



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO VEGETAL

PARTICIPACIÓN DEL GEN *IAA-LEUCINE RESISTANT 3 (ILR3)* EN LA  
COORDINACIÓN DE LA RESPUESTA DE LA RAÍZ DE *Arabidopsis thaliana* A LA  
DEFICIENCIA DE HIERRO Y FOSFATO

Tesis que presenta

**BIÓL. GUADALUPE JESSICA SALMERÓN BARRERA**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D.C. JOSÉ LÓPEZ BUCIO**

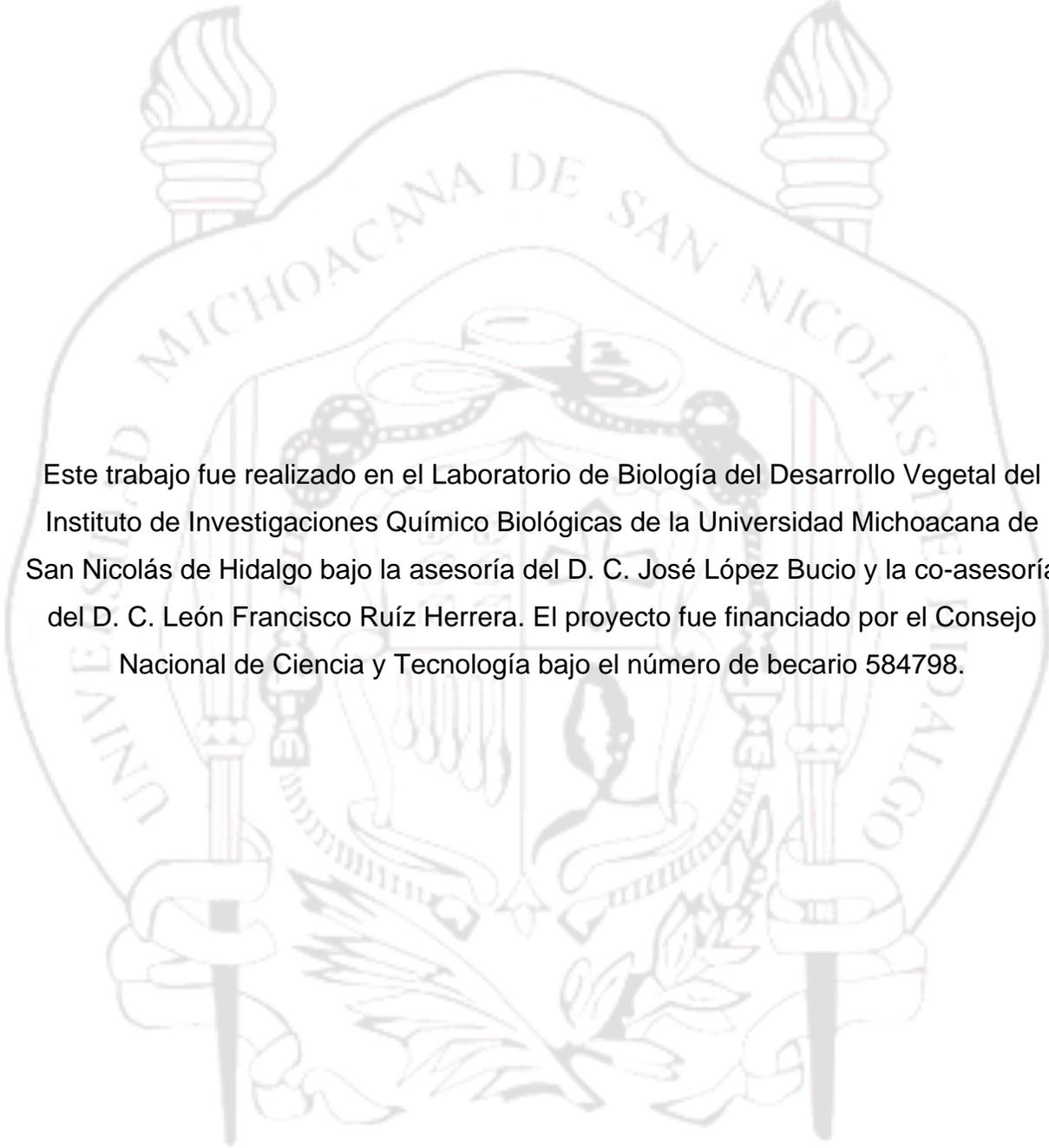
**CO-DIRECTOR DE TESIS:**

**D.C. LEÓN FRANCISCO RUÍZ HERRERA**

FEBRERO DE 2018



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
QUÍMICO-BIOLÓGICAS  
UMSNH



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del D. C. José López Bucio y la co-asesoría del D. C. León Francisco Ruíz Herrera. El proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología bajo el número de becario 584798.

## **Reconocimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por haber permitido la realización de este proyecto gracias al financiamiento otorgado.

Al D. C. José López Bucio, por haber dirigido este proyecto, por sus observaciones y consejos que siempre fueron para mejorar, por los seminarios para el análisis y estructuración de esta investigación y la revisión del manuscrito.

Al D. C. Javier Raya González, por haber contribuido enormemente en la formulación de este proyecto, así como por la ayuda en la realización de las cruces.

Al D.C. León Francisco Ruíz Herrera, por sus observaciones y apoyo en la toma de fotografías en el microscopio confocal.

A la M. C. Edith Muñoz Parra, por su ayuda en la corrección de figuras.

Al comité sinodal integrado por: D. C. Elda María Guadalupe Beltrán Peña, D. C. Ernesto García Pineda y D. C. Eduardo Valencia Cantero, por sus valiosas observaciones y aportaciones en la interpretación de los resultados, así como por el tiempo dedicado en los seminarios de avance y en la revisión del escrito.

<b>Índice</b>	
<b>RESUMEN</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>XI</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>4</b>
II.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>4</b>
II.1.1 El sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>7</b>
II.2 Factores que regulan el desarrollo del sistema radicular	<b>10</b>
II.2.1 Nutrientes minerales y su disposición en el suelo	<b>10</b>
II.3 El fósforo (P)	<b>11</b>
II.3.1 El fosfato en las plantas	<b>13</b>
II.3.2 Regulación genética de la homeostasis del fosfato en <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>16</b>
II.4 El hierro (Fe)	<b>19</b>
II.4.1 El hierro en las plantas	<b>19</b>
II.4.2 Regulación genética de la homeostasis del hierro	<b>20</b>
II.4.2.1 Estrategia I	<b>22</b>
II.4.3 Factores de transcripción bHLH que regulan las respuestas a la deficiencia de hierro	<b>26</b>
II.4.3.1 El factor transcripcional <i>ILR3</i>	<b>27</b>
II.5 La interacción hierro-fosfato en plantas	<b>29</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>32</b>

<b>IV. HIPÓTESIS</b>	<b>33</b>
<b>V. OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
V.1 Objetivo general	33
V.2 Objetivos específicos	33
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>34</b>
VI.1 Material biológico	34
VI.2 Desinfección de las semillas	34
VI.3 Preparación del medio de cultivo y condiciones de crecimiento	34
VI.4 Análisis del desarrollo radicular <i>in vitro</i>	35
VI.5 Cruzas	36
VI.6 Análisis histoquímico de la actividad de GUS y clareo de tejidos	37
VI.7 Análisis mediante microscopía confocal	37
VI.8 Tinción de calosa con azul de anilina	38
VI.9 Técnica de Perls/DAB	38
VI.10 Análisis estadístico	39
<b>VII. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
VII.1 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la arquitectura radicular de las mutantes <i>ilr3-1</i> e <i>ilr3-2</i>	40
VII.2 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la arquitectura radicular de las mutantes <i>pye-1</i> y <i>bts-1</i>	42
VII.3 La expresión de <i>ILR3:uidA</i> aumenta durante la deficiencia de fosfato	44

VII.4 Diferenciación prematura del meristemo de <i>ilr3-1</i> durante la deficiencia de fosfato	46
VII.5 La deficiencia de fosfato disminuye el máximo de auxinas en el meristemo de <i>ilr3-1</i>	48
VII.6 La expresión de <i>PIN1:PIN1:GFP</i> disminuye en <i>ilr3-1</i> en condiciones de deficiencia de fosfato	50
VII.7 La deficiencia de fosfato modifica la expresión de <i>AtPT2:uidA</i> en <i>ilr3-1</i>	52
VII.8 Expresión de <i>AtPT2:GUS</i> en deficiencia de hierro y fosfato	54
VII.9 La concentración de hierro en el ápice de la raíz primaria no se modifica en la mutante <i>ilr3-1</i> en deficiencia de fosfato	56
VII.10 El aumento en la acumulación de calosa en la punta de la raíz primaria en <i>ilr3-1</i> bajo deficiencia de fósforo	58
<b>VIII. DISCUSIÓN</b>	<b>60</b>
<b>IX. CONCLUSIONES</b>	<b>66</b>
<b>X. REFERENCIAS</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Ciclo de vida de <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>6</b>
<b>FIGURA 2.</b> Estructura de la punta de la raíz primaria y división de las células iniciales	<b>9</b>
<b>FIGURA 3.</b> El ciclo del fósforo en el suelo	<b>13</b>
<b>FIGURA 4.</b> Fenotipo característico de la deficiencia de fosfato en <i>Arabidopsis thaliana</i>	<b>15</b>
<b>FIGURA 5.</b> Esquema de la regulación de genes de respuesta a deficiencia de fosfato mediada por PHR1	<b>17</b>
<b>FIGURA 6.</b> Modelo de la regulación a las respuestas de deficiencia de hierro	<b>22</b>
<b>FIGURA 7.</b> Esquema general del transporte de hierro desde la raíz al follaje	<b>25</b>
<b>FIGURA 8.</b> Las mutaciones <i>ilr3-1</i> e <i>ilr3-2</i>	<b>28</b>
<b>FIGURA 9.</b> Efecto de la deficiencia de fosfato en la arquitectura radicular de las mutantes <i>ilr3-1</i> e <i>ilr3-2</i>	<b>41</b>
<b>FIGURA 10.</b> Arquitectura del sistema radicular de las mutantes <i>pye-1</i> y <i>bts-1</i> bajo deficiencia de fosfato	<b>43</b>
<b>FIGURA 11.</b> Expresión de <i>ILR3:uidA</i> dependiente de la concentración de fosfato	<b>45</b>
<b>FIGURA 12.</b> Diferenciación prematura del meristemo de <i>ilr3-1</i> durante la deficiencia de fosfato	<b>47</b>
<b>FIGURA 13.</b> La expresión de <i>DR5:GFP</i> en <i>ilr3-1</i> en deficiencia de fosfato	<b>49</b>
<b>FIGURA 14.</b> La expresión de <i>PIN1:PIN1:GFP</i> en el fondo mutante <i>ilr3-1</i> bajo deficiencia de fosfato	<b>51</b>
<b>FIGURA 15.</b> La deficiencia de fosfato modifica la expresión de <i>AtPT2:uidA</i>	

en *ilr3-1* **53**

**FIGURA 16.** La expresión de *AtPT2:GUS* en el fondo mutante *ilr3-1* en deficiencia de hierro y fosfato **55**

**FIGURA 17.** Concentración de hierro en la punta de la raíz primaria en plántulas silvestres (Col-0) y mutantes *ilr3-1* **57**

**FIGURA 18.** Deposición de calosa en la punta de la raíz primaria bajo deficiencia de fosfato **59**

## RESUMEN

Entre los problemas más comunes en la agricultura relacionados con el estrés nutricional, se encuentran las deficiencias de fósforo y hierro, sin que se tenga esclarecido cuáles son los componentes genéticos que coordinan las respuestas a ambas deficiencias. Reportes previos han demostrado que la expresión de ciertos genes que intervienen en la captación y homeostasis del hierro se altera durante la deficiencia de fosfato (Misson et al., 2005; Li y Lan, 2015). En *Arabidopsis thaliana* la deficiencia de fosfato provoca un aumento en el número de raíces laterales y pelos radiculares (López-Bucio et al., 2002) así como una inhibición del crecimiento de la raíz primaria debida a una intoxicación por hierro (Hirsch et al., 2006; Ward et al., 2008).

