glicerol fueron observadas al estereoscopio (Leica MZ6) capturando imágenes del follaje de las plántulas *pLOX2:FLUC/GUS*, en tanto que *pPRZ1:GUS*, *CycB1;1::uidA*, *pAtEXP7::GUS*, *DR5:GUS* y *pPLDζ2:GUS* fueron montadas con glicerol al 50% sobre un portaobjetos de vidrio, cubiertas con cubreobjetos y se sellaron con

barniz de uñas comercial, subsecuentemente se observaron y tomaron fotografías en un microscopio de contraste de fases [microscopio Nomarski] (Leica DFC450 C). Para cada tratamiento, al menos 10 plantas transgénicas fueron analizadas. La coloración azul en los tejidos se debe a la actividad de la enzima β -glucuronidasa (GUS) sobre el sustrato X-Gluc, cuya expresión está regulada por los promotores de los genes de interés.

6.5. Tinción de yoduro de propidio y microscopía confocal

Plántulas de *Arabidopsis thaliana* *pCYCD6;1::GFP*, *DR5:GFP*, *pPLT1:CFP*, *pPLT2:CFP*, *pSCR:H2B:YFP*, *pSHR:GFP* y *pWOX5:GFP* de cuatro días después de la germinación fueron transferidas a una solución de yoduro de propidio 10 mg/mL por un minuto. Las plántulas fueron enjuagadas en agua y montadas con glicerol al 50% sobre un portaobjetos y cubiertas con un cubreobjetos. Cada línea fue analizada por separado para el yoduro de propidio (con un láser de argón de una longitud de onda de 568 nm de excitación y una ventana de emisión de 585-610 nm) y la proteína verde fluorescente [GFP] (488 nm de excitación/ 505-550 nm de emisión), la proteína cian fluorescente [CFP] (439 nm de excitación/ 476 nm de emisión) o la proteína amarillo fluorescente [YFP] (514 nm de excitación/ 527 nm de emisión) usando un microscopio confocal (Olympus FV1000), esas dos micrografías fueron fusionadas para producir una imagen final. Para cada tratamiento, al menos 10 plantas transgénicas fueron analizadas.

6.6. Análisis de micrografías

Las micrografías adquiridas en los microscopios (Nomarski y confocal) fueron analizadas en el programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Para cada tratamiento y línea, 10 micrografías se registraron, obteniendo parámetros como longitud del tricoblasto, longitud del meristemo, longitud de la zona de elongación,

células expresando el reportero, expresión relativa GUS y fluorescencia relativa. La expresión de los genes fusionados a los reporteros GUS, GFP, CFP o YFP fue cuantificada determinando los pixeles de interés (azul, verde, cian o amarillo, respectivamente) en un área definida. Entonces se obtuvo una unidad de valor arbitraria (UA=pixeles/ μm^2), la cual se normalizó a 1 en la condición control y los tratamientos con ácido fólico fueron ajustados relativos a esta, por esta razón es que en las figuras se reporta la expresión de GFP, CFP o YFP como fluorescencia relativa o expresión relativa GUS para el caso de las líneas reporteras *GUS (uidA)*. La estadística para estos parámetros fue la misma que se utilizó en el apartado de “análisis del crecimiento vegetal”.

7. RESULTADOS

7.1. El ácido fólico (AF) modifica la arquitectura de la raíz

Para evaluar la función del AF en la arquitectura del sistema de la raíz, se suplementaron a los medios de cultivo concentraciones crecientes en un intervalo de 0.1 hasta 200 μM . Se registraron algunos parámetros de la arquitectura radicular y se encontró que el compuesto tiene una mayor actividad en las concentraciones de 100 y 200 μM , inhibiendo el crecimiento de la raíz primaria (Fig. 8a) e induciendo la formación de las raíces laterales (Fig.8b-c).

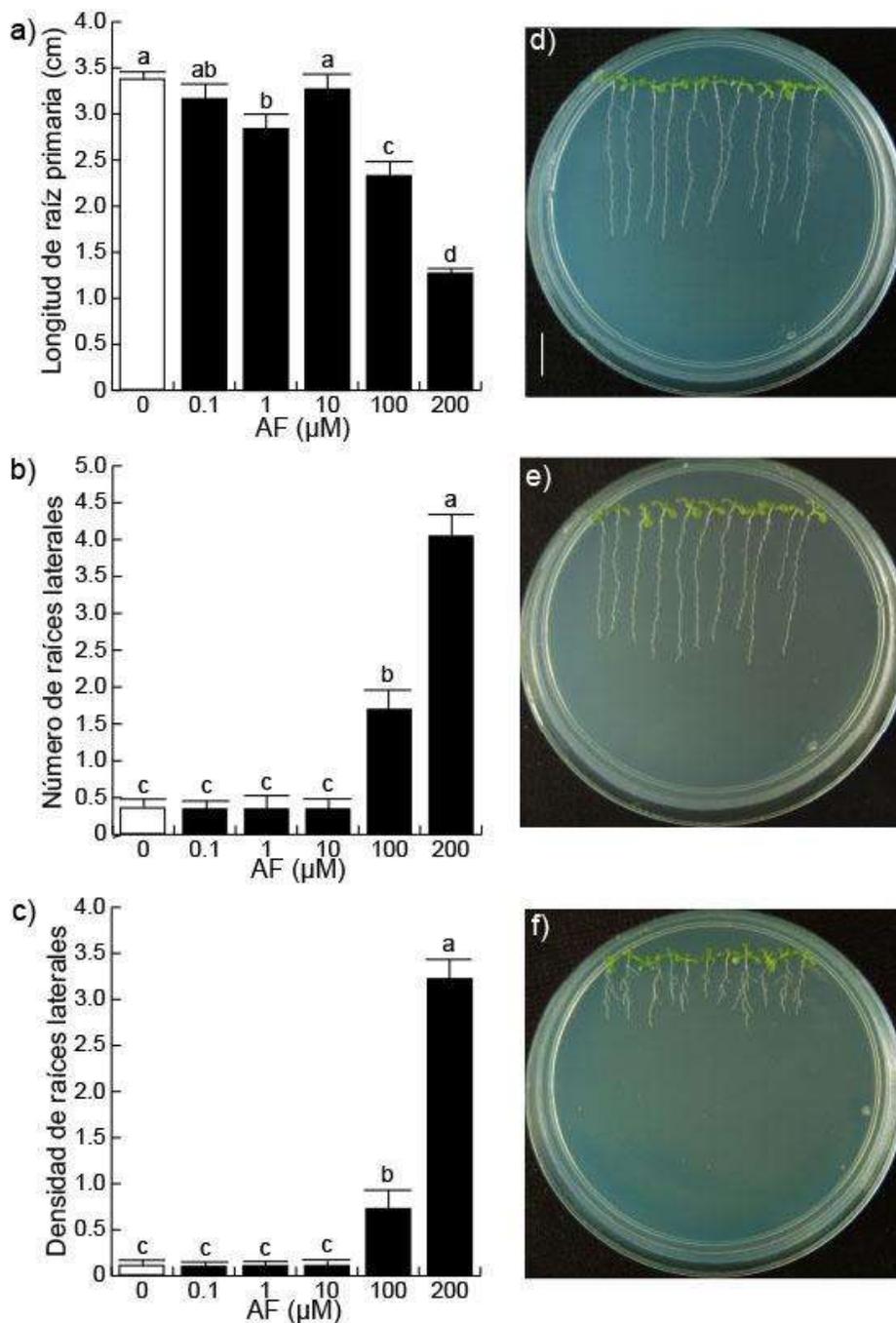


Figura 8. Efecto del ácido fólico sobre el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Las plantas silvestres fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 10 días: **a)** la longitud de la raíz primaria [LRP], **b)** el número de raíces laterales [NRL] y **c)** la densidad de raíces laterales [DRL] fueron registrados. Imágenes representativas: **d)** la condición control, **e)** 10 y **f)** 200 μM de AF (barra de escala= 1cm). Los datos indican la media ± la desviación estándar (n=30 para LRP, NRL y DRL). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Debido a que el intervalo entre 10 y 100 μM de AF era bastante amplio, se reajustó la curva en concentraciones que van de 25 a 125 μM y se hizo un análisis más completo en el crecimiento *in vitro* de plántulas silvestres (Fig. 9). En esta nueva curva, el AF acorta la raíz primaria de manera dependiente de la concentración (Fig. 9a) e incrementa el número de raíces laterales aproximadamente al doble con respecto de la condición control en todos los tratamientos utilizados (Fig. 9b). Un análisis del número de raíces laterales por centímetro de raíz primaria (densidad de raíces laterales) mostró que la formación de estos órganos incrementa conforme aumenta la concentración de AF (Fig. 9c).

El registro del peso fresco total en las plántulas tratadas con el compuesto dio como resultado cambios discretos en la acumulación de biomasa entre el control y los tratamientos utilizados (Fig. 9d). Un análisis más detallado del peso fresco mostró un incremento en el follaje y una disminución en la raíz en las plántulas tratadas a diferencia de aquellas a las que solo se les aplicó el solvente (Fig. 9e-f). Las imágenes en la figura 9 muestran la condición control (g), la concentración de 25 μM donde hay un incremento del número de raíces laterales (h) y 125 μM el tratamiento donde se observa la mayor modificación en la arquitectura de la raíz (i).

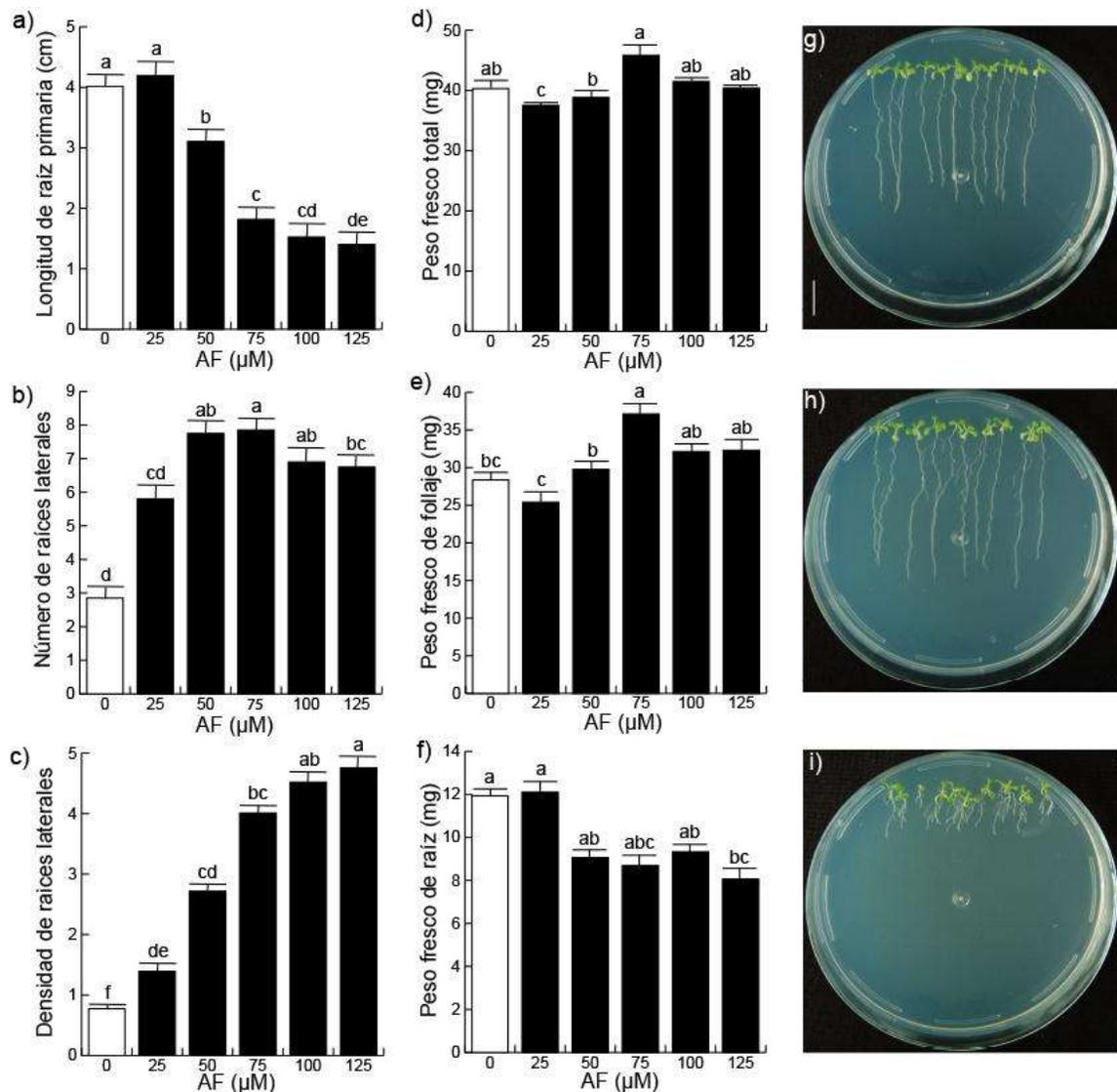


Figura 9. Efecto del ácido fólico (AF) sobre el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Las plántulas silvestres fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 10 días; **a)** la longitud de la raíz primaria [LRP], **b)** el número de raíces laterales [NRL], **c)** la densidad de raíces laterales [DRL], **d)** el peso fresco total [PFT], **e)** el peso fresco del follaje [PFF] y **f)** el peso fresco de la raíz [PFR] fueron registrados. Imágenes representativas de **g)** la condición control, **h)** 25 e **i)** 125 μM de AF (barra de escala= 1cm). Los datos indican la media ± la desviación estándar (n=30 para LRP, NRL y DRL; n=3 para PFT, PFF y PFR). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de p<0.05. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.2. El ácido fólico (AF) regula los programas de división y elongación celular en la raíz

Para entender como el AF modifica el crecimiento de la raíz primaria se analizó la expresión del marcador de meristemas *pPRZ1:GUS*, el cual se expresa exclusivamente en tejidos proliferativos (Sieberer *et al.*, 2003) y los marcadores de división celular *pCYCD6;1::GFP* y *CycB1;1::uidA*, los cuales se expresan durante la transición G1/S (Sozzani *et al.* 2010) y en la fase G2/M del ciclo celular (Colón-Carmona *et al.*, 1999), respectivamente. Para el caso de *pPRZ1:GUS*, encontramos que la longitud del meristemo disminuye de manera dependiente de la concentración del compuesto (Fig. 10a), lo cual indica que existe una menor zona de tejido proliferativo (Fig. 10b).

Cuando se evaluó la expresión de *pCYCD6;1::GFP* encontramos que al aumentar la concentración de AF hay más células expresando el reportero (Fig. 10c), en los tratamientos con AF ocurre un incremento en la intensidad y el dominio de expresión del reportero, el cual va acompañado con cambios en la morfología de las células (Fig. 10d). Un análisis del número de células expresando *CycB1;1::uidA* mostró que si bien hay un mayor número de células expresando el marcador en cada uno de los tratamientos de AF utilizados (Fig. 10e), el dominio de expresión se reduce considerablemente conforme aumenta la concentración del compuesto (Fig. 10f) y esto último se correlacionó con la expresión observada en *pPRZ1:GUS*.

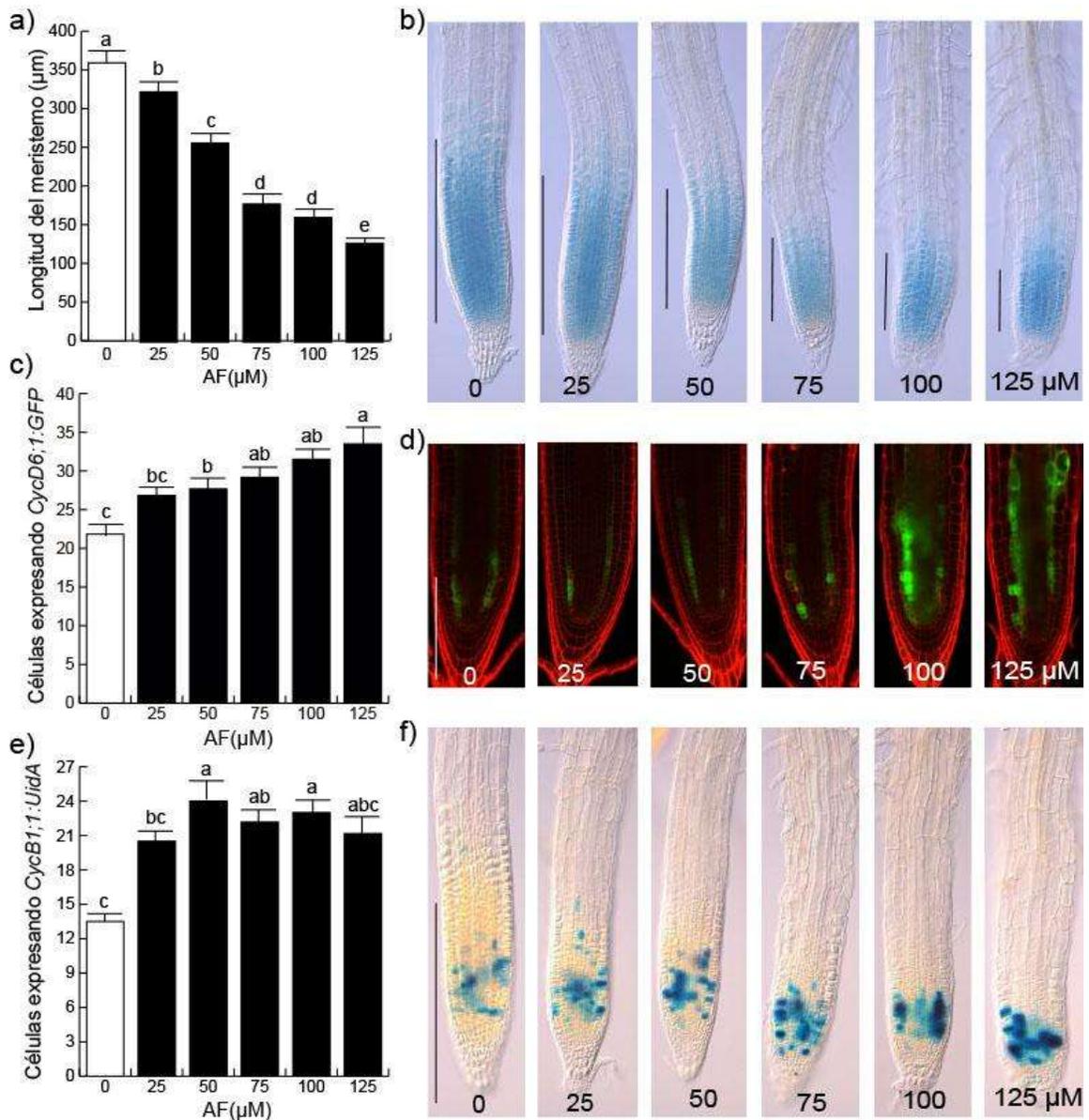


Figura 10. Respuesta al ácido fólico (AF) de las líneas transgénicas *pPRZ1::GUS*, *pCYCD6;1::GFP* y *CycB1;1::uidA*. Las plántulas fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 4 días, posteriormente *pPRZ1::GUS* y *CycB1;1::uidA* fueron incubadas con el sustrato X-Gluc y *pCYCD6;1::GFP* con yoduro de propidio; **a)** la longitud del meristemo [LM] se registró a partir de las micrografías de *pPRZ1::GUS* en las condiciones indicadas del panel “b” (Las barras indican la longitud aproximada del meristemo evaluada en el panel “a”). **c)** las células expresando el reportero [CER] fueron registradas a partir de las micrografías de *pCYCD6;1::GFP* en las condiciones indicadas del panel “d” (Barra de escala= 50 µm). **e)** las células expresando el reportero [CER] fueron registradas a partir de las micrografías de *CycB1;1::uidA* en las condiciones indicadas del panel “f” (barra de escala= 50 µm) Los datos indican la media ± la desviación estándar (n=10 para LM y CER). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Además del estudio con las líneas reporteras de división celular, se realizó un análisis con el gen reportero *pAtEXP7::GUS*, el cual funciona como un marcador del tejido epidérmico diferenciado (Cho y Cosgrove, 2002). Dado que *pAtEXP7::GUS* nos permitió visualizar el tejido diferenciado, se realizó una medición de la zona de elongación, la cual disminuye drásticamente conforme aumenta la concentración de AF (Fig. 11a), siendo hasta de un 60% menor en el tratamiento de 125 μM de AF. Una disminución similar ocurre en los tricoblastos, donde la longitud llega a ser hasta un 40% menor en el tratamiento más alto de AF (Fig.11b). El incremento en la expresión de *pAtEXP7::GUS* en los tratamientos con AF indica una mayor diferenciación celular (Fig. 11c).

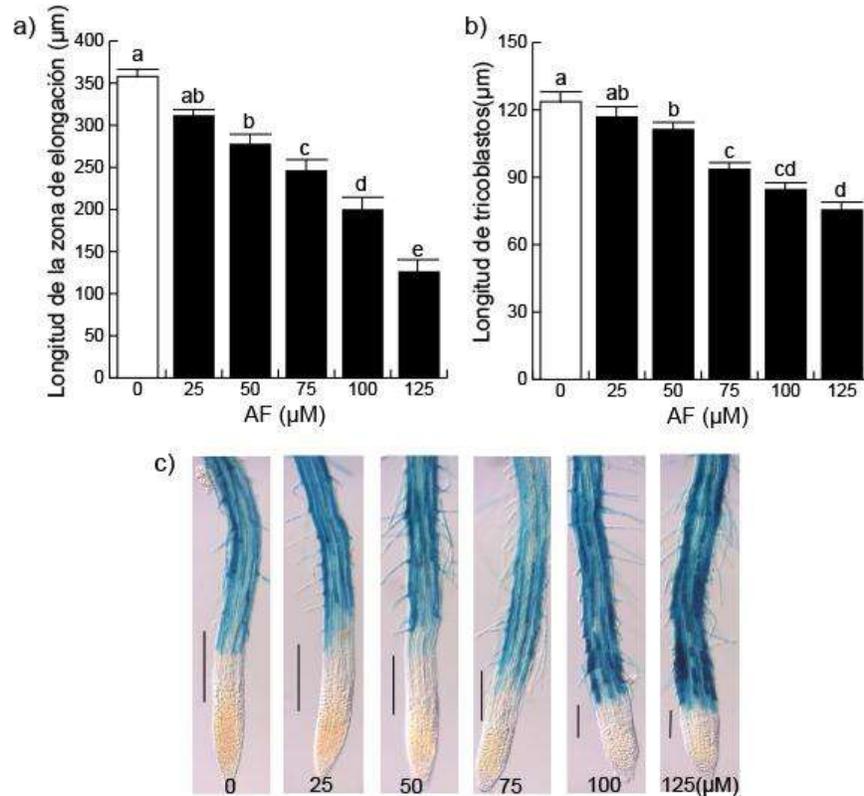


Figura 11. Respuesta al ácido fólico (AF) de la línea transgénica *pAtEXP7::GUS*. Las plántulas llevando la construcción *pAtEXP7::GUS* fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 4 días, posteriormente fueron incubadas con el sustrato X-Gluc; **a)** la longitud de la zona de elongación [LZE] y **b)** la longitud del meristemo [LM] fueron registradas. **c)** micrografías representativas de la condición control y de las concentraciones indicadas de AF (las barras indican la longitud aproximada del meristemo). Los datos indican la media \pm la desviación estándar ($n=10$ para LZE y LM). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.3. La expresión de factores de transcripción del nicho celular se modifica en respuesta al ácido fólico (AF)

Para dilucidar el efecto del AF en la regulación del meristemo de la raíz primaria se analizó la expresión de algunos de los factores de transcripción implicados en dos vías paralelas encargadas de regular el mantenimiento del nicho de células. La vía dependiente de los factores de transcripción PLETHORA implica principalmente a *PLT1* y *PLT2*, en tanto que la ruta del módulo SHORT ROOT/SCARECROW incluye principalmente a *SHR*, *SCR* y *WOX5* (Petricka *et al.*, 2012). Plántulas de *A. thaliana* que portan las construcciones que nos permiten visualizar la expresión de los diferentes factores de transcripción previamente mencionados, fueron crecidas en condiciones control y la curva de concentraciones de AF (25-125 μ M) definida con base en el acortamiento de la raíz primaria inducido por el compuesto.

La expresión de *pPLT1:CFP* y *pPLT2:CFP* ocurre principalmente en el centro quiescente (QC, por sus siglas en inglés), la columela, la estela y la cubierta lateral de la raíz o cofia lateral; cuando las plántulas crecen en los medios con AF, la expresión de *pPLT1:CFP* disminuye y se restringe, confinándose en el QC y parte de la estela (Fig. 12a,b). En tanto que *pPLT2:CFP* se mantiene en los mismos tejidos donde normalmente ocurre pero con una menor expresión (Fig. 12a,c). Por otra parte, *pSHR:GFP* se expresa en la estela, las células del periciclo y el QC, *pSCR:H2B:YFP* en el periciclo y el QC, en tanto que *pWOX5:GFP* solo en el QC (Fig. 12a); cuando la concentración de AF incrementa ocurre una disminución en la expresión de los tres reporteros de manera dependiente de la concentración del compuesto (Fig. 12d,e,f). Cabe mencionar que la localización de los tres genes reporteros se mantiene en los mismos tejidos; sin embargo, presenta una menor intensidad (Fig. 12a).

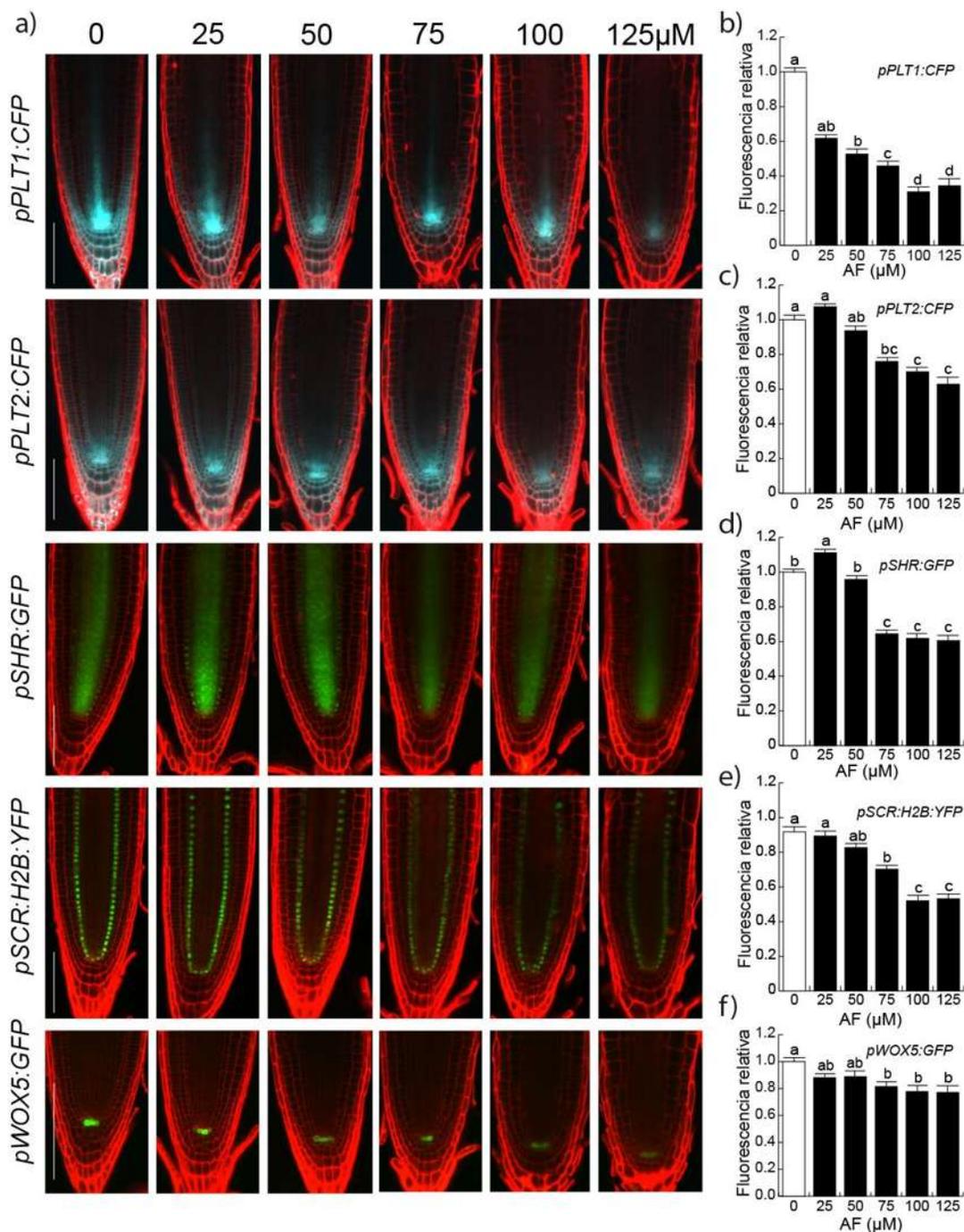


Figura 12. Efecto del ácido fólico (AF) en la expresión de pPLT1:CFP, pPLT2:CFP, pSHR:GFP, pSCR:H2B:YFP y pWOX5:GFP. Las plántulas de las distintas líneas transgénicas fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 4 días, posteriormente fueron incubadas con yoduro de propidio. **a)** micrografías representativas de las distintas líneas transgénicas en la condición control y las concentraciones indicadas de AF (Barra de escala= 50 μm). Fluorescencia relativa [FR] en **b)** pPLT1:CFP, **c)** pPLT2:CFP, **d)** pSHR:GFP, **e)** pSCR:H2B:YFP y **f)** pWOX5:GFP. Los datos indican la media ± la desviación estándar (n=10 para FR). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.4. El ácido fólico (AF) estimula la maduración de primordios de raíces laterales mediante un mecanismo auxínico

Adicionalmente al acortamiento de la raíz primaria observado, el AF induce la formación de raíces laterales, las cuales surgen a partir de primordios de raíces laterales. Para evaluar cambios en el tipo y la cantidad de primordios, se crecieron plántulas de *Arabidopsis* que expresan la construcción *DR5:GUS* para facilitar el análisis debido a que la expresión del reportero se lleva a cabo en estas estructuras. *DR5:GUS* está formado por un promotor sintético de respuesta a auxinas fusionado a la secuencia que codifica para la enzima β -glucuronidasa, siendo esta última la que en presencia del sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido) indica el sitio y la intensidad donde se lleva a cabo la señalización de auxinas (Ulmasov *et al.*, 1997).

Un registro del tipo de primordios según las siete etapas de desarrollo descritas por Malamy y Benfey en (1997), mostró que en la condición control la mayor cantidad de primordios se encuentran en las primeras etapas y conforme la concentración de AF incrementa hay más primordios en las últimas etapas y más raíces laterales emergidas (Fig. 13a). Por otra parte, el análisis de primordios totales indicó que aun cuando el compuesto induce la maduración de los primordios, ocurre una disminución de la cantidad de estas estructuras conforme incrementa la concentración de AF (Fig. 13b). Adicional al efecto sobre la cantidad y el tipo de primordios, se observaron cambios en la expresión del reportero inducible por auxinas *DR5:GUS* (datos no mostrados), por lo que se realizó un análisis más fino por microscopía confocal con *DR5:GFP*, encontrando que la expresión del reportero incrementa cuando se adiciona AF, tanto en los primordios como en la zona de la estela donde se están formando dichas estructuras y una vez que la raíz lateral ha emergido, la expresión disminuye en la estela con los tratamientos de AF (Fig. 13c).

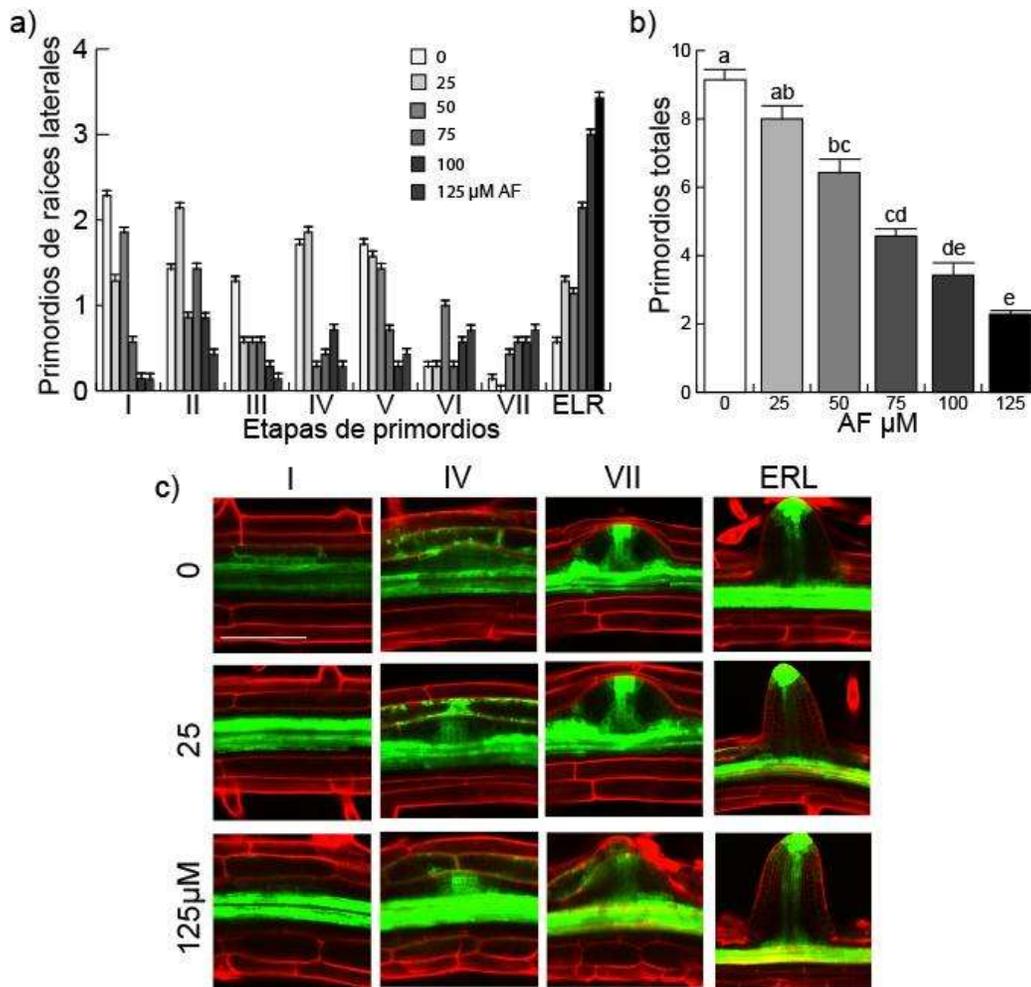


Figura 13. Efecto del ácido fólico (AF) en el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Las plántulas de DR5:GUS fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 4 días, posteriormente fueron incubadas con el sustrato X-Gluc; **a)** Los primordios de raíces laterales [PRLs] y **b)** los primordios totales [PTs] fueron registradas. **c)** Micrografías representativas de algunas etapas del desarrollo de los primordios en la condición control y las concentraciones indicadas de AF de plántulas DR5:GFP de 4 días después de la germinación incubadas con yoduro de propidio (Barra de escala= 100 μm). ERL= Raíz lateral emergida. Los datos indican la media ± la desviación estándar (n=10 para PRLs y PTs). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

En la raíz primaria de plantas silvestres, *DR5:GFP* se expresa en las células de la estela, mostrando una mayor expresión en la región más distal del meristemo apical de la raíz (RAM; por sus siglas en ingles), es decir, la zona de formación de raíces laterales y dicha expresión disminuye gradualmente en las células de la estela más cercanas al RAM (Fig. 14a). El tratamiento de 125 μM de AF provoca que *DR5:GFP* se exprese uniformemente en la estela de una raíz primaria más

corta (Fig. 14b). En la zona meristemática se puede observar que si bien en el tejido mitóticamente activo (como se mostró en la Figura 10) no hay gran diferencia en cuanto a la expresión de *DR5:GFP*, el principal cambio ocurre en el nicho de células madre, ya que en la condición control *DR5:GFP* se expresa en el centro quiescente y las células de la columela (Fig. 14c), en tanto que el tratamiento con AF provoca que se exprese en el centro quiescente y las células iniciales (Fig. 14d).

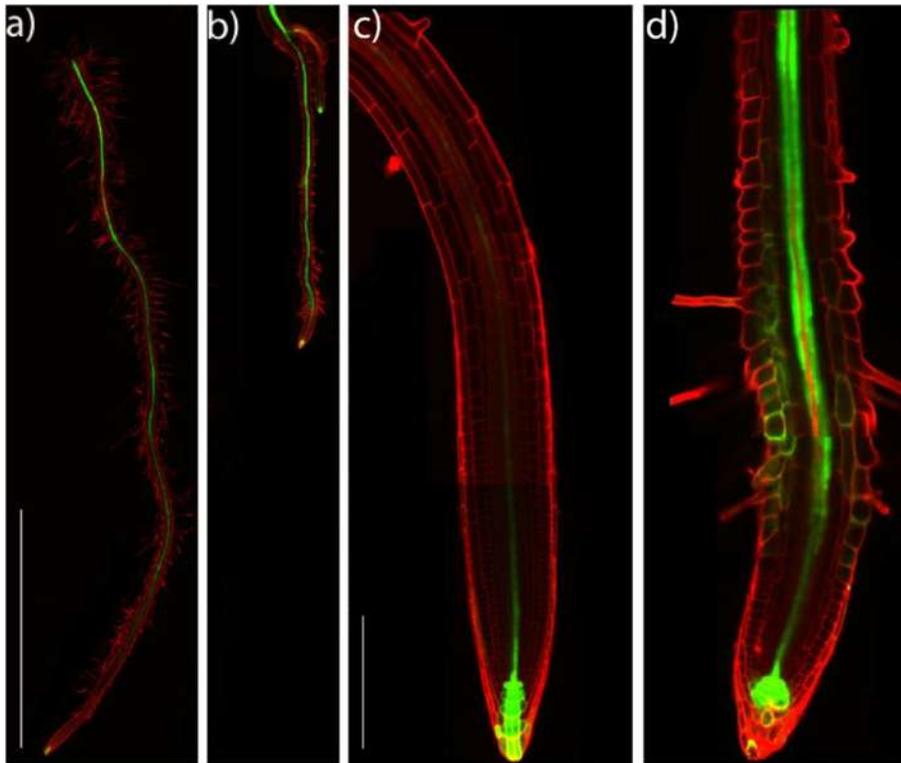


Figura 14. Respuesta al ácido fólico (AF) de *DR5:GFP* en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Las plántulas de la línea transgénica *DR5:GFP* fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 4 días, posteriormente fueron incubadas con yoduro de propidio; las imágenes muestran el patrón de expresión del reportero de respuesta a auxinas *DR5:GFP* en raíces completas de plántulas crecidas en **a)** la condición control y **b)** 125 μ M de AF (Barra de escala= 1 cm). Los paneles “c” y “d” son un acercamiento de la punta de la raíz de las plántulas en “a” y “b” respectivamente (Barra de escala= 100 μ m). El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.5. La señalización de auxinas media los efectos del ácido fólico (AF) sobre la arquitectura de la raíz

Debido a que la señalización de auxinas parece estar implicada en los cambios ocasionados con los tratamientos de AF sobre la raíz, se decidió evaluar la respuesta radicular a la vitamina de tres mutantes afectadas en genes que codifican para diversos elementos de la señalización de auxinas, la cual finaliza con la inducción de la expresión de genes a través de factores de transcripción. Las mutantes analizadas fueron *arf7/afr19*, una doble mutante afectada en dos genes que codifican para factores de transcripción de la vía auxínica (Okushima *et al.*, 2007); *slr1*, una mutante en un gen que codifica para un represor de la ruta de señalización (IAA14) y dicha mutación provoca una ganancia de función bloqueando drásticamente la respuesta a auxinas (Fukaki *et al.*, 2002) y *tir1-1/afb1-5/afb2-5*, una triple mutante afectada en tres genes que codifican para receptores de auxinas (Parry *et al.*, 2009).

Las plántulas silvestres y mutantes mencionadas anteriormente fueron crecidas en la condición control y con los tratamientos de 25 a 125 μ M de AF, encontrando que como ocurren con las plantas silvestres, las tres mutantes acortan su raíz primaria de manera dependiente de la concentración de AF; sin embargo, dicha inhibición ocurrió con menor intensidad en *slr1*, la cual mostró una resistencia parcial a dicho efecto en cada uno de los tratamientos de AF utilizados (Fig. 15a). En cuanto a la formación de raíces laterales, el AF fue incapaz de inducir la formación de estas estructuras en *arf7/afr19* y *slr1*, las cuales no forman raíces laterales desde la condición control, en tanto que *tir1-1/afb1-5/afb2-5* tiende a formar muy pocas raíces laterales y solo en el tratamiento de 125 μ M ocurrió un incremento significativo en el número y la densidad de estas estructuras sin llegar a ser igual al efecto observado en las plántulas silvestres (Fig. 15b-c).

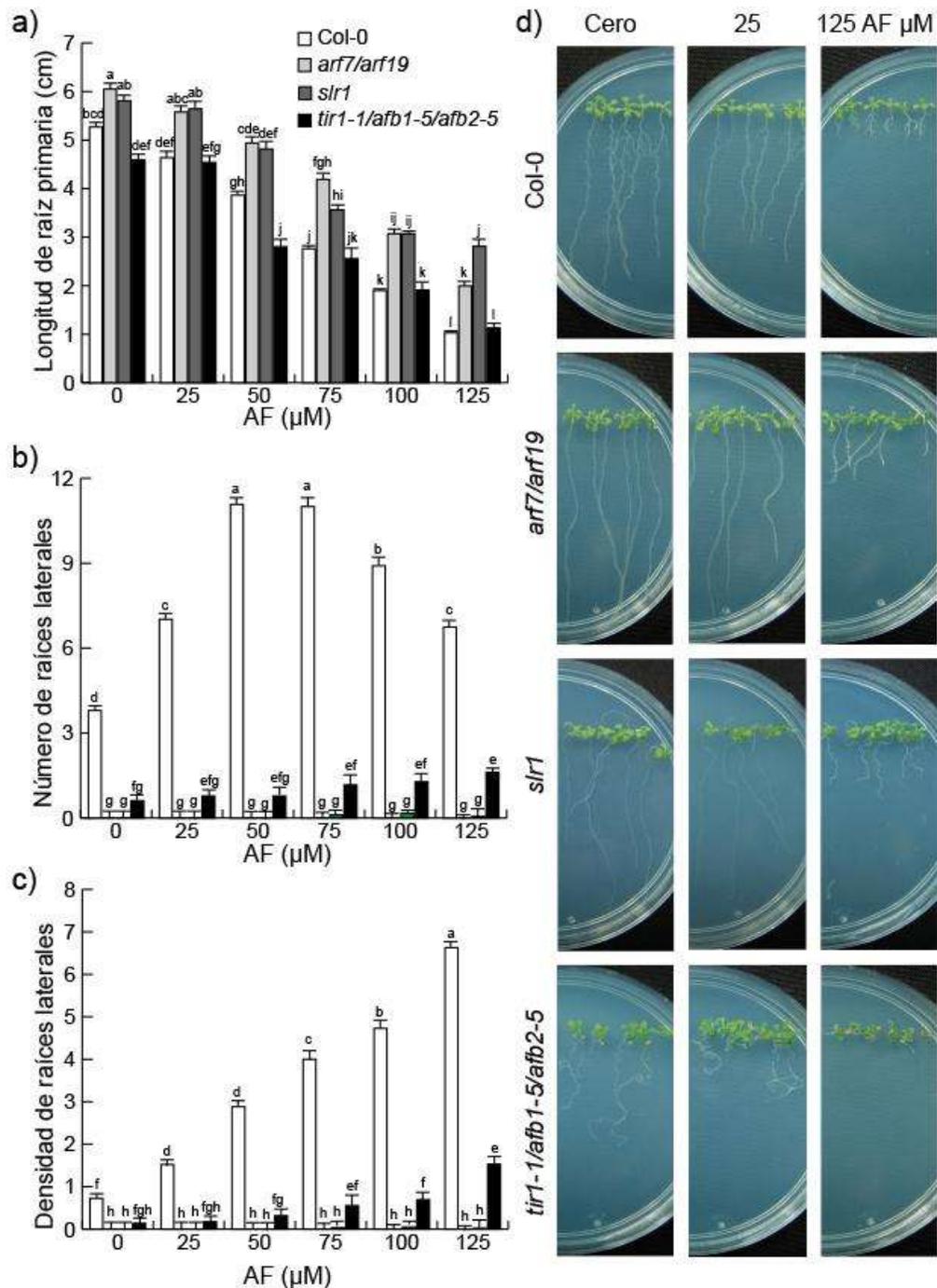


Figura 15. Efecto del ácido fólico (AF) en las mutantes de la ruta de señalización de auxinas *arf7/arf19*, *slr1* y *tir1-1/afb1-5/afb2-5*. Las plántulas silvestres y mutantes fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 10 días. **a)** la longitud de la raíz primaria [LRP]; **b)** el número de raíces laterales [NRL] y **c)** la densidad de raíces laterales [DRL] fueron registrados. **d)** Imágenes representativas de la condición control y las concentraciones indicadas de AF en las plántulas silvestres y las tres mutantes utilizadas (Barra de escala= 1cm). Los datos indican la media \pm la desviación estándar ($n=15$ para LRP, NRL y DRL). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.6. El ácido jasmónico (AJ) está implicado en el efecto del ácido fólico (AF) sobre el crecimiento de *Arabidopsis*.

Debido a que la señalización de auxinas es necesaria para que el AF provoque su efecto sobre las plantas, se decidió evaluar si otras vías de señalización hormonal estaban implicadas en el proceso. Análisis con diversas líneas transgénicas y mutantes afectadas en las rutas de señalización hormonal más ampliamente estudiadas fueron llevados a cabo, encontrando que solo el AJ (además de las auxinas) parece estar implicado en la respuesta vegetal al AF.

El gen *lox2* codifica para una lipoxigenasa implicada en la biosíntesis de AJ y la expresión de dicho gen se induce por la señalización del AJ como mecanismo de retroalimentación positiva (Jensen *et al.*, 2002). Las plántulas de *A. thaliana* portando la construcción *pLOX2:FLUC/GUS* nos permitieron visualizar la expresión basal del reportero en la condición control, la cual ocurre principalmente en los extremos de los cotiledones opuestos a los peciolo (Fig. 16a), en tanto que en el tratamiento con 32 μM de AJ (utilizado como un control positivo) la expresión se observa principalmente en los cotiledones y el hipocotilo e incluso en las hojas verdaderas que se forman en esta condición (Fig. 16b). En el tratamiento de 50 μM de AF se observa un incremento en la expresión de *pLOX2:FLUC/GUS* en los mismos sitios de la plántula cuando se trata con AJ (con excepción del hipocotilo), aunque la intensidad es menor que la observada en el tratamiento con AJ (Fig. 16c). Al incrementar la concentración de AF a 125 μM la expresión se vuelve muy similar a la de los tratamientos con AJ pero sin observarse nuevamente alguna coloración en el hipocotilo (Fig. 16d).

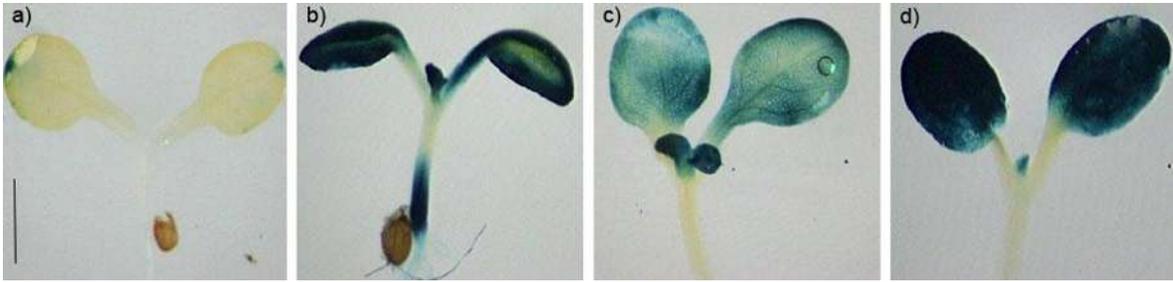


Figura 16. Respuesta al ácido fólico (AF) de pLOX2:FLUC/GUS en el follaje de *Arabidopsis thaliana*. Las plántulas de la línea transgénica de respuesta al ácido jasmónico (AJ) pLOX2:FLUC/GUS fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X por 4 días, posteriormente fueron transferidas a medios. **a)** control, **b)** 32 μ M de AJ, **c)** 50 y **d)** 125 μ M de AF, un días después fueron incubadas con el sustrato X-Gluc; (Barra de escala= 1 mm). El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

El incremento en la expresión de *pLOX2:FLUC/GUS* en tratamientos con AF nos motivó a analizar el crecimiento de mutantes afectadas en la respuesta al AJ para identificar si los elementos que participan en la biosíntesis o la señalización de la fitohormona están involucrados en el efecto del AF sobre la planta. La mutante *jar1* se encuentra afectada en un gen que codifica para la jasmonoil-L-isoleucina sintetasa, una enzima encargada de conjugar el AJ y la isoleucina en jasmonoil-isoleucina, siendo este último compuesto el que es capaz de activar al receptor del AJ (Staswick *et al.*, 1992; Staswick y Tiryaki, 2004; Katsir *et al.*, 2008; Santner *et al.*, 2009). Por su parte, *myc2-1* y *myc2-2* son dos mutantes con pérdida de la función en el gen *MYC2*, el cual codifica para un factor de transcripción de la vía de señalización de AJ (Lorenzo *et al.*, 2004; Dombrecht *et al.*, 2007). Un análisis del crecimiento de la raíz primaria mostró un comportamiento similar al de las plántulas silvestres en las mutantes *jar1* (Fig. 17a), *myc2-1* y *myc2-2* (Fig. 17b); además de que el fenotipo general de las mutantes es muy similar al de las plantas silvestres en los medios suplementados con AF (Fig. 17c).

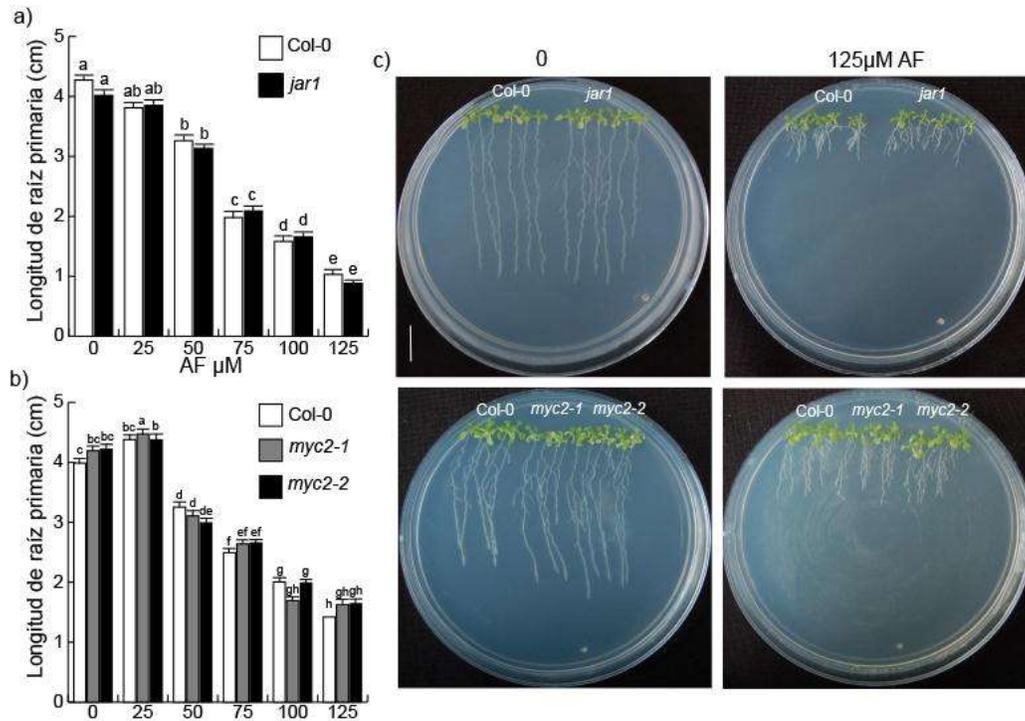


Figura 17. Efecto del ácido fólico (AF) en las mutantes de la ruta de señalización del ácido jasmónico jar1, myc2-1 y myc2-2. Las plántulas silvestres y las mutantes fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 10 días; la longitud de la raíz primaria [LRP] de las mutantes. **a)** jar1 y **b)** myc2 (alelos 1 y 2) fueron registrados. **c)** Imágenes representativas de la condición control y la concentración indicada de AF en las plántulas silvestres y las tres mutantes utilizadas (Barra de escala= 1 cm). Los datos indican la media \pm la desviación estándar (n=15 para LRP). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

7.7. TOR regula el crecimiento y el desarrollo vegetal por un mecanismo que involucra al ácido fólico (AF)

La fosfolipasa D zeta2 ha sido reportada como un punto de interconexión entre las vías de señalización de auxinas y TOR (Bögge *et al.* 2013), por lo que decidimos evaluar el efecto de esta vitamina sobre plántulas portando la construcción *pPLD ζ 2:GUS*, la cual funciona como reportero de la expresión del gen *PLD ζ 2* que codifica para la fosfolipasa D zeta2 (Li y Xue, 2007). El análisis de la expresión GUS reveló que el reportero no se expresa en la condición control ni en la punta (zona 1), ni en la zona de formación de raíces laterales (zona 2) de la raíz primaria, mientras que en los tratamientos con AF comienza a observarse la

expresión en la zona de formación de raíces laterales desde la concentración de 25 μM incrementando gradualmente conforme la concentración del compuesto es mayor (Fig. 18); sin embargo, no se observó la señal GUS en la punta de la raíz primaria en ninguno de los tratamientos utilizados aun cuando el fenotipo en esta zona se modifica drásticamente.

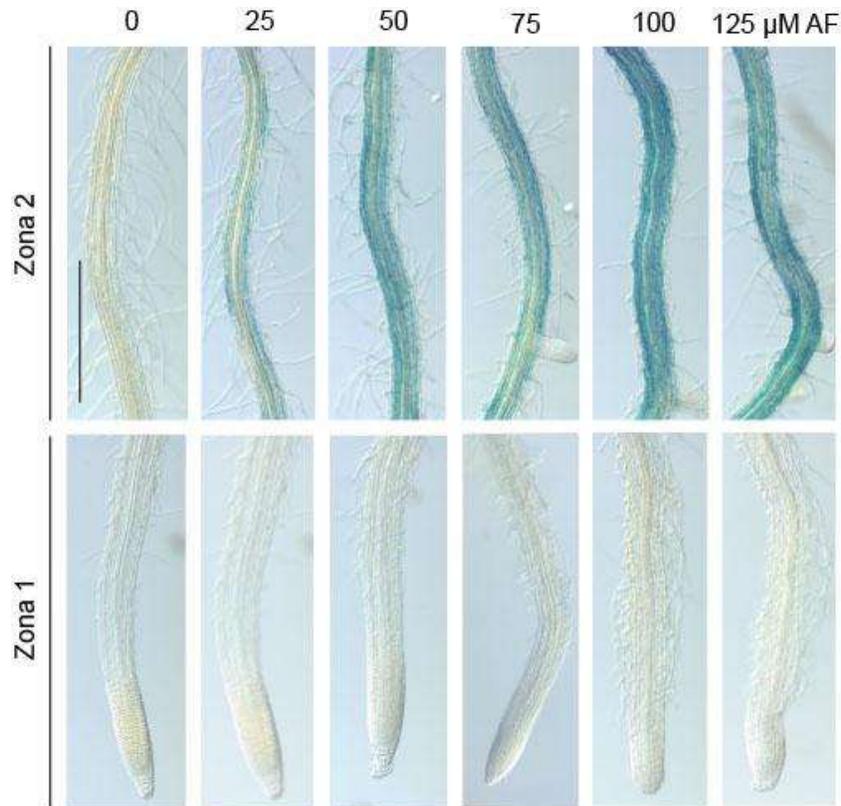


Figura 18. Respuesta al ácido fólico (AF) de la línea transgénica *pPLD ζ 2:GUS*. Las plántulas llevando la construcción *pLD ζ 2:GUS* fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF por 4 días, posteriormente fueron incubadas con el sustrato X-Gluc. Micrografías representativas de la condición control y las concentraciones indicadas de AF en dos zonas de la raíz primaria (Zona 1, punta de la raíz primaria; Zona 2, zona de formación de raíces laterales) (Barra de escala= 100 μM). El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

TOR es un gen indispensable para la planta, la mutante nula *tor* exhibe un arresto del crecimiento del embrión entre las etapas de 16 y 32 células (Xiong y Sheen, 2014). Además de regular el desarrollo del embrión, la señalización de TOR también es indispensable para el desarrollo post-embrionario en plantas, la represión de TOR por diferentes métodos retarda fuertemente muchos aspectos clave del crecimiento de órganos en plántulas, incluyendo la expansión del

cotiledón, el desarrollo de hojas verdaderas, la elongación del peciolo y el crecimiento de las raíces laterales y la raíz primaria (Ren *et al.*, 2012; Caldana *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2013).

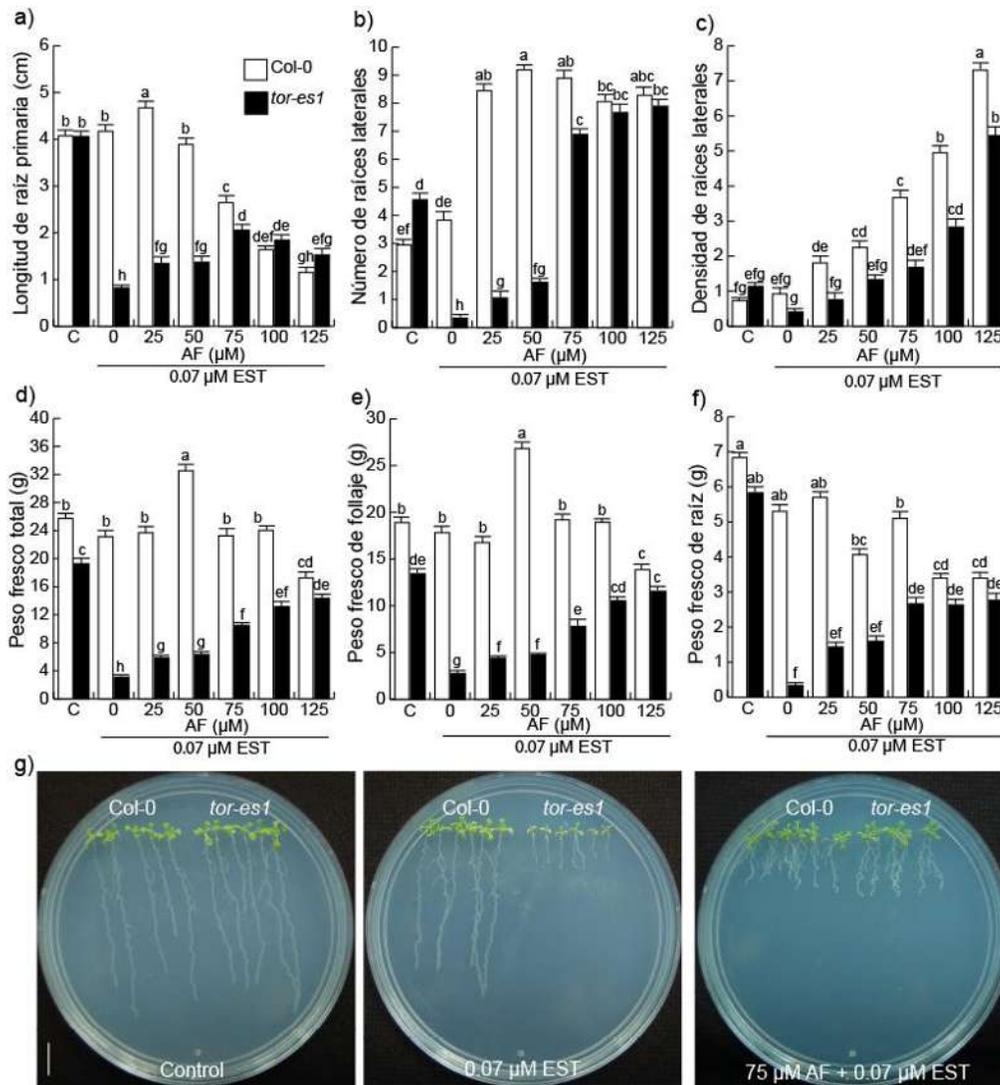


Figura 19. Efecto del ácido fólico (AF) en la línea transgénica inducible por estradiol (EST) *tor-es1*. Las plántulas silvestres y transgénicas *tor-es1* fueron germinadas y crecidas sobre medio MS 0.2X con o sin AF y 0.07 μM de EST por 10 días; **a)** la longitud de la raíz primaria [LRP], **b)** el número de raíces laterales [NRL], **c)** la densidad de raíces laterales [DRL], **d)** el peso fresco total [PFT], **e)** el peso fresco del follaje [PFF] y **f)** el peso fresco de la raíz [PFR] fueron registrados. **g)** Imágenes representativas de las condiciones y plántulas indicadas (Barra de escala= 1 cm). Los datos indican la media ± la desviación estándar (n=30 para LRP, NRL y DRL; n=3 para PFT, PFF y PFR). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $p < 0.05$. El experimento fue repetido dos veces obteniendo resultados similares.

Para entender más acerca de la función del AF, se evaluó el crecimiento de una mutante inducible por estradiol (EST) *tor-es1* lado a lado con plántulas silvestres en medios control y suplementados con 0.07 μM de EST (La concentración mínima necesaria para conseguir el fenotipo más acentuado en *tor-es1*, la cual fue determinada mediante una curva de concentraciones de EST, datos no mostrados), adicionando AF en concentraciones de 0 (únicamente el solvente), 25, 50, 75, 100 y 125 μM , encontrando que en las plántulas silvestres el EST no tiene algún efecto significativo modificando la raíz primaria con o sin el AF. En tanto que en *tor-es1* ocurre una fuerte inhibición del crecimiento de la raíz primaria en el tratamiento donde solo se adiciona el EST; sin embargo, la adición de AF en los medios que también contienen el EST restaura la elongación de la raíz primaria hasta la concentración de 75 μM . Sobre esta concentración, la mutante inducible y la planta silvestre presentan la misma longitud en las concentraciones de 100 y 125 μM de AF (Fig. 19a). Dicho efecto de restauración del fenotipo mutante de *tor-es1* (inducido con el tratamiento de EST) se observó también en la formación de raíces laterales, las cuales vuelven a formarse en la mutante inducible en los medios que además de EST contienen AF (Fig. 19b-c).

El tamaño pequeño de la mutante inducible en medios con EST y su restauración en medios que además de EST contienen AF, nos motivó a analizar la biomasa de las plántulas, encontrando que de acuerdo a lo esperado, en el tratamiento con EST disminuye drásticamente la biomasa total de *tor-es1* y conforme incrementa la concentración de AF, ocurre un aumento en la biomasa total de esta línea transgénica de forma dependiente de la concentración hasta que en la concentración de 125 M de AF llega a ser similar a la de la plántula silvestre (Fig. 19d). Un análisis de la biomasa del follaje (Fig. 19e) y la raíz (Fig.19f) por separado en las plántulas silvestre y mutante inducible mostró que el fenómeno de restauración del AF sobre la mutante inducible ocurre igualmente en ambas partes de la planta.

8. DISCUSIÓN

En este trabajo se demostró que el ácido fólico (AF) altera el programa de crecimiento de la raíz en *Arabidopsis thaliana*, el cual consiste del crecimiento indeterminado y preponderante de la raíz primaria con su posterior ramificación por las raíces laterales. El AF suplementado exógenamente cambia el programa de crecimiento en la raíz induciendo un acortamiento de la raíz primaria y promoviendo la formación de raíces laterales (Fig. 9). La inhibición de la longitud de la raíz primaria ocurre por una ausencia del proceso de elongación (Fig. 11), aun cuando el meristemo cuenta con más células mitóticamente activas y por lo tanto existe una mayor división celular (Fig. 10).

Lo anterior propone que existe un balance previo al proceso de diferenciación entre la división y elongación de las células. Dicho balance división/elongación podría ser regulado en el nicho de células madre por un mecanismo que involucra al AF. Un exceso de la vitamina reprime la expresión de genes que codifican para factores de transcripción (*PLT1*, *PLT2*, *WOX5*, *SHR* y *SCR*) (Fig. 12), los cuales regulan el mantenimiento del estado indiferenciado de las células madre iniciales ya que la pérdida de la función en estos genes conlleva a fenómenos relacionados con la diferenciación celular (Sabatini *et al.*, 2003; Aida *et al.*, 2004; Galinha *et al.*, 2007); siendo que el efecto del AF no implica algún proceso de diferenciación en el nicho celular y no bloquea por completo la expresión de estos genes, es posible que ellos también participen en la regulación del tamaño del meristemo y la actividad mitótica en el mismo y esto en consecuencia afecte la elongación celular al provocar un desbalance entre la división y la elongación.

La formación de raíces laterales puede dividirse en dos fases principales: la activación del periciclo y el establecimiento del meristemo (Himanen *et al.*, 2002). En la figura 13, se incluyó un análisis del tipo y la cantidad de primordios de raíces laterales (PRLs), el cual revela que el AF promueve la maduración de PRLs debido a que al incrementar la concentración del compuesto existe una mayor

cantidad de PRLs en las últimas etapas del desarrollo y muy pocos en las primeras (Fig. 13a). Además, el análisis de los primordios totales indicó que el exceso de la vitamina origina una menor cantidad de PRLs (Fig. 13b), lo cual nos lleva a hipotetizar que la generación de nuevos PRLs se lleva a cabo a la misma velocidad tanto en plántulas en condición normal, como en plántulas tratadas con AF, pero una emergencia más rápida de los PRLs resulta en una menor cantidad de PRLs en las plántulas tratadas con la vitamina. Por lo tanto, el AF estimula la maduración de los PRLs existentes (el establecimiento del meristemo de las nuevas raíces laterales), pero no da lugar a la generación de *novo* de los mismos. Los análisis en distintas etapas del desarrollo con el gen reportero de respuesta a auxinas *DR5:GFP*, indicaron que una mayor activación de la ruta de señalización de auxinas (evidenciado por una mayor expresión del reportero) ocurría en respuesta al AF en los PRLs de las primeras etapas y la zona de la estela donde se originan los mismos (Fig. 13c), por lo que la maduración de los PRLs vía AF implica a la señalización de auxinas y la expresión de genes de respuesta a la fitohormona.

En la figura 14, se muestra que una mayor expresión de *DR5:GFP* ocurre en la estela a través de toda la zona de diferenciación en la raíz primaria de plántulas tratadas con AF, sugiriendo que el efecto sobre la raíz primaria también depende de la señalización de auxinas. Lo anterior fue comprobado con la evaluación de mutantes en la vía de señalización donde se mostró que *slr1* y *arf7/arf19* son parcialmente resistentes al efecto represor del AF en la raíz primaria. La resistencia parcial observada en las mutantes propone que el AF acorta la raíz primaria por un mecanismo dependiente de los productos de los genes *IAA14*, *ARF7* y *ARF19* de la señalización de auxinas. La triple mutante *tir1-1/afb1-5/afb2-5* no mostró un comportamiento diferencial al de las plántulas silvestres en el crecimiento de la raíz primaria, es posible que el AF no requiera de los receptores de la señalización de auxinas o bien las otras proteínas AFBs funcionales suplen la función de los tres receptores afectados en ese fondo mutante y no sea posible observar algún fenotipo distinto al silvestre en la raíz primaria de la triple mutante.

El hecho de que la respuesta observada en cuanto al crecimiento de la raíz primaria solo fuera parcial, sugiere que además de la señalización de auxinas existen otros mecanismos por los cuales el AF coordina el crecimiento en la raíz primaria. Para el caso de la formación de raíces laterales, es notorio que la vía de señalización de auxinas desde los receptores (TIR1, AFB1 y AFB2) hasta los represores (IAA14) y factores transcripcionales (ARF7 y ARF19) es necesaria para la formación de la raíz lateral vía el AF. Además de la señalización de auxinas, los jasmonatos parecen estar implicados en el efecto del AF en la planta. La vitamina regula la expresión del gen *LOX2*, el cual codifica para una enzima de biosíntesis del ácido jasmónico; sin embargo, los ensayos de dosis respuesta al AF en mutantes afectadas en la señalización del JA no mostraron comportamiento diferencial de las mutantes al observado en las plántulas silvestres, descartando la participación de esos genes en la respuesta al AF, por lo que es posible que el mecanismo que implica al JA requiera de otros elementos distintos a los evaluados en este estudio (*JAR1* y *MYC2*) o bien, los aspectos relacionados con el JA en la respuesta al AF solo ocurran en el follaje, donde se expresa *LOX2*.

El crecimiento de los organismos multicelulares está determinado por la división y expansión de sus células, procesos relacionados con el AF y altamente regulados por la señalización de TOR. En plantas, la conexión entre las auxinas y TOR es la fosfolipasa D ζ 2 (PLD ζ 2), aunque a la fecha se desconoce si el mecanismo de activación de esta enzima por las auxinas implica a la ruta del receptor ABP1, la cual es independiente de la transcripción de genes o la de TIR1, que sí depende de la transcripción de genes, nuestros datos sugieren que es este último el mecanismo que podría activar a PLD ζ 2 en la respuesta al AF. Lo cual permitiría la producción de ácido fosfatídico para la activación de PDK1, la cual ha sido reportada que fosforila a S6K, siendo este último el regulador central de la traducción que también es altamente regulado por TOR. Lo anterior explicaría por qué el suplemento de AF rescata el fenotipo de la mutante inducible *tor-es1*, es decir, una vía alterna a TOR activada por auxinas que implica a PLD ζ 2 para

activar a S6K permitiendo la síntesis de proteínas necesarias para el crecimiento y desarrollo de la planta.

9. CONCLUSIONES

El ácido fólico (AF) regula el crecimiento y el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana*, disminuyendo la elongación e incrementa la tasa de división en las células de la raíz primaria, en donde *PLT1*, *PLT2*, *SHR*, *SCR* y *WOX5* podrían estar implicados en la regulación del balance división/elongación por el nicho celular, en un mecanismo que incluye a la señalización de auxinas a nivel del módulo represor/factor transcripcional IAA14/ARF7-ARF19. Adicionalmente, el AF promueve la maduración de los primordios de raíces laterales, lo cual origina una mayor cantidad de raíces laterales en plantas tratadas con la vitamina, requiriendo una vía de señalización de auxinas completamente funcional a nivel de receptores con TIR1, AFB1 y AFB2, del represor con IAA14 y de los factores de transcripción con ARF7 y ARF19. Finalmente, la síntesis de proteínas es fundamental para el crecimiento vegetal y la ruta de señalización de TOR controla dicho proceso a través de la activación del regulador maestro S6K, el cual posiblemente es activado por el AF en una vía alterna por un mecanismo auxínico dependiente de la acción de PLD ζ 2.

10. REFERENCIAS

Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y. S., Amasino R. y Scheres B. (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119: 109-120.

Anthony R. G., Henriques R., Helfer A., Meszaros T., Rios G., Testerink C., Munnik T., Deak M., Koncz C. y Bögre L. (2004) A protein kinase target of a PDK1 signalling pathway is involved in root hair growth in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 23: 572-581.

Badescu G. O. y Napier R. M. (2006) Receptors for auxin: will it all end in TIRs. *Trends in Plant Science* 11: 217-223.

Beemster G. T. S. y Baskin T. I. (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 116: 1515-1526.

Belanger F. C., Leustek T., Chu B. y Kriz A. L. (1995) Evidence for the thiamine biosynthetic pathway in higher-plant plastids and its developmental regulation. *Plant Molecular Biology* 29: 809-821.

Blakely L. M. y Evans T. A. (1979) Cell dynamics studies on the pericycle of radish seedling roots. *Plant Science Letters* 14: 79-83.

Blancquaert D., Storozhenko S., Loizeau K., De Steur H., De Brouwer V., Viaene J., Ravel S., Rébeillé F., Lambert W. y Van Der Straeten D. (2010) Foliates and folic acid: from fundamental research toward sustainable health. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29: 14-35.

Bögre L., Henriques R. y Magyar Z. (2013) TOR tour to auxin. *The EMBO journal* 32: 1069-1071.

Cho H.-T. y Cosgrove D. J. (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 3237-3253.

Caldana C., Li Y., Leisse A., Zhang Y., Bartholomaeus L., Fernie A. R., Willmitzer L. y Gialalisco P. (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 73: 897-909.

Chen L., Chan S. Y. y Cossins E. A. (1997) Distribution of folate derivatives and enzymes for synthesis of 10formyltetrahydrofolate in cytosolic and mitochondrial fractions of pea leaves. *Plant Physiology* 115: 299-309.

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

Cossins E. A. (2000) The fascinating world of folate and one-carbon metabolism. *Canadian Journal of Botany* 78: 691-708.

Cui H., Levesque M. P., Vernoux T., Jung J. W., Paquette A. J., Gallagher K. L., Wang J. Y., Bilou I., Scheres B. y Benfey P. N. (2007) An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* 316: 421-425.

Cybulski N. y Hall M. N. (2009) TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends in Biochemical Sciences* 34: 620-627.

Deshaies R. J. (1999) SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 15: 435-467.

Dharmasiri N., Dharmasiri S., Jones A. M. y Estelle M. (2003) Auxin action in a cell-free system. *Current Biology* 13: 1418-1422.

Di Lorenzo L., Wysocka-Diller J., Malamy J. E., Pysh L., Helariutta Y., Freshour G., Hahn M. G., Felmann K. A. y Benfey P. N. (1996) The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86: 423-433.

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

Dombrecht B., Xue G. P., Sprague S. J., Kirkegaard J. A., Ross J. J., Reid J. B., Fitt G. P., Sewelam N., Schenk P. M., Manners J. M. y Kazan K. (2007) MYC2 Differentially Modulates Diverse Jasmonate Dependent Functions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19:2225-2245.

Dubrovsky J. G., Gambetta G. A., Hernández-Barrera A., Shishkova S. y González I. (2006) Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Annals of Botany* 97: 903-915.

Fukaki H., Tameda S., Masuda H. y 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.

- Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., Heidstra R. y Scheres B. (2007)** PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449: 1053-1057.
- Gray W. M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O. y Estelle M. (2001)** Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271-276.
- Guilfoyle T. J. y Hagen G. (2007)** Auxin response factors. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 453-460.
- Hanson A. D. y Gregory III J. F., (2011)** Folate Biosynthesis, Turnover, and Transport in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 62: 105-125.
- Hanson A. D. y Roje S. (2001)** One-carbon metabolism in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 119-137.
- Hara K., Maruki Y., Long X., Yoshino K.-I., Oshiro N., Hidayat S., Tokunaga C., Avruch J. y Yonezawa K. (2002)** Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110: 177-189.
- He H.-Y., Liu M. Z., Zhang Y. L. y Zhang W. (2017)** Vitamin Pharmacogenomics: New Insight into Individual Differences in Diseases and Drug Responses. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* doi: 10.1016.
- Heidstra R., Welch D. y Scheres B. (2004)** Mosaic Analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes & Development* 18: 1964-1969.
- Helariutta Y., Fukaki H., Wysocka-Diller J., Nakajima K., Jung J., Sena G., Hauser M.-T. y Benfey P. N. (2000)** The *SHORT-ROOT* Gene Controls Radial Patterning of the *Arabidopsis* Root through Radial Signaling. *Cell* 101: 555-567.
- Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almeida Engler J., Inzé D. y Beeckman T. (2002)** Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant Cell* 14: 2339-2351.
- Jabrin S., Ravanel S., Gambonnet B., Douce R. y Rébeillé F. (2003)** One-carbon metabolism in plants. Regulation of tetrahydrofolate synthesis during germination and seedling development. *Plant Physiology* 131: 1431-1439.
- Holz M. K., Ballif B. A., Gygi S. P. y Blenis J. (2005)** mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* 123: 569-580.
- Hotton S. K. y Callis J. (2008)** Regulation of cullin RING ligases. *Annual Review of Plant Biology* 59: 467-489.

Jefferson R. A., Kavanagh T. A. y Bevan M. W. (1987) GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. The European Molecular Biology Organization Journal 6: 3901-3907.

Jensen A. B., Raventos D. y Mundy J. (2002) Fusion genetic analysis of jasmonate-signaling mutants in *Arabidopsis*. The Plant Journal 29:595-606.

Katsir L., Schilmiller A. L., Staswick P. E., He S. Y. y Howe G. A. (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105: 7100-7105.

Kepinski S. y Leyser O. (2004) Auxin-induced SCFTIR1-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCFTIR1 complex. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101: 12381-12386.

Kim B.-H., Cai X., Vaughn J. N. y von Arnim A. G. (2007) On the functions of the h subunit of eukaryotic initiation factor 3 in late stages of translation initiation. Genome Biology 8: R60.

Levesque M. P., Vernoux T., Busch W., Cui H., Wang J. Y., Blilou I., Hassan H., Nakajima K., Matsumoto N., Lohmann J. U., Scheres B. y Benfey P. N. (2006) Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. PLoS Biology 4: 739-752.

Li G. y Xue H.-W. (2007) *Arabidopsis* PLD ζ 2 regulates vesicle trafficking and is required for auxin response. The Plant Cell 19: 281-295.

Ljung K. (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. Development 140: 943-950.

Loewith R., Jacinto E., Wullschlegel S., Lorberg A., Crespo J. L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P. y Hall M. N. (2002) Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. Molecular Cell 10: 457-468.

Lorenzo O., Chico J. M., Sánchez-Serrano J. J. y Solano R. (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. The Plant Cell 16: 1938-1950.

Madeira Da Silva L. y Beverley S. M. (2010) Expansion of the target of rapamycin (TOR) kinase family and function in *Leishmania* shows that TOR3 is required for acidocalcisome biogenesis and animal infectivity. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107: 11965-11970.

Malamy J. E. y Benfey P. N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development 124: 33-44.

Mahfouz M. M., Kim S., Delauney A. J. y Verma D. P. S. (2006) *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *The Plant Cell* 18: 477-490.

Menand B., Desnos T., Nussaume L., Berger F., Bouchez B., Meyer C. y Robaglia C. (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 6422-6427.

Mockaitis K. y Estelle M. (2008) Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24: 58-80.

Mueller M. J., Brodschelm W., Spannagl E. y Zenk M. H. (1993) Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7490-7494.

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

Neuburger M., Rébeillé F., Jourdain A., Nakamura S. y Douce R. (1996) Mitochondria are a major site for folate and thymidylate synthesis in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 9466-9472.

Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A. y Tasaka M. (2007) ARF7 and ARF19 Regulates Lateral Root Formation via Direct Activation of *LBD/ASL* Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 118-130.

Ortiz-Castro R. y López-Bucio J. (2010) La arquitectura de las plantas. En Beltran-Peña E., López-Bucio J. (Ed.), *Fronteras en la bioquímica del desarrollo de plantas*. Michoacán, México: Morevalladolid. pp. 3-14.

Ottenschläger I., Wolff P., Wolverton C., Bhalerao R. P., Sandberg G., Ishikawa H., Evans M. y Palmer K. (2003) Gravity regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 2987-2991.

Overvoorde P., Fukaki H. y Beeckman (2010) Auxin Control of Root Development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: 1-16.

Parry G., Calderon-Villalobos L. I., Prigge M., Peret B., Dharmasiri S., Itoh H., Lechner E., Gray W. M., Bennett M. y Estelle M. (2009) Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 22540-22545.

Petricka J. J., Winter C. M. y Benfey P. N. (2012) Control of *Arabidopsis* Root Development. *Annual Review of Plant Biology* 63: 563-590.

Pickart C. M. (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* 70: 503-533.

Ren M., Venglat P., Qiu S., Feng L., Cao Y., Wang E., Xiang D., Wang J., Alexander D., Chalivendra S., Logan D., Mattoo A., Selvaraj G. y Datla R. (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24: 4850-4874.

Reyes-Hernández B. J., Srivastava A. C., Ugartechea-Chirino Y., Shishkova S., Ramos-Parra P. A., Lira-Ruan V., Díaz de la Garza R. I., Dong G., Moon J.-C., Blancaflor E. B. y Dubrovsky J. G. (2014) The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 202: 1223-1236.

Roy B., Vaughn J. N., Kim B.-H., Zhou F., Gilchrist M. A. y von Arnim A. G. (2010) The h subunit of eIF3 promotes reinitiation competence during translation of mRNAs harboring upstream open reading frames. *RNA* 16: 748-761.

Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P. y Scheres B. (2003) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463-472.

Santner A., Calderon-Villalobos L. I. A. y Estelle M. (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology* 5: 301-307.

Sanz L., Dewitte W., Forzani C., Patell F., Nieuwland J., Wen B., Quelhas P., De Jager S., Titmus C., Campilho A., Ren H., Estelle M., Wang H. y Murray J. A. (2011) The *Arabidopsis* D-type cyclin CYCD2;1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation. *The Plant Cell* 23: 641-660.

Sarkar A. K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R. y Laux T. (2007) Conserved factors regulate signaling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446: 811-814.

Sauer M. y Kleine-Vehn J. (2011) AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. *The Plant Cell* 23: 2033-2043.

Schepetilnikov M., Dimitrova M., Mancera-Martínez E., Geldreich A., Keller M. y Ryabova L. A. (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *The EMBO Journal* 32: 1087-1102.

Scheres B. (2007) Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 345-354.

Scheres B., Benfey P. y Dolan L. (2002) Root Development. *The Arabidopsis book* 1: 1-18.

Scheres B. y Wolkenfelt H. (1998) The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiology and Biochemistry*. 36: 21-32.

Scott J., Rébeillé F. y Fletcher J. (2000) Folic acid and folates: the feasibility for nutritional enhancement in plant foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 795-824.

Seo H. S., Song J. T., Cheong J.-J., Lee Y.-H., Lee Y.-W., Hwang I., Lee J. S. y Choi Y. D. (2001) Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4788-4793.

Shimobayashi M. y Hall M. N. (2014) Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15: 155-162.

Sieberer T., Hauser M.-T., Seifert G. J. y Luschnig C. (2003) *PROPORZ1*, a putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein, mediates auxin and cytokinin signals in the control of cell proliferation. *Current Biology* 13: 837-842.

Smith A. G., Croft M. T., Moulin M. y Webb M. E. (2007) Plants need their vitamins too. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 266-275.

Spradling A., Drummond-Barbosa D. y Kai T. (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414:98-104.

Staswick P. E., Su W., y Howell S. H. (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 6837-6840.

Staswick P. E. y Tiryaki I. (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 2117-2127.

Strader L. C. y Bartel B. (2008) A new path to auxin. *Nature Chemical Biology* 4: 337-339.

Sozzani R., Cui H., Moreno-Risueno M. A., Busch W., Van Norman J. M., Vernoux T., Brady S. M., Dewitte W., Murray J. A. H. y Benfey P. N. (2010) Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466: 128-132.

Suh J. R., Herbig A. K. y Stover P. J. (2001) New perspectives on folate catabolism. *Annual Review of Nutrition* 21: 255-282.

Szemenyei H., Hannon M. y Long J. A. (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* 319: 1384-1386.

Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S. Y., Howe G. A. y Browse J. (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signaling. *Nature* 448: 661-665.

Toloti J. M., Chacón-Madrid K., Miranda B. C. Zezzi M. A. (2015) *Arabidopsis thaliana* and omics approaches: a review. *Journal of Integrated Omics* 5 (1): 1-16.

Tominaga-Wada R., Ishida T. y Wada T. (2011) New insights into the mechanism of development of *Arabidopsis* root hairs and trichomes. *International Review of Cell and Molecular Biology* 286: 67-106.

Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. y Guilfoyle T. J. (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell* 9: 1963-1971.

van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P. y Scheres B. (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390: 287-289.

Vanneste S., De Rybel B., Beemster G. T. S., Ljung K., De Smet I., Van Isterdael G., Naudts M., Iida R., Gruissem W., Tasaka M., Inzé D., Fukaki H. y Beeckman T. (2005) Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 17: 3035-3050.

Vanstraelen M. y Benková E. (2012) Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 28:463-487.

Vieten A., Sauer M., Brewer P. B. y Friml J. (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science* 12: 160-168.

Wasternack C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100: 681-697.

Woodward A. W. y Bartel B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.

Wullschleger S., Loewith R. y Hall M. N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471-484.

Xie D.-X., Feys B. F., James S., Nieto-Rostro M. y Turner J. G. (1998) COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* 280: 1091-1094.

Xiong Y. y Sheen J. (2012) Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 2836-2842.

Xiong Y., McCormack M., Li L., Hall Q., Xiang C. y Sheen J. (2013) Glucose TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* 496: 181-186.

Xiong Y. y Sheen J. (2014) The role of Target of Rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism. *Plant Physiology* 164: 499-512.

Zempleni J., Rucker R. B., McCormick D. B. y Suttie J. W. (2007) Handbook of vitamins. Tylor & Francis Group. Cuarta edición: 1-593.

Zoncu R., Efeyan A. y Sabatini D. M. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12: 21-35.