



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**División de Estudios de Posgrado
Facultad de Biología**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Área temática: Fisiología y Genética Vegetal

**Efecto de la sacarosa, cromo y deficiencia de fosfato,
sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz de
Arabidopsis thaliana L.**

Tesis que presenta:

Biól. Jazmín Karina Mateo Valentín

Como requisito para obtener el título profesional de:

Maestro en Ciencias Biológicas

Directores de tesis:

**Dr. Miguel Martínez Trujillo
M.C. Fátima Hernández Madrigal**

Morelia, Michoacán, Marzo 2018

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



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DRA. LILIANA MÁRQUEZ BENAVIDES
COORDINADORA GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

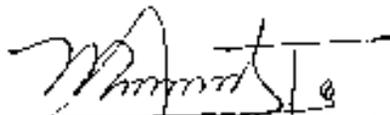
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Efecto de la sacarosa, etano y deficiencia de fósforo, sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L." presentado por la BIOL. JAZMÍN KARINA MATEO VALENTÍN con Número de Matrícula 0939674A, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestría en Ciencias.

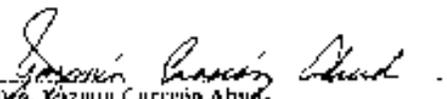
Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

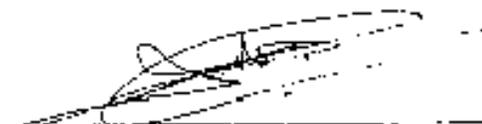
Morelia, Michoacán, a 21 de febrero de 2018

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA


Dr. Miguel Martínez Trujillo


Dra. Jazmín Carrasco Abad


Dra. Patricia Ríos Chávez


Dr. Gastón Santoyo Plazo


Dr. Randy Ortiz Castro

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de **Genética y Microbiología** de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del **Dr. Miguel Martínez Trujillo y M.C Fátima Hernández Madrigal**, contando con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) y la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana.

AGRADECIMIENTOS

A mi **familia** les agradezco por todo el apoyarme que me han brindado en este camino y por animarme en los momentos difíciles.

Dr. Miguel Martínez Trujillo le doy las gracias por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, así también agradezco infinitamente toda su ayuda, tiempo y asesoría en la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio M.C. Ángeles, Dra. Gloria, Alex, Hilda, Juanita, Sandra, Moni y Nubia agradezco su compañía y conocimientos.

Le agradezco también a la **M.C Fátima Hernández Madrigal** por su asesoría, paciencia y amistad, sabes que te quiero mucho, así mismo agradezco Aarón por ayudándome a tomar fotos y por resolver todas mis dudas gracias.

Al comité sinodal por tomar parte de su tiempo en la revisión de este trabajo.

A dios gracias por permitirme estar aquí y por siempre estar a mi lado en todo momento.

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VI

ÍNDICE GENERAL

1.INTRODUCCIÓN	1
2.ANTECEDENTES	3
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> (L) Heynh.	3
2.2 Desarrollo embrionario de <i>A. thaliana</i> .	3
2.3. Sistema radical de <i>A. thaliana</i> .	5
2.4. Reguladores del crecimiento vegetal.	9
2.5. Las auxinas.	11
2.6 Vías de transporte de las auxinas.	11
2.7. Mecanismo de señalización de las auxinas.	13
2.8. Síntesis y transporte de sacarosa.	15
2.9. Fosfato y sacarosa.	17
2.10. Factores exógenos que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas.	19
2.11. El Cromo (Cr).	19
2.12. Transporte del Cr en plantas.	20
2.13. Efectos del Cr en plantas.	21
3. HIPÓTESIS	24
4. OBJETIVO GENERAL	24
4.1. Objetivos particulares.	24
5. MATERIALES Y MÉTODOS	25
5.1. Material biológico.	25
5.2. Condiciones generales del crecimiento de las plantas.	26
5.3. Evaluación del efecto de la sacarosa en la reactivación del crecimiento de la raíz inhibido por Cr(VI).	26
5.4. Evaluación del efecto de la sacarosa en la reactivación del crecimiento de la raíz inhibido por bajo fosfato.	26

5.5. Evaluación del crecimiento de la raíz por exposición eventual al Cr(VI).	27
5.6. Análisis de variables del desarrollo.	27
5.7. Análisis histoquímico de la actividad de la β -glucuronidasa.	27
5.8. Análisis estadístico.	28
6. RESULTADOS	29
6.1. La sacarosa estimula el crecimiento de la raíz primaria en plantas de <i>A. thaliana</i> silvestres y <i>slr-1</i> , crecidas previamente por 4 días en medios con Cr(VI) y transferidas a medios sin Cr(VI).	29
6.2. La sacarosa estimula el crecimiento de la raíz lateral en plantas de <i>A. thaliana</i> , crecidas previamente por 7 días en medios con Cr(VI) y transferidas a medios sin Cr(VI).	34
6.3. Efecto de las combinaciones de sacarosa y fosfato en el crecimiento de la raíz de <i>A. thaliana</i> y en la división celular, utilizando un sistema de transferencia de plantas.	40
6.4. Efecto del Cr(VI) en el crecimiento de la raíz y la expresión de marcadores de división celular y de expansión celular, en un sistema de exposición eventual.	43
7. DISCUSIÓN	47
8. CONCLUSIONES	53
9. REFERENCIAS	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Arabidopsis thaliana</i> .	4
Figura 2. La organización apical-basal de los tejidos y órganos vegetales es establecida muy temprano en la embriogénesis.	4
Figura 3. Estructura de la raíz primaria.	6
Figura 4. Estructura de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> .	7
Figura 5. Desarrollo de las raíces laterales.	8
Figura 6. Representación esquemática del desarrollo de la raíz adventicia (AR) en <i>A. thaliana</i> .	9
Figura 7. Modelo general que explica la interacción de los reguladores del crecimiento con la célula vegetal.	10
Figura 8. Principales reguladores de crecimiento vegetal.	10
Figura 9. Transporte de auxina.	12
Figura 10. Esquema de una célula vegetal y el papel específico que tienen las proteínas PIN en el control de los niveles celulares de auxina.	13
Figura 11. Modelo de la señalización por auxinas en <i>A. thaliana</i> .	14
Figura 12. Síntesis de sacarosa.	16
Figura 13. Efecto del Cr(VI) y sacarosa en el crecimiento de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> .	17
Figura 14. Efecto de la disponibilidad de fosfato en la arquitectura de la raíz.	19
Figura 15. Modelo hipotético de transporte de cromo y toxicidad en las raíces de las plantas.	21
Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de Cr(VI) en el crecimiento de <i>A. thaliana</i> .	23
Figura 17. Efecto de la sacarosa en la estimulación del crecimiento de la raíz primaria en plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 y <i>slr-1</i> crecidas por 4 días en medios con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 8 días en otro medio.	30
Figura 18. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en la expresión de marcadores genéticos en la raíz primaria de plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 y <i>slr-1</i> crecidas por 4 días en un medio con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 8 días en otro medio.	32
Figura 19. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en la expresión de marcadores genéticos de identidad del meristemo, en la raíz primaria de plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 crecidas por 4 días en un medio con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 8	

días en otro medio.	33
Figura 20. Efecto del Cr(VI) en la formación de raíces laterales en plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 y <i>slr-1</i> .	35
Figura 21. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en el crecimiento de la raíz primaria y lateral en plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 y <i>slr-1</i> crecidas por 7 días en un medio con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 5 días en otro medio.	37
Figura 22. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en la división celular de la raíz primaria y raíz lateral de plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 y <i>slr-1</i> , crecidas por 7 días en medios con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 5 días en otro medio.	38
Figura 23. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en la distribución de auxina de la raíz primaria y raíz lateral de plantas de <i>A. thaliana</i> Col-0 y <i>slr-1</i> , crecidas por 7 días en un medio con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 7 días en otro medio.	39
Figura 24. Efecto de la sacarosa y fosfato en el crecimiento de la raíz de <i>A. thaliana</i> Col-0, utilizando un sistema de transferencia de plantas.	41
Figura 25. Efecto de la sacarosa y fosfato en la expresión del marcador de división celular en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> .	42
Figura 26. Efecto del sistema de exposición eventual al Cr(VI) en el crecimiento del sistema radical de <i>A. thaliana</i> .	44
Figura 27. Efecto de la exposición eventual al Cr(VI) en la expresión del gen de ciclina <i>CycB1</i> en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> .	45
Figura 28. Efecto de la exposición eventual a Cr(VI) en la expresión del marcador de expansión celular en la raíz primaria de plantas de <i>A. thaliana</i> .	45
Figura 29. Efecto de la exposición eventual al Cr(VI) en la longitud del meristemo en la raíz primaria de plantas de <i>A. thaliana</i> .	46

RESUMEN

El crecimiento de la raíz en *Arabidopsis thaliana* se inicia con la raíz primaria derivada del embrión, posteriormente se forman raíces laterales derivadas del periciclo y ocasionalmente se pueden formar raíces adventicias a partir de la región del hipocótilo; estas raíces junto con los pelos radicales constituyen la arquitectura de la raíz y determinan el anclaje y la absorción de agua y nutrientes del suelo o medio de cultivo. La raíz tiene un crecimiento post-embriionario que depende de factores endógenos como hormonas y expresión de genes, y por otra parte factores exógenos dado por las condiciones y señales ambientales, entre las que se encuentran la escasez de nutrientes y las altas concentraciones de elementos esenciales y no esenciales. En este trabajo se analizó el crecimiento en condiciones *in vitro* de la raíz de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y la línea mutante *iaa14/slr1* bajo diferentes condiciones de Cr(VI) y sacarosa, encontrando: i) Una disminución en el transporte de la auxina en la raíz primaria por efecto del Cr(VI) se correlaciona con una inhibición del crecimiento de la raíz primaria, con la pérdida de división celular y de marcadores de identidad del meristemo, ii) la suplementación con sacarosa restablece el crecimiento de la raíz primaria, iii) el Cr(VI) induce la formación de raíces laterales tanto en *A. thaliana* Col-0 y en la línea mutante *iaa14/slr1*, con patrones normales de distribución de auxina y de división celular. Además, se analizó el efecto de bajo fósforo y sacarosa en la formación de raíces laterales, encontrando que el estrés generado por bajo fósforo sensibiliza o predispone a las plantas a formar más raíces laterales por efecto de la sacarosa. Finalmente, se determinó que la exposición eventual de las plantas al Cr(VI) permite una mejor adaptación y tolerancia del sistema radical con relación a otros sistemas de exposición (transferencia o germinación directa). Los resultados obtenidos aportan información novedosa para entender los mecanismos celulares y genéticos del sistema radical en la respuesta al Cr(VI) y bajo fósforo, y el efecto benéfico de la sacarosa en potencializar estas respuestas para una mejor adaptación.

Palabras clave: Raíz, *Arabidopsis*, Cromo, Fósforo, Sacarosa.

ABSTRACT

Root growth in *Arabidopsis thaliana* begins with the primary root derived from the embryo, later lateral roots derived from the pericycle are formed and occasionally adventitious roots can be formed from the hypocotyl region; these roots together with the radical hairs constitute the architecture of the root and determine the anchoring and absorption of water and nutrients from the soil or culture medium. The root has a post-embryonic growth that depends on endogenous factors such as hormones and gene expression, and on the other hand exogenous factors given by the environmental conditions and signals, among which are the shortage of nutrients and the high concentrations of essential and non-essentials elements. In this work, the growth at *in vitro* conditions of the root of *A. thaliana* ecotype Col-0 and the mutant line *iaa14/slr1* under different conditions of Cr(VI) and sucrose was analyzed, finding that: i) A decrease in the transport of auxin in the primary root by the effect of Cr(VI) is correlated with an inhibition of the growth of the primary root, with the loss of cell division and markers of meristem identity, ii) The sucrose supplementation restores the primary root growth, iii) Cr(VI) induces the formation of lateral roots in both *A. thaliana* Col-0 and in the mutant line *iaa14/slr1*, with normal patterns of auxin distribution and cellular division. In addition, the effect of low phosphate and sucrose on the formation of lateral roots was analyzed, finding that the stress generated by low phosphate sensitizes or predisposes the plants to form more lateral roots by the effect of sucrose. Finally, it was determined that the eventual exposure of plants to Cr(VI) allows a better adaptation and tolerance of the root system in relation to other exposure systems (transfer or direct germination).

The obtained results provide new information to understand the cellular and genetic mechanisms of the radical system in the response to Cr(VI) and low phosphate, and the beneficial effect of sucrose in potentiating these responses for a better adaptation.

Key words: Root, *Arabidopsis*, chromium, phosphate, sucrose.

1. INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de las plantas angiospermas se forma un embrión acompañado de sustancias de reserva y cubiertas protectoras, lo que se conoce como la semilla; en ésta el embrión detiene su crecimiento y presenta una actividad metabólica baja. Cuando la semilla es liberada por la planta madre y encuentra condiciones ambientales favorables, el embrión reanuda su crecimiento, consumiendo las sustancias de reserva, formando un sistema radical para la captación de nutrientes y una parte aérea con capacidad para realizar la fotosíntesis (Taiz y Zeiger 1996). El sistema radical en las plantas dicotiledóneas presenta una raíz principal o primaria derivada del embrión, a partir de la cual se forman raíces laterales que aumentan su capacidad de absorción y anclaje; eventualmente se pueden formar raíces a partir de las zonas aéreas y se les da el nombre de adventicias (Bellini et al. 2014). El crecimiento y desarrollo post-embriionario de la raíz y de la parte aérea es posible por la presencia de células que conservan su capacidad de división, las cuales se concentran en áreas restringidas formando meristemas.

En el crecimiento y desarrollo post-embriionario de las plantas además del programa genético intrínseco se integran señales endógenas y ambientales, que determinan en conjunto la forma y funcionamiento de una planta. Entre los reguladores endógenos se encuentran las hormonas vegetales, de las cuales la auxina (ácido indol-3-acético, AIA) participa en varios procesos, entre ellos la regulación de la arquitectura de la raíz. La sacarosa es un compuesto que contribuye al crecimiento y desarrollo, ya que representa la forma principal en la que el carbono fotosintéticamente asimilado es transportado a los distintos órganos. Entre los factores ambientales, la carencia de algunos elementos esenciales ocasiona cambios en el crecimiento y desarrollo, siendo el fósforo, nitrógeno y potasio los limitantes en la mayoría de los suelos (Ruíz-Herrera et al. 2015).

Durante el crecimiento y desarrollo del sistema radicular en el suelo se obtienen nutrientes minerales y agua, no obstante se pueden presentar condiciones adversas como son la presencia de concentraciones elevadas de algunos nutrientes

minerales como el Hierro (Fe), Zinc (Zn) o Cobre (Cu), o bien compuestos de elementos no esenciales como Cromo (Cr) o Plomo (Pb); en ambas situaciones se pueden presentar efectos tóxicos. En concentraciones subletales, en las cuales la planta puede seguir creciendo, se genera una respuesta en el sistema radical que consiste en la inhibición del crecimiento de la raíz principal (primaria) por agotamiento de su capacidad meristemática y la formación de raíces laterales o adventicias por la activación de la división celular y formación de nuevos meristemas. Esta respuesta incrementa la superficie de exploración de la raíz en el suelo y la posibilidad de crecer hacia áreas con condiciones más favorables. (Potters et al. 2009).

El efecto de diferentes factores abióticos en el desarrollo y crecimiento de la raíz se ha sido estudiado principalmente en la planta modelo *A. thaliana*, ya que presenta mayor simplicidad y disponibilidad de diferentes líneas transgénicas que permiten determinar el cambio en la expresión de genes de manera relativamente sencilla (López-Bucio et al. 2003; Péret et al. 2009). Se han realizado estudios del efecto del Cr(VI) en el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*, encontrando que tiene un efecto estimulador del crecimiento a bajas concentraciones (20 μM) y un efecto inhibitorio a mayores concentraciones (100 μM); además, entre los mecanismos moleculares que subyacen a estos cambios de crecimiento se encuentran cambios en la expresión de varios genes, modificaciones en la distribución de auxina en la raíz primaria y en las raíces laterales (Martínez-Trujillo et al. 2014).

Para profundizar en las respuestas morfológicas y genéticas de la raíz al efecto del estrés abiótico, en este trabajo se utilizaron concentraciones subletales de Cr o escasez de fósforo, y la influencia de la sacarosa en estas respuestas. Se utilizaron plantas de *A. thaliana* con dos fondos genéticos diferentes: el silvestre (Col-0) y el mutante *iaa14/slr1* que se reporta que en medios *in vitro* no forma raíces laterales, a diferencia del fondo genético silvestre. Además, se valoró un sistema de exposición eventual al Cr, en el que el cromato se difunde en el medio y llega inicialmente al extremo de la raíz primaria.

2. ANTECEDENTES

2.1. *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh

Arabidopsis thaliana, es una planta vascular de la familia de las Crucíferas o Brassicaceae, con una amplia distribución a lo largo de Europa y América del Norte. Esta angiosperma presenta características óptimas que la convierten en un organismo modelo para el estudio de los procesos fisiológicos y la biología de las plantas, entre las que podemos destacar su capacidad de crecimiento bajo condiciones controladas, su pequeño tamaño de 30 cm de altura, un ciclo de vida corto de 6-8 semanas, autopolinización, alta fecundidad y una abundante producción de semillas (hasta 10 000 por planta; Figura 1). Otra de las ventajas es que existe un gran número de mutantes y líneas transgénicas disponibles para realizar investigación y analizar diferentes procesos biológicos, además de tener todo su genoma secuenciado, el cual contiene 25,498 genes que codifican proteínas de 11000 familias (Meinke et al. 1998; The *Arabidopsis* genome initiative 2000).

2.2. Desarrollo embrionario de *A. thaliana*

Como producto de la fecundación se forma el cigoto, el cual se divide de forma asimétrica dando lugar a dos células hijas: la apical, que es pequeña y con citoplasma denso, y la basal, que es más grande y vacuolada. La célula apical sufre dos rondas de divisiones longitudinales seguidas por una transversal, para formar el pro-embrión de 8 células. Por el contrario, la célula basal se divide horizontalmente produciendo una estructura filamentosa, el suspensor, el cual sirve como conexión entre el embrión en desarrollo y los tejidos maternos (Capron et al. 2009; Möller y Weijers 2009). El origen del centro quiescente y la capa de la columela de la raíz pueden ubicarse a partir de una célula, la hipófisis; esta célula deriva de una célula hija basal de la primera división cigótica, siendo la única contribución de la célula basal al propio embrión (Figura 2) (Scheres et al. 1994).

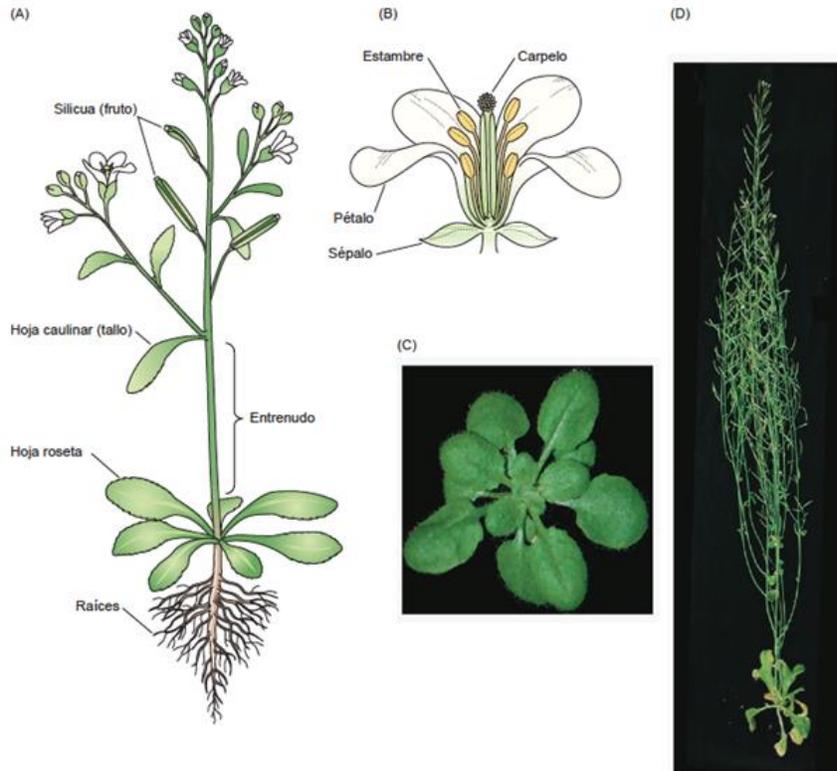


Figura 1. *Arabidopsis thaliana*. A) Dibujo de una planta madura de *A. thaliana* mostrando los diferentes órganos. B) Dibujo de una flor, mostrando las estructuras florales. C) Planta en estado juvenil, mostrando las hojas de la roseta. D) Planta madura después de que sus flores han madurado y los frutos (silicuas) se han desarrollado (Taiz y Zeiger 2006).

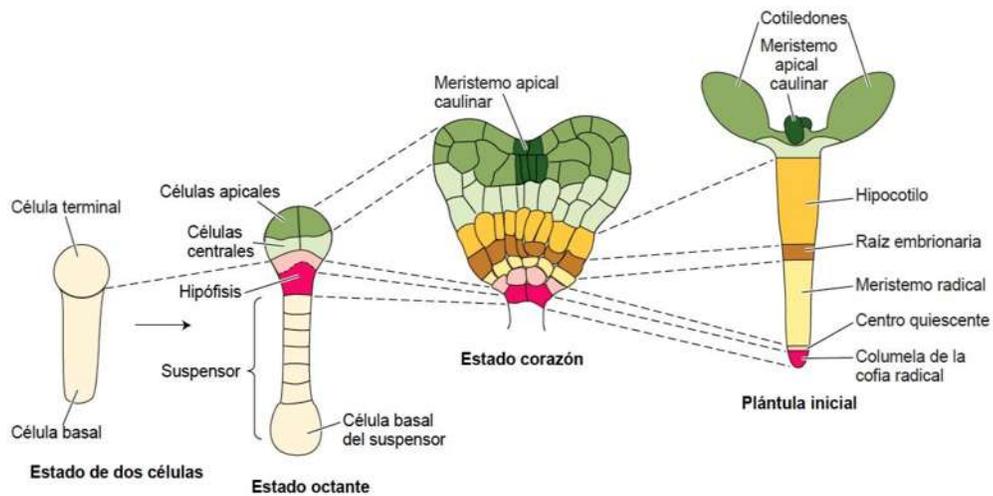


Figura 2. La organización apical-basal de los tejidos y órganos vegetales es establecida muy temprano en la embriogénesis. Se ilustra cómo los órganos de una planta joven de *A.thaliana* se originan de regiones específicas del embrión (Taiz y Zeiger 2006).

2.3. Sistema radical de *A. thaliana*

El sistema radical (SR) está formado por la raíz primaria (RP) la cual se origina a partir de la raíz embrionaria, las raíces laterales (RLs) y en ocasiones raíces adventicias (RA) (Dolan et al. 1993); sus funciones son el anclaje al sustrato y la toma y transporte de agua y nutrimentos de la rizósfera. La forma y estructura del SR son muy variables y están directamente relacionadas con la especie y la función particular que se encuentran desempeñando. La distribución espacial de la raíz primaria, raíces laterales y pelos radicales se conoce comúnmente como arquitectura de la raíz (Fahn 1974).

Se denomina sistema radical pivotante o axonomorfo a aquel en la que existe una raíz principal gruesa que adquiere una dominancia apical preponderante y unas raíces laterales de menor longitud que se disponen a lo largo de la raíz primaria; este es el caso de *A. thaliana* (Bellini et al. 2014). Las raíces crecen y se desarrollan desde sus extremos distales; se suelen distinguir cuatro zonas en el ápice radical: la cofia radical, la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de maduración (Figura 3) (Casimiro et al. 2001). En la zona meristemática las células se dividen tanto en la dirección de la base de la raíz para formar células que se diferencian en tejidos de la raíz funcional, como en la dirección del ápice para formar la cofia. En la zona de elongación, las células se alargan rápidamente y experimentan una serie final de divisiones para formar un anillo central de células llamado endodermis, la cual divide la raíz en dos regiones: el córtex hacia el exterior y el cilindro vascular o estele hacia el interior (Taiz y Zeiger 2006). La zona de maduración es la región en la que las células adquieren sus características en diferenciación; las células entran en la zona de maduración una vez que han pasado por la división y la elongación (Russell 1977; Taiz y Zeiger 2006).

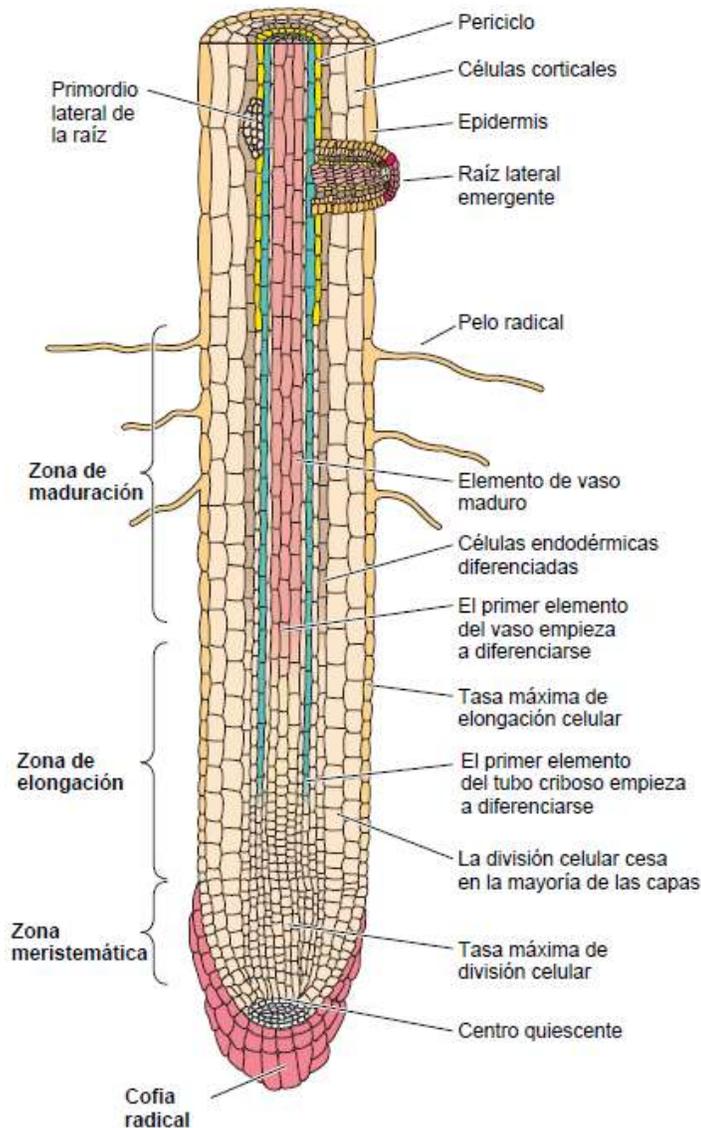


Figura 3. Estructura de la raíz primaria. Esquema de una sección longitudinal de la región apical de la raíz, mostrando la cofia, la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de maduración (Taiz y Zeiger 2006).

En la mayoría de las raíces, los linajes celulares son fácilmente observables como columnas (o filas) de células organizadas en la longitud radicular, las cuales se generan a través de divisiones repetidas en la región meristemática. De esta forma, las filas celulares se asemejan a una “línea de ensamblaje celular”, con cada célula en una fila más avanzada en desarrollo que la antecesora desde el ápice (Figura 4A) (Schiefelbein et al. 1997). Otra característica de las raíces es la presencia de un patrón radial, el cual está conformado por anillos (o capas) concéntricos de tejidos; en *A. thaliana* dicha anatomía es relativamente simple, y está compuesta de capas o

anillos de células individuales que forman la epidermis, corteza, endodermis y periciclo rodeando una estela central de tejidos vasculares; hay un número constante de ocho células por anillo para las capas de la corteza y endodermis, en cambio el periciclo está constituido por doce células, todas estas capas celulares tienen sus propias células madre (Dolan et al. 1993; Scheres et al. 1994; Celenza et al. 1995). En el interior y en contacto con todas las células madre de estas capas hay un pequeño número de células centrales que son mitóticamente inactivas, llamadas células del centro quiescente (CQ), el cual mantiene activas a estas células, para que en conjunto se mantenga la actividad del meristemo (Figura 4B) (Scheres et al. 2002). En el CQ los genes *PLETHORA* (*PLT*), codifican factores de transcripción que son necesarios para el mantenimiento de la identidad del CQ y de las células madre y se conoce que la expresión aumenta con la acumulación de auxina (Aida et al. 2004).

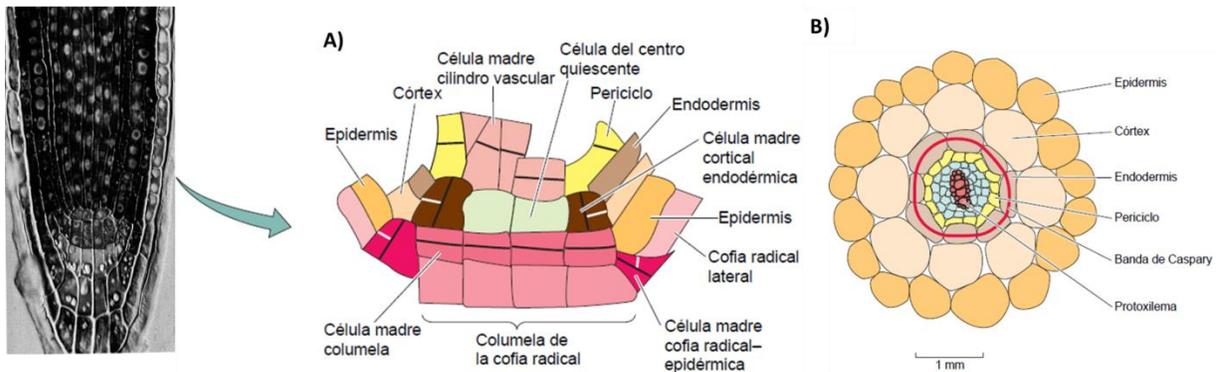


Figura 4. Estructura de la raíz primaria de *A. thaliana*. A) Todos los tejidos de la raíz de *A. thaliana* se derivan de un número pequeño de células madre en el meristemo apical de la raíz. Las líneas negras en el diagrama de la derecha indican los planos de división celular de las células madre. Las líneas blancas indican las divisiones celulares secundarias que ocurren en el cortex-endodermis y en la epidermis-cofia radical lateral. B) Diagrama de una sección transversal de la raíz de *A. thaliana* mostrando el patrón radial de tejidos. El diagrama se elaboró considerando el corte a 1 mm del ápice de la raíz (Taiz y Zeiger 2006).

Por otra parte, la formación de primordios de raíces laterales (PRL) se inicia por divisiones periclinales y anticlinales en las células del periciclo de la zona de maduración de la raíz primaria (Dolan et al. 1993; Dubrovsky et al. 2000). Su desarrollo se ha dividido en 8 etapas: se inicia cuando un par de células fundadoras del periciclo se someten a varias rondas de divisiones anticlinales para crear un único primordio compuestas por un máximo de diez pequeñas células de igual

longitud (etapa I), posteriormente las células sufren divisiones periclinales formando una capa interior y una exterior (estadio II), luego ocurren divisiones anticlinales y periclinales creando un primordio en forma de cúpula (etapas III-VII) y finalmente el primordio de la raíz lateral se expande notablemente a medida que emerge desde la raíz parental (etapa VIII) (Péret et al. 2009; Figura 5).

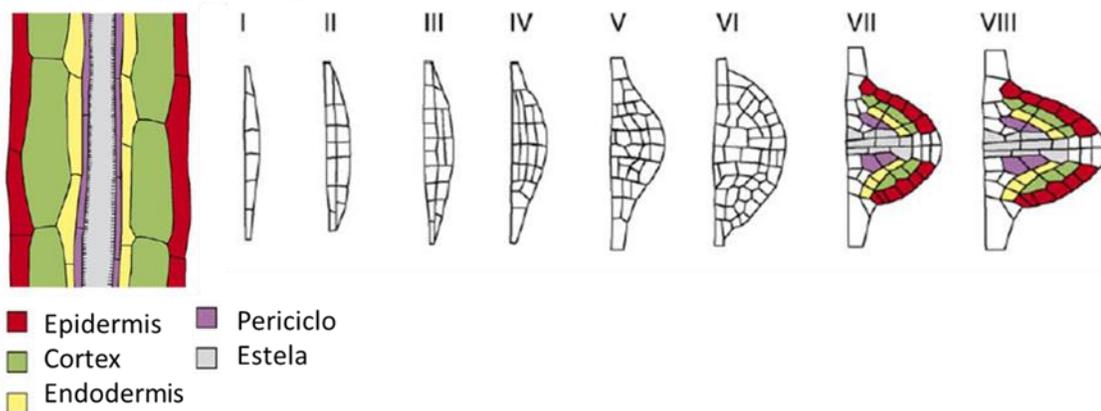


Figura 5. Desarrollo de las raíces laterales. Las raíces laterales vienen de lo profundo de la raíz primaria de las células del periciclo. Se establecen 8 etapas de desarrollo del primordio, lo cual se muestra en números romanos (Modificado de Péret et al. 2009).

Otro de los componentes del sistema radical son los pelos radicales. Cada pelo radical es una extensión de forma tubular que emerge desde el extremo basal de una célula epidérmica especializada llamada tricoblasto, y contribuyen con cerca del 77% del área superficial total de la planta y representan el principal punto de contacto entre la planta y la rizósfera. Además, son los responsables de la absorción de agua y nutrientes (Dolan et al. 1994; Parker et al. 2000; Foreman y Dolan 2001). El desarrollo de los pelos radicales se ha dividido en 4 fases: especificación del destino celular, iniciación, crecimiento y maduración, cada una de las cuales se encuentra controlada por mecanismos genéticos y de señalización, en los que participan las hormonas vegetales (Gilroy y Jones 2000). En los pelos radicales se encuentran canales de agua y transportadores de diferentes nutrimentos, lo que permite potenciar la captación de éstos (Libault et al. 2010).

A. thaliana no forma raíces adventicias (RA) como parte del crecimiento y desarrollo normal, pero se desarrollan como una respuesta adaptativa a diversas

tensiones abióticas y bióticas; pueden formarse a partir de células del periciclo en el hipocotilo, células parenquimatosas del xilema, floema o células del cambium cercanas a las células del floema. (Bellini et al. 2014; Figura 6).

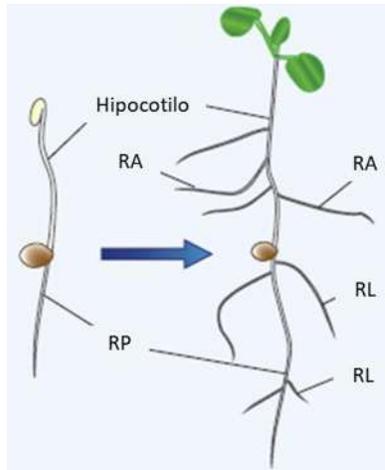


Figura 6. Representación esquemática del desarrollo de la raíz adventicia (AR) en *A. thaliana*. (Modificado de Bellini et al. 2014).

2.4. Reguladores del crecimiento vegetal

Varias moléculas orgánicas pequeñas denominadas fitohormonas o reguladores del crecimiento son responsables de cada aspecto del desarrollo vegetal, desde la embriogénesis hasta la senescencia. El control del desarrollo se realiza modulando la división, expansión, diferenciación y muerte celular. De esta manera se modifican diversos procesos morfogénicos: la germinación de la semilla, la configuración de la arquitectura de la planta, la floración, la maduración de frutos y el desprendimiento de las hojas (Bishopp et al. 2006; Kepinski 2006). En general, las vías de señalización de los reguladores del crecimiento requieren un estricto control que inicia con la percepción de la fitohormona, seguida por una cascada de transducción de señales que termina con la expresión de genes que dan como resultado la regulación de procesos celulares específicos en los diferentes tejidos de la planta (Beltrán-Peña y López-Bucio 2010; Figura 7). Entre los reguladores de crecimiento vegetal más estudiadas se encuentran las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (Figura 8).

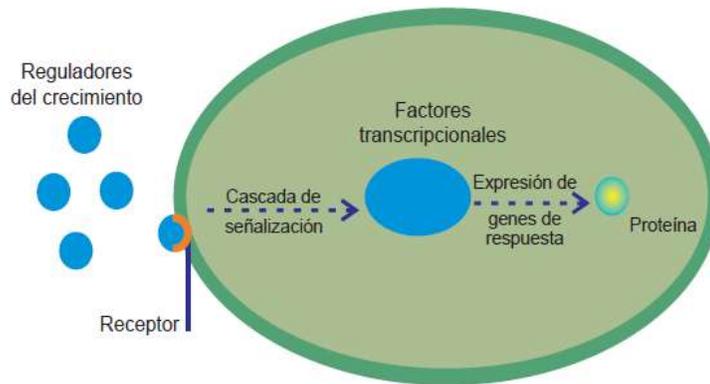


Figura 7. Modelo general que explica la interacción de los reguladores del crecimiento en la célula vegetal. Inicia con la percepción del regulador por un receptor, seguida por una cascada que termina con la expresión de genes que dan como resultado la regulación de procesos específicos de la planta que afectan el desarrollo, la defensa u otras respuestas adaptativas (Beltrán-Peña y López-Bucio 2010).

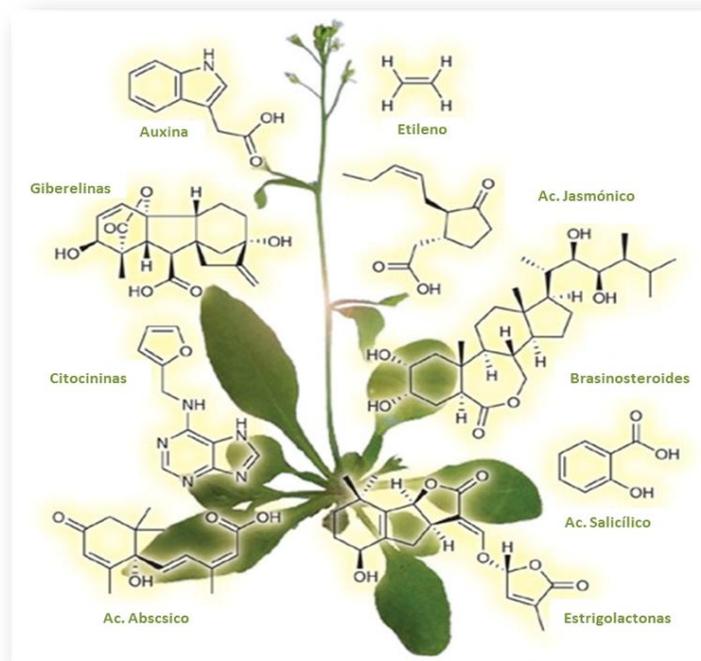


Figura 8. Principales reguladores de crecimiento vegetal. (Modificado de Santner et al. 2009).

2.5. Las auxinas

Existe un gran número de auxinas, como son el ácido 1-naftalen acético (NAA de sus siglas en inglés), el indol-3-etanol (IET), el indol-3-acetaldehído (IAAID) y el ácido fenol acético (PAA); sin embargo, la principal auxina en las plantas es el ácido indol-3-acético (IAA) (Kende y Zeevaart 1997). Las vías de biosíntesis de AIA pueden provenir de dos rutas principales: una de ellas, conocida como la ruta dependiente de triptófano (TRP), que puede bifurcarse en cuatro vías distintas [(indol-acetamida (IAM), ácido indol-3-piruvico (IPA), triptamina (TAM) y indol-3-acetonitrilo (IAOx)]; mientras que la segunda ruta se deriva de la molécula precursora del TRP, el antranilato, y se conoce como la vía independiente del TRP (Tromas y Perrot-Rechenmann 2010).

El AIA actúa como molécula señal durante procesos de división, elongación y diferenciación celular, desde la embriogénesis al establecer la polaridad basal-apical y en la formación de los meristemas de la raíz y el follaje, hasta el desarrollo post-embrionario (Bishopp et al. 2006; Teale et al. 2006). Así las auxinas son de gran importancia en muchos aspectos del desarrollo de la raíz, incluyendo la formación y emergencia de raíces laterales, la organización del meristemo y la respuesta gravitrópica (Ljung et al. 2001; Benjamins y Scheres 2008).

La biosíntesis de auxinas ocurre tanto en el follaje como en la raíz de la planta, siendo las hojas jóvenes de gran importancia en la biosíntesis de estos compuestos (Ljung et al. 2001). Las auxinas sintetizadas son transportadas a tejidos específicos donde activan cascadas de señalización que causan las respuestas de desarrollo (Benjamins y Scheres 2008).

2.6. Vías de transporte de las auxinas

Las auxinas sintetizadas son distribuidas a través del cuerpo de la planta, donde es requerida para varios procesos del desarrollo (Davies 2010). El transporte de auxina es conducido por 2 vías fisiológicamente distintas y separadas espacialmente: a) a través del floema, de una forma más rápida y no polar, y b) de célula a célula, de manera polar y más lenta (Michniewicz et al. 2007). El transporte de la auxina por el floema ocurre por el mecanismo de transporte en masa de este

tejido, a una velocidad de entre 5 a 20 cm/h y unidireccionalmente del ápice a la base, de manera basipétala en la parte aérea y de manera acropétala hacia el extremo de la raíz (Muday y Delong 2001; Figura 9).

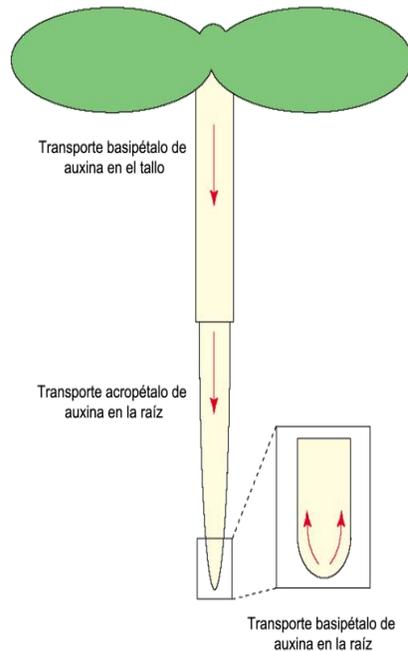


Figura 9. Transporte de auxina. El transporte de auxina por el floema ocurre de manera basipétalo en la parte aérea y acropétalo en la raíz (Modificado de Muday y Delong 2001).

El transporte polar de auxinas es conducido principalmente por gradientes de la forma protonada de AIA en la pared celular (AIAH), ya que el pH es de 5.5 aproximadamente y formas aniónicas en el citoplasma (AIA^-), ya que el pH en el interior celular es de alrededor de 7.0. La forma protonada AIAH puede difundir libremente a través de la membrana plasmática, pero además de la difusión simple de moléculas de AIA, existen acarreadores de entrada AUX1 que transportan la forma iónica (AIA^-) hacia el interior de la célula. La salida de AIA^- de las células es a través de transportadores de membrana que se encuentran localizados hacia un lado de las células, preferentemente hacia la parte basal, estos transportadores se conocen como PIN (Figura 10) (Korasick et al. 2013).

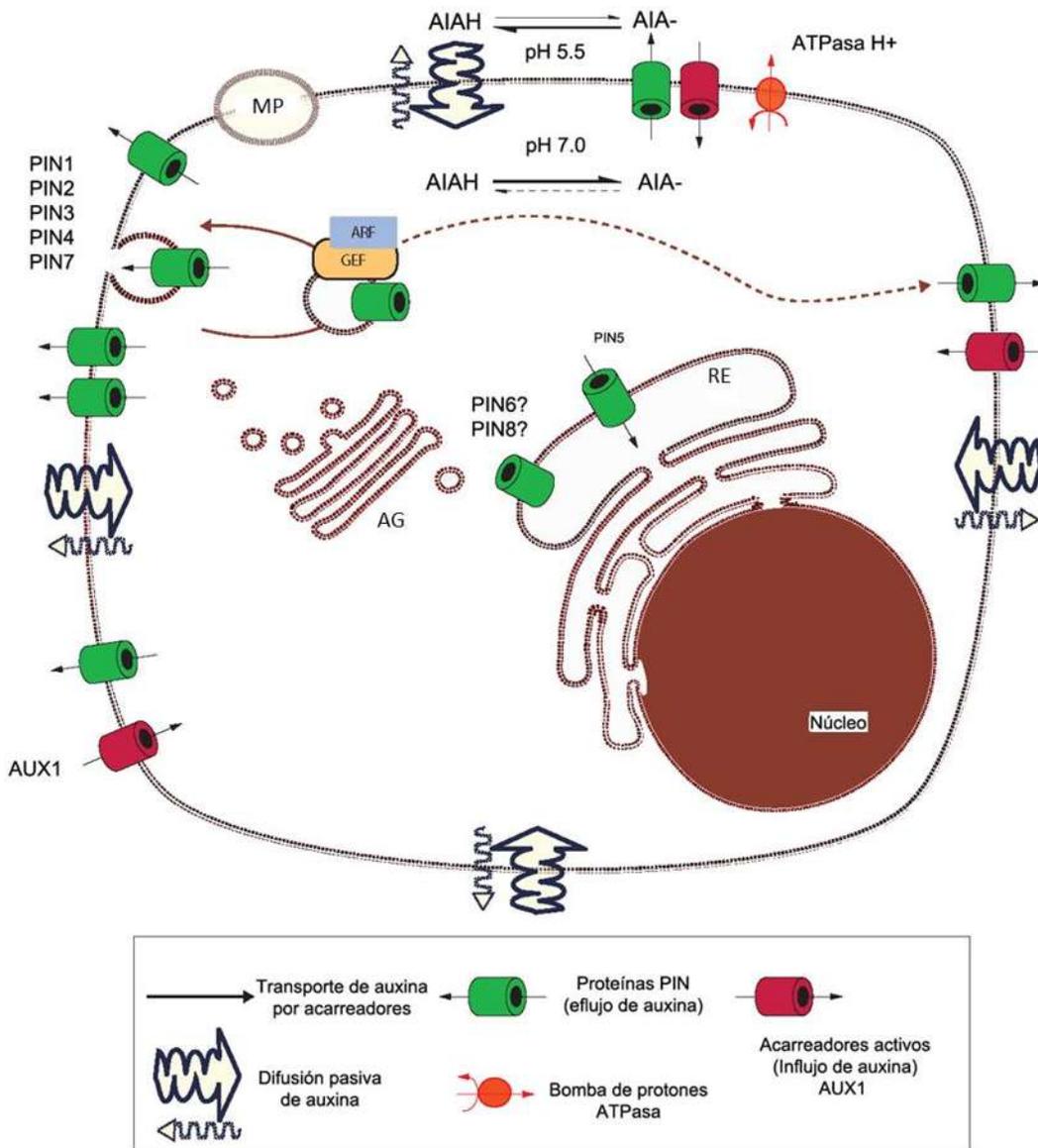


Figura 10. Esquema de una célula vegetal y el papel específico que tienen las proteínas PIN en el control de los niveles celulares de auxina. El pH del apoplasto es mantenido por el transporte de H^+ mediante una ATPasa. La auxina en su forma protonada puede difundir libremente por la membrana plasmática. La forma ionizada de la auxina puede ser internalizada por AUX1 y expulsada por diferentes transportadores PIN (Modificado de Krecek et al. 2009).

2.7. Mecanismo de señalización de las auxinas

En cuanto a la señalización de auxina, esta se encuentra regulada en parte por la combinación de dos clases de proteína: las proteínas represoras Aux/IAA, y los factores de respuesta a auxina (ARFs). En Arabidopsis existen 29 Aux/IAA y 23 ARFs; la combinación entre diferentes Aux/IAA y ARFs tienen un rol importante en

mediar la respuesta en el crecimiento y desarrollo regulados por auxinas, entre ellos la formación de raíces laterales. Las proteínas Aux/IAA reprimen a los ARF, impidiendo que se unan a los elementos de respuesta a auxina (AuxREs) en los promotores de genes de respuesta a esta hormona, y así activar o reprimir la transcripción de sus genes blanco. Partes importantes en este proceso son el complejo correceptor SCF^{TIR1} , y la auxina, que actúa para unir a los Aux/IAAs a este complejo, el cual les adiciona ubiquitininas para su degradación por los proteosomas, dando como resultado la regulación de la expresión de los genes que contienen elementos de respuesta a auxina (Figura 11). (Dharmasiri et al. 2005; Lau et al. 2008).

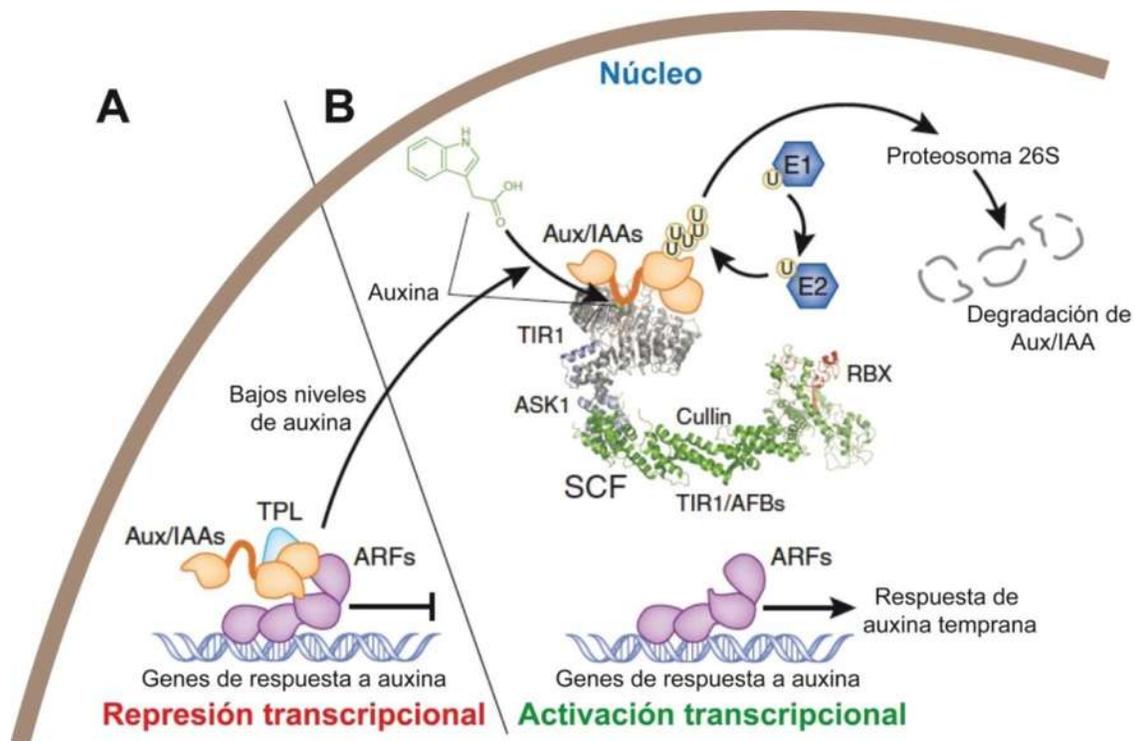


Figura 11. Modelo de la señalización por auxinas en *A. thaliana*. A) En bajos niveles de auxina, la transcripción dependiente de los factores de respuesta a auxina (ARFs) es reprimida por las proteínas Aux/IAA y el co-represor TOPLESS. B) Altos niveles de auxina permiten la formación del complejo SCF^{TIR1}-Aux/IAA, con lo cual se lleva a cabo la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA y su subsecuente degradación, permitiendo a los ARFs la activación transcripcional de genes regulados por auxina (Modificado de Santner et al. 2009).

2.8. Síntesis y transporte de sacarosa

La sacarosa ocupa una posición central en el metabolismo de todas las plantas, es el principal producto de la fotosíntesis en la mayoría de las angiospermas y es exportado de las hojas (tejidos fuente) hacia tejidos de poca o nula actividad fotosintética como raíces, flores, semillas, hojas jóvenes, meristemas, etc. (tejidos demanda) (Padilla et al. 2007; Ruan 2014). La síntesis de sacarosa está confinada al citosol, debido a la estricta separación en compartimentos de las enzimas implicadas en su síntesis, se inicia a partir de triosas fosfato provenientes del cloroplasto, las cuales al combinarse forman hexosas, en una ruta altamente regulada, principalmente por inhibición alostérica de las enzimas por los productos de la reacción (Ruan 2014).

La acumulación de sacarosa atrae el agua por osmosis, creando presión de turgencia alta, lo que impulsa el flujo de masa de asimilados hacia los sitios de consumo (Ruan 2014). Se llama carga del floema al proceso por el cual los fotosintatos sintetizados en las hojas son concentrados en el floema. Por su parte, su liberación controlada en los tejidos demanda se conoce como descarga del floema. Ambos procesos son afectados por factores ambientales, bioquímicos, fisiológicos y de desarrollo que en conjunto determinan la cantidad de fotosintatos que pueden ser descargados en los tejidos demanda. En algunos casos la carga del floema se lleva a cabo por movimiento transmembranal (carga apoplástica) o por los plasmodesmos (carga simplástica). De igual manera, en la descarga del floema están presentes las dos vías.

Algunos de los transportadores de azúcares en plantas superiores han sido caracterizados en sistemas heterólogos. Se ha determinado que funcionan como "simporte" (H^+ /sacarosa o H^+ /hexosas) y su actividad permite el movimiento de azúcares en contra del gradiente de concentración. Se ha sugerido que la predominancia de las rutas de descarga de fotosintatos simplástica y apoplástica está relacionada con la forma en que se usan los fotosintatos (Padilla et al. 2007).

Tras la translocación a través del floema a los tejidos de demanda, la sacarosa se degrada por las enzimas invertasa (INV) o sacarosa sintasa (Sus) en hexosas o sus derivados. INV hidroliza la sacarosa en glucosa y fructosa, mientras que Sus

degrada sacarosa en presencia de UDP en UDP-Glucosa y fructosa (Ruan 2014; Figura 12).

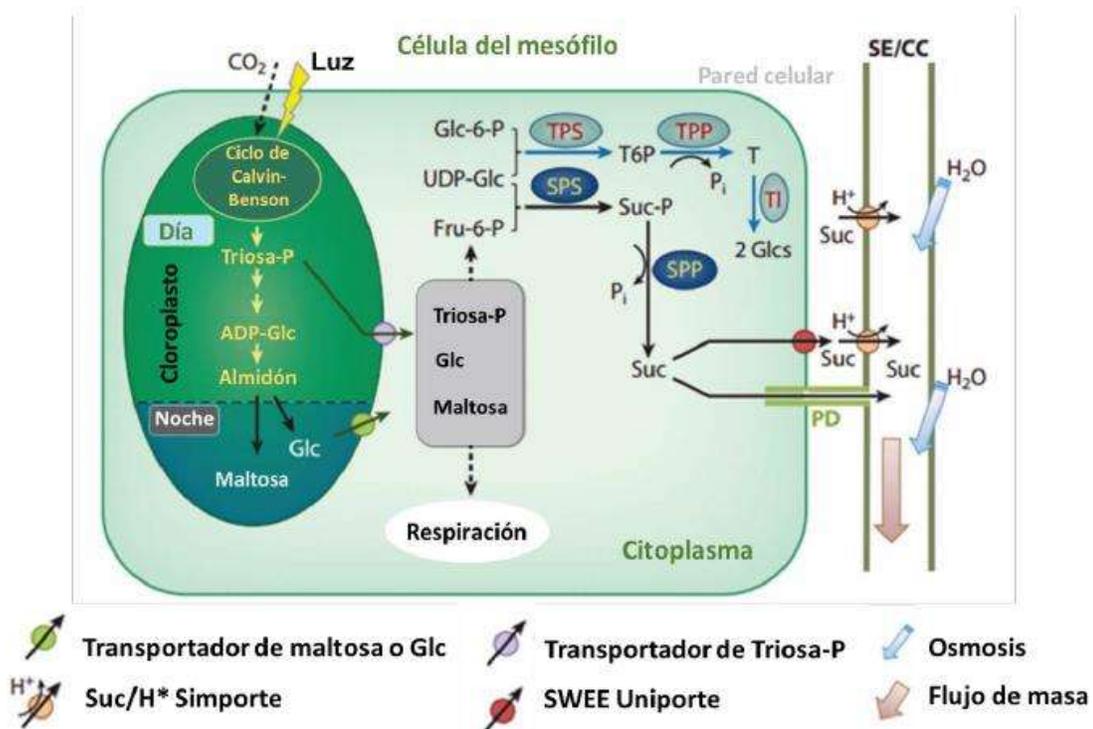


Figura 12. Síntesis de sacarosa. La síntesis de sacarosa y la carga del floema en las hojas origen. Las hojas fotosintéticas (fuente) utilizan la energía solar para fijar CO₂ para producir triosas fosfatos (triosas-P) en el cloroplasto. Las triosa-P se exportan al citoplasma como bloques a otro metabolismo. También se puede convertir para la síntesis de ADP-glucosa (ADP-Glc) para la síntesis de almidón en el cloroplasto. El almidón es degradado por la noche en glucosa (Glc) o maltosa para su exportación al citoplasma. La glucosa puede ser fosforilada por la hexoquinasa, para formar fructosa-6-fosfato (Fru-6-P) por la glucosa-6-fosfato isomerasa. La sacarosa-fosfato sintasa (SPS) utiliza fructosa-6-fosfato y UDP-Glc como sustrato para producir sacarosa-fosfato (Suc-P), posteriormente se convierte en sacarosa por la fosfatasa sacarosa-fosfato (SPP). La sacarosa se carga en el floema ya sea apoplásticamente o simplásticamente. La acumulación de sacarosa atrae el agua por osmosis, creando presión de turgencia alta, lo que impulsa el flujo de masa de asimilados hacia los sumideros. En paralelo con la síntesis de sacarosa, una pequeña cantidad de trehalosa (T) también se puede sintetizar. Mediante el uso de ADP-Glc y Glc-6-P como sustratos, la trehalosa-6- fosfato (T6P) sintasa (TPS) sintetiza T6P, un metabolito de señal recientemente descubierto, luego se convierte en trehalosa por T6P fosfatasa (TPP). La trehalosa puede ser finalmente hidrolizada por la trehalasa (TI) en dos moléculas de glucosa. También se muestran varios transportadores implicados. Abreviatura adicional: Pi ortofosfato (Modificado de Ruan, 2014).

Distintos estudios sugieren que la arquitectura de la raíz está relacionada con el estado de carbono, el cual aumenta la elongación de la raíz primaria y el número de raíces laterales (Muller et al. 1998). En plantas de *A. thaliana* transferidas a medios con sacarosa, presentaron una mayor longitud de la raíz primaria

dependiendo de la concentración de sacarosa (Freixes et al. 2002). Por otra parte, Karthikeyan et al. (2007) menciona que hay aumento de raíces laterales cuando se suplementa sacarosa en el medio de crecimiento.

Recientemente Hernández-Madrugal et al. (2017) reportaron que la adición de sacarosa a medios de crecimiento que contenían 100 μM de Cr (VI), reactivó el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana* en un 60 y 100% en los tratamientos que contenían 70 y 140 mM de sacarosa respectivamente (Figura 13).

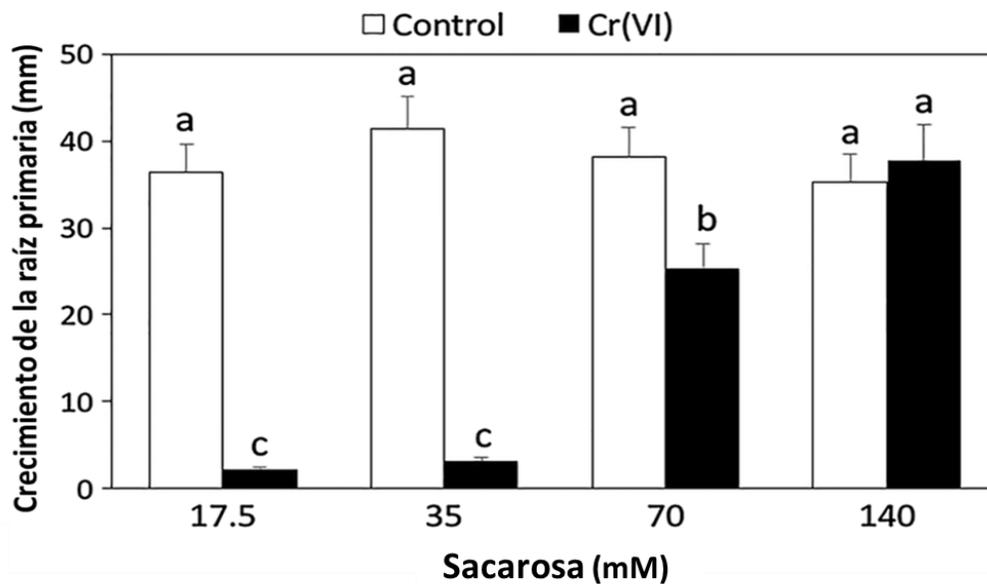


Figura 13. Efecto del Cr(VI) y sacarosa en el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana*. Las semillas de *A. thaliana* se germinaron y crecieron por 10 días en medios con concentraciones crecientes de sacarosa, suministrados con o sin 100 μM de Cr(VI) (Modificado de Hernández-Madrugal et al. 2017).

2.9. Fosfato y sacarosa

El fósforo (P) forma parte estructural de biomoléculas como los ácidos nucleicos, los fosfolípidos y el ATP (Rausch y Bucher et al. 2002). También es importante en procesos fisiológicos como la fotosíntesis, la respiración, el metabolismo energético y la regulación de diversas enzimas (Raghothama 1999). Las plantas adquieren fósforo como fosfato (P_i) de la solución del suelo, y aunque la cantidad total de P en el suelo puede ser alta, la fijación inorgánica y la formación de complejos orgánicos de fosfato disponible en suelo son las principales razones de su

baja disponibilidad (Raghothama y Karthikeyan 2005).

La escasez de P puede provocar cambios en el sistema radical: en *A. thaliana* el número y densidad de las raíces laterales se incrementa de manera muy marcada y la longitud de la raíz primaria se reduce drásticamente (Figura 14) (López-Bucio et al. 2002). Por otra parte, Sánchez-Calderón et al. (2005) mencionan que la reducción la longitud de la raíz por escasez de fosfato es provocada por cambios en el programa de desarrollo post-embriionario indeterminado a uno determinado. Para entender el mecanismo molecular que subyace a estas respuestas, se aisló la mutante de *A. thaliana*, hipersensible a la inanición de fosfato1 (*hps1*), que presenta una alta sensibilidad en casi todos los aspectos de las respuestas de las plantas a la escasez de fosfato; los análisis moleculares y genéticos indicaron que el fenotipo de esta mutante *hps1* es causado por la sobreexpresión del *gen SUCROSE TRANSPORTER2 (SUC2)* y como consecuencia, la mutante *hps1* tiene un alto nivel de sacarosa en el follaje y la raíz (Lei et al. 2011). Se ha demostrado también que la mutante es hipersensible a la privación de nitrógeno y potasio (Lei y Liu 2011), sugiriendo así la participación de la sacarosa en la respuesta a la escasez de nutrientes (Lei et al. 2011; Lei y Liu 2011). Además, la sacarosa incrementa la distribución de auxina en la zona de la raíz comprendida del extremo de la raíz primaria al inicio de la primera raíz lateral, lo que sugiere que la estimulación de la formación y crecimiento de raíces laterales por sacarosa, es mediada por el aumento de auxina (Jain et al. 2007; Karthikeyan et al. 2007).

Lo reportado anteriormente sugiere que la sacarosa, además de su función en el aporte de energía, actúa como un regulador global en varias respuestas relacionadas con la disponibilidad de nutrientes para las plantas, aunque se desconoce cuáles son los blancos directos (Lei et al. 2011; Lei y Liu 2011).

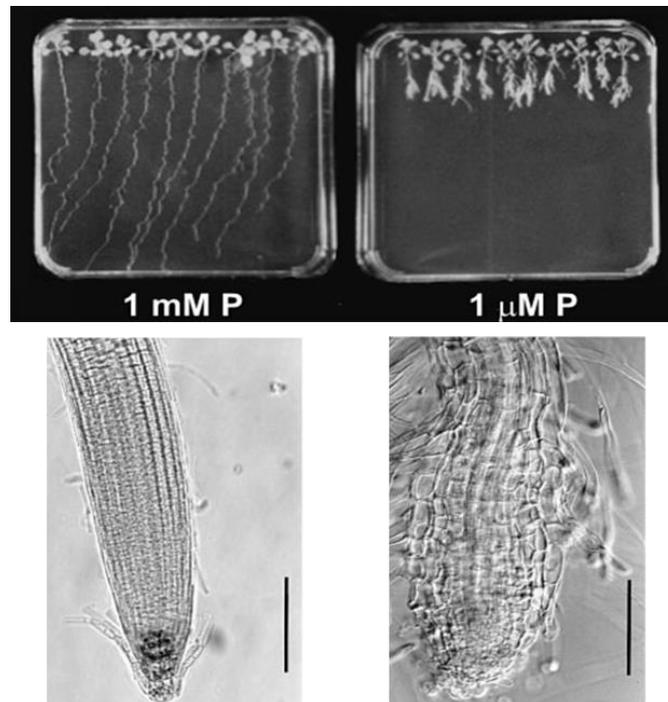


Figura 14. Efecto de la disponibilidad de fosfato (P) en la arquitectura de la raíz. Plantas creciendo en condiciones óptimas (izquierda) y limitantes (derecha) de P (Modificado de Sánchez-Calderón et al. 2005).

2.10. Factores exógenos que influyen en el crecimiento y desarrollo de las plantas

El crecimiento y desarrollo de las plantas está en función de la integración de distintos factores endógenos, pero además existen factores exógenos como la temperatura, cantidad de carbono, presencia de patógenos o parásitos, disponibilidad de agua y nutrientes, así como la presencia de metales pesados en concentraciones tóxicas. Dentro de los metales pesados que no son nutrientes pero que se encuentran en el suelo se encuentra el Cromo (Cr).

2.11. El Cromo (Cr)

El cromo (Cr) es el séptimo elemento más abundante en la tierra y el vigésimo primer lugar en las rocas de la corteza. En la corteza varía en un rango de 100 a 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ y el suelo puede contener entre 5 y 3 000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Skeffington et al. 1976; McGrath y Smith 1990). Los usos de Cr y sus compuestos en la industria son muy

diversos, el 60-70% se utiliza en aleaciones, incluyendo el acero inoxidable, y el 15% se utiliza en los procesos químicos industriales, principalmente en el curtido de pieles, en los pigmentos y en la galvanoplastia. Estas aplicaciones aumentan su concentración en la atmósfera, por lo que se ha convertido en uno de los principales contaminantes del aire, suelo y agua (Armienta-Hernández y Rodríguez-Castillo 1995).

El Cr es un metal de transición localizado en el grupo VI-B de la tabla periódica, con un número atómico de 24 y un peso atómico de 51.996 (Ramírez-Díaz et al. 2009). Su química no es sólo es rica en la variedad de colores de sus compuestos, sino también en la variedad de estados de oxidación, que van de -2 a +6. Los estados más abundantes y estables son el Cr trivalente [Cr(III)] y el Cr hexavalente [Cr(VI)], los otros estados de valencia son inestables y de corta duración en los sistemas biológicos (Shupack 1991). El Cr(VI) se asocia con el oxígeno, para formar oxianiones hidrocromato (HCrO_4^-), cromato (CrO_4^{2-}) o dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (Shanker et al. 2005). En el ambiente, el Cr(VI) puede ser reducido a Cr(III) de manera abiótica o por medio de enzimas llamadas cromato reductasas (Katz y Salem 1993).

2.12. Transporte del Cr en plantas

El Cr es un elemento tóxico no esencial para las plantas, por lo que no poseen mecanismos específicos para su captación. Por lo tanto, la absorción de este metal pesado es a través de proteínas transportadoras de nutrientes esenciales de la plantas: la vía de transporte de Cr(VI) es un mecanismo activo que implica transportadores de aniones esenciales como el sulfato (Shanker et al. 2005; Figura 15). López-Bucio et al. (2014) demostraron que la adición de fosfato al medio interfiere con la captación de cromato y en menor medida lo hace el sulfato, lo que sugiere que la captación del Cr(VI) en *A. thaliana* es a través de transportadores de fosfato y sulfato.

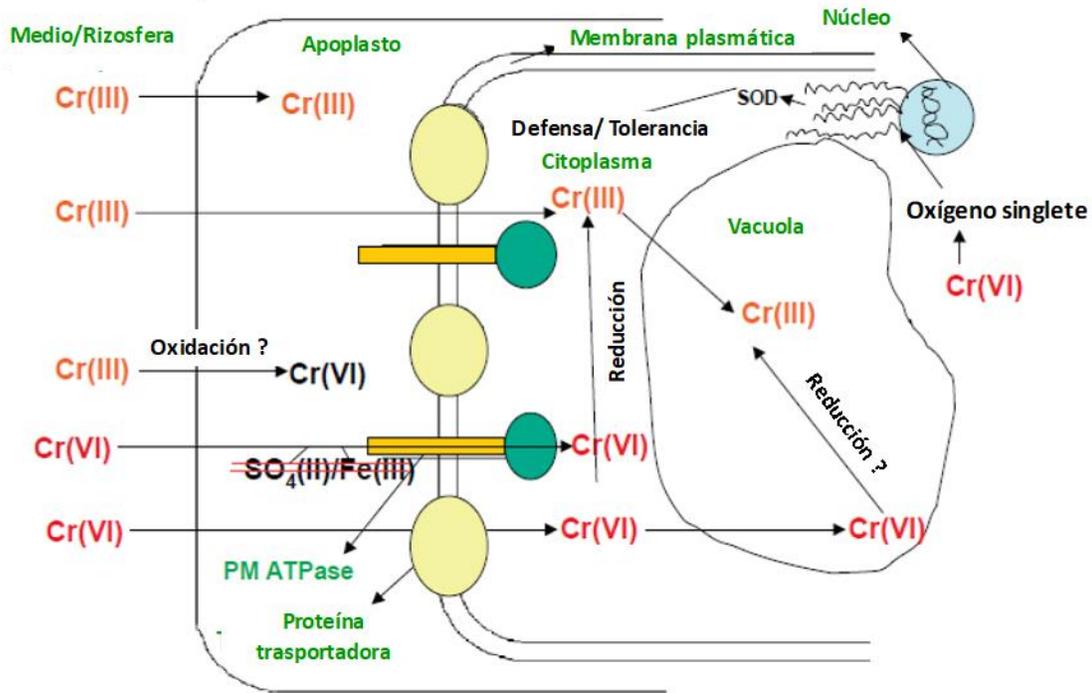


Figura 15. Modelo hipotético de transporte de Cr y toxicidad en las raíces de las plantas. (Modificado de Shanker et al. 2005).

2.13. Efectos del Cr en plantas

En el interior de la célula la reducción del Cr(VI) a estados oxidativos inferiores como Cr(V) y el Cr(III) puede ocasionar la formación de especies reactivas de oxígeno, generando estrés oxidativo y en consecuencia diversos efectos tóxicos en el ADN, lípidos y proteínas. Se considera que el daño oxidativo al ADN es responsable de los efectos genotóxicos causados por el cromo (Figura 15). Aunque el Cr(III) a nivel extracelular es relativamente inocuo debido a su insolubilidad, en el interior de la célula es altamente tóxico debido a su capacidad para unirse al ADN y a las proteínas (Ramírez-Díaz et al. 2009).

El Cr(VI) inhibe la germinación y causa necrosis y/o clorosis de las hojas, reducción del crecimiento de la raíz y disminución en la producción de biomasa, durante el desarrollo post-embriionario (Sharma et al. 1995). Estos efectos se explican por el daño oxidativo a las membranas celulares (Vázquez et al. 1987), reducción en la producción de clorofila (Sharma et al. 2003), disminución del contenido de proteínas e inhibición de la actividad de la nitrato reductasa (Vajpayee

2000). También afecta directamente al material genético, provocando alteraciones cromosómicas (Zou et al. 2006).

Además de los efectos tóxicos del Cr en las plantas, se ha reportado que en concentraciones pequeñas puede haber una estimulación del crecimiento. En *A. thaliana*, Ortiz-Castro et al. (2007) reportaron que plantas de 6 días de edad al ser transferidas a medios con 100 μM de Cr(VI) en los cuales se mantuvieron por 6 días más, tuvieron un mayor peso del follaje y de la raíz con relación a las plantas transferidas a medios sin el metal. Por otro lado, Martínez-Trujillo et al. (2014) demostraron que en la germinación y crecimiento de plantas de *A. thaliana* directamente en medios con Cr(VI), hay un efecto estimulador a bajas concentraciones (20 μM) y un efecto inhibitor a mayores concentraciones (100 μM) (Figura 16).

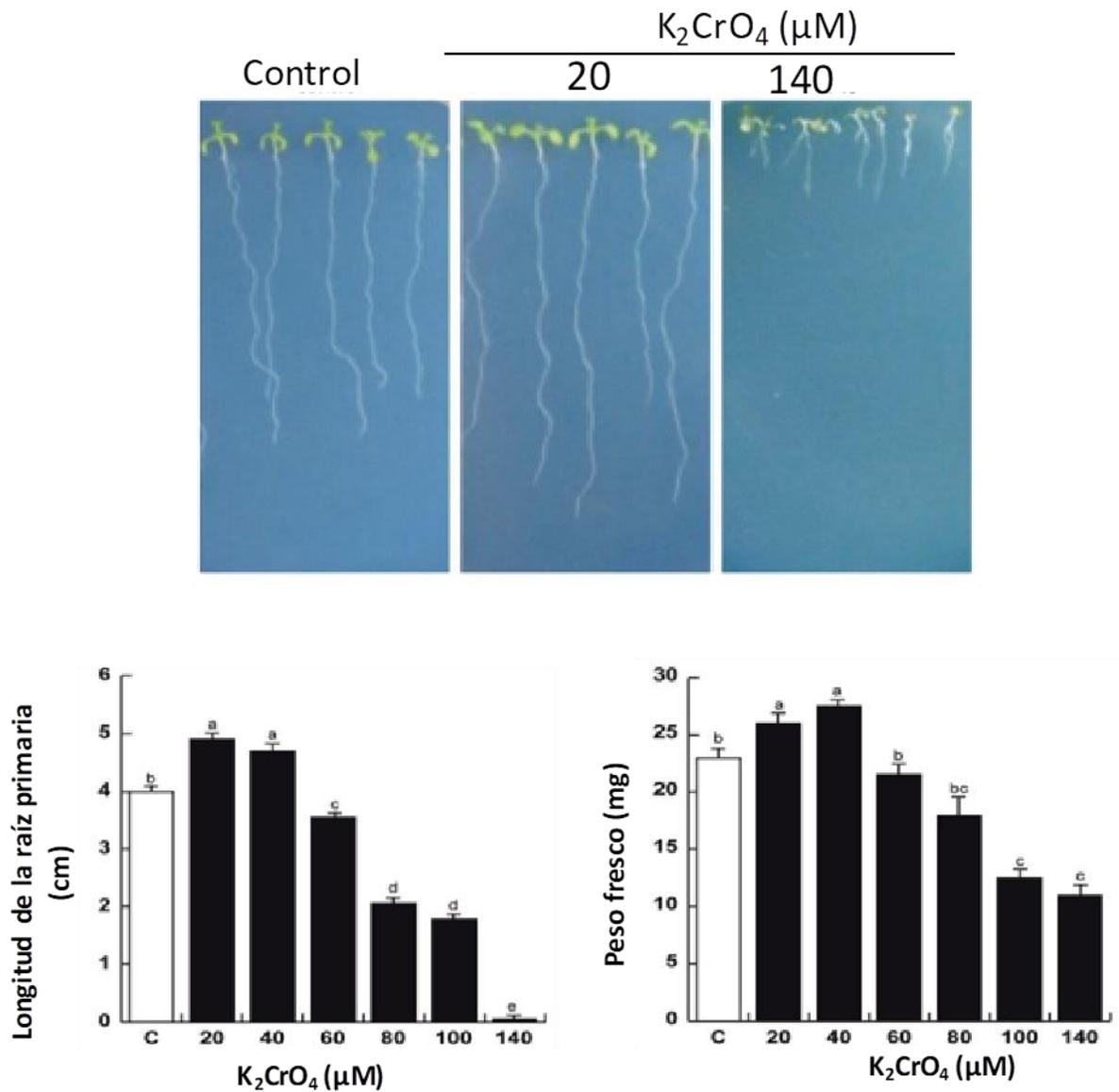


Figura 16. Efecto de diferentes concentraciones de Cr(VI) en el crecimiento de *A. thaliana*. Las semillas fueron germinadas directamente en medios con Cr(VI) y las plantas se dejaron crecer por 6 días más (Modificado de Martínez Trujillo et al. 2014).

3. HIPÓTESIS

Las respuestas de la raíz de *A. thaliana* al Cr(VI) y a la deficiencia de fosfato son afectadas por sacarosa.

4. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto de la sacarosa, Cr(VI) y deficiencia de fosfato sobre el crecimiento y desarrollo de la raíz de *A. thaliana*.

4.1. OBJETIVOS PARTICULARES

a) Determinar el efecto del Cr(VI) y sacarosa exógena en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *A. thaliana*, y su correlación con la división celular, distribución de auxina e identidad del meristemo.

b) Determinar el efecto del represor IAA14 en la respuesta de plantas de *A. thaliana* a Cr(VI) e incremento de sacarosa exógena.

c) Determinar el efecto de la deficiencia de fosfato y sacarosa exógena en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *A. thaliana*.

d) Caracterizar el crecimiento y desarrollo de la raíz de *A. thaliana* en un sistema de exposición eventual al Cr(VI), y su correlación con la división celular y expansión celular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Se utilizaron semillas de la línea silvestre de *A. thaliana* ecotipo Col-0 y las líneas transgénicas de *A. thaliana* con el fondo genético silvestre Col-0:

a) La línea *DR5::uidA* (Ulmasov et al. 1997) consiste en un elemento de respuesta a auxina artificial (CCTTTTGTCTC) repetido en hilera 8 veces y fusionado al promotor mínimo -46 del Virus del Mosaico de la Coliflor y al gen *uidA*; esta línea permite determinar los lugares de la raíz en que está presente la hormona auxina.

b) La línea *CycB1;1::uidA* (Colon-Carmona et al. 1999) contiene el promotor del gen que codifica para la ciclina mitótica de *A. thaliana* CYCB1;1 fusionado al gen *uidA* y además se adicionó al gen una caja de destrucción de ciclina para que la enzima β -glucuronidasa se degradara después de cada ciclo celular; esta línea permite monitorear la actividad del ciclo celular de manera temporal y espacial.

c) La línea *AtEXP7::uidA* (Cho y Cosgrove 2002) contiene el promotor de la expansina 7 de tipo α de *A. thaliana* fusionado al gen *uidA*; este promotor se enciende cuando existe una expansión de la célula por crecimiento de la pared celular y permite monitorear las partes de la raíz que se están expandiendo por crecimiento de las células.

d) La línea *QC46::uidA* (Sabatini et al. 1999) contiene el promotor trap QC46 fusionado al gen reportero *uidA*, la cual confiere expresión en las células del centro quiescente, el cual actúa como un centro organizador, manteniendo la identidad de las células madre del meristemo de la raíz (Wildwater et al. 2005).

e) La línea *PLT1::uidA* contiene el promotor del gen *PLT1* fusionado al gen reportero *uidA*; este gen contribuye a mantener la identidad del meristemo de la raíz (Aida et al. 2004).

Además, se utilizó el fondo genético de la mutante *iaa14/slr1* (Fukaki et al. 2002), la cual presenta una mutación en el gen que codifica la proteína represora IAA14; debido a un cambio de aminoácido la proteína no se degrada en presencia de auxina por lo que inhibe la formación de raíces laterales. A este fondo genético

fueron transferidos en este trabajo los marcadores genéticos *CycB1;1::uidA* y *DR5::uidA* de manera separada.

5.2. Condiciones generales del crecimiento de las plantas

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente con etanol al 95% (v/v) por 5 minutos y posteriormente en hipoclorito de sodio (Cloralex) al 20% por 8 minutos. Luego de efectuar 6 lavados con agua desionizada estéril, las semillas fueron colocadas en oscuridad a 4°C, durante 48 h en agua desionizada estéril, para promover y sincronizar la germinación. Las semillas de *A. thaliana* fueron germinadas en medio MS 0.2x (Murashige y Skoog 1962), suplementado con sacarosa al 0.6%, agar para plantas al 1% (w/v) (Phytotechnology Laboratories), y pH 7 el cual se ajustó una vez agregado el agar. Las plantas se crecieron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 18 h de luz ($300 \mu\text{M m}^2 \text{s}^{-1}$) y 6 h de oscuridad, con una humedad de 70-75%, orientadas en posición vertical para permitir el crecimiento del sistema radical sobre el medio.

5.3. Evaluación del efecto de la sacarosa en la reactivación del crecimiento de la raíz inhibido por Cr(VI)

Para evaluar el efecto de la sacarosa en la reactivación del crecimiento de la raíz, las semillas de *A. thaliana* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2x con cromato de potasio (K_2CrO_4) como Cr(VI) a una concentración de 100 μM ; las plantas se dejaron crecer por 4 ó 7 días y después fueron transferidas a medio MS suplementado con sacarosa al 0.6% o 4.8%. Las plantas transferidas se dejaron crecer por 8 o 5 días en estos tratamientos y se realizó la medición de las variables.

5.4. Evaluación del efecto de la sacarosa en la reactivación del crecimiento de la raíz inhibido por bajo fosfato

Las semillas de *A. thaliana* fueron germinadas en medio MS 0.2x con alto fosfato (1.25mM) o bajo fosfato (20 μM) con sacarosa al 0.6%. Las plantas se dejaron crecer por 7 días y después fueron transferidas a medio MS 0.2x con alto fosfato (1.25mM), suplementado con sacarosa al 0.6% o 4.8%. Las plantas

transferidas se dejaron crecer por 7 días en estos tratamientos y se realizó la medición de las variables.

5.5. Evaluación del crecimiento de la raíz por exposición eventual al Cr(VI)

Las semillas de *A. thaliana* fueron germinadas y crecidas en medios MS 0.2x y a los 6 días después de la siembra se realizó un corte horizontal sobre el medio a 2.5 cm del extremo de la raíz primaria, para adicionar distintas concentraciones de Cr(VI) en un rango de 0 a 100 μ M. Las plantas se dejaron crecer durante 6 días más y se realizó la medición de variables.

5.6. Análisis de variables del desarrollo

El crecimiento de la raíz primaria (RP) se registró usando una regla graduada en mm. El número de raíces laterales (RL) se determinó por conteo de las RL presentes en la raíz primaria de la punta de la raíz a la zona de transición del tallo.

5.7. Análisis histoquímico de la actividad de la β -glucoronidasa

Las plantas transformadas con el gene reportero *uidA* (Jefferson et al. 1987) se incubaron con el sustrato X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido) al 0.1% en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH7) con 2 mM de ferrocianuro de potasio y 2 mM de ferricianuro de potasio, durante 1 hora a 37 °C. Las plantas se aclararon y fijaron con 0.24 N de HCl en 20% (v/v) de metanol, incubándolas a 62 °C por 40 min. La solución se reemplazó por NaOH al 7% (w/v) en etanol al 60% (v/v) por 20 min a temperatura ambiente. Las raíces se rehidrataron mediante tratamientos con etanol al 40%, 20% y 10% (v/v), haciendo incubaciones de 20 minutos en cada concentración, después se les añadió glicerol al 50% (v/v). Las plantas fueron montadas y fijadas en portaobjetos con glicerol al 50% (v/v) (Malamy y Benfey, 1997). Los bordes entre el portaobjetos y el cubreobjetos fueron sellados con un barniz comercial.

El análisis de la actividad de GUS se realizó con el microscopio estereoscópico (MZ6; Leica Microsystems). Las imágenes se capturaron con una

cámara digital Cyber-shot DSC-S75 (Sony Electronics) adaptada al microscopio y se procesaron con el software Axio Vision 4AC.

5.8. Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente utilizando el programa SPSS19 para Windows. Se usó un análisis univariado con la prueba posthoc de Tukey para determinar las diferencias significativas en las respuestas de crecimiento y desarrollo de raíz ($P < 0.05$). Los intervalos de confianza se determinaron con el programa Excel versión 15.26.

6. RESULTADOS

6.1. La sacarosa estimula el crecimiento de la raíz primaria en plantas de *A. thaliana* silvestres y *slr-1*, crecidas previamente por 4 días en medios con Cr(VI) y transferidas a medios sin Cr(VI)

Para determinar el efecto de la sacarosa en la reactivación del crecimiento de la raíz, tanto en el fondo genético silvestre (Col-0) como en la mutante *slr-1*, las plantas se germinaron y se dejaron crecer en medios con Cr(VI) 100 μ M y 0.6% de sacarosa durante 4 días; posteriormente se transfirieron a medios con 0.6% o 4.8% de sacarosa sin Cr(VI), donde se dejaron crecer durante 8 días más; se incluyeron controles sin Cr(VI) en ambos medios y con Cr(VI) en ambos medios (Figura 17). En todos los tratamientos no se formaron raíces laterales. Se encontró que en todos los tratamientos, la mutante *slr-1* siempre tuvo un mayor crecimiento de la raíz primaria con respecto a la silvestre; respecto a la sacarosa, en las plantas de ambos fondos genéticos se estimuló el crecimiento de la raíz primaria en alrededor de un 30% en todos los casos cuando el segundo medio se complementó con alta concentración de sacarosa (4.8%) (Figura 17).

Los resultados demuestran lo siguiente: i) que el meristemo de la raíz primaria no se agota al crecer las plantas por 4 días en el medio con Cr(VI), ii) que el tiempo de 4 días en Cr(VI) no fue suficiente para inducir la formación de raíces laterales o adventicias, y iii) que la sacarosa confiere un mejor crecimiento a la raíz primaria, después de haber crecido inicialmente en medio con Cr(VI).

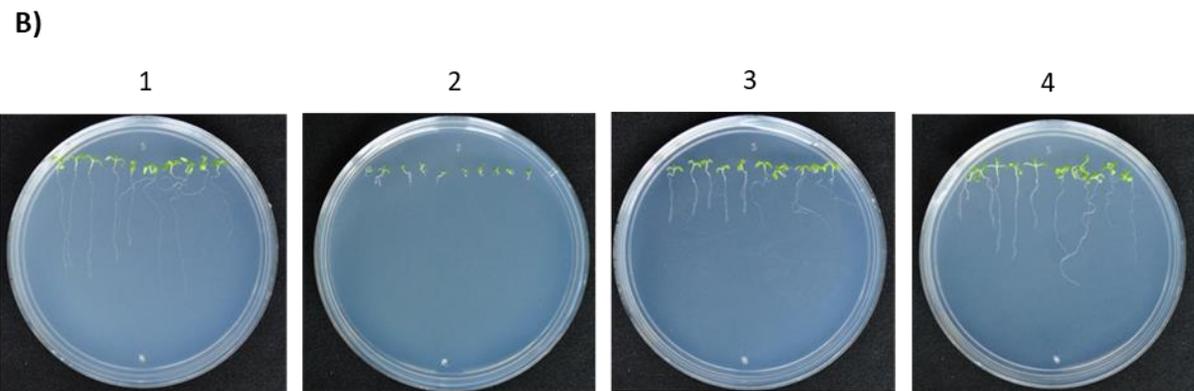
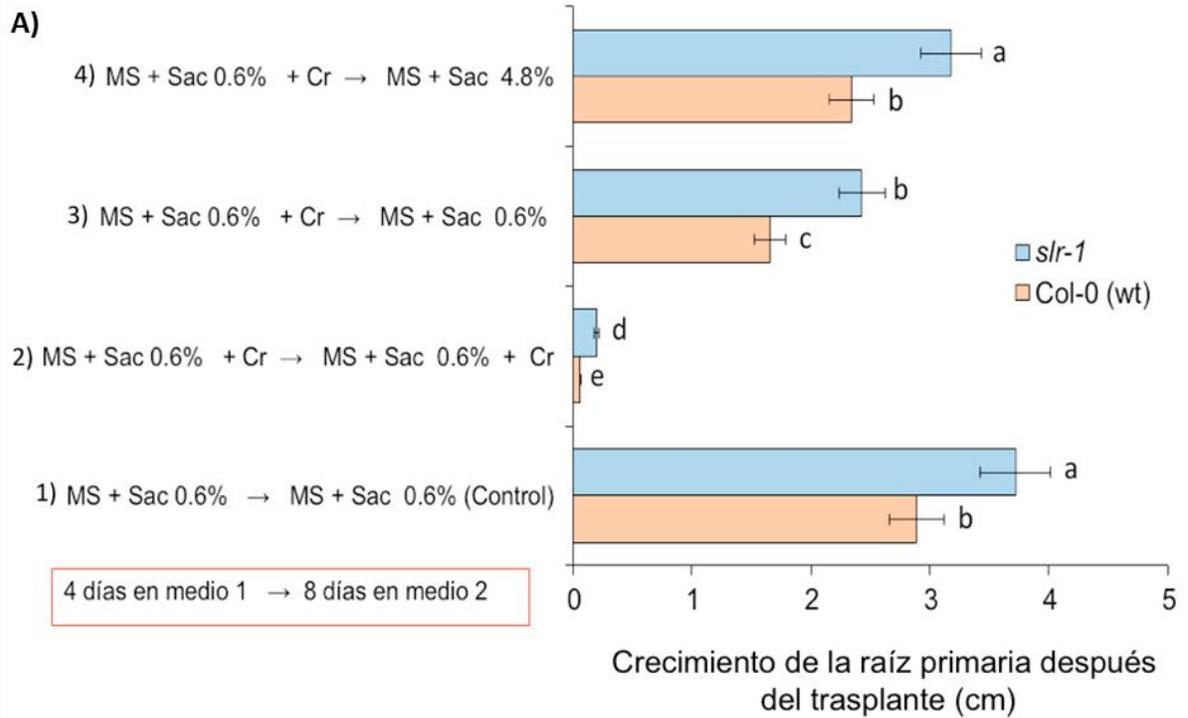


Figura 17. Efecto de la sacarosa en la estimulación del crecimiento de la raíz primaria en plantas de *A. thaliana* Col-0 y *slr-1* crecidas por 4 días en medios con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 8 días en otro medio. Las semillas de *A. thaliana* fueron germinadas y se dejaron crecer por 4 días en los medios iniciales para posteriormente transferidas a los medios finales dejándolas crecer por 8 días más. Al término de este periodo las plantas fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Los medios con Cr(VI) tuvieron una concentración de 100 μ M del metal. A) Crecimiento de la raíz primaria a partir del momento de la transferencia de 30 plantas analizadas para cada tratamiento. B) Fotos representativas de cada tratamiento. Se indican los intervalos de confianza para $\alpha=0.05$. Las letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ($P<0.05$); $n=30$.

Para determinar el efecto del Cr(VI) y la sacarosa en la división celular del meristemo de la raíz primaria, así como de la distribución de auxina, tanto en el fondo genético silvestre (Col-0) como en la mutante *slr-1*, se utilizaron líneas transgénicas con los marcadores *CycB1::uidA* y *DR5::uidA*. La expresión de los 2 marcadores se conservó en las plantas cuando fueron transferidas a los medios sin Cr(VI), pero no cuando siguieron en un medio con Cr(VI), lo cual concuerda con el mayor crecimiento de esta raíz. Los resultados muestran que en general la división celular es mayor en el meristemo de *slr-1*; asimismo, el área de la distribución de auxina es mayor en *slr-1* con relación a Col-0. Además, la mayor concentración de sacarosa aumentó el área de distribución de auxina en sección transversal (Figura 18).

Además, en la línea silvestre (Col-0) fueron analizados marcadores de identidad celular: *QC46::uidA* y *PLT1::uidA*. Estos marcadores mantuvieron su expresión cuando las plantas fueron transferidas a medios sin Cr(VI), pero no así cuando siguieron creciendo en medios con Cr(VI). Además, en este último caso se presentó una desorganización de las células y una diferenciación más cercana al extremo de la raíz, evidenciado por la formación de pelos radicales. Se confirma que el crecimiento de la raíz requiere de la expresión de estos marcadores. En lo que respecta a la sacarosa, no tuvo un efecto notable en aumentar el área de expresión (Figura 19).

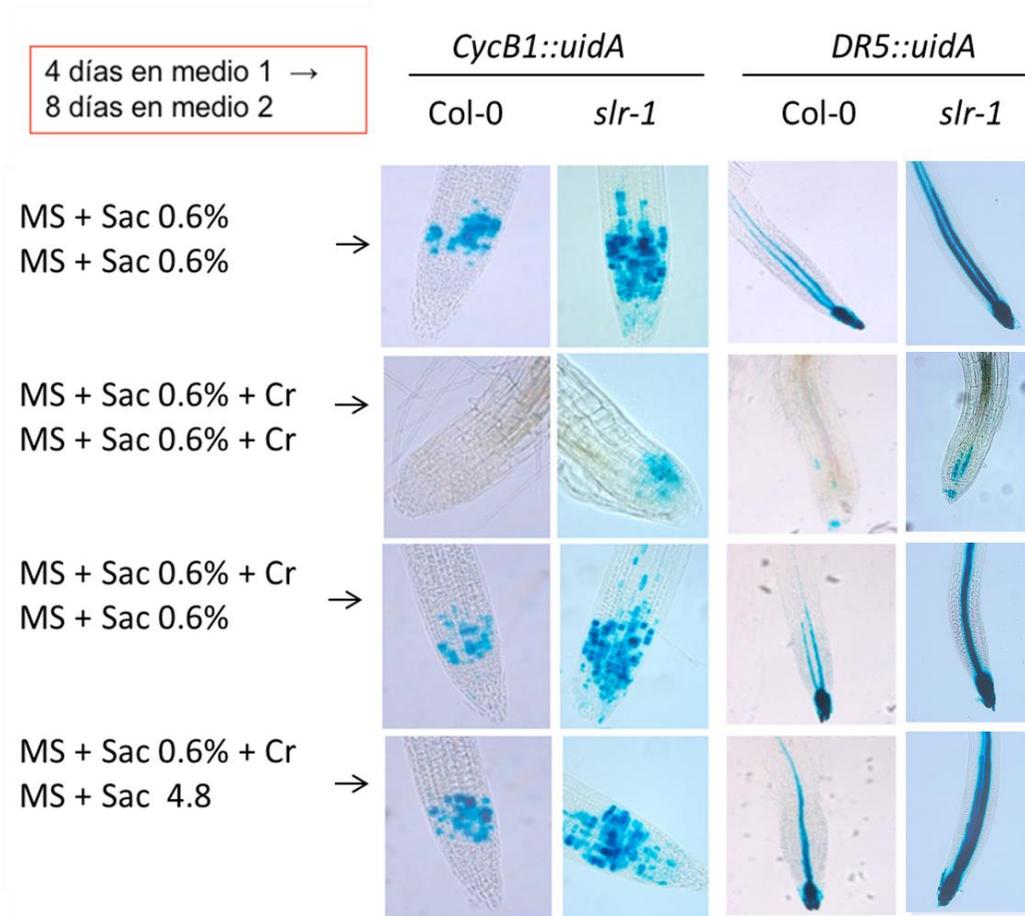


Figura 18. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en la expresión de marcadores genéticos en la raíz primaria de plantas de *A. thaliana* Col-0 y *slr-1* crecidas por 4 días en un medio con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 8 días en otro medio. Las semillas de *A. thaliana* Col-0 que expresan los distintos marcadores genéticos fueron germinadas y se dejaron crecer en los medios iniciales para posteriormente transferidas a los medios finales dejándolas crecer por 8 días más. Los medios con Cr(VI) tuvieron una concentración de 100 μ M del metal. La actividad de *uidA* (GUS) se realizó de acuerdo a materiales y métodos. Las fotos son representativas de 15 imágenes analizadas para cada tratamiento.

4 días en medio 1 →
8 días en medio 2

MS + Sac 0.6% →
MS + Sac 0.6%

MS + Sac 0.6% + Cr →
MS + Sac 0.6% + Cr

MS + Sac 0.6% + Cr →
MS + Sac 0.6%

MS + Sac 0.6% + Cr →
MS + Sac 4.8

QC46::*uidA*

PLT1::*uidA*

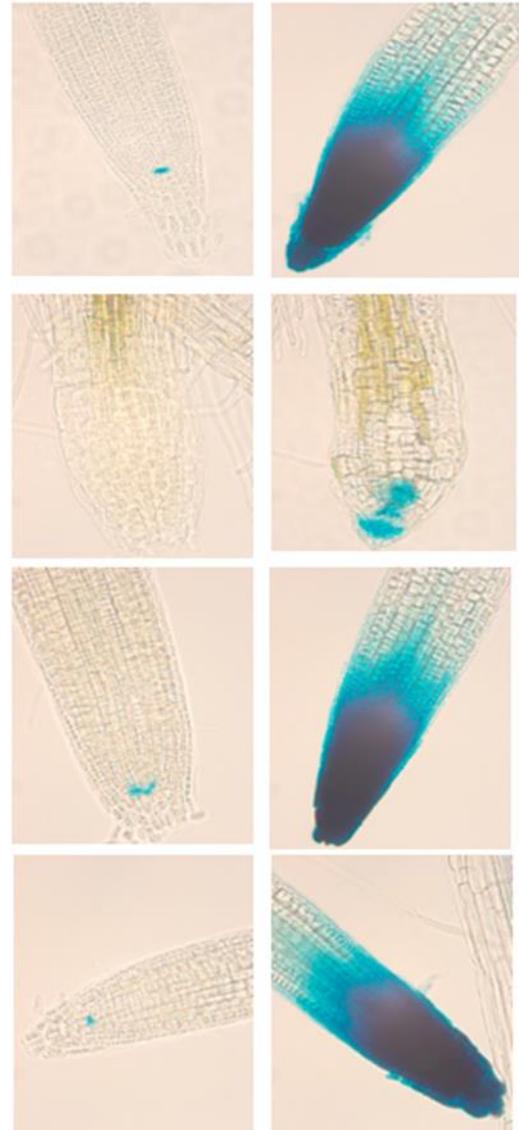


Figura 19. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en la expresión de marcadores genéticos de identidad del meristemo, en la raíz primaria de plantas de *A. thaliana* Col-0 crecidas por 4 días en un medio con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 8 días en otro medio. Las semillas de *A. thaliana* Col-0 que expresan los distintos marcadores genéticos fueron germinadas y se dejaron crecer en los medios iniciales para posteriormente transferidas a los medios finales dejándolas crecer por 8 días más. Los medios con Cr(VI) tuvieron una concentración de 100 μ M del metal. La actividad de *uidA* (GUS) se realizó de acuerdo a materiales y métodos. Las fotos son representativas de 15 imágenes analizadas para cada tratamiento.

6.2. La sacarosa estimula el crecimiento de la raíz lateral en plantas de *A. thaliana*, crecidas previamente por 7 días en medios con Cr(VI) y transferidas a medios sin Cr(VI)

Con los resultados anteriores, se planteó la pregunta de sí incrementando el tiempo de crecimiento de las plantas en medios con Cr(VI) 100 μ M, el meristemo de la raíz primaria se agotaba y se favorecía la formación de raíces laterales o adventicias; asimismo, qué efecto tenía la sacarosa en estas condiciones. Las plantas silvestres (Col-0) y *slr-1* de *A. thaliana* se dejaron crecer durante 7 días en el medio inicial y posteriormente se transfirieron a otro medio donde se dejaron crecer durante 5 días más. Los resultados muestran que en las plantas crecidas inicialmente en Cr(VI) se formó una raíz lateral, la cual tuvo un mayor crecimiento que la raíz primaria, y en las plantas *slr-1* se formó esta raíz en el 80% de los individuos (Figura 20). Cabe mencionar que no está reportado que *slr-1* forme raíces laterales (Fukaki et al. 2002), por lo que es el primer reporte al respecto, y será analizado en la sección de discusión.

En las plantas crecidas en Cr(VI) la raíz primaria ya no pudo crecer al transferirlas a medios sin Cr(VI), en cambio, las raíces laterales si crecieron. En todos los casos, la raíz lateral creció más en las plantas silvestres (Col-0) con relación a *slr-1*; además, la sacarosa estimuló este crecimiento en un rango de 30-40% en ambos fondos genéticos (Figura 21 A, B).

Se puede concluir que: i) El crecimiento inicial por 7 días en medios con Cr(VI) induce la formación de una raíz lateral, en Col-0 y *slr-1*, ii) El meristemo de la raíz primaria se agota al crecer las plantas en medios con Cr(VI) durante 7 días, y iii) La sacarosa estimula el crecimiento de la raíz lateral al pasar de medios con Cr(VI) a medios sin Cr(VI).

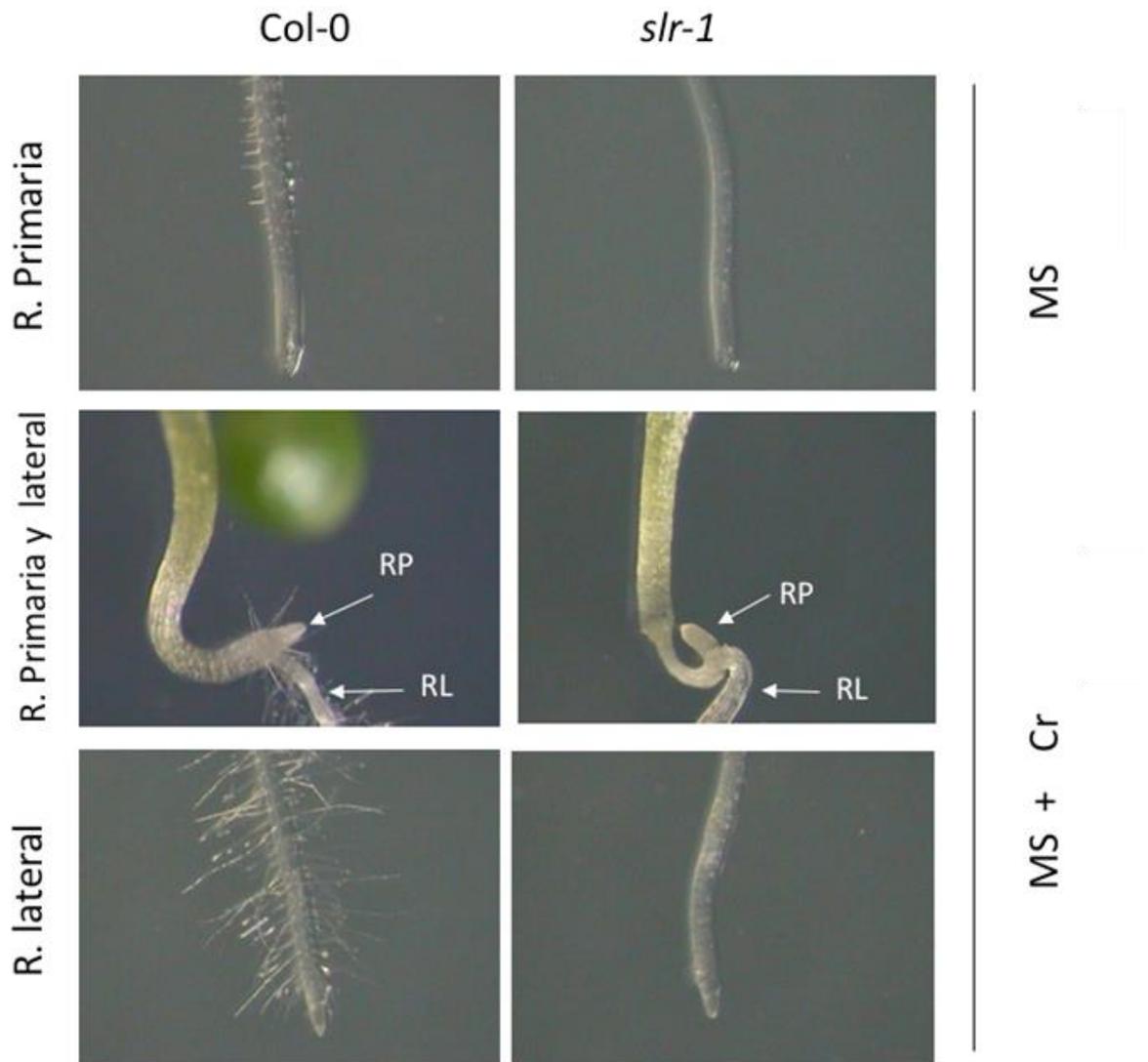
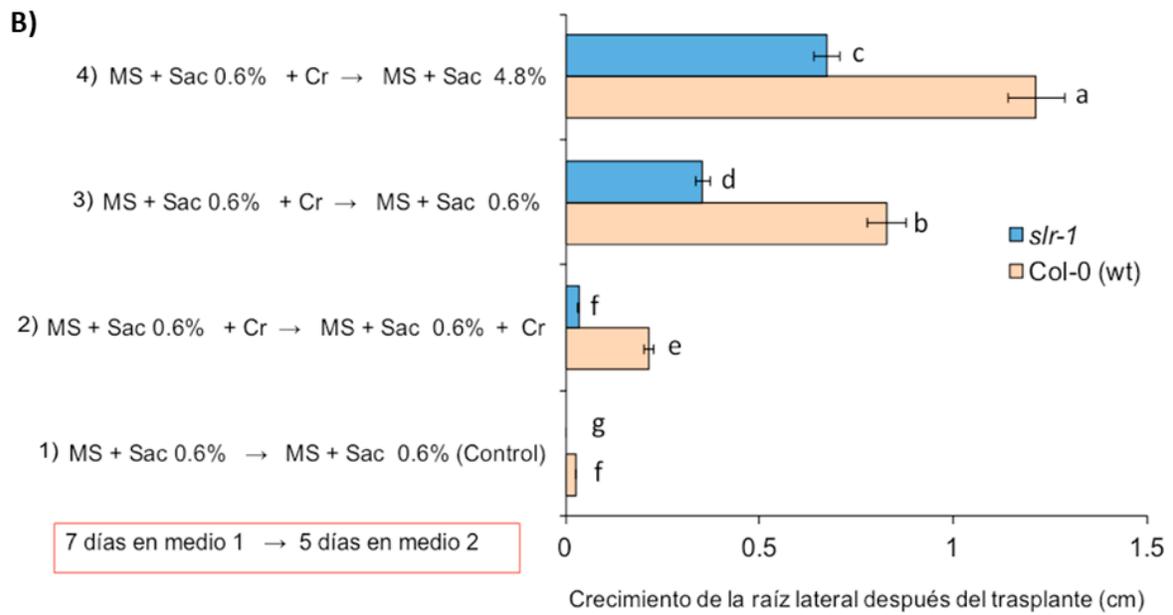
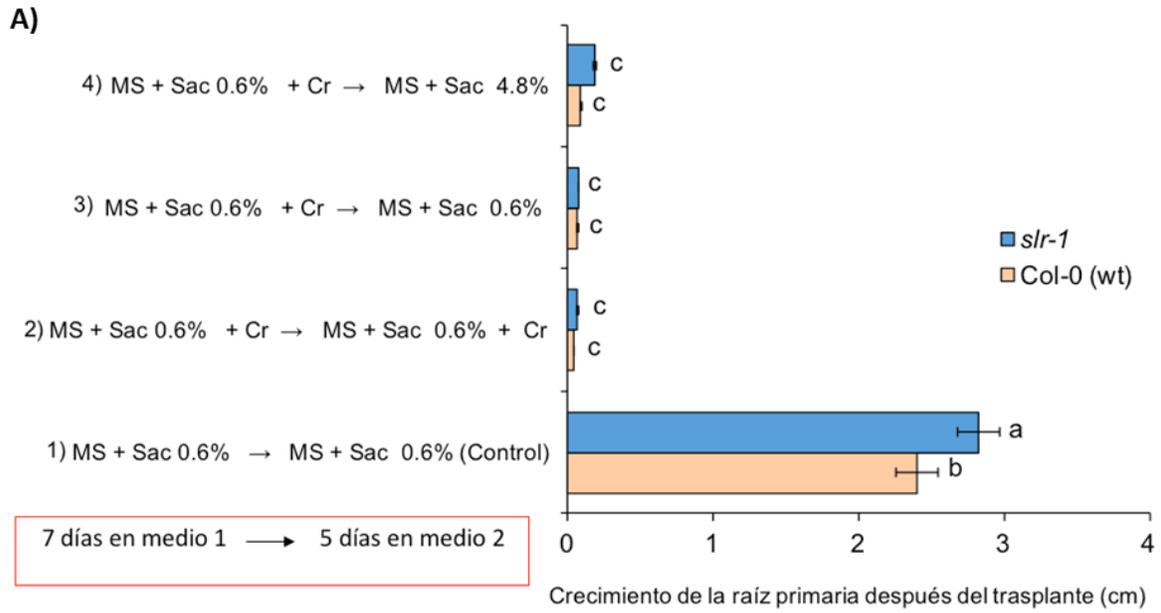


Figura 20. Efecto del Cr(VI) en la formación de raíces laterales en plantas de *A. thaliana* Col-0 y *slr-1*. Las semillas de *A. thaliana* fueron germinadas y se dejaron crecer por 7 días en los medios iniciales: MS ó MS+Cr(VI), por 7 días, para posteriormente transferidas a los medios finales sin Cr(VI), donde se crecieron por 5 días más. Los medios con Cr(VI) tuvieron una concentración de 100 μ M del metal. Al término de este periodo las plantas fueron analizadas de acuerdo a materiales y metodos. Las fotografías son representativas de 30 plantas analizadas, para cada fondo genético. Nótese que en *slr-1* hay carencia de pelos radicales.



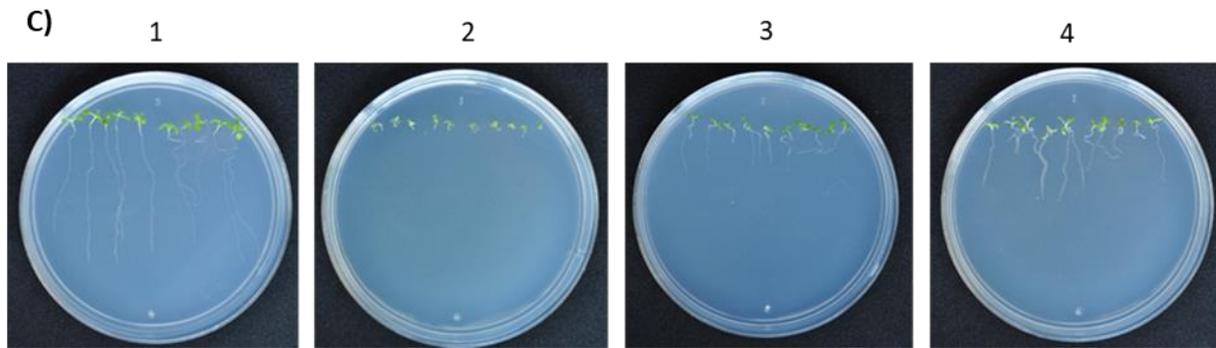


Figura 21. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en el crecimiento de la raíz primaria y lateral en plantas de *A. thaliana* Col-0 y *slr-1* crecidas por 7 días en un medio con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 5 días en otro medio. Las semillas de *A. thaliana* fueron germinadas y se dejaron crecer por 7 días en los medios iniciales para posteriormente transferidas a los medios finales, donde se crecieron por 5 días más. Los medios con Cr(VI) tuvieron una concentración de 100 μ M del metal. Al término de este periodo las plantas fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. A) Crecimiento de la raíz primaria a partir del momento de la transferencia de 30 plantas analizadas para cada tratamiento. B) Crecimiento de la raíz lateral a partir del momento de la transferencia de 30 plantas analizadas para cada tratamiento C) Fotos representativas de cada tratamiento. Se indican los intervalos de confianza para $\alpha=0.05$. Las letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ($P<0.05$); $n=30$.

La división celular fue analizada utilizando la línea transgénica *CycB1::uidA*. Los resultados muestran que en las plantas crecidas inicialmente en medios con Cr(VI) se pierde la expresión en la raíz primaria, aunque las plantas se transfirieran a medios sin Cr(VI); esta pérdida de expresión se acompaña con una desorganización de las células del meristemo. En cambio, la raíz lateral presenta una expresión del marcador de división celular, aunque más tenue con relación al control de las plantas que no estuvieron en medios con Cr(VI). El efecto de la sacarosa en la expresión del marcador en la raíz lateral fue poco notable, no obstante que se estimuló el crecimiento de ésta. (Figura 22).

De manera similar al marcador de división celular, en las plantas crecidas en Cr(VI) y transferidas a medios sin Cr(VI), el marcador de distribución de auxina (*DR5::uidA*) perdió su expresión en la raíz primaria y se estableció una expresión normal en la raíz lateral (Figura 23). No se observó una diferencia notable entre el fondo genético silvestre (Col-0) respecto al mutante *slr-1*. La sacarosa influyó al establecimiento del patrón normal de auxina en la línea silvestre.

Por lo anterior se puede concluir que: i) La división celular y distribución de auxina se pierde en la raíz primaria y se establece de manera normal en la raíz lateral, ii) El patrón normal de expresión de los marcadores genéticos se mantiene en las raíces laterales de las plantas silvestres por efecto de la sacarosa.

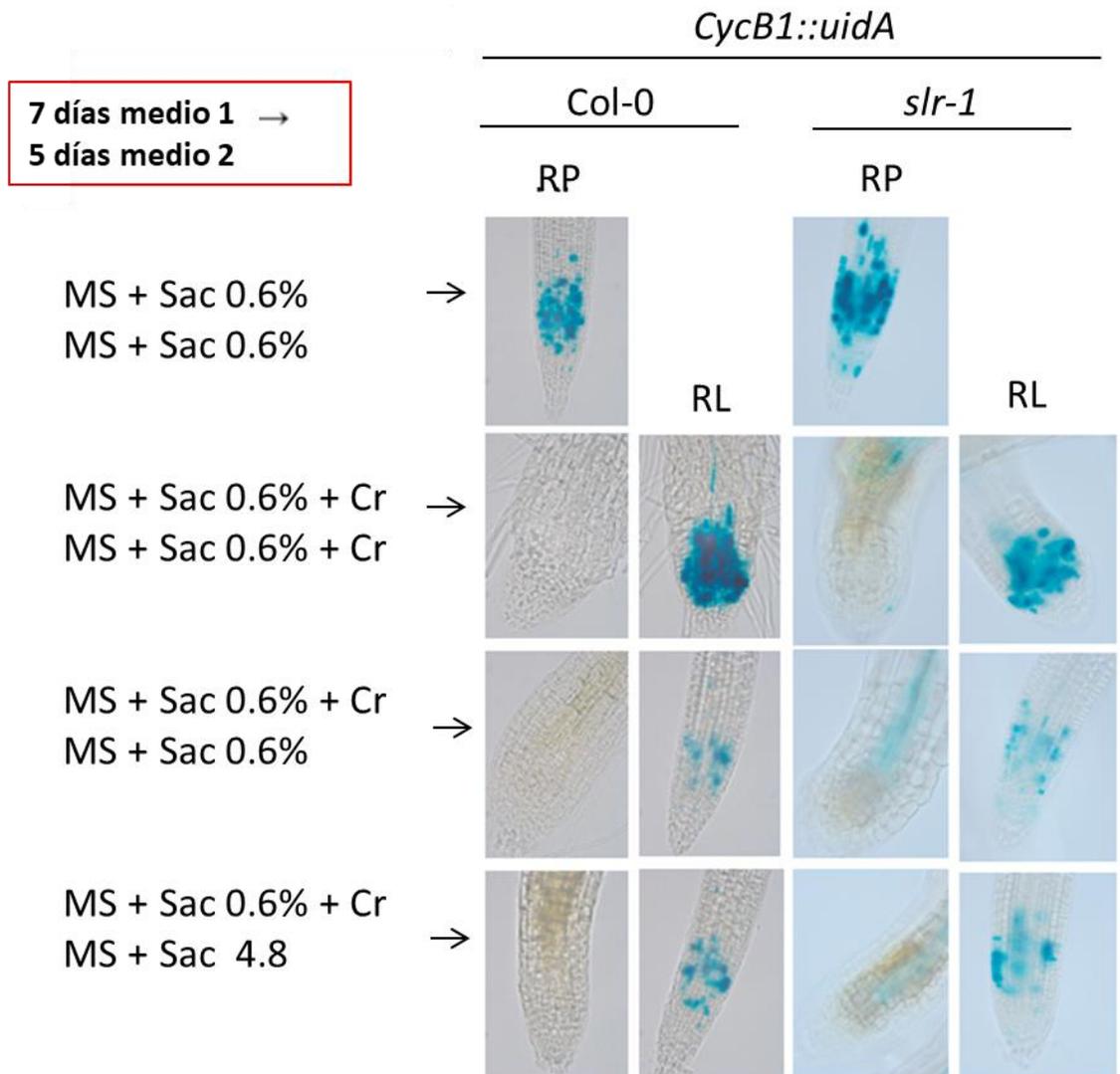


Figura 22. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en la división celular de la raíz primaria y raíz lateral de plantas de *A. thaliana* Col-0 y *slr-1*, crecidas por 7 días en medios con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 5 días en otro medio. Las semillas de Col-0 y *slr-1* con el marcador genético *CycB1::uidA* fueron germinadas y se dejaron crecer en los medios iniciales para posteriormente transferidas a los medios finales dejándolas crecer por 7 días más. Los medios con Cr(VI) tuvieron una concentración de 100 μ M del metal. La actividad de *uidA* (GUS) se realizó de acuerdo a materiales y métodos. Las fotos son representativas de 15 imágenes analizadas para cada tratamiento.

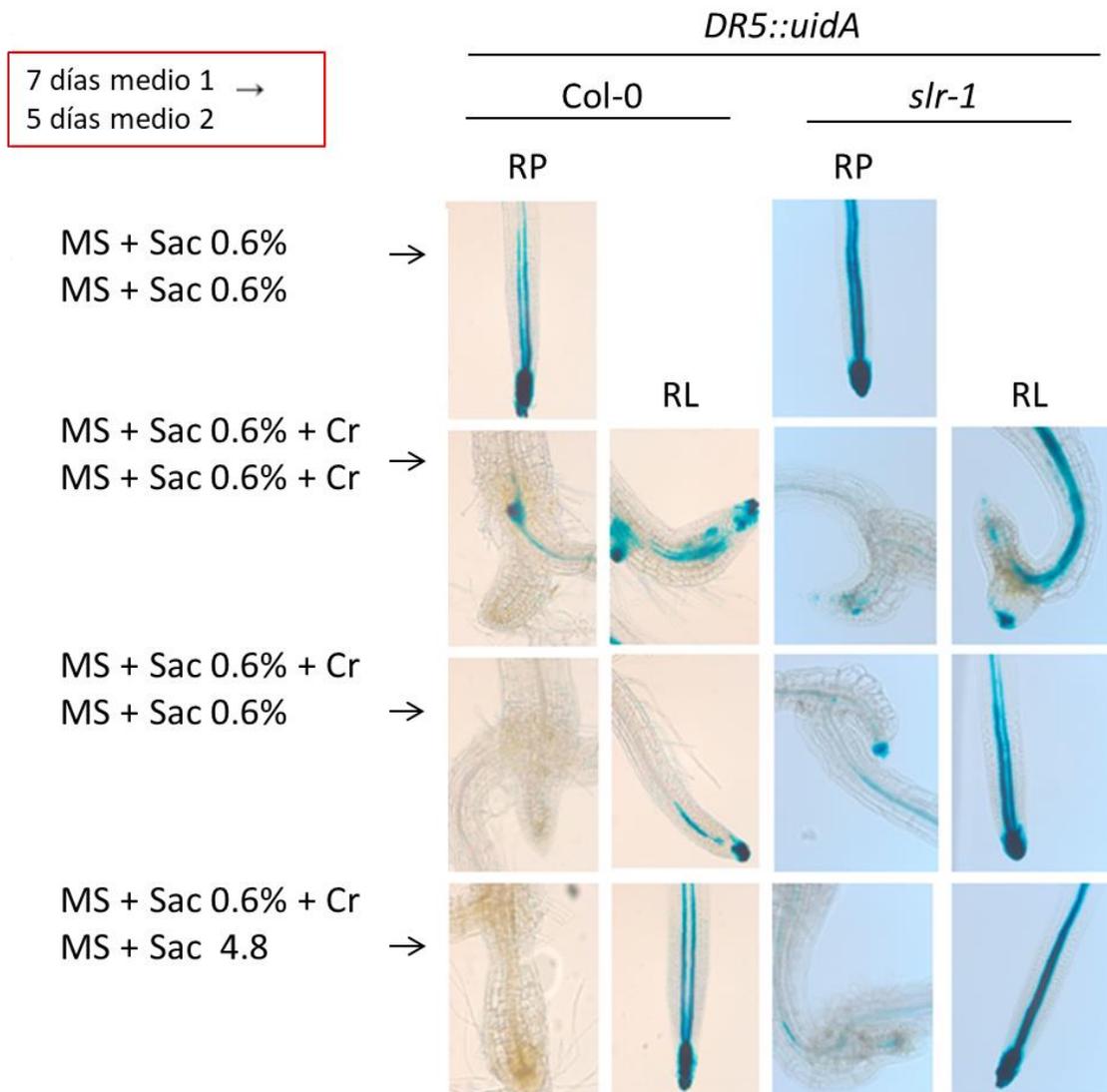


Figura 23. Efecto del Cr(VI) y la sacarosa en la distribución de auxina de la raíz primaria y raíz lateral de plantas de *A. thaliana* Col-0 y *slr-1*, crecidas por 7 días en un medio con Cr(VI) y transferidas y crecidas por 7 días en otro medio. Las semillas de *A. thaliana* Col-0 y *slr-1* con el marcador genético *CycB1::uidA* fueron germinadas y se dejaron crecer en los medios iniciales para posteriormente transferidas a los medios finales dejándolas crecer por 8 días más. Los medios con Cr(VI) tuvieron una concentración de 100 μ M del metal. La actividad de *uidA* (GUS) se realizó de acuerdo a materiales y métodos. Las fotos son representativas de 15 imágenes analizadas para cada tratamiento.

6.3. Efecto de las combinaciones de sacarosa y fosfato en el crecimiento de la raíz de *A. thaliana* y en la división celular, utilizando un sistema de transferencia de plantas

De manera similar al Cr(VI), se ha reportado que la deficiencia de fosfato ocasiona una reducción en la longitud de la raíz primaria debido a cambios en el programa de desarrollo post-embriionario de uno indeterminado a otro determinado en el cual la división celular es inhibida, la diferenciación celular es promovida y el meristemo se agota.

Para determinar si la sacarosa podía influir en este cambio de desarrollo, se utilizaron semillas de *A. thaliana* de la línea *CycB1::uidA* con fondo genético Col-0, las cuales fueron germinadas en medio MS 0.2x con alto fosfato (1.25 mM) o bajo fosfato (20 μ M), con sacarosa al 0.6%, dejándolas crecer por 7 días, para después transferidas a medio MS 0.2x con alto fosfato (1.25 mM), suplementado con sacarosa al 0.6% o 4.8%, dejándolas crecer nuevamente por 7 en estos tratamientos, para finalmente realizar las mediciones de las variables. El crecimiento de las plantas al final se muestra en la figura 24.

Los resultados del crecimiento de la raíz primaria muestran que: i) el crecimiento inicial en bajo fosfato por 7 días no agota al meristemo y la capacidad de crecimiento, ii) la sacarosa estimula el crecimiento de la raíz primaria en las plantas que inicialmente crecieron en bajo fosfato.

En lo referente a las raíces laterales, las plantas incrementaron significativamente su número cuando fueron crecidas en los medios finales con sacarosa al 4.8%, destacando que el número fue aún mayor en las plantas que inicialmente crecieron en bajo fosfato (Figura 24 B).

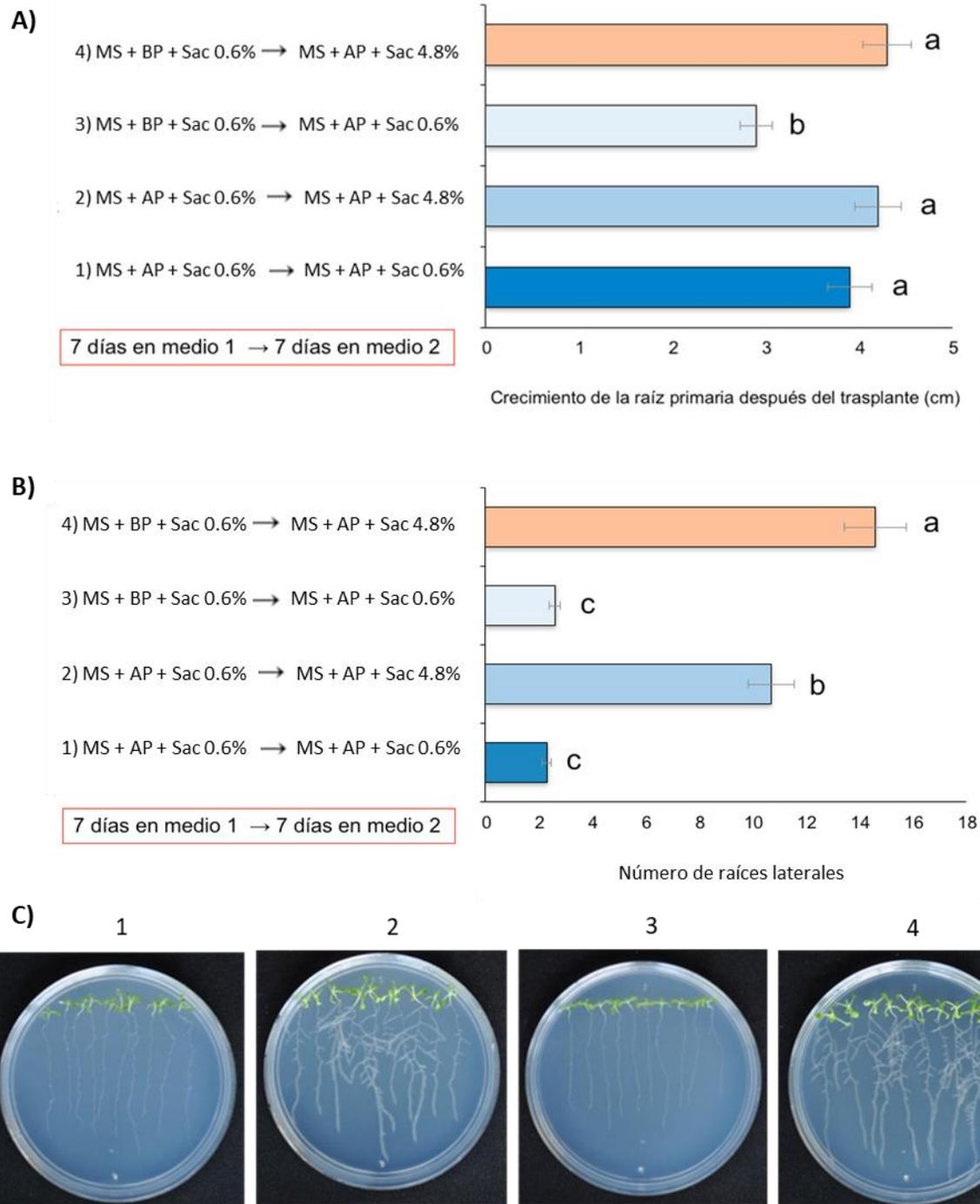


Figura 24. Efecto de la sacarosa y fosfato en el crecimiento de la raíz de *A. thaliana* Col-0, utilizando un sistema de transferencia de plantas. Las semillas fueron germinadas y crecidas en los medios iniciales durante 7 días y posteriormente se transfirieron a los medios finales donde se dejaron crecer por otros 7 días. Alto fosfato (AP) = 1.25 mM; bajo fosfato (BP) = 20 μ M; Sac = Sacarosa. A) Crecimiento de la raíz primaria a partir del momento de la transferencia de 30 plantas analizadas para cada tratamiento. B) Numero de raíces laterales a partir del momento de la transferencia de 30 plantas analizadas para cada tratamiento C) Fotos representativas de cada tratamiento. Se indican los intervalos de confianza para alfa=0.05. Las letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ($P < 0.05$); $n = 30$.

Para determinar posibles cambios influidos por sacarosa en la división celular de la raíz primaria, se utilizó la línea transgénica *CycB1::uidA*. Los resultados mostraron división celular en todos los tratamientos, siendo menor en el tratamiento donde crecieron en bajo fósforo y baja cantidad de sacarosa y se transfirieron a medios con alto fósforo y baja cantidad de sacarosa (Figura 25 C).

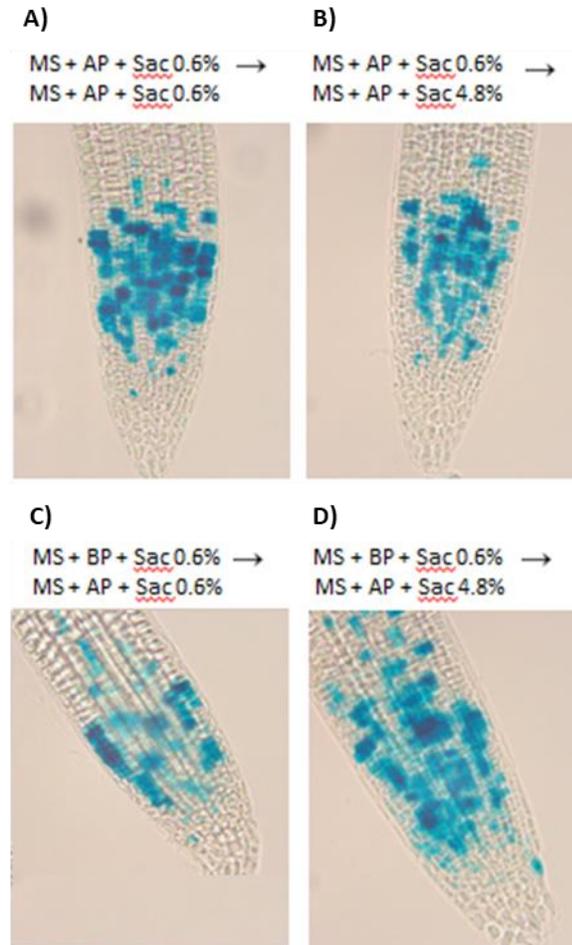


Figura 25. Efecto de la sacarosa y fósforo en la expresión del marcador de división celular en la raíz primaria de *A. thaliana*. Las semillas fueron germinadas y crecidas en los medios iniciales durante 7 días y posteriormente se transfirieron a los medios finales donde se dejaron crecer por otros 7 días; al cabo de este periodo se realizó la tinción de acuerdo a materiales y métodos Alto fósforo (AP) = 1.25 mM; bajo fósforo (BP) = 20 μ M; Suc = Sacarosa. Las fotos son representativas de 30 imágenes para cada tratamiento.

6.4. Efecto del Cr(VI) en el crecimiento de la raíz y la expresión de marcadores de división celular y de expansión celular, en un sistema de exposición eventual

En este sistema de exposición eventual a Cr(VI) las semillas de *A. thaliana* fueron germinadas en medio MS 0.2x con 0.6% de sacarosa y las plantas se dejaron crecer por 6 días; al paso de este periodo se realizó un corte horizontal en el medio de crecimiento a 2.5 cm de la raíz primaria y se adicionó Cr(VI) en un rango de concentración de 0 a 100 μM , dejándolas crecer por 6 días más, para posteriormente llevar a cabo las mediciones de las variables. Con base en la difusión analizada en el medio de cultivo, el Cr(VI) llega primero al extremo de la raíz primaria, de manera similar a la exploración del sistema radical en condiciones naturales en el suelo, lo que teóricamente permite la detección de esta señal en las células de la cofia y posteriormente la generación de una respuesta. Los resultados muestran que el crecimiento de la raíz primaria se inhibió de una manera dependiente de la concentración de Cr(VI) y paralelamente aumentó el número de raíces laterales (Figura 26).

Para determinar si la exposición eventual al Cr(VI) afecta la expresión del gen de ciclina *CycB1* en la raíz primaria de *A. thaliana*, se utilizó la línea reportera *CycB1::uidA*. Los resultados muestran un aumento notable de la expresión a partir de la concentración de 60 μM de Cr(VI) (Figura 27).

Para analizar posibles cambios en la expansión celular de la raíz primaria por la exposición eventual al Cr(VI), se utilizó la línea reportera *AtEXP7::uidA*. Los resultados permitieron observar que la zona de expansión celular está más cerca del ápice de la raíz conforme se aumenta la concentración de Cr(VI)(Figura 28). Lo anterior se correlacionó con una reducción del tamaño de la zona meristemática (Figura 29).

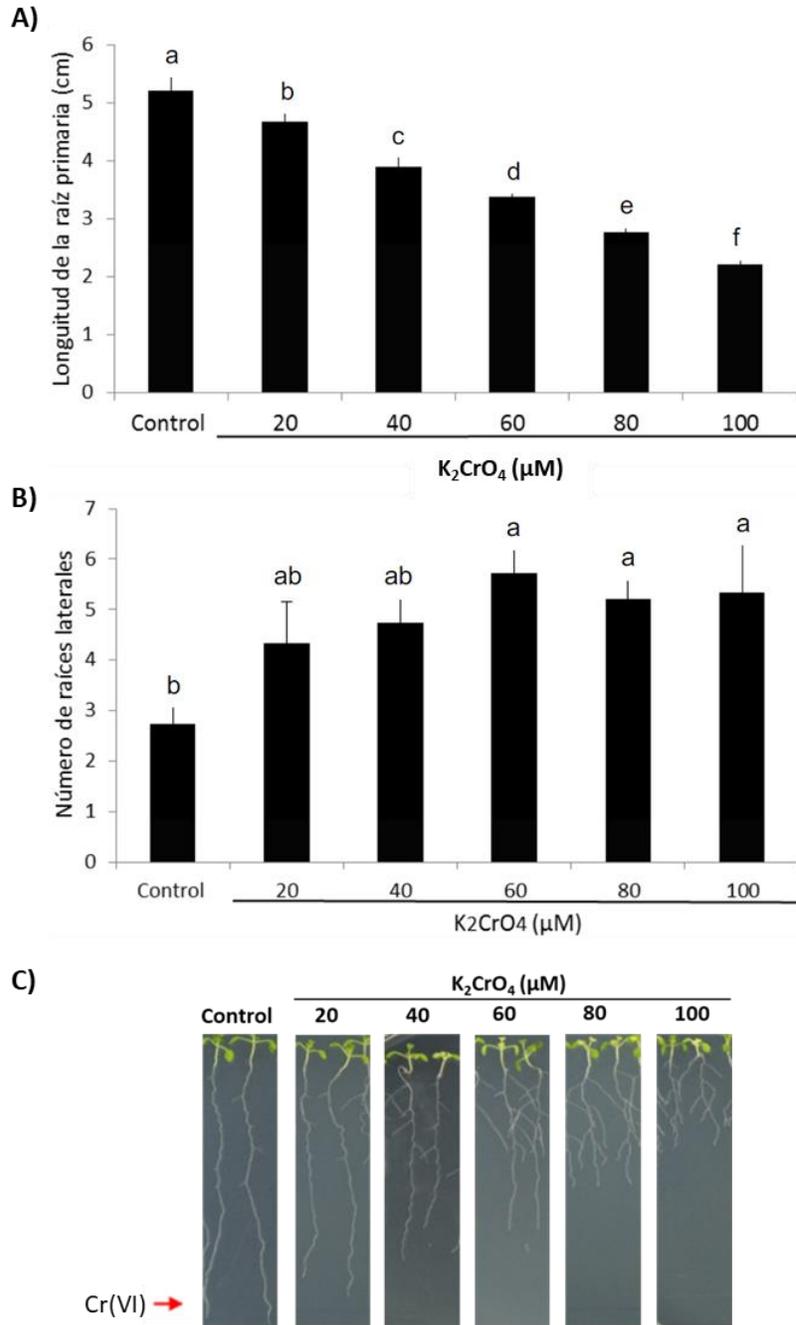


Figura 26. Efecto del sistema de exposición eventual al Cr(VI) en el crecimiento del sistema radical de *A. thaliana*. Las semillas de *A. thaliana* Col-0 fueron germinadas en los medios MS0.2x y las plantas se dejaron crecer por 6 días. Posteriormente se realizó un corte horizontal en el medio a 2.5 cm de la raíz primaria y adiciónó el Cr(VI). Las plantas se dejaron crecer por 6 días y se procesaron de acuerdo a materiales y metodos. A) Crecimiento de la raíz primaria a partir del momento de la adición de Cr(VI) de 30 plantas analizadas para cada tratamiento. B) Numero de raíces laterales a partir del momento de la adición de Cr(VI) de 30 plantas analizadas para cada tratamiento C) Fotos representativas de cada tratamiento. Se indican los intervalos de confianza para alfa=0.05. Las letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ($P < 0.05$); $n = 30$.

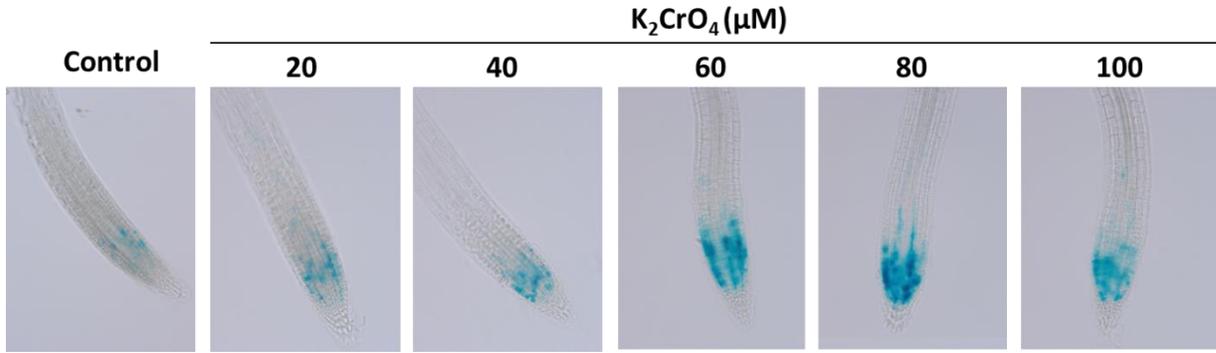


Figura 27. Efecto de la exposición eventual al Cr(VI) en la expresión del gen de ciclina *CycB1* en la raíz primaria de *A. thaliana*. Las plantas de Arabidopsis que expresan el marcador *CycB1::uidA* fueron germinadas y crecidas en los medio MS por 6 días para posteriormente realizar un corte horizontal sobre el medio y adicionar las distintos tratamientos de Cr(VI), las plantas se dejaron crecer por 6 días más en estos tratamientos y fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Las fotografías son representativas de 15 plantas analizadas.

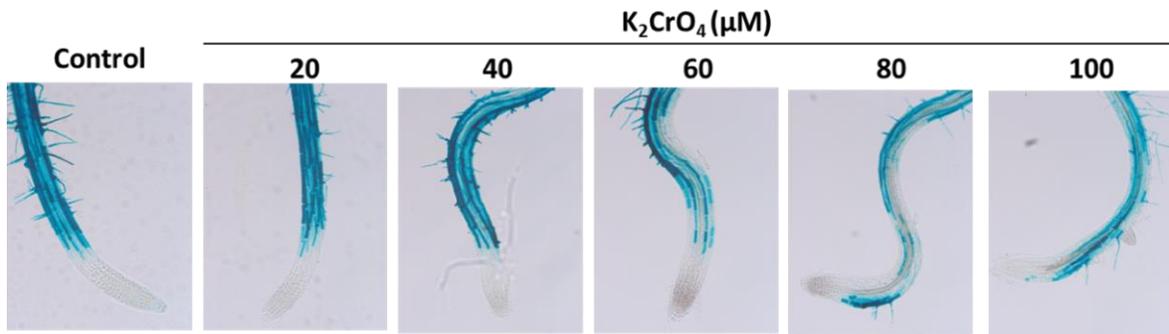


Figura 28. Efecto de la exposición eventual al Cr(VI) en la expresión del marcador de expansión celular en la raíz primaria de plantas de *A. thaliana*. Las semillas de *A. thaliana AtEXP7::uidA*, fueron germinadas y crecidas en los medio MS por 6 días para posteriormente realizar un corte horizontal sobre el medio y adicionar las distintos tratamientos de Cr(VI); las plantas se dejaron crecer por 6 días más en estos tratamientos y fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Las fotografías son representativas de 15 plantas analizadas.

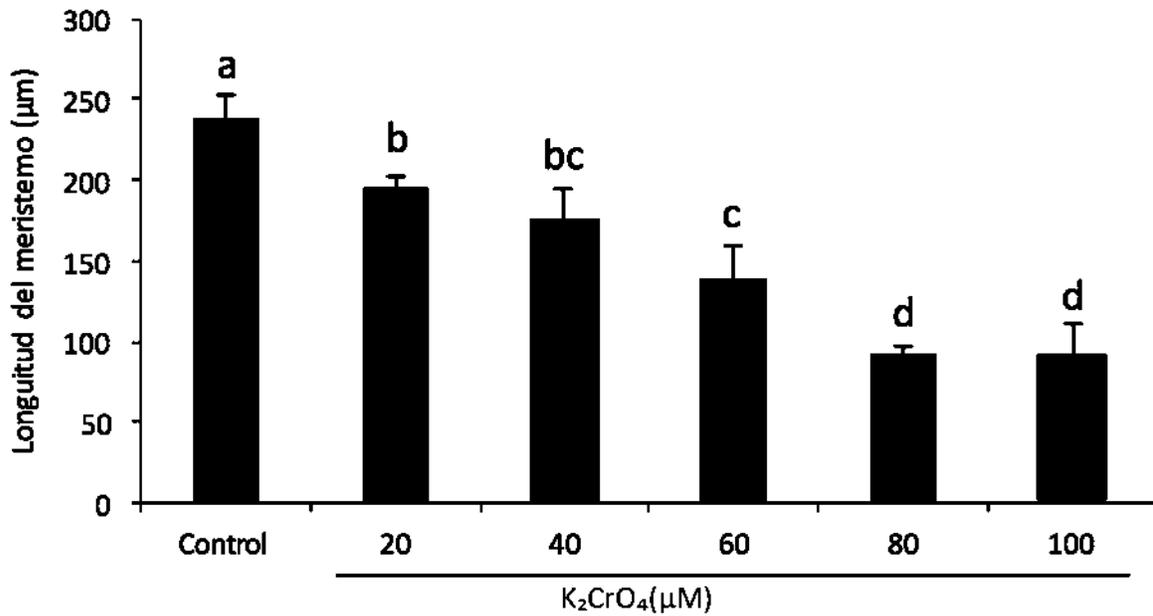


Figura 29. Efecto de la exposición eventual al Cr(VI) en la longitud del meristemo en la raíz primaria de plantas de *A. thaliana*. Las semillas de *A. thaliana AtEXP7::uidA*, fueron germinadas y crecidas en los medio MS por 6 días para posteriormente realizar un corte horizontal sobre el medio y adicionar los distintos tratamientos de Cr(VI); las plantas se dejaron crecer por 6 días más en estos tratamientos y fueron analizadas de acuerdo a materiales y métodos. Se indican los intervalos de confianza para $\alpha=0.05$. Las letras diferentes indican diferencias significativas con la prueba de Tukey ($P<0.05$); $n=30$.

7. DISCUSIÓN

Una característica del desarrollo post-embrionario de las plantas es su plasticidad, generando diversas modificaciones causadas por interacciones con su ambiente biótico y abiótico (Forde y Lorenzo 2001). Debido a que las plantas son sésiles, la estrategia para explorar el suelo para la captación de nutrientes y agua es el desarrollo de una raíz primaria, raíces laterales y de pelos radicales (Lynch, 1995). Se ha reportado que el Cr(VI) tiene un efecto dual en el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana*, dependiendo de la concentración, estimulando el crecimiento en concentraciones de 20-40 μM e inhibiéndolo a partir de 100 μM (Martínez-Trujillo et al. 2014) y recientemente Hernández-Madrugal et al. (2017) reportaron que la adición de sacarosa a medios de crecimiento que contenían Cr(VI) 100 μM , reactivó el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana*.

Para profundizar en el efecto del Cr(VI) y sacarosa en el crecimiento y desarrollo de la raíz de *A. thaliana*, se analizó la expresión de distintos marcadores genéticos de la raíz en dos fondos genéticos, silvestre y mutante *slr-1*; asimismo se analizó el efecto de la sacarosa y bajo fósforo en el crecimiento y desarrollo de la raíz.

El crecimiento de la raíz primaria es mayor en *slr-1* con respecto a Col-0 y se estimula con sacarosa

En las condiciones en las que la raíz primaria continuó su crecimiento, éste fue mayor en *slr-1* con relación a las plantas silvestres Col-0, incluso cuando estas últimas todavía no han formado raíces laterales. De manera inversa, cuando se forma una raíz lateral en *slr-1* su crecimiento es menor al de la raíz lateral del tipo silvestre. Este comportamiento no ha sido reportado, pero seguramente está relacionado con la presencia del represor IAA14 y su estabilidad incluso en presencia de auxina. La estimulación del crecimiento de la raíz primaria por la sacarosa es coincidente con los trabajos de Freixes et al. (2002) quienes reportan que cuando se transfieren plantas de *A. thaliana* a medios con distintas concentraciones de sacarosa presentan un mayor crecimiento de la raíz primaria en aquellos medios con

mayor concentración del sacarosa. Asimismo, Hernández-Madrugal et al. (2017) reportan que la adición de sacarosa a medios de crecimiento con exposición temporal a Cr(VI) 100 μ M, incrementa el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana*.

La reversión por sacarosa de los efectos inhibitorios del Cr(VI) en el crecimiento de la raíz primaria, depende del tiempo previo de exposición al Cr(VI)

La germinación y crecimiento inicial de *A. thaliana* en concentraciones subletales de Cr(VI) y 0.6% de sacarosa, demostró que el tiempo de exposición a Cr(VI) (4 o 7 días) determinó la respuesta posterior del sistema radical al ser transferidas las plantas a medios sin Cr(VI): continuación del crecimiento de la raíz primaria, o bien su detención y crecimiento de raíces laterales. De manera similar, cuando plantas mutantes *suc2*, afectadas en el transporte de sacarosa de la parte aérea a la raíz, se germinaron y crecieron en medios sin sacarosa por 10 días, la planta detuvo el crecimiento de su raíz primaria, y cuando se transfirieron a medios con sacarosa al 1%, el crecimiento de la raíz primaria ya no se reanudó, aunque el sistema radical creció mediante la formación de raíces laterales (Gottwald et al. 2000).

En cambio, se ha reportado que cuando las plantas de *A. thaliana* se germinan y crecen en medios con Cr(VI) y sacarosa 4.8%, la raíz primaria crece durante los 10 días que dura el análisis (Hernández-Madrugal et al. 2017); de manera similar, las plantas de *A. thaliana suc2* crecidas desde un inicio en medios con 1% de sacarosa, tienen una raíz primaria con crecimiento (Gottwald et al. 2000).

Lo anterior permite concluir que el efecto de la sacarosa en vencer el efecto del Cr(VI) y mantener el crecimiento de la raíz primaria, sólo es posible durante la germinación o bien cuando no ha transcurrido el tiempo suficiente en el cual ocurren cambios que agotan la identidad y capacidad de división del meristemo.

La disminución del área de distribución de auxina en la raíz primaria por efecto del Cr(VI) se correlaciona con la detención del crecimiento de la raíz, con la pérdida de división celular y de marcadores de identidad del meristemo, así como con la incapacidad de la sacarosa de reactivar el crecimiento

Los meristemos de las raíces son muy sensibles y puede verse afectados por la exposición a metales o por baja disponibilidad de nutrientes (Potters et al. 2007), El funcionamiento del meristemo se ha relacionado con la acumulación de auxina en el centro quiescente, las células de la cofia, y a lo largo del cilindro central (Aida et al. 2004), lo cual coincide con nuestros resultados con el marcador *DR5::uidA*, ya que cuando se altera la distribución de auxina el crecimiento de la raíz primaria se detiene. Si bien en este caso no fue posible analizar la distribución de proteínas de transporte de auxina (PINs), en trabajos previos se ha reportado que PIN1 y PIN2 disminuyen su expresión cuando cesa el crecimiento de la raíz primaria por efecto del Cr(VI) (López-Bucio et al. 2015). Como posible consecuencia de la disminución de auxinas en la raíz primaria, la división celular (evaluada mediante el marcador *CycB1::uidA*) se perdió en el meristemo, y la expresión en el centro quiescente y *PLT1* (analizando los marcadores *QC46::uidA* y *PLT1::uidA*) dependientes ambos de auxina, decreció, por lo que se asume que hubo pérdida de la identidad del meristemo, como ha sido reportado previamente (Aida et al. 2004; Aichinger et al. 2012). Por lo anterior, se sugiere que una vez que se pierde el patrón de distribución de auxina y la expresión de genes dependientes de ésta, la sacarosa ya no puede rescatar el funcionamiento del meristemo por algún mecanismo de señalización como la vía TOR (Xiong et al. 2013) o bien aportando energía a partir de su degradación en los tejidos consumidores como la raíz (Ruan 2014).

El Cr(VI) induce la formación de raíces laterales tanto en Col-0 como en la mutante *slr-1*, con patrones normales de distribución de auxina y de división celular

Los fondos genéticos utilizados, silvestre (Col-0) y mutante *slr-1*, permitieron establecer que el Cr(VI) induce la formación de raíces laterales, no sólo en las plantas silvestres, ya reportado por nuestro grupo de trabajo en otras condiciones experimentales (Ortiz-Castro et al. 2007; López-Bucio et al. 2015), sino además en

slr-1, lo cual fue novedoso, ya que esta mutante fue caracterizada por poseer una raíz solitaria, sin raíces laterales o adventicias (Fukaki et al. 2002). Una explicación a lo anterior debe considerar al menos los elementos que participan en la señalización que conduce a la activación de células del periciclo, a partir de las cuales se originan las raíces laterales (Bellini et al. 2014), y que puede consistir en dos posibilidades generales: a) que la proteína represora IAA14 de *slr-1* que no se degrada por el efecto de auxina, pueda afectarse en su función o en la expresión de su gen por efecto del Cr(VI), lo que permitiría que los factores de transcripción ARF7 y ARF19 pudieran actuar mediante la inducción de la transcripción de genes y permitir la síntesis del factor de transcripción GATA23, que se ha reportado como necesario para la especificación de las células del periciclo que formarán las raíces laterales (De Rybel et al. 2010; Murphy et al. 2016); b) que aunque la proteína IAA14 no se alterara en su función, el Cr(VI) si afectara otro blanco que podría activar la expresión del gen de GATA23 directamente o por una vía alternativa. Las alteraciones propuestas se hacen con base en que la reducción del Cr(VI) a estados oxidativos inferiores como Cr(V) y el Cr(III) ocasiona la formación de especies reactivas de oxígeno, las cuales pueden reaccionar con proteínas, lípidos y ADN (Shanker et al. 2005), y a la vez pueden alterar el balance celular de especies reactivas de oxígeno, que se ha reportado que participan en las vías de señalización que regulan el crecimiento en la raíz y su transición del crecimiento indeterminado a determinado (Tsukagoshi et al. 2010).

No obstante que se forman raíces laterales en *slr-1* por efecto del Cr(VI), esta vía está desmejorada respecto a las plantas silvestres, ya que hay algunos individuos (20%) que no la forman, no obstante que se detiene el crecimiento de la raíz primaria. Además, cuando las plantas *slr-1* que formaron una raíz lateral se transfieren a medios sin Cr(VI), esta puede crecer, pero ya no se forman otras raíces laterales de primer orden, o bien raíces laterales de segundo orden, a diferencia de las plantas silvestres que si lo hacen. Esto demuestra que es necesario que el Cr(VI) ejerza su efecto de manera constante para que se formen nuevas raíces laterales en *slr-1*, ya sea alterando a la proteína IAA14 o induciendo una vía alterna para que se produzca GATA23.

Las raíces laterales formadas tanto en Col-0 como en *slr-1* presentaron un patrón de distribución de auxina normal a lo anteriormente reportado (Michnewicz et al. 2007), así como la expresión normal del marcador de división celular, lo que se correlacionó con el crecimiento de este tipo de raíces; asimismo, en Col-0 se encontró una expresión normal de los marcadores de identidad celular (*QC* y *PLT1*), lo que no pudo ser analizado en *slr-1* por el tiempo largo requerido para la movilización de marcadores genéticos a la mutante. La priorización del crecimiento de las raíces laterales sobre la raíz primaria es un aspecto que puede depender de un cambio en el flujo de auxina, canalizado hacia las raíces laterales en detrimento de la raíz primaria, lo que ha sido reportado en plantas silvestres crecidas en concentraciones crecientes de Cr(VI) (Martínez-Trujillo et al. 2015), y que además se demuestra para *slr-1* en este trabajo; en concordancia con lo anterior, se ha reportado que la formación de raíces laterales es mediada por auxina en *A. thaliana* (Jain et al. 2007; Karthikeyan et al. 2007).

En otras condiciones experimentales, en las que las plantas silvestres y *slr-1* se exponen gradualmente al Cr(VI), el crecimiento de la raíz primaria se detiene en Col-0 pero no en *slr-1*, con la formación y crecimiento de raíces laterales en el primer caso (Hernández-Madrugal et al. en prensa), lo que demuestra que la formación de raíces laterales por efecto del estrés del Cr(VI) depende no sólo de su concentración en el medio sino de su forma de aplicación (directa o gradual) y de la etapa de desarrollo de las plantas.

El crecimiento de las plantas en bajo fosfato sensibiliza a las plantas de *A. thaliana*, lo que posteriormente permite una mayor formación de raíces laterales por efecto de la sacarosa

El estrés abiótico ocasionado por carencia de algunos nutrientes como fosfato o las concentraciones tóxicas de algunos compuestos, ocasionan respuestas similares en plantas dicotiledóneas, al inhibir el crecimiento de la raíz primaria y estimular la formación de raíces laterales (Potters et al. 2007). Los resultados obtenidos permitieron determinar que la sacarosa exógena potencializó el efecto del bajo fosfato en la formación de raíces laterales, lo que sugiere que las plantas quedaron

“sensibilizadas” al crecer inicialmente en bajo fosfato, independientemente de si al transferirlas siguieron creciendo en bajo fosfato o alto fosfato. En concordancia con lo anterior, *hps1*, que presenta una alta sensibilidad en casi todos los aspectos de las respuestas de las plantas a la escasez de fosfato se deben a la sobreexpresión del gen *SUC2*, lo que le confiere un alto nivel de sacarosa en el follaje y la raíz (Lei et al. 2011).

En este trabajo se demuestra que la sacarosa no sólo confiere hipersensibilidad a las plantas de *A. thaliana* en las respuestas a la escasez de fosfato, sino que además la confiere aunque exista un desfase temporal fosfato-sacarosa, lo que sugiere que el mecanismo sensor del fosfato primero se “pre-activa” y posteriormente la magnitud de la respuesta en la formación de raíces laterales depende de la cantidad de sacarosa que llega a la raíz, ya sea de manera exógena o a través de la parte aérea. Este mecanismo sensor de fosfato ha sido elusivo, aunque se conoce que éste radica en el extremo de la raíz primaria (Svitoonoff et al. 2007), e involucra una proteína con actividad de ATPasa (PDR2) anclada al retículo endoplásmico, que a su vez es necesaria para la expresión del gen *SCR* (*SCARECROW*), que participa en el establecimiento del patrón de arreglo celular de la raíz (Ticconi et al. 2009; Bouain et al. 2016).

La exposición eventual de las plantas al Cr(VI) permite una mejor adaptación y tolerancia del sistema radical con relación a otros sistemas de exposición

La exposición eventual al Cr(VI) permitió que el compuesto llegara primero al extremo de la raíz primaria, lo que simuló las condiciones naturales de un suelo heterogéneo, observando que no obstante que la raíz primaria se inhibió en una correlación directa con el aumento de la concentración de Cr(VI), ésta siguió creciendo (2 cm o más) a la vez que se formaron varias raíces laterales (4-5). En cambio, en la germinación directa en medios con Cr(VI) en este trabajo, o bien en una transferencia de plantas a medios con Cr(VI) (Ortiz-Castro et al. 2007), la raíz primaria no crece más allá de 1-2 mm. Esta diferencia puede estar relacionada con que las células de la cofia del extremo de la raíz son los sitios sensores de señales ambientales que transmiten señales a tejidos distantes para aumentar o disminuir las

tasas de crecimiento de raíz (Tsugeki y Fedoroff 1999), y les permite a las plantas adaptarse a los suelos heterogéneos.

La diferenciación de las células de la raíz se aceleró y ocurrió a una distancia menor del extremo de la raíz conforme se aumentó la concentración de Cr(VI), lo que se ha reportado en experimentos de transferencias de plantas de *A. thaliana* a medios con concentraciones inhibitorias de Cr(VI)(Ortiz-Castro et al. 2007); esto se correlaciona con la disminución del crecimiento de la raíz primaria y su transición de un crecimiento indeterminado a uno determinado, como ha sido reportado en condiciones de estrés por escasez de fósforo (López-Bucio et al. 2002; Sánchez-Calderón et al. 2005).

8. CONCLUSIONES

- El Cr(VI) puede inducir la formación de raíces laterales en la mutante *slr-1*, venciendo o evadiendo la estabilidad del represor IAA14.
- Dependiendo de la severidad del Cr(VI), la adición de sacarosa puede estimular el crecimiento de la raíz primaria o las raíces laterales, tanto en plantas silvestres como en la mutante *slr-1*.
- El efecto generado por bajo fósforo sensibiliza o predispone a las plantas a formar más raíces laterales por efecto de la sacarosa.
- La exposición eventual a Cr(VI) permite una mejor adaptación y tolerancia del sistema radical.

9. REFERENCIAS

- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I** (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**: 109–120.
- Aichinger E, Kornet N, Friedrich T, Laux T** (2012) Plant stem cell niches. *Annual Review of Plant Biology* **63**: 615-36.
- Armienta-Hernández MA, Rodríguez-Castillo R** (1995) Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, México. *Environmental Health and Perspectives* **103**: 47-51.
- Bellini C, Pacurar D, Perrone I** (2014) Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 639-666.
- Beltrán-Peña E, López-Bucio J** (2010) Fronteras en la biología del desarrollo de las plantas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Benjamins R, Scheres B** (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 443-465.
- Ben Scheres, Philip Benfey y Liam Dolan** (2002) Root Development. *The Arabidopsis Book*. Doi:10.1199/tab.0101.
- Bishopp A, Mähönen AP, Helariutta Y** (2006) Signs of change hormone receptors that regulate plant development. *Development* **133**: 1857-1869.
- Bouain N, Dumas P, Rouached H** (2016) Recent advances in understanding the molecular mechanisms regulating the root system response to phosphate deficiency in *Arabidopsis*. *Current Genomics* **17**: 308-314.
- Cañas-Navarro MA, Carreon-Abud Y, Martinez-Trujillo M** (2012) Evaluacion de la toxicidad ocasionada por el exceso de micronutrientos en plantas de *Arabidopsis thaliana*. *Biológicas* **14** :30-36.
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Awarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M** (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**: 843-852.
- Capron A, Chatfi S, Provart N, Y Berleth T** (2009) Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *The Arabidopsis Book*. Doi:10.1199/tab.0051.

- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T y Doerner P** (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* **20**: 503–508.
- Celenza JL, Grisafi PL, Fink GR** (1995) A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development* **9**: 2131-2142.
- Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutierrez-Corona F, Tavera HL, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R** (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* **25**: 335-347.
- Cho HT, Cosgrove DJ** (2002) Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 3237-53.
- Davies PJ** (2010) *Plant Hormones biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Substantially revised 3rd edition. USA.
- De Rybel B, Vassileva V, Parizot B, Demeulenaere M, Grunewald W, Audenaert D, Van Campenhout J, Overvoorde P, Jansen L, Vanneste S, Möller B, Wilson M, Holman T, Van Isterdael G, Brunoud G, Vuylsteke M, Vernoux T, De Veylder L, Inzé D, Weijers D, Bennett MJ, Beeckman T** (2010) A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology* **20**: 1697-1706.
- Dubrovsky JG, Doerner PW, Colón-Carmona A, Rost TL** (2000) Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**: 1648-1657.
- Dolan L, Duckett CM, Grierson C, Linstead P, Schneider K, Lawson E, Dean C, Poethig S, Roberts K** (1994) Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**: 2465-2474.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B** (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71-84.
- Doncheva S, Amenós M, Poschenrieder C y Barceló J** (2005) Root cell patterning: a primary target for aluminum toxicity in maize. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1213-1220.

- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M** (2005) The TF-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445.
- Eleftherios PE, Loannis-Dimosthenis SA, Pelagia M** (2012) Effect of hexavalent chromium on microtubule organization, ER distribution and callose deposition in root tip cells of *Allium cepa* L. *Protoplasma* **249**: 401-416.
- Estelle MA, Somerville CR** (1986) The mutants of *Arabidopsis*. *Trends in Genetics* **2**: 89-93.
- Fahn A** (1974) Anatomía vegetal. H.Blume ediciones. España.
- Forde B, Lorenzo H** (2001) The nutritional control of root development. *Plant and Soil* **232**: 51-68.
- Foreman J, Dolan L** (2001) Root hairs as a model system for studying plant cell growth. *Annals of Botany* **88**: 1-7.
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H, Tasaka M** (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*. *Plant Journal* **29**: 153–168.
- Freixes S, Thibaud MC, Tardieu F y Muller B** (2002) Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell and Environment* **25**: 1357–1366.
- Gilroy S, Jones DL** (2000) Through form to function: root hair development and nutrient uptake. *Trends in plant Science* **5**: 56-60.
- Gottwald JR, Krysan PJ, Young JC, Evert RF, Sussman MR** (2000) Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* **7**: 13979–13984
- Hernández-Madrigal F, Ortiz-Castro R, Ruiz-Herrera LF, Cervantes C, Lopez-Bucio J, Martinez-Trujillo M** (2017) Sucrose protects *Arabidopsis* roots from chromium toxicity influencing the auxin–plethora signaling pathway and improving meristematic cell activity. *Journal of Plant Growth Regulation*. Doi: 10.1007/s00344-017-9751-1.
- Jain A, Poling MD, Karthikeyan AS, Blakeslee JJ, Peer WA, Titapiwatanakun B, Murphy AS, Raghothama KG** (2007) Differential effects of sucrose and auxin

- on localized phosphate deficiency-induced modulation of different traits of root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **244**: 232-247.
- Jang JC, Leon P, Zhou L, Sheen J** (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* **9**: 5–19.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan M** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* **6**: 3910-3907.
- Karthikeyan A, Varadarajan D, Jain A, Held M, Carpita N, Raghothama K** (2007) Phosphate starvation responses are mediated by sugar signaling in *Arabidopsis*. *Planta* **225**: 907–918.
- Katz SA, Salem H** (1993) The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *Journal of Applied Toxicology* **13**: 217-224.
- Kende H, Zeevaart JAD** (1997) The five “classical” plant hormones. *Plant Cell* **9**: 1197-1210.
- Kepinski S** (2006) Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 28-34.
- Korasick DA, Enders TA y Strader LC** (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* **64** (9): 2541-2555.
- Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J y Zazimalová E** (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* **10**: 249.
- Lau S, Jurgens G, De Smet I** (2008) The evolving complexity of the auxin pathway. *Plant Cell* **20**: 1738-1746.
- Lei M y Liu D** (2011) Sucrose regulates plant responses to deficiencies in multiple nutrients. *Plant Signaling and Behavior* **6**: 1247-1249.
- Lei M, Liu Y, Zhang B, Zhao Y, Wang X, Zhou Y, Raghothama K, y Liu D** (2011) Genetic and genomic evidence that sucrose is a global regulator of plant responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **156**: 1116-1130.
- Libault M, Brechenmacher L, Cheng J, Xu D, Stacey G** (2010) Root hair systems biology. *Trends in plant Science* **15** (11): 641-650.

- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L** (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* **6**: 280-287.
- López-Bucio J, Hernández-Madrigal F, Cervantes C, Ortiz-Castro R, Carreón-Abud Y, Martínez-Trujillo M** (2014) Phosphate relieves chromium toxicity in *Arabidopsis thaliana* plants by interfering with chromate uptake. *Biometals* **27**(2): 363-70.
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sanches-Calderon L, Cieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* **129**(1): 244-256.
- López-Bucio J, Ortiz-Castro R, Ruíz-Herrera LF, Juárez C, Hernández-Madrigal F, Carreón-Abud Y, Martínez-Trujillo M** (2015) Chromate induces adventitious root formation via auxin signalling and SOLITARY-ROOT/IAA14 gene function in *Arabidopsis thaliana*. *Biometals* **28**: 353–365.
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal* **28**: 465-474.
- Lynch J** (1995) Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology* **109**: 7-13.
- Martínez-Trujillo M, Mendez-Barvo A, Ortiz-Castro R, Hernández-Madrigal F, Ibarra-Laclette E, Ruiz-Herrera LF, Long TA, Cervantes C, Herrera Estrella, López-Bucio J** (2014) Chromate alters root system architecture and activates expression of genes involved in iron homeostasis and signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **86**: 35-50.
- Martínez-Trujillo M, Sántiz-Gómez M, Ortiz-castro R, Carreón-Abud Y** (2009) Efecto del cobre en el crecimiento y la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana* L. *Biológicas* **11**: 122-131.
- Martínez-Trujillo M, Solís-Guzmán G, Jiménez-Saragoz JC, López-Hernández D, Carreón-Abud Y, Ríos-Chávez P** (2013) Respuestas morfogénicas de las raíces de *Arabidopsis thaliana* (Magnoliophyta: Brassicales) al estrés de Cr(VI). *Revista Chilena de Historia Natural* **86**: 207-219.

- Malamy JE, Benfey PN** (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33-44.
- Meinke DW, Cherry MJ, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M** (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**: 679-682.
- Möller B y Weijers** (2009) Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **1**(5): a001545.
- Michniewicz M, Zago MK, Abas L, Weijers D, Schweighofer A, Meskiene I, Heisler, MG, Ohno C, Zhang J, Huang F, Schwab R, Weigel D, Meyerowitz EM, Luschnig C, Offringa R, Friml J** (2007) Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell* **130**:1044-1056.
- Muday GK, Delong A** (2001) Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in Plant Science* **6** (11): 535-542.
- Muller B, Stosser M, Tardieu F** (1998) Spatial distributions of tissue expansion and cell division rates are related to irradiance and to sugar content in the growing zone of maize roots. *Plant Cell and Environment* **21**: 149-158.
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.
- Murphy E, Dai Vu L, Van den Broeck L, Lin Z, Ramakrishna P, Van de Cotte B, Gaudinier A, Goh T, Slane D, Beeckman T, Inzé D, Brady SM, Fukaki H, De Smet I** (2016) RALFL34 regulates formative cell divisions in *Arabidopsis* pericycle during lateral root initiation. *Journal of Experimental Botany* **67**: 4863-4875.
- McGrath SP, Smith S** (1990) Chromium and nickel. In: *Heavy Metals in Soils* Ed Alloway BJ. Wiley, New York .125-150pp.
- Narise T, Kobayashy K, Baba S, Shimojima M, Masuda S, Fukaki H, Ohta H** (2010) Involvement of auxin signaling mediated by IAA14 and ARF7/ARF19 in membrane lipid remodeling during phosphate starvation. *Plant Molecular Biology* **72**: 533-544.
- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C** (2006) Modificaciones en el desarrollo de la raíz inducidas por cromo en plantas de *Arabidopsis thaliana*. *Ciencia Nicolaita* **44**: 107-120.

- Ortiz-Castro R, Martínez-Trujillo M, López-Bucio J, Cervantes C** (2007) Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science* **172**: 684-691.
- Padilla D y Maetinez E** (2007) Factores involucrados en la distribución de azúcares en las plantas vasculares: comunicación entre los tejidos fuente y tejidos demanda. *Revista de Educación Bioquímica* **26**(3): 99-105.
- Parker JS, Cavell AC, Dolan L, Roberts K, Grierson CS** (2000) Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 1961-1974.
- Pasternak T, Rudas V, Potters G y Jansen M** (2005) Morphogenic effects of abiotic stress: reorientation of growth in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **53**: 299–314.
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ** (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in plant science* **14**: 399-408.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Jansen AK** (2009) Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant Cell and Environment* **32**: 158-169.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MA** (2007) Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* **12**: 98-105.
- Raghothama KG** (1999) Phosphate acquisition. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 665-693.
- Raghothama, K.G. y A.S. Karthikeyan** (2005) Phosphate acquisition. *Plant and Soil* **274**: 37-49.
- Ramírez-Díaz MI, Riveros-Rosas H, Campos-García J, Cervantes C** (2009) Reducción bacteriana de cromo hexavalente. *Revista de Educación Bioquímica* **28**(3): 73-79.
- Rausch C, Bucher M** (2002) Molecular mechanism of phosphate transport in plants. *Planta* **216**: 23-37.

- Ruan YL** (2014) Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 1-26.
- Ruiz-Herrera LF, Shane MW, López-Bucio J** (2015) Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **4**: 431-443.
- Russell RS** (1977) *Plant root system: their function and interaction with the soil*. McGraw-Hill, London.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P, Scheres B** (1999) An auxin dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* **99**: 463-472.
- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacón-López A, Cruz-Ramírez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovsky JG, Herrera-Estrella L** (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* **46**: 174-184.
- Santner A, Calderon-Villalobos LIA, Estelle M** (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of planta growth. *Nature Chemical Biology* **5**: 301-307.
- Sivaguru M, Frantisek B, Volkmann D, Felle H y Horst W** (1999) Impacts of aluminum on the cytoskeleton of the maize root apex. Short term effects on the distal part of the transition zone. *Plant Physiology* **119**: 1073-1082.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S** (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International* **31**: 739-753.
- Sharma DC, Sharma CP, Tripathi CP** (2003) Phytotoxic lesions of chromium in maize. *Chemosphere* **51**(1): 63-68.
- Scheres B, Benfey P y Dolan L (2002)** Root Development. *Arabidopsis Book*. Doi: 10.1199/tab.0101.
- Scheres B, Wolkenfel H, Willemsen V, Terlouw M, Lawson E, Dean C, Weisbeek P** (1994) Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 475-2487.

- Schiefelbein JW, Masucci JD, Wang H** (1997) Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *Plant Cell* **9**: 1089-1098.
- Shupack SI** (1991) The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environment Health Perspectives* **92**: 7-11.
- Shanker AK, Cervantes C, Loza-Tavera H, Avudainayagam S** (2005) Chromium toxicity in plants. *Environment International* **31**: 739-753.
- Skeffington RA, Shewry PR, Petersen PJ** (1976) Chromium uptake and transport in barley seedlings *Hordeum vulgare* L. *Planta* **132**: 209-214.
- Svistoonoff S, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L y Desnos T** (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nature Genetics* **39**: 792-796.
- Taiz L, Zeiger E** (2006) *Fisiología vegetal*. 3ta Ed. Universitat Jaume I.
- Teale WD, Paponov IA, Palme K** (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews in Molecular Cell Biology* **7**: 847-859.
- Ticconi CA, Lucero RD; Sakhonwasee S, Adamson AW, Creff A, Nussaume L, Desnos T, Abel S** (2009) ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc Natl Acad Sci USA* **106** (33): 14174-14179.
- Tsuqeki R, Fedoroff NV** (1999) Genetic ablation of root cap cells in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(22): 1294-6.
- Thomas A, Perrot-Rechenmann C** (2010) Recent progress in auxin biology. *Comptes rendus biologiques* **333**: 297-306.
- Tsukagoshi H, Busch W, Benfey PN** (2010) Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* **143**: 606-16.
- The *Arabidopsis* genome initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA Proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963-1971.
- Vajpayee P, Tripathi RD, Rai UN, Ali MB, Singh SN** (2000) Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nymphaea alba* L. *Chemosphere* **41**: 1075-1082.
- Wildwater M, Campilho A, Perez-Perez JM, Heidstra R, Blilou I, Korthout H, Chatterjee J, Mariconti L, Gruijsem W y Scheres B** (2005) The RETINOBLASTOMA-RELATED gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* **123**: 1337–1349.
- Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen Jen J** (2013) Glc-TOR signalling leads transcriptome reprogramming and meristem activation. *Nature* **496**: 181-186
- Zou JH, Wang M, Jiang WS, Liu DU** (2006) Effects of hexavalent chromium (VI) on root growth and cell division in root tip cells of *Amaranthus Viridis* L. *Pak. Journal of Botany* **38**: 673-681.