El gen *ILR3*, que codifica a un factor transcripcional tipo cierre de leucina de la familia bHLH, regula la captación de hierro en *Arabidopsis* (Zhang et al., 2015); por lo que en este trabajo se evaluó su posible participación en la deficiencia de fosfato y su influencia en la expresión de uno de los principales elementos moleculares que se expresa durante la deficiencia de fosfato, el transportador de alta afinidad de fosfato AtPT2. Para lo cual se analizó el sistema radicular de las mutantes *ilr3-1* e *ilr3-2*, así como la expresión del gen reportero *ILR3:uidA* en deficiencia de fosfato. La mutante con ganancia de función *ilr3-1* mostró una respuesta hipersensible a la deficiencia de fosfato en tanto que la expresión del gen reportero *ILR3:uidA* fue inversamente proporcional a la concentración de fosfato en el medio. Sin embargo, la mutante nula con pérdida de función, *ilr3-2* no mostró respuestas a la deficiencia de fosfato.

Se ha reportado que la deficiencia de fosfato induce la activación de un programa de crecimiento determinado, en el cual la concentración máxima de auxinas en la punta de la raíz primaria se ve disminuido, esto ocasiona la diferenciación de las células meristemáticas y por lo tanto el cese del crecimiento de la raíz. Debido a la hipersensibilidad a la deficiencia de fosfato mostrada en la mutante *ilr3-1*, decidimos analizar si el programa de crecimiento determinado se aceleraba en *ilr3-1* y encontramos que efectivamente, el meristemo de la mutante sufre una diferenciación prematura; por lo cual se examinaron tanto la acumulación como el transporte de

auxinas mediante el uso de las líneas reporteras *DR5:GFP* y *PIN1:PIN1:GFP*, cuya expresión disminuyó en el fondo mutante *ilr3-1*.

Debido a la disminución de la acumulación y el transporte de auxinas, decidimos analizar la deposición de calosa en *ilr3-1*, ya que se ha reportado que este polisacárido con enlaces  $\beta$ -1-3-glucano restringe la comunicación célula-célula al acumularse en el simplasto durante la deficiencia de fosfato (Müller *et al.*, 2015) y encontramos que *ilr3-1* presenta una mayor acumulación de calosa en comparación a Col-0.

Adicionalmente, se observó una disminución en la expresión del gen reportero *AtPT2:uidA* en el fondo mutante *ilr3-1*, bajo diferentes combinaciones de deficiencia de hierro y fosfato. Nuestros resultados sugieren la participación del gen *ILR3* en la modulación de las respuestas a la deficiencia de fosfato, mediante la regulación de la proteína de transporte de fosfato *AtPT2*. Además *ILR3* regula positivamente la deposición de calosa, lo cual modifica los niveles de auxinas en la punta de la raíz primaria e impacta en el mantenimiento del meristemo.

**Palabras clave:** *Arabidopsis thaliana*, *ILR3*, fosfato, hierro, factor transcripcional.

## ABSTRACT

Iron and phosphate deficiencies are amongst the most common agricultural problems related to nutritional stresses. Both deficiencies have been linked in the last few years at the molecular level, yet little is known about the genetic components that modulate such crosstalk. Previous reports have shown an alteration in iron uptake and homeostasis gene expression during phosphate deficiency (Misson *et al.*, 2005; Li y Lan, 2015). In *Arabidopsis thaliana* phosphate deficiency leads to an increase in lateral root and hair root number (López-Bucio *et al.*, 2002) as well as primary root growth inhibition due to iron toxicity (Hirsch *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2008).

The bHLH leucine zipper transcription factor ILR3 regulates iron uptake in *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 2015); therefore we evaluated its possible role under phosphate deficiency and its influence over the high affinity phosphate transporter *AtPT2* gene, a major molecular element that is overexpressed during phosphate deficiency.

We analyzed *ilr3-1* and *ilr3-2* root system architecture, as well as *ILR3:GUS* reporter gene expression. The gain of function mutant, *ilr3-1*, exhibited a hypersensitivity response to phosphate deficiency. Complementary to this result the *ILR3:uidA* expression was inversely correlated with phosphate concentration in the culture media. However, the loss of function knockout mutant, *ilr3-2*, showed no response to phosphate deficiency.

It has been reported that phosphate deficiency induces a determinate growth program, in which the auxin maximum concentration in primary root tip decreases leading to meristematic cells differentiation and finally to root growth ceasing. Due to the *ilr3-1* hypersensitive response to phosphate deficiency, we decided to analyze if the determinate growth accelerated in *ilr3-1*, and found that effectively, the mutants meristem goes through premature differentiation; reason why we analyzed auxin transport and accumulation through analyzing *DR5:GFP* and *PIN1:PIN1:GFP*. Both reporter genes expression decreased in *ilr3-1* background.

Because auxin transport and accumulation was decreased, we analyzed callose deposition in *ilr3-1*, since it has been reported that this polysaccharide accumulation in the symplast restricts cell to cell communication during phosphate deficiency (Müller *et al.*, 2015) and found that *ilr3-1* presents a larger callose accumulation than wild type.

Additionally, a decrease in the expression of *AtPT2:uidA* in the *ilr3-1* mutant background was observed under different combinations of iron and phosphate deficiencies. Our results suggest the participation of the *ILR3* gene in the modulation of the responses to phosphate deficiency, through the negative regulation of *AtPT2*, as well as a positive regulation of callose deposition, which modifies auxin levels at the primary root tip and impacts meristem maintenance.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*, *ILR3*, phosphate, iron.

## I. INTRODUCCIÓN

Los nutrientes minerales (N, S, P, B, K, Na, Ca, Mg, Mn, Cl, Fe, Zn, Cu y Mo) son elementos químicos incorporados en forma de iones inorgánicos y junto a los nutrientes no minerales (C, H y O) obtenidos del agua y del CO<sub>2</sub>, son importantes para las plantas porque constituyen la materia orgánica que las conforma, están asociados al balance osmótico y de iones, y se les puede encontrar en forma de oxianiones, quelatos o metaloproteínas estructurales (Rao et al., 2006). Además se ha demostrado su participación en la regulación de procesos fisiológicos como el metabolismo del carbono (Coruzi y Bush, 2001), la fotosíntesis (Briat et al., 2007; Warren, 2011) la síntesis de DNA (Puig *et al.*, 2017) y procesos del desarrollo como el aumento en la elongación y el número de raíces laterales y pelos radiculares (Gruber *et al.*, 2013; Ghiesl *et al.*, 2013). Dicho control ocurre a través de vías de transducción de señales que dependen de la concentración interna y externa de nutrientes específicos, por ejemplo, el hierro, el fosfato, el nitrógeno y el azufre (López-Bucio *et al.*, 2003). El análisis de las vías de señalización que se activan por deficiencia o exceso de nutrientes es relevante por lo siguiente: 1) en el ámbito de la ciencia básica permitirá conocer a qué niveles los nutrientes minerales regulan procesos celulares o metabólicos, así como establecer las bases de las redes complejas de señalización en las que participan dos o más nutrientes minerales, y 2) en el campo de la ciencia aplicada aportará mejoras en la agricultura, e impactará de manera positiva en el uso responsable del suelo al disminuir el uso de fertilizantes, lo cual también reducirá costos de producción. Además, al explorar las vías de señalización dependientes de nutrientes minerales de manera exhaustiva se podría tener un control específico de las cantidades de nutrientes que deben adicionarse para la obtención de flores, frutos y hojas de mayor tamaño.

Debido al creciente aumento de la población mundial es fundamental elucidar los mecanismos de captación de nutrientes, para poder mantener una producción suficiente de alimentos.

Las deficiencias de hierro y fósforo representan un problema agro-económico mundial, que además deteriora el ambiente, debido al uso excesivo de fertilizantes. Sin embargo, a nivel molecular se conoce poco acerca de esta interacción lo cual limita el desarrollo de soluciones a largo plazo. A la fecha se conocen algunos elementos que participan en la coordinación de las deficiencias de hierro y fósforo, por ejemplo, se sabe que el gen *PHR1* (*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1*), un factor transcripcional, regula a la proteína FER1 (*FERITIN1*), proteína de almacenamiento de hierro en cloroplastos (Bournier *et al.*, 2013). Se sabe también que la expresión de genes que participan en el transporte de hierro se ve aumentada (Hirsch *et al.*, 2006). Además, de manera interesante se ha reportado que en condiciones de exceso de hierro, hay un aumento en la expresión de la proteína transportadora de fósforo AtPT2 (Ward *et al.*, 2008). Debido al potencial que tiene el análisis de las vías reguladas por nutrientes, en este trabajo decidimos evaluar la interconexión entre las vías de señalización del hierro y fósforo.

En este trabajo se utilizó a la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, ya que características como su genoma pequeño y completamente secuenciado, su ciclo de vida corto, la facilidad para generar mutantes y líneas transgénicas y al ser una planta diploide con autofertilización, el análisis de los mecanismos moleculares y genéticos a evaluar se ve facilitado. Nos enfocamos en el sistema radicular puesto que este es el órgano de la planta que está directamente en contacto con los nutrientes y se ha sugerido que a través de estímulos locales se perciben las deficiencias o el exceso de estos, a través de vías de señalización que integran respuestas fisiológicas y bioquímicas para la adaptación al estrés (Thibaud *et al.*, 2010; Alvarez *et al.*, Gayomba *et al.*, 2015).

El fósforo es el onceavo elemento más abundante en la corteza terrestre, mientras que el hierro ocupa el cuarto lugar, sin embargo, ambos tienen una alta

reactividad entre sí y con otros elementos, lo que los lleva a mineralizarse y por lo tanto se vuelven inasequibles para las plantas (Mielczarek y Bertsch, 2000; Juárez-Sanz, 2007; Kim y Guerinot, 2007; White y Hammond, 2008). A través de diversas estrategias, que involucran redes complejas de señalización, se activan procesos adaptativos a nivel fisiológico y estructural. Diversos reportes indican la interacción entre las vías de señalización de respuesta a hierro y fósforo (Misson *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2008, Bournier *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2015). Sin embargo, se tiene información escasa acerca de los componentes moleculares que las coordinan. En este trabajo se propuso la participación de ILR3 (*IAA-LEUCINE RESISTANT 3*), un factor transcripcional bHLH con cierres de leucina como un probable modulador de las vías mencionadas, debido a su papel como regulador de genes que participan en la captación de hierro.

## II. ANTECEDENTES

### II.1.- *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. es una planta dicotiledónea ampliamente utilizada en el campo de la investigación científica, el primer ejemplar colectado se registró en las montañas de Hartz en Alemania por el médico Johannes Thal en el siglo XVI. Sin embargo, fue hasta el año de 1943 cuando Friedrich Laibach propone el uso de esta planta como organismo modelo (Meyerowitz, 2001). Más tarde en 1960, científicos de los países de Alemania, República Checa, Holanda y Bélgica organizaron la primera conferencia internacional de *Arabidopsis* en Göttingen, Alemania y en el año de 1980 diversas publicaciones demostraron a la comunidad científica la relevancia del estudio de *Arabidopsis thaliana*. Entre dichas publicaciones destacan las realizadas por Chris Somerville y colaboradores, que incluyen estudios acerca de la fotorrespiración, biosíntesis de lípidos y almidón, respuestas a fitohormonas y arquitectura de la pared celular; así como los escrutinios de mutantes realizados por Maarten Koorneef y Jaap van der Veen (Meyerowitz, 2001; Koorneef y Meinke, 2010; Provart *et al.*, 2016).

En la actualidad a pesar de los avances en el estudio de plantas de importancia económica como el maíz, el arroz el frijol, etc., *Arabidopsis* se mantiene vigente como el modelo más utilizado, debido a que permite la comprensión de procesos biológicos básicos y este conocimiento puede ser extrapolado a otras especies vegetales e incluso a organismos de otros grupos taxonómicos (Provart *et al.*, 2016).

Las características que posicionan a la planta de *Arabidopsis* como un excelente modelo de estudio son:

- 1) Tamaño pequeño, que permite el cultivo de varias plantas en espacios reducidos bajo condiciones controladas.
- 2) Es una angiosperma que presenta un ciclo de vida relativamente corto, de alrededor de 8 semanas.

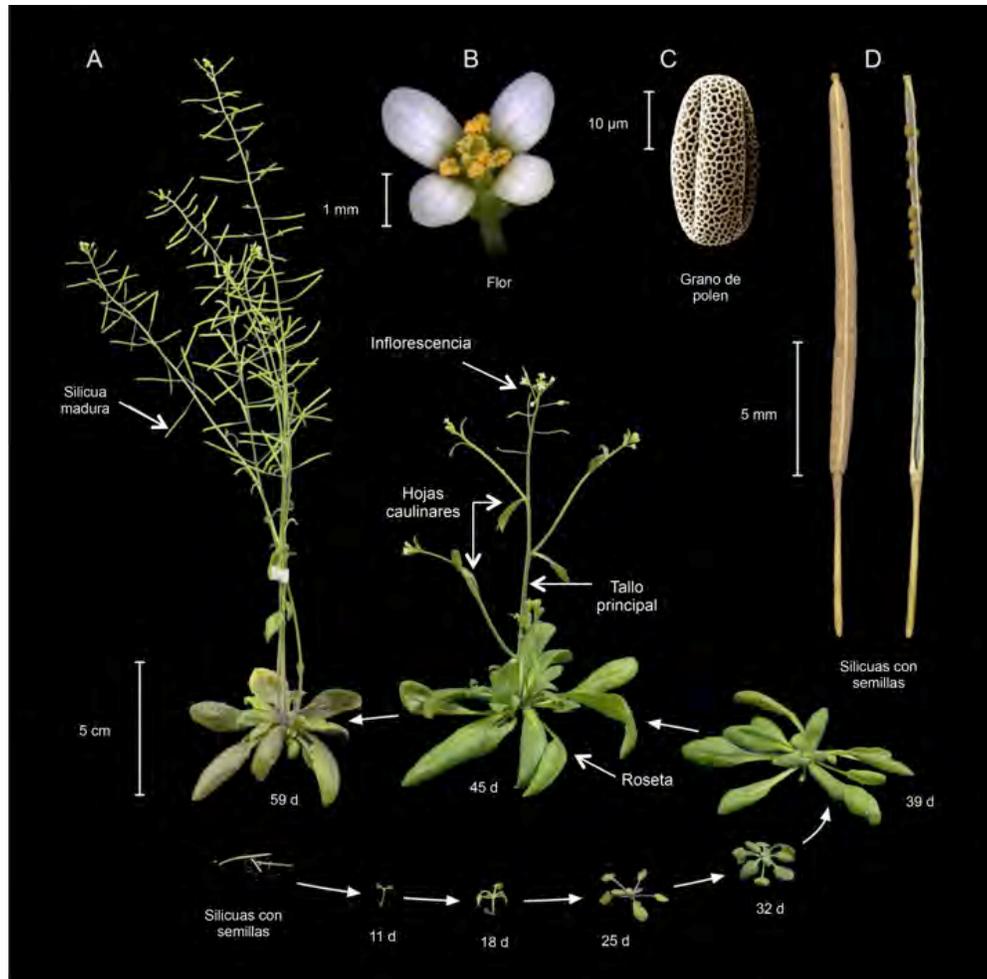
3) Permite la creación relativamente simple de mutantes y líneas transgénicas , además de que actualmente se cuenta con bancos de semillas de distribución mundial.

4) Es una planta diploide con autofertilización, por lo que la polinización cruzada para la obtención de dobles y triples mutantes, así como la movilización de líneas reporteras a fondos mutantes se ve facilitada.

5) A partir de un individuo se producen miles de semillas.

6) El genoma de esta planta, que en el 2000 fue completamente secuenciado, es pequeño comparado con otras dicotiledóneas, ya que cuenta con sólo 5 pares de cromosomas. Se estima que tiene alrededor de 25, 498 genes que codifican alrededor de 11, 000 proteínas.

*Arabidopsis thaliana* pertenece a la familia Brassicaceae, anatómicamente presenta un follaje, en el cual se encuentran los tejidos fotosintéticos y reproductivos y una región generalmente oculta en el suelo que es el sistema radicular. En la parte aérea se puede distinguir una roseta de la cual surge un tallo principal en el que se producen las hojas caulinares y las inflorescencias, que se autopolinizan para producir el fruto en forma de vaina conocido como silicua, en el cual están contenidas las semillas que darán paso a la siguiente generación. Si bien la parte aérea es sumamente importante para el desarrollo de la planta, los análisis de este trabajo de tesis se enfocaron en el desarrollo del sistema radicular (Fig. 1).



**FIGURA 1. Ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*.** En la imagen se muestran fotografías de *A. thaliana* ecotipo Col-0; (A) se pueden observar las diferentes etapas del ciclo de vida, desde la semilla (abajo a la izquierda) hasta planta madura a los 59 días (d). Se señalan, en la etapa reproductiva (45 d), la roseta, el tallo principal, las hojas caulinares y las inflorescencias. (B) Acercamiento de una flor, en donde se puede apreciar la estructura conformada por cuatro pétalos, cuatro estambres y un pistilo del cual solo se advierte el estigma, (C) fotografía de un grano de polen, obtenida mediante microscopía de barrido electrónico, (D) silicuas maduras. Modificado de Krämer (2015).

### **II.1.1- El sistema radicular de *Arabidopsis thaliana***

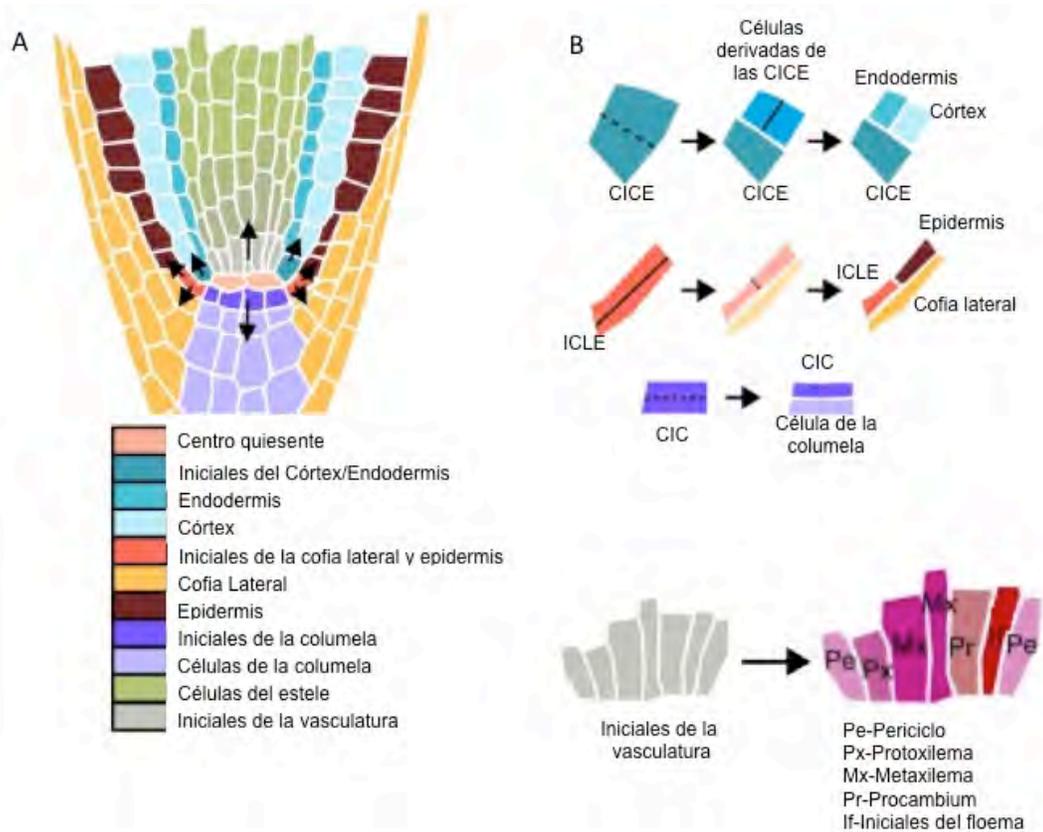
La raíz es un sistema altamente sofisticado, que además de ser el soporte de la parte aérea, está especializado en la captación de agua y nutrientes, así como en la exploración del entorno y en la interacción con otros organismos con los cuales puede establecer relaciones simbióticas. En *Arabidopsis thaliana*, este sistema está conformado por un eje principal de crecimiento denominado raíz primaria, a partir del cual se forman las raíces laterales y los pelos radiculares. El crecimiento de la raíz primaria es sostenido por la acción del meristemo apical de la raíz (MAR), el cual se establece durante la embriogénesis y se activa durante la germinación de la semilla. En el MAR se encuentran las células iniciales que darán lugar durante el desarrollo de la planta a los diferentes tejidos de la raíz (Smith y De Smet 2012).

La raíz primaria se divide en tres zonas: la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de diferenciación. La zona meristemática está integrada por el MAR y la cofia. En el MAR se encuentran las células que establecen los dominios de proliferación y de la transición a la elongación celular. En el dominio de proliferación se localizan las células iniciales, las cuales presentan una elevada actividad mitótica y rodean a un número pequeño de células centrales que son mitóticamente inactivas, las cuales se denominan como centro quiescente (CQ) (Dolan, 1993). Cuando las células iniciales se dividen, una de las células hijas mantiene la identidad de célula inicial mientras que la otra entra a un ciclo de varias divisiones para posteriormente pasar al dominio de transición donde rara vez se divide, comienza a incrementar su tamaño y transita a la zona de elongación donde incrementa su tamaño rápidamente. En la zona meristemática se establecen los tejidos celulares que incluyen al periciclo, la endodermis, el córtex y la epidermis, mientras que en la zona de diferenciación se establecen los tejidos vasculares conformados por el xilema y el floema. En la región basal del ápice de la raíz se diferencia la cofia formada por las células de la columela y la capa lateral (Fig. 2) (Dolan, 1993).

Las raíces laterales emergen continuamente desde el periciclo de la raíz primaria, localizado en la zona de diferenciación, sin embargo, este proceso comienza con la

estimulación y desdiferenciación de las células fundadoras del periciclo, las cuales reingresan al ciclo celular y a través de divisiones celulares asimétricas, darán paso a una estructura en forma de domo denominado primordio de raíz lateral, el cual para emerger atraviesa la endodermis, el córtex y la epidermis (Nibau *et al.*, 2008; Vilches-Barro y Maizel, 2015).

Por otra parte los pelos radiculares son células epidérmicas alargadas, que pueden medir desde 10  $\mu\text{M}$  hasta 1 mm aproximadamente y poseen una tasa de crecimiento de más de 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ . Para que el pelo pueda formarse en la zona de diferenciación, debe provenir de una célula de la epidermis denominada tricoblasto que se encuentre situada sobre el espacio intercelular de dos células corticales (Dolan *et al.*, 1993; Grierson *et al.*, 2014). Las raíces laterales y pelos radicales incrementan la capacidad exploratoria y de absorción de las plantas, lo cual puede favorecer en el desarrollo de la parte aérea por lo que el entendimiento de los factores que regulan positivamente el establecimiento del sistema radicular es uno de los objetivos principales en la agricultura para mejorar el uso de los recursos que cada vez son más limitados.



**FIGURA 2. Estructura de la punta de la raíz primaria y divisiones de las células iniciales.** (A) Esquema que muestra las diferentes capas que integran a la raíz primaria, así como el nicho de células fuente en donde se encuentra el centro quiescente y las células iniciales. (B) Esquema en donde se ejemplifican las divisiones que siguen las células fuente, las cuales darán paso a las células que integran a los diferentes tejidos de la raíz primaria. CICE (Células Iniciales del CórteX y Endodermis), ICLE (Iniciales de la Cofia Lateral y Epidermis), CIC (Células Iniciales de la Columela). Tomado de Fischer y Sozzani (2016).

## **II.2 Factores que regulan el desarrollo del sistema radicular**

Existen diversos factores bióticos y abióticos que afectan el desarrollo del sistema radicular. Los factores bióticos incluyen la presencia de microorganismos en la rizósfera. Se ha demostrado que diferentes microorganismos pueden establecer relaciones simbióticas con las plantas mediante el sistema radicular, además pueden influenciar tanto el crecimiento como el desarrollo mediante la emisión de compuestos difusibles y volátiles, así como actuar como agentes de biocontrol contra microorganismos patógenos (Ortíz-Castro *et al.*, 2009). Por otro lado, los principales factores abióticos del suelo que afectan el desarrollo del sistema radicular incluyen la disponibilidad de agua y de nutrientes, presencia de metales pesados y la salinidad del suelo (Parida y Das, 2005; Gruber *et al.*, 2013; Lipiec *et al.*, 2013; Chibuike y Obiora, 2014). De acuerdo a sus diferentes características, los suelos tendrán menor o mayor disponibilidad de agua y nutrientes, comprender cómo interactúan las raíces con la escasez de nutrientes es un problema de relevancia mundial, que implica la participación interdisciplinaria de ciencia básica y aplicada.

### **II.2.1 Nutrientes minerales y su disposición en el suelo**

Los nutrientes minerales son elementos químicos, que incorporados en forma de iones inorgánicos son necesarios para el crecimiento de las plantas. Para que un elemento se considere *esencial* debe ser requerido por todas las plantas, ser indispensable para completar el ciclo de vida y ningún otro elemento puede reemplazarlo por completo (Barker y Pilbeam, 2007). Análisis químicos han demostrado la presencia de 60 elementos en los tejidos vegetales, de los cuales 17 son considerados esenciales (Taiz y Zeiger, 2005; Rao *et al.*, 2006; Barker y Pilbeam, 2007).

Las plantas utilizan los macronutrientes para poder sintetizar proteínas y ácidos nucleicos. La disponibilidad de fósforo (P) y nitrógeno (N) especialmente, determinan

cómo será el rendimiento de la planta; otros nutrientes (micronutrientes) como el hierro (Fe) o el magnesio (Mg) son usados como co-factores. La captación de nutrientes, está determinada por su disponibilidad, el pH, el balance de los diferentes nutrientes y la composición del suelo (Koevoets *et al.*, 2016).

Los nutrientes están distribuidos heterogéneamente y a menudo, presentan un patrón de distribución vertical, que va a depender por una parte de la lixiviación de nutrientes y por otra parte de su reciclaje. La lixiviación es causada por el flujo vertical del agua, el cual arrastra a los nutrientes a las capas más bajas del suelo, en donde, el flujo del agua disminuye y los nutrientes se acumulan. El reciclaje consiste en la toma de los nutrientes del suelo por parte de las plantas y su reincorporación en forma de materia orgánica, lo que disminuye la acumulación de nutrientes en la rizósfera y la aumenta en la capa superficial del suelo. Los elementos de baja movilidad como el fósforo (P) y el potasio (K), se quedan en las capas superficiales, mientras que los nutrientes con alta movilidad como el nitrato y el cloro son lixiviados y tienden a acumularse en las capas más profundas del suelo (Koevoets *et al.*, 2016). Además de su distribución espacial, la disponibilidad de nutrientes está ligada a los compuestos químicos que se forman entre los diferentes elementos, así como la competencia entre ellos, lo que dificulta su absorción por las raíces de las plantas.

La tasa de absorción de nutrientes por las raíces, depende de la concentración de cada nutriente, de la especie vegetal y de los requerimientos de la planta. A mayor concentración de nutrientes, la tasa de absorción suele ser mayor, pero las plantas exhiben una selectividad, absorbiendo preferencialmente ciertos nutrientes y excluyendo otros (Adler *et al.*, 2009), lo cual indica que la absorción no se da solamente por cuestiones químicas y físicas externas a la planta, sino que hay una regulación interna que la define.

### **II.3 El fósforo (P)**

El fósforo forma parte de la estructura del DNA y de las membranas celulares; participa en los sistemas energéticos de todos los organismos y además, se le

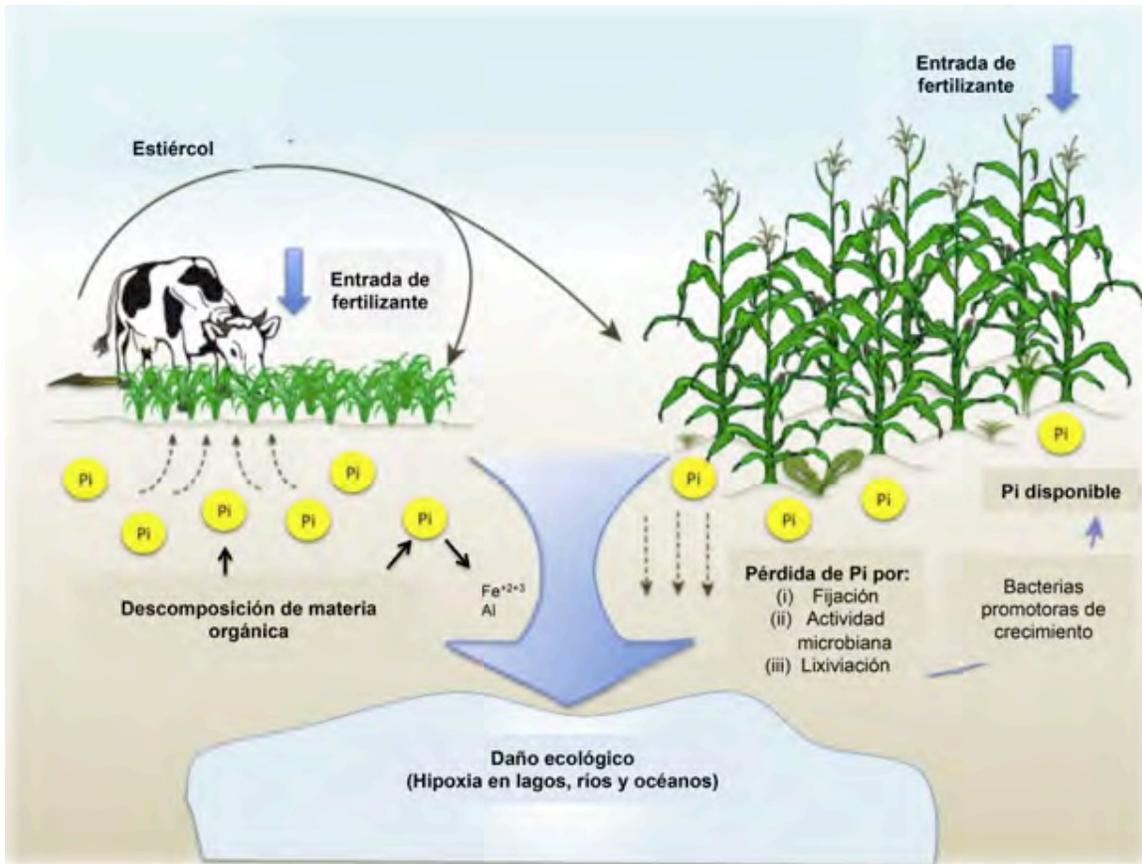
considera un recurso elemental no renovable que limita la producción agrícola (Butusov y Jernelöv, 2013; Raven, 2013). Es el onceavo elemento más abundante en la litósfera, pero no se le encuentra en su forma elemental, ya que al ser altamente reactivo suele combinarse con oxígeno cuando es expuesto al aire formando fosfatos inorgánicos, aunque también se le puede encontrar como fosfato orgánico unido a biomoléculas.

Una fuente importante de fósforo en la biosfera es la descomposición de materia orgánica vegetal y animal, el proceso de conversión de fosfato orgánico a inorgánico es llamado mineralización, éste es causada por la liberación de fosfatasas por parte de microorganismos y por las raíces. Dicha actividad está controlada por la temperatura y la humedad del suelo (Fig. 3) (Lutz Hherlich, 2002; Oelkers y Valsami-Jones, 2008; Pagliari *et al.*, 2017).

El fósforo inorgánico puede encontrarse en formas solubles e insolubles, la forma más habitual es como ortofosfato o simplemente fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , en suelos ácidos y como  $\text{HPO}_4^{2-}$ , en suelos alcalinos), cuya solubilidad dependerá de la presencia de cationes alcalinotérreos como el  $\text{Ca}^{+2}$  o el  $\text{Mg}^{+2}$ , o en presencia de cationes metálicos como el  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  o  $\text{Al}^{+3}$  a valores de pH apropiados (Fig. 3). Los fosfatos son las formas inorgánicas del fosfato disponibles para ser absorbidas por las plantas. Las formas más comunes de fosfato insoluble incluyen la apatita [ $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F}, \text{Cl}, \text{OH})$ ], en donde el radical (F, Cl, OH) puede representar exclusivamente al F, Cl u OH o cualquier combinación de estos. También pueden encontrarse sales de aluminio, como la variscita  $\text{AlPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  o como fosfato de hierro (vivianita [ $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ]). Estos compuestos inorgánicos pueden ser solubilizados por acción microbiana o vegetal (Lutz Hherlich, 2002).

El exceso de fosfatos disueltos en los cuerpos de agua lleva a un crecimiento de algas, lirio y otras plantas acuáticas que causan un desequilibrio ambiental. El uso de fosfatos minerales y sus productos como fertilizantes son parte de dicho problema, sin embargo, son necesarios para mantener una producción de alimentos capaz de responder a la creciente demanda debido al aumento de la población, a pesar de que el 80% del fosfato aplicado en forma de fertilizante no es aprovechado por los

cultivos (Hirsch *et al.*, 2006). El fósforo es un recurso global limitado, según estimaciones se vislumbra que en 100 años las reservas de este compuesto se verán mermadas (Oelkers y Valsami-Jones, 2008; Fink *et al.*, 2016).



**FIGURA 3. El ciclo del fósforo en el suelo.** El fósforo (Pi) se obtiene a partir de materia orgánica en descomposición, estiércol y fertilizantes agregados a los cultivos. Una vez en el suelo el fósforo puede ser reutilizado por las plantas o por microorganismos, pero también puede mineralizarse con otros elementos como el hierro o el aluminio, lo que lo vuelve indisponible para los organismos que lo requieren; otra manera en la que el fósforo se pierde en el suelo es por la lixiviación, lo cual ocurre con la adición de fertilizantes, afectando el ambiente. Modificado de Herrera-Estrella y López-Arredondo (2016).

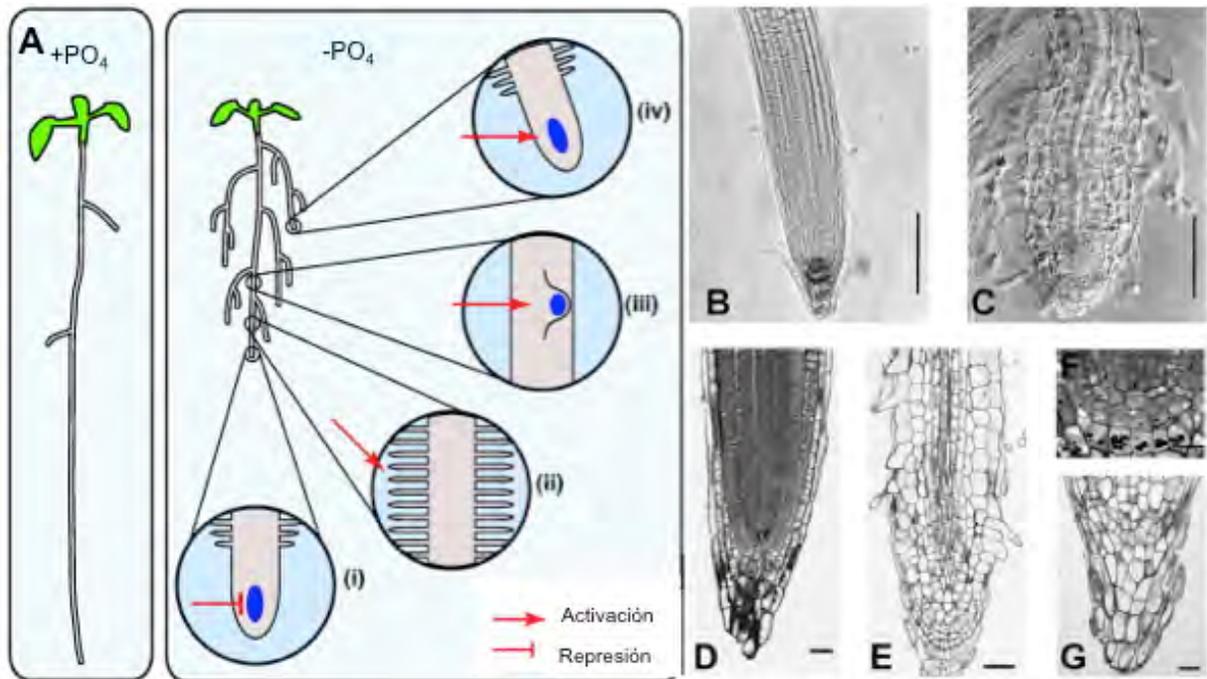
### II.3.1 El fósforo en las plantas

El fósforo es un macronutriente debido a que las plantas lo requieren en cantidades relativamente altas. Es un elemento fundamental en la estructura del DNA, RNA, ATP, NADPH y membranas fosfolípídicas; participa en procesos de transferencia de

energía como la fotosíntesis, la respiración y en procesos de señalización (Plagiari *et al.*, 2017; Młodzińska y Zboińska, 2016).

En deficiencia de fosfato, el sistema radicular sufre modificaciones producidas por señales locales y sistémicas que aumentan su capacidad de absorción. Las respuestas fenotípicas que se observan en la mayoría de las plantas incluyen follaje pequeño, acumulación de antocianinas, un cese en el crecimiento y diferenciación de la raíz primaria (crecimiento determinado), aumento en el desarrollo de raíces laterales, aumento en el tamaño y densidad de pelos radicales (Fig. 4), exudación de ácidos orgánicos y fosfatasas hacia la rizósfera, inducción o aumento en la expresión de transportadores de Pi (fósforo inorgánico) de alta afinidad, así como cambios en las interacciones raíz-microbioma (Abel *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2002, 2005; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014; Bouain *et al.*, 2016; Ham *et al.*, 2018).

La deficiencia de fosfato ocasiona un estrés significativo en las plantas, esto es reflejado en la inducción de la expresión de genes relacionados con la resistencia a patógenos, el catabolismo de toxinas y enzimas involucradas en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Misson *et al.*, 2005). En condiciones de deficiencia, el fosfato se puede removilizar dentro de las plantas. Este proceso involucra la relocalización específica del P del follaje y de la raíz, la liberación del fosfato vacuolar y el reemplazo de fosfolípidos de membrana por sulfolípidos o galactolípidos (Zhang *et al.*, 2014). En condiciones de suficiencia, el fosfato estimula el crecimiento y acelera la maduración de las plantas (Pagliari *et al.*, 2017).



**FIGURA 4. Fenotipo característico de la deficiencia de fósforo en *Arabidopsis thaliana*.** (A) Esquema que representa plántulas de *Arabidopsis thaliana* en medio con suficiencia de fósforo (+PO<sub>4</sub>) y en deficiencia de fósforo (-PO<sub>4</sub>) en donde se muestran las respuestas típicas a este estrés, (i) inhibición del crecimiento de la raíz primaria, (ii) aumento en el número y longitud de pelos radiculares, (iii) aumento en la formación de raíces laterales, así como (iv) aumento en la longitud de raíces laterales. (B) Punta de la raíz primaria de *A. thaliana* en suficiencia de fosfato, donde se observan gránulos de almidón en la cofia. (C) Punta de la raíz primaria de *A. thaliana* crecida en deficiencia de fósforo, donde se observa el crecimiento determinado, característica típica de esta deficiencia. (D) Sección longitudinal de la punta de la raíz de *Arabidopsis* en suficiencia de fósforo. (E) Sección longitudinal de la punta de la raíz de *Arabidopsis* en deficiencia de fosfato. (F) Acercamiento a la zona del centro quiescente y células de la columela en suficiencia de fosfato. (G) Acercamiento a las células de la columela de la punta de la raíz de una plántula de *Arabidopsis* crecida en medio con deficiencia de fósforo. Modificado de Péret *et al.*, 2011 y Sánchez-Calderón, 2005.

### II.3.2 Regulación de la homeostasis del fósforo en *Arabidopsis thaliana*

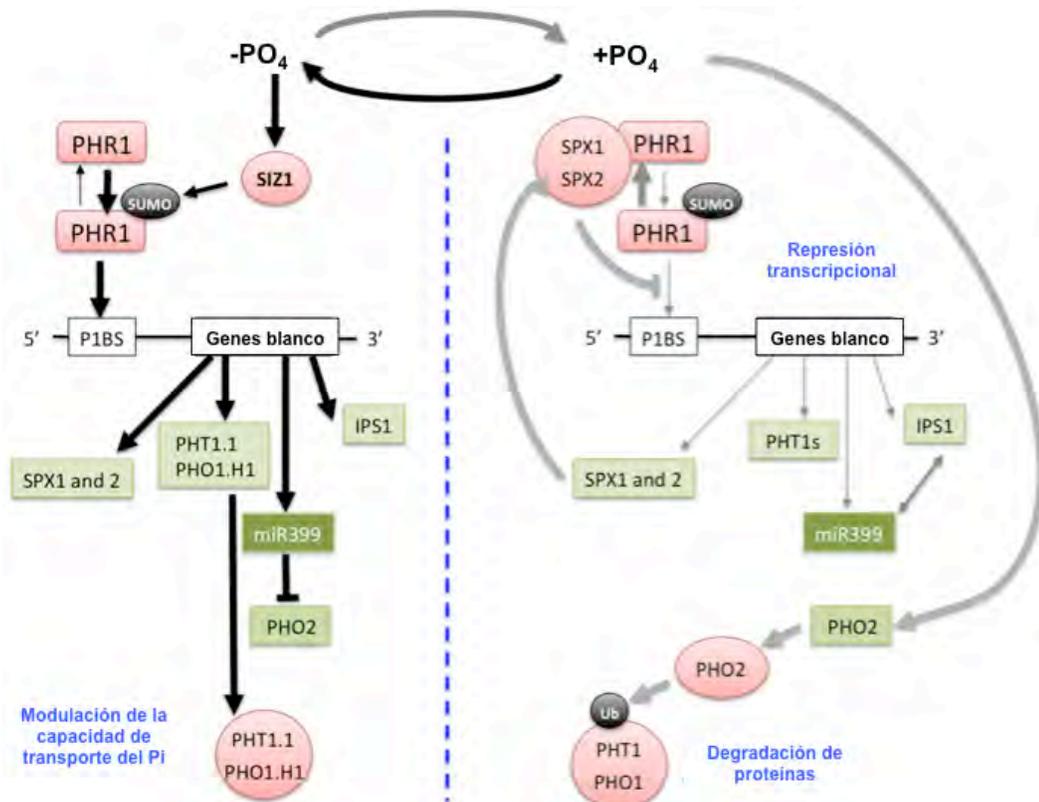
La deficiencia de fósforo se percibe localmente por el sistema radicular, específicamente en la punta de las raíces, sin embargo, a la fecha se desconocen los mecanismos moleculares de este proceso. Se propone 1) la presencia de un receptor localizado en la membrana plasmática, que reacciona ante los cambios en la concentración externa del nutriente y/o 2) un receptor intracelular que se modifica por la concentración interna de fósforo (Zhang *et al.* 2014). Entre las moléculas que participan como señales de deficiencia, se encuentra el mismo fósforo, hormonas, miRNAs y la sacarosa. Dichas señales son movilizadas a través del sistema vascular tanto de la raíz hacia el follaje, como del follaje hacia la raíz (Zhang *et al.*, 2014).

AtPHR1 (*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1*) es un regulador central de la señalización de fósforo. Es un factor transcripcional de la familia MYB-CC y se localiza en el núcleo independientemente del estatus de Pi en la planta. La regulación de AtPHR1 sobre genes río abajo requiere de la presencia de un elemento P1BS en los promotores, que es una secuencia de unión de PHR1 tipificada por un palíndromo imperfecto (GnATATnC) (Rubio *et al.*, 2001; Yang y Finnegan, 2010; Li *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017).

AtPHR1 no responde a la deficiencia de Pi a nivel transcripcional e incluso traduccional, sin embargo, la actividad de la proteína que codifica podría ser modificada a niveles post-traduccionales ya sea mediante proteínas modificadoras u otras proteínas en diferentes condiciones de Pi. El gen AtSIZ1 [parálogo del gen SIZ1 en levaduras], codifica una proteína que contiene un dominio SAP (SCAFFOLD ATTACHMENT FACTOR) y un dominio Miz (Msx2-INTERACTING ZINC FINGER) (Strunnikov *et al.*, 2001), actúa como una ligasa E3 de ubiquitina (SUMO, por sus siglas en inglés) y media la sumoilación *in vitro* de AtPHR1 (Fig. 5), movilizándolo al núcleo donde regula la expresión de genes de captación de Pi (Wang *et al.*, 2017).

Bajo condiciones fisiológicas normales se requiere de transporte activo del Pi desde el suelo hacia el interior de la raíz a través de la membrana plasmática, debido a la

alta concentración interna de Pi y al potencial negativo de la membrana celular (Schachtman *et al.*, 1998). Por lo tanto, la captación de fosfato se da por transporte activo mediado principalmente por proteínas PHT (*PHAGOSOMAL NUTRIENT TRANSPORT*). Dichos transportadores actúan como cotransportadores de protones (Smith, 2002).



**FIGURA 5. Esquema de la regulación de genes de respuesta a deficiencia de fosfato mediada por PHR1.** Bajo deficiencia de fosfato ( $-PO_4$ ) la activación de los genes de las subfamilias PHT1 y PHO1, requiere de la unión del factor transcripcional PHR1 al elemento-*cis* presente en la región promotora de los genes. PHR1 es sumoilado por SIZ1; adicionalmente los reguladores post-transcripcionales de las proteínas transportadoras de Pi (PHT1.1, PHO1.H1) también son activados por PHR1. De entre estos reguladores el micro-RNA miR399 regula negativamente a la ubiquitina conjugasa E2 PHO2, que se encarga de ubiquitinar a PHT1 y a PHO1 para su degradación. Bajo suficiencia de fosfato ( $+PO_4$ ) los genes blanco de PHR1 son reprimidos transcripcionalmente y la expresión de PHO2 es activada, lo que promueve la degradación de los transportadores de Pi. Esta represión transcripcional está mediada a través de la percepción de Pi de las proteínas nucleares SPX que interactúan con PHR1 de manera dependiente de Pi, para inhibir la unión de PHR1 a su secuencia P1BS, encontrada en la región promotora de los genes de respuesta a Pi. Los colores representan: en verde, transcritos; rojo, proteínas; negro,

modificaciones post-traduccionales; el grosor de las flechas es proporcional a la fuerza del flujo considerado. Modificado de Briat *et al.* (2015).

La familia de transportadores de fósforo PHT, cuenta con 5 subfamilias (Sun *et al.*, 2017). Las subfamilias PHT2, PHT3 y PHT4, están integradas por proteínas transportadoras de baja afinidad, la subfamilia PHT5 aún no se ha estudiado a fondo, y la subfamilia PHT1 está integrada por proteínas transportadoras de alta afinidad (Peñaloza *et al.*, 2016). De estas subfamilias, solamente PHT1 (*PHOSPHATE TRANSPORTER 1*) participa en la captación del fosfato del suelo. En esta subfamilia se agrupan 9 miembros, que comparten un alto nivel de similitud (61%) y sus patrones de expresión suelen traslaparse (Ayadi *et al.*, 2015). Cinco transportadores de esta subfamilia han sido analizados y se ha demostrado su expresión en raíces, así como una sobreexpresión en condiciones de deficiencia de Pi (Wang *et al.*, 2017). Los miembros *PHT1;1* y *PHT1;4*, muestran una mayor expresión que el resto de los integrantes de esta familia y se expresan en la epidermis, en pelos radicales y en la cofia de la raíz primaria (Shin *et al.*, 2004). *PHT1;1* contribuye en la captación de Pi en condiciones de suficiencia, mientras que *PHT1;4* (cuyos sinónimos son PHT4 y AtPT2, en este trabajo utilizaremos el nombre de AtPT2), *PHT1;8* y *PHT1;9* parecen captar Pi solamente en condiciones de deficiencia (Ayadi *et al.*, 2015).

Las plantas que crecen en deficiencia de fosfato aumentan la expresión de genes que participan en la síntesis y secreción de enzimas que químicamente aumentan la disponibilidad y la removilización del Pi (Steffen *et al.*, 2002; Smith, 2002). Además exudan ácidos orgánicos, malato y citrato principalmente, para facilitar la quelación de cationes; esto también facilita la movilización de compuestos asociados al Pi como el  $\text{FePO}_4$ ,  $\text{AlPO}_4$  o  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (Ruíz-Herrera, 2012).

Una vez que ha ingresado al simplasto, el fósforo es metabolizado en el citosol o transportado a células vecinas o a organelos, entre los cuales destaca la vacuola como un reservorio temporal en el cual se almacena alrededor del 70-95% del Pi intracelular (Gu *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). La vacuola también destaca como

reservorio del hierro, un metal con el que el fosfato interactúa y del cual se hablará en el siguiente capítulo.

## **II.4 El hierro (Fe)**

El hierro es uno de los elementos más importantes para la vida en la Tierra; prácticamente todos los organismos lo requieren para sobrevivir, exceptuando solamente a las bacterias *Lactobacillus plantarum* (Archivald, 1983) y *Borrelia burgdorferi* (Posey y Gherardini, 2000), que en su lugar utilizan manganeso.

A pesar de ser el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, debido a sus propiedades químicas (alta reactividad con el ambiente puesto que puede cambiar su estado de oxidación con relativa facilidad), el hierro, suele unirse a otros elementos; en su mayoría se le encuentra en forma de minerales de silicato y como óxidos e hidróxidos de hierro, compuestos altamente estables e insolubles (Mielczarek y Bertsch, 2000; Juárez-Sanz, 2007; Kim y Guerinot, 2007). Esto ocurre principalmente en condiciones alcalinas y aerobias, así como en suelos calcáreos, los cuales conforman un tercio de los suelos cultivables del mundo (Kim y Guerinot, 2007; Kobayashi y Nishizawa, 2014).

### **II.4.1 El hierro en las plantas**

En las plantas el hierro es un micronutriente esencial, requerido en reacciones enzimáticas y procesos biológicos fundamentales como la síntesis de DNA, hormonas, clorofilas y la respiración, donde participa en la transferencia de electrones a través de reacciones redox reversibles uniéndose en sitios activos de metaloproteínas. El hierro también es requerido por los cloroplastos para mantener la integridad funcional y estructural de las membranas de los tilacoides. Además, es incorporado a numerosas proteínas ya sea en forma de agregados Fe-azufre (S), como parte del grupo hemo o como hierro libre (Wu *et al.*, 2005; Juárez *et al.*, 2007; Kim y Guerinot, 2007, Kobayashi y Nishizawa, 2015).

La concentración óptima de hierro en las plantas es de  $1 \times 10^{-9}$  –  $1 \times 10^{-4}$  M (Kim y Guerinot, 2007), cantidades por debajo de dicha concentración provocan diferentes

respuestas morfológicas y fisiológicas que incluyen la clorosis en el follaje, principalmente en hojas jóvenes, así como una reducción general de la biomasa. En el sistema radicular se observa una disminución en la elongación de la raíz primaria, aumento en el número de raíces laterales y el número de pelos radiculares, además de la exudación de compuestos que solubilizan hierro (Kim y Guerinot, 2007, Juárez *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2008; Arizmendi-Galicia, 2011). Sin embargo, el exceso de hierro también es dañino, ya que el ion  $Fe^{+2}$  ionizado cataliza la generación de especies reactivas de oxígeno en la reacción de Fenton, donde el  $H_2O_2$  es convertido a radicales hidroxilo altamente reactivos, lo que promueve el estrés oxidativo (Kobayashi y Nishizawa, 2014).

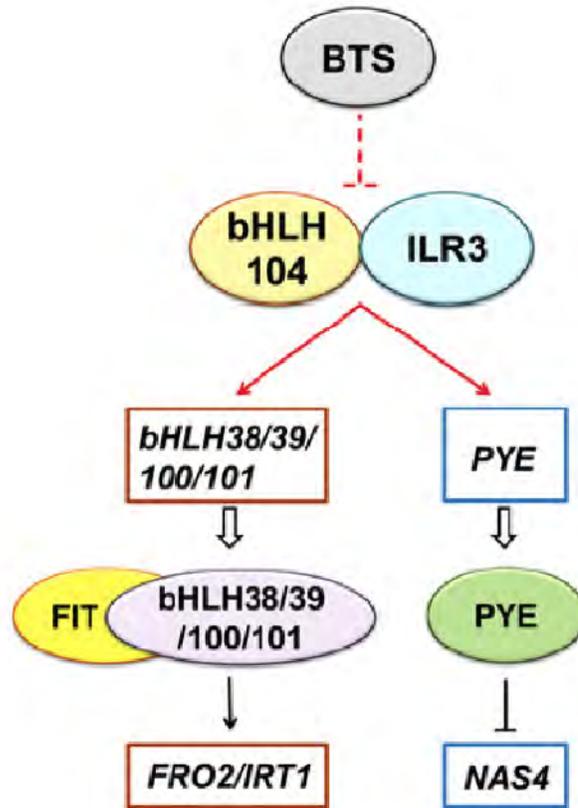
La toxicidad por hierro es común en suelos inundados y afecta principalmente a los cultivos como el arroz, provocando una disminución en su biomasa (Saaltink *et al.*, 2017). La vía de señalización del hierro se ha estudiado en condiciones de deficiencia, sin embargo, los genes maestros que participan en este control activan genes que reprimen la captación de hierro al alcanzarse niveles normales o excesivos en los tejidos vegetales.

#### **II.4.2 Regulación de la homeostasis del hierro en plantas**

Se han identificado factores transcripcionales clave que regulan a los genes relacionados con la captación del hierro, sin embargo, no se han identificado los receptores que regulan estas respuestas (Kobayashi y Nishizawa, 2014). Recientemente, se ha propuesto que metales pesados como el Co, Ni, Cd y especialmente el Zn, desencadenan las respuestas a deficiencia de hierro en *Arabidopsis thaliana* (Lešková *et al.*, 2017). No obstante, hace falta probar experimentalmente que cualquiera de estos iones se una a un receptor que sea el encargado de regular la respuesta a la deficiencia de hierro.

Por otra parte, la proteína BTS (BRUTUS) se ha propuesto como el sensor de hierro en *Arabidopsis*. BTS es una proteína E3 ubiquitina ligasa, que actúa como un regulador negativo de las respuestas a la deficiencia de hierro. BTS interactúa con los factores transcripcionales ILR3 (IAA-LEUCINE RESISTANT 3) (Fig. 6), bHLH115

y bHLH104 a los que suele denominarse como proteínas tipo PYE (PYEL). PYE (POPEYE) es un factor de transcripción de la familia bHLH cuya expresión es inducida en el periciclo bajo deficiencia de hierro y está co-regulada con BTS; sin embargo, dichas proteínas no interactúan físicamente. PYE regula negativamente genes involucrados en la movilización del hierro desde la raíz hacia el follaje (Long *et al.*, 2010; Selote *et al.*, 2015).



**FIGURA 6. Modelo de la regulación a las respuestas de deficiencia de hierro.** En este modelo propuesto por Zhang *et al.* (2015), se propone la interacción de bHLH104 con ILR3, este heterodímero regula la expresión de los genes *bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100*, *bHLH101* y *PYE* al unirse a sus promotores. Además se sugiere que bHLH104 e ILR3 están río debajo de BTS, una proteína ubiquitina ligasa E3 que regula negativamente la toma de hierro y se sabe que interactúa con bHLH104 e ILR3.

#### II.4.2.1 Estrategia I

Las plantas han desarrollado dos estrategias diferentes para la captación de hierro del suelo. Las plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas no gramíneas siguen la estrategia I, que se basa en la reducción del hierro; mientras que en plantas monocotiledóneas gramíneas utilizan la estrategia II, en la cual el hierro del suelo es quelado (Kim y Guerinot, 2007). Se hace mención solamente de la estrategia I, por ser la estrategia utilizada por *Arabidopsis*. Esta estrategia se basa en tres pasos principales: 1) la liberación de protones a la solución del suelo para disminuir el pH,

lo que permite la solubilización del  $\text{Fe}^{+3}$ ; 2) la reducción del  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  y 3) el transporte del hierro reducido hacia los diferentes tejidos de la planta.

Bajo deficiencia de hierro se liberan protones hacia la rizósfera, lo que disminuye el pH y aumenta la solubilidad de  $\text{Fe}^{+3}$ . En este proceso participa el citocromo b5 reductasa 1 (CBR1) que a través de un mecanismo aún desconocido, aumenta el contenido de ácidos grasos insaturados, que a su vez activan enzimas de la familia de las  $\text{H}^+$ -ATPasas unidas a la membrana y mediante la hidrólisis de ATP exportan protones hacia el exterior de la célula. En *Arabidopsis* hay 12 miembros de esta familia, de los cuales AHA2 y AHA7 (*Arabidopsis H<sup>+</sup>-ATPase*) son esenciales para una correcta respuesta a la deficiencia de hierro (Kim y Guerinot, 2007; Santi y Schmidt, 2009; Jeong *et al.*, 2017). En este proceso de reducción también hay exudación de compuestos fenólicos, y de cumarinas, mediada por PDR9 - *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9*) (Fig. 7) (Schmidt *et al.*, 2014; Clemens y Weber, 2015).

Para la mayoría de las plantas es más sencillo captar hierro reducido ( $\text{Fe}^{+2}$ ) que hierro oxidado ( $\text{Fe}^{+3}$ ), aunque esto depende de la especie vegetal (Juárez-Sanz *et al.*, 2007). A la fecha se han descrito 8 proteínas en *Arabidopsis thaliana* que pertenecen a la familia de genes de Fe (III) quelato reductasas (AtFROs), de las cuales FRO2 (*FERRIC REDUCTION OXIDASE 2*) es la responsable de la reducción de hierro a nivel de la superficie de la epidermis de la raíz (Wu *et al.*, 2005). La expresión de FRO2 está altamente coordinada a nivel transcripcional y postranscripcional con la expresión de IRT1 (*IRON-REGULATED TRANSPORTER 1*), el principal transportador de hierro reducido. La expresión de AHA2, IRT1 y FRO2 está controlada por el factor transcripcional FIT1, el cual para poder ser funcional tiene que formar heterodímeros con otras proteínas de la familia bHLH: bHLH38, bHLH 39, bHLH 100 y bHLH101 (Connorton *et al.*, 2017; Jeong *et al.*, 2017).

Una vez que el hierro ha sido captado en la epidermis, es transportado mediante las vías simplástica y apoplástica. En el simplasto, es inmediatamente quelado, lo cual evita que forme radicales hidroxilo, además la quelación del hierro es necesaria para su transporte a corta y larga distancia. Algunos ejemplos de agentes quelantes del

hierro en la planta son el citrato, que se une al  $\text{Fe}^{+3}$  y la nicotianamina que se une a  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$ . Un pequeño porcentaje del hierro quelado, es disociado por reacciones de equilibrio, y estos iones (principalmente  $\text{Fe}^{+2}$ ) son incorporados a proteínas férricas y otras biomoléculas (Kim y Guerinot, 2007; Kobaysahi y Nishizawa, 2014; Jeong *et al.*, 2017).

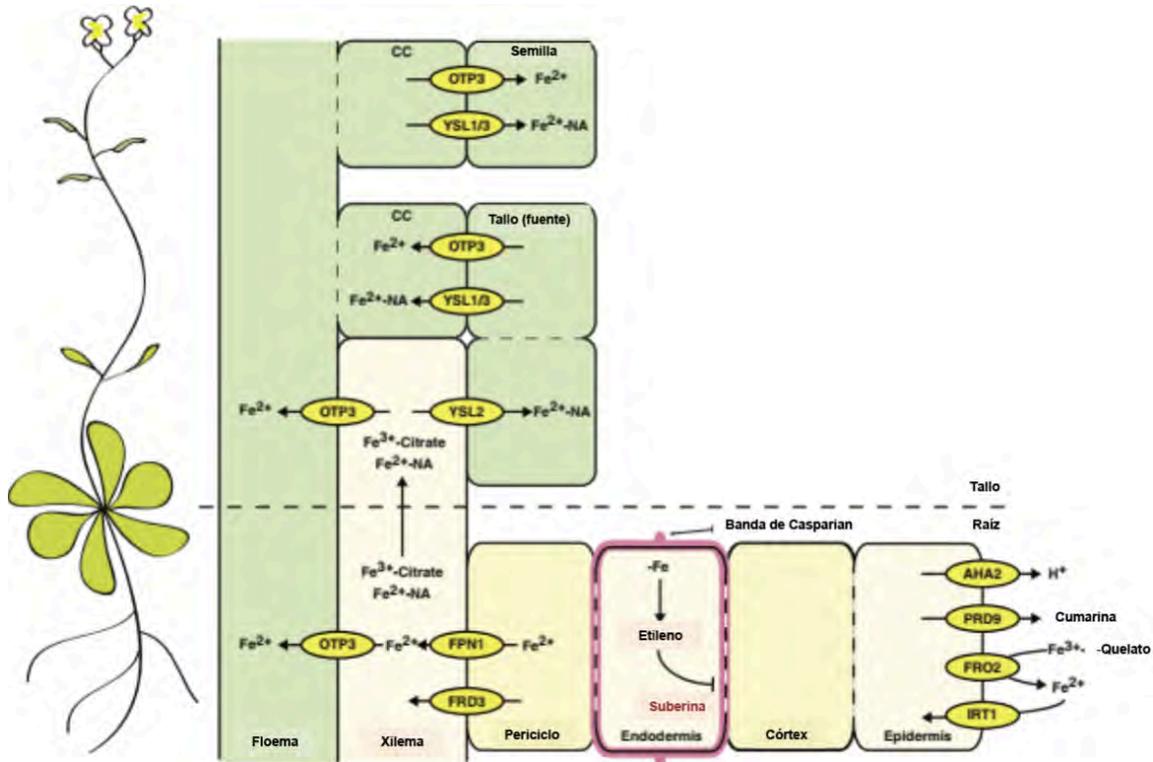
Las proteínas como FDR3 (*Fe-DEFICIENCY RELATED 3*), YSL1 (*YELLOW STRIPE-LIKE*) y OPT3 (*OLIGOPEPTIDE TRANSPORTER 3*) participan en el transporte interno del hierro (Kim y Guerinot, 2007; Cassin *et al.*, 2009; Jeong *et al.*, 2017). Además, se ha sugerido que la concentración de nicotianamina (NA) en el apoplasto puede ser un punto de control para la homeostasis del hierro (Cassin *et al.*, 2009).

Las vacuolas acumulan el exceso de hierro y lo liberan al citosol cuando disminuye su disponibilidad en el suelo. Esto correlaciona con un aumento en la concentración de NA en la vacuola, mientras que en condiciones normales o de deficiencia, la NA se encuentra en el citosol. No se sabe si los complejos Fe-NA se translocan a la vacuola o si hay transportadores específicos de NA y los complejos se forman dentro de la vacuola. Cuando no hay nicotianamina, se forman precipitados de Fe (III) – fosfato, lo que sugiere que esta es necesaria para mantener el hierro vacuolar en su forma soluble (Kim y Guerinot, 2007). En la mutante *chloronerva*, no hay producción de NA, y aun cuando hay una acumulación de hierro, la planta muestra fenotipo de deficiencia (Walker y Conolly, 2008).

En las raíces el hierro se almacena principalmente en el apoplasto, en donde se encuentra en forma de hidróxido de hierro, fosfato férrico o unido a componentes de la pared celular como la pectina y la hemicelulosa, polisacáridos con alta carga negativa, que participan como sitios de intercambio de cationes (Sigel y Sigel, 1998). El hierro unido a la hemicelulosa es el reservorio de Fe más grande en la pared celular, este reservorio se ve disminuido en condiciones de deficiencia de hierro, mientras que la abundancia de Fe soluble en raíces aumenta (Curie y Mari, 2016).

Las ferritinas son proteínas de almacenamiento del hierro conformadas por 24 subunidades. En *Arabidopsis* se han encontrado 4 genes que codifican para estas

proteínas. En raíces de plantas crecidas en deficiencia de hierro hay una disminución en la expresión de FER1 (FERRITIN 1) y FER3 (FERRITIN 3) tiene una alta expresión en el meristemo, periciclo y endodermis (Jeong *et al.*, 2017). Las vacuolas en las células del tejido vascular son importantes para el almacenamiento del hierro; su removilización durante la germinación es crucial para el desarrollo de la plántula cuando el suministro de hierro es bajo (Kim y Guerinot, 2007).



**FIGURA 7. Esquema general del transporte de hierro desde la raíz al follaje.** Se ilustra la captación y transporte de hierro en la raíz de *A. thaliana*. En la epidermis hay una liberación de protones regulada por la ATPasa AHA2, ácidos orgánicos y cumarina, regulada por PRD9; lo anterior provoca una disminución del pH en la rizósfera y la consecuente liberación del hierro acomplejado en el suelo. La proteína FRO2 reduce al hierro y la proteína IRT1 lo transporta hacia la epidermis. Una vez que el hierro se ha internalizado en la epidermis, es transportado vía simplástica y apoplástica hacia la endodermis; FDR3 y FPN1 transportan el complejo citrato-Fe hacia el xilema. El hierro quelado por citrato o nicotianamina es translocado al follaje. Los complejos de Fe-NA son transportados lateralmente desde el xilema hacia células vecinas mediante YSL2, mientras que YSL1 y YSL3 los transportan desde el follaje, hacia las semillas. OPT3 participa en la redistribución del hierro hacia tejidos en desarrollo.

### **II.4.3 Factores de transcripción bHLH que regulan las respuestas a la deficiencia de hierro**

Como se ha descrito en párrafos anteriores, durante la deficiencia de hierro hay una extensa participación de factores transcripcionales de la familia bHLH. Esta superfamilia fue primeramente descrita en animales, en procesos como la determinación sexual, neurogénesis, miogénesis, hematopoyesis y el desarrollo del corazón. Estudios posteriores demostraron la existencia de estas proteínas en levaduras, participando en el control de la captación de fosfato y en la glucólisis; mientras que en plantas modulan las vías de señalización del metabolismo secundario, diferenciación y respuestas a factores ambientales (Heim *et al.*, 2003; Jones 2004; Pires y Dolan, 2009).

El dominio básico hélice-vuelta-hélice (bHLH) está conformado por 50 – 60 aminoácidos y consta de dos regiones con funciones distintas: la región básica, localizada en el extremo N terminal, es la encargada de la unión al DNA, tiene alrededor de 15 aminoácidos los cuales en su mayoría son residuos básicos; y la región HLH, en el extremo C-terminal que es la que permite la dimerización y se estructura principalmente por residuos hidrofóbicos que forman dos hélices  $\alpha$  separadas por una región de secuencia y longitud variables (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortíz *et al.*, 2003).

Análisis por cristalografía han mostrado que la interacción entre dos regiones HLH de dos polipéptidos separados lleva a la formación de homodímeros y/o heterodímeros y la región básica de cada uno se une a una mitad de la secuencia de reconocimiento del DNA. La secuencia de DNA que es reconocida por las proteínas bHLH es una secuencia consenso hexonucleotídica conocida como caja E (5'-CANNTG-3'). Se cree que la dimerización y el reconocimiento de diferentes cajas E proveen mecanismos a través de los cuales las proteínas bHLH generan suficiente diversidad para regular una variedad de diferentes programas transcripcionales. En este contexto, las proteínas bHLH podrían funcionar como reguladores negativos de las propias proteínas bHLH, mediante la formación de heterodímeros incapaces de unirse al DNA (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortíz *et al.*, 2003).

Se ha descrito la participación de otros factores bHLH en el control de la homeostasis del hierro. Los homólogos bHLH34 y bHLH104 activan la transcripción de los genes *bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100* y *bHLH101*. La participación de bHLH100 y bHLH101 como activadores de FIT, se sugirió por su analogía con bHLH38 y bHLH39, pero no hay evidencia experimental de ello. En 2012 se demostró que bHLH100/101 no interactúan con los genes blanco de FIT sugiriendo que tales factores actúan independientemente de FIT (Sivitz *et al.*, 2012). Se ha sugerido que bHLH34, bHLH104 y bHLH105 (ILR3) forman homodímeros o heterodímeros regulando de manera no redundante la homeostasis del hierro (Li *et al.*, 2016). También se ha descrito que bHLH115 se une a los promotores de los factores transcripcionales *bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100* y *bHLH101* y PYE, además de que es regulado por BTS (Liang *et al.*, 2017).

#### **II.4.3.1 El factor transcripcional ILR3**

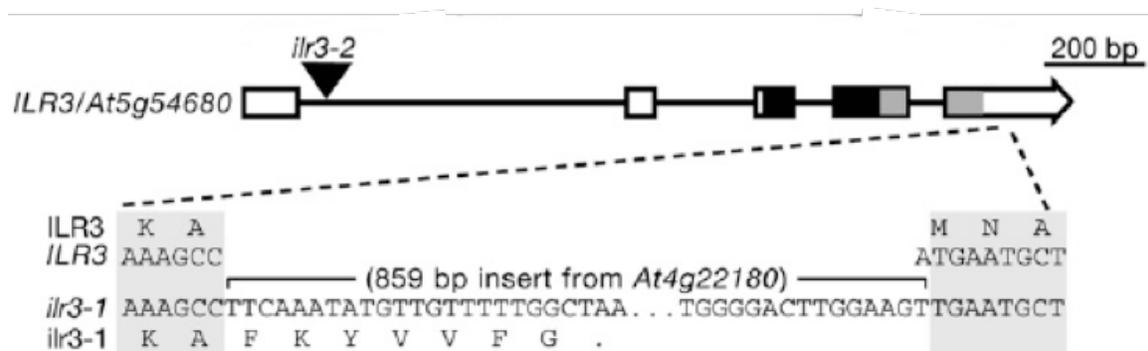
El gen *IAA-LEUCINE RESISTANT 3 (ILR3)* codifica una proteína de 234 aminoácidos de la familia bHLH, de las cuales solo 7 miembros contienen un dominio canónico de cierre de leucinas, incluyendo a ILR3 y bHLH115. El dominio de cierre de leucinas es contiguo a la segunda hélice del dominio bHLH y al igual que este último, también media la dimerización. Su secuencia consiste en un heptámero, con residuos hidrofóbicos y apolares en las posiciones primera y cuarta; y residuos polares y cargados en las posiciones restantes. La leucina es el residuo que predomina en la posición 4, de ahí el nombre de este dominio (Jones, 2004). *ILR3* se expresa en plántulas en las puntas de la raíz primaria y de las raíces laterales; en la vasculatura y en las estípulas (Rampey *et al.*, 2006).

La mutante alélica *ilr3-1 (At5g54680)* fue aislada de una progenie de semillas Col-0 mutagenizadas mediante bombardeo rápido de neutrones, las cuales mostraron resistencia de la raíz a IAA-Leu. La mutación consistió en una delección de un par de bases en el último exón del gen ILR3 localizado en el cromosoma 5; seguido de esta modificación se insertó una secuencia de 859 pares de bases, provocando un codón

de termino prematuro. El dominio básico, el dominio HLH y el dominio de cierre de leucinas están inalteradas en la proteína *ilr3-1*. La inserción removió 64 aminoácidos del extremo C-terminal, el cual es un dominio altamente conservado en la subfamilia de ILR3. La mutante *ilr3-1* es resistente a IAA-Leu, IAA-Ph y Mn, e hipersensible a medios carentes de sacarosa (Rampey *et al.*, 2006).

La mutante alélica *ilr3-2* es una mutante recesiva de inserción de T-DNA, aislada por el Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. La inserción está localizada en la posición 186 de *ILR3*. Esta inserción permite la traducción de la proteína hasta el primer exón, truncándola antes de cualquier región conservada. Esta mutante muestra sensibilidad a IAA-Leu e IAA-Phe (Rampey *et al.*, 2006). En un estudio reciente se demostró que en esta mutante hay una disminución en la expresión de los genes *FIT*, *FRO2*, *IRT1*, *bHLH38*, *bHLH39*, *bHLH100* y *bHLH101* (Zhang *et al.*, 2015).

ILR3 modula la hidrólisis de auxinas conjugadas de una manera Fe-dependiente, quizá mediante el control transcripcional de la expresión de transportadores de hierro (Selote *et al.*, 2015). También se ha propuesto que ILR3 forma heterodímeros con *bHLH104* y que en conjunto regulan a los promotores de los genes *bHLH38*, *bHLH100*, *bHLH101* y *PYE* (Zhang *et al.*, 2015).



**FIGURA 8. Las mutaciones *ilr3-1* e *ilr3-2*.** Esquema donde se muestra la inserción de T-DNA en la mutante *ilr3-2* después del primer exón de *ILR3*; así como la mutación en *ilr3-1* localizada en el cromosoma 5. Dicha mutación consistió en una deleción de un par de bases en el último exón del gen *ILR3* localizado en el cromosoma 5; seguido de esta modificación se insertó una secuencia de 859 pares de bases, provocando un codón de termino prematuro. Modificado de Rampey *et al.* (2006).

## II.5. La interacción hierro-fosfato en plantas

El estudio de la interrelación de hierro y fósforo es importante porque la interacción de estos elementos comienza desde su presencia en el suelo, posteriormente en la superficie de la raíz y finalmente dentro de la planta. La interacción de nutrientes ha demostrado ser un punto clave en la manifestación de síntomas de deficiencia y toxicidad; en algunos casos estos síntomas pueden ser aliviados mediante el aumento o la disminución de otro nutriente (Ward *et al.*, 2008).

En el suelo el fósforo inorgánico suele unirse al hierro, lo que limita la disponibilidad de ambos; en la superficie de la raíz se forman placas de Fe que actúan como barrera del movimiento del fosfato hacia la raíz; dentro de la planta la retención del fosfato en las raíces aumenta y la translocación de fosfato hacia el follaje disminuye en una manera dependiente de la concentración de Fe cuando es absorbido al mismo tiempo que el fósforo. Además, se ha demostrado que el Fe ligado a ferritina, suele unirse al fosfato y que en exceso de fosfato se puede inducir clorosis en hojas, aun cuando las concentraciones de hierro sean similares a aquellas de hojas sanas (Ward *et al.*, 2008).

Misson y col. (2005), examinaron la acumulación de macronutrientes y micronutrientes en plantas crecidas en deficiencia de fosfato, encontrando para el caso de los micronutrientes un aumento en las concentraciones de zinc (Zn) en el follaje y de hierro (Fe) en follaje y raíz, siendo la acumulación de este último elemento, la más evidente. Además analizaron la expresión de 22, 810 genes de *Arabidopsis* mediante microarreglo. En este estudio se reportó la represión del gen *IRT1* (transportador de hierro reducido) en las raíces e inducción de *FER1* (Ferritina, proteína que se encuentra en el cloroplasto y está involucrada en el almacenamiento seguro y biodisponible del hierro) en hojas, lo cual indicó una respuesta a una sobreacumulación de hierro provocada por la deficiencia de fosfato. Se propone que esto se debe a que al no haber fosfato en el medio, la disponibilidad de hierro y otros metales aumenta, lo que correlaciona con la inducción de genes que codifican para transportadores de diversos metales, así como de transportadores ABC (*ATP-BINDING CASSETTE*) en deficiencia de P, sugiriendo que la respuesta adaptativa de

la planta a dicha condición es explorar el suelo con la raíz y absorber metales que formen complejos con el fosfato, para poder usar el fosfato liberado. Actualmente se sabe que los factores transcripcionales de respuesta a deficiencia de fosfato, PHR1 y PHRL1 regulan la expresión de *FER1*; mediante la interacción con el elemento 2 de la región promotora de *FER1*, que contiene un dominio P1BS (sitio de unión de PHR1). Dicha regulación no involucra a IDRS (*IRON-DEPENDENT REGULATORY SEQUENCE*) presente en el promotor de *FER1*, la cual es una caja promotora involucrada en la regulación dependiente de hierro. La respuesta de *FER1* a la deficiencia de fósforo es independiente del estatus de hierro de las plantas y es iniciada específicamente por la deficiencia de fosfato (Bournier *et al.*, 2013).

La baja disponibilidad de fosfato imita el fenotipo ocasionado por exceso de hierro (Hirsch *et al.*, 2006; Ward *et al.* 2008). La toxicidad por hierro, al igual que la deficiencia de fosfato inhibe la elongación de la raíz primaria. En *Arabidopsis* la inhibición en la elongación de la raíz primaria está regulada por la concentración de hierro en la planta y más que una adaptación a la deficiencia de fosfato, es una respuesta adversa debida a la intoxicación ocasionada por el hierro. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en deficiencia de fosfato y deficiencia de hierro mostraron un re-establecimiento en la elongación de la raíz primaria, además la expresión del transportador AtPT2 se localizó a lo largo de todo el sistema radicular. Así mismo en deficiencia de fósforo y suficiencia de hierro se observó mayor elongación de la raíz primaria en los ecotipos Llagostera-0 (LI-0) y Bay-0 (Bayreuth) en comparación a Col-0, se propone que esto es debido a una mayor tolerancia a la concentración de Fe en los tejidos de LI-0 y a la ausencia de una oxidasa de multicobre en Bay-0. Plantas con una raíz primaria más larga se adaptan mejor a la deficiencia de fosfato; ya que presentaron mayores tasas de absorción y mayor concentración de fosfato en tejidos, así como mayor peso seco (Ward *et al.*, 2008). Adicionalmente, la deficiencia de fósforo modifica el almacenamiento del hierro, el cual en vez de llevarse a cabo en vacuolas, se localiza en cloroplastos; y correlaciona con un aumento en la expresión de genes y contenido de la proteína ferritina, así como una inducción de *NAS3* (*NICOTIANAMINE SYNTHASE 3*), gen que codifica a una enzima que participa en la biosíntesis de nicotianamina, un

quelante metálico esencial para la distribución del hierro en plantas, ZIP5 (*ZINC TRANSPORTER 5 PRECURSOR*) y otros genes que participan en el transporte de metales (Hirsch *et al.*, 2006).

De manera interesante, al crecer plántulas de *Arabidopsis* en exceso de hierro, se encontraron niveles altos de expresión del transportador AtPT2; a pesar de que el medio era abundante en Pi, las plantas mostraron una respuesta típica a la deficiencia de fósforo (Ward *et al.*, 2008). Müller y col. (2015) demostraron que la acumulación de hierro en la punta de la raíz es clave para observar el fenotipo de deficiencia de Pi, ya que si el hierro se encontraba en la zona de diferenciación pero no en la punta, las raíces se elongaban normalmente. Además, concluyeron que las dinámicas histológicas de acumulación de Fe están delimitadas por cambios en las pozas de Fe<sup>+3</sup>, ya que los niveles de Fe<sup>+2</sup> que encontraron fueron muy bajos.

LPR1 (LOW PHOSPHATE ROOT 1) y PDR2 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 2) son proteínas de la vía secretora y sus dominios de expresión se sobrelapan en el meristemo apical de la raíz (MAR). Ambos genes interactúan genéticamente (la doble mutante *lpr1lpr2* suprime el fenotipo de hipersensibilidad de raíz corta de *pdr2* en bajo Pi). El módulo LPR1-PDR2 regula la acumulación de Fe y calosa en la punta de la raíz primaria, así como la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo que impacta directamente en el mantenimiento del MAR y del nicho de células iniciales del MAR en deficiencia de Pi (Müller *et al.*, 2015). Al crecer plantas en medio con exceso de hierro, no hay deposición de calosa ni formación de superóxido. La organización del MAR se mantiene y la inhibición del crecimiento de la raíz primaria es menor al observado en -Pi (Müller *et al.*, 2015).

### **III. JUSTIFICACIÓN**

Las deficiencias de hierro y fósforo representan un problema para la agricultura a nivel mundial, ya que ambos elementos desempeñan funciones esenciales en las plantas. Actualmente se conocen parcialmente las vías de señalización que regulan las respuestas a las deficiencias de ambos nutrientes. En los últimos años se ha propuesto que existe una interacción a nivel genético de dichas vías, no obstante, se desconocen los componentes que participan en esta coordinación. ILR3 es uno de los factores transcripcionales que regulan la respuesta de la raíz a la deficiencia de hierro, sin embargo, se desconocen los mecanismos a través de los cuales actúa y su posible conexión con la deficiencia de fosfato. Establecer la conexión molecular, así como entender los mecanismos de regulación que utilizan las plantas en la deficiencia de hierro y de fósforo, permitirá proponer alternativas para la mejora en el uso de fertilizantes, tan necesarios para mantener la productividad de los cultivos.

#### **IV. HIPÓTESIS**

*ILR3* participa en la coordinación de la respuesta de la raíz a la deficiencia de hierro y fósforo.

#### **V. OBJETIVOS**

##### **V.1 OBJETIVO GENERAL:**

Estudiar la participación del factor transcripcional *ILR3* en la coordinación de la respuesta a la deficiencia de hierro y fosfato en *Arabidopsis thaliana*.

##### **V.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

Analizar la participación de *ILR3* en la respuesta de la arquitectura del sistema radicular en deficiencia fosfato.

Caracterizar la función de *ILR3* en la expresión de genes clave que participan en la adaptación de *Arabidopsis thaliana* a la deficiencia de fosfato y hierro.

Determinar la participación del gen *ILR3* en la acumulación de Fe en condiciones contrastantes de suministro de fosfato y hierro.

## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### VI.1 Material biológico

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0), como control de cada uno de los experimentos realizados. En el caso de la evaluación de los componentes de la vía de señalización del hierro se utilizaron las mutantes *ilr3-1*, *ilr3-2* (Rampey *et al.*, 2006), *pye-1* y *bts-1* (Long *et al.*, 2010), así como las líneas transgénicas *ILR3:uidA* (Rampey *et al.*, 2006), *AtPT2:uidA* (Karthikeyan *et al.*, 2002), *DR5:GFP* (Ottenschaläger *et al.*, 2003) y *PIN1::PIN1:GFP* (Benková *et al.*, 2003). Además, se obtuvieron semillas de las cruces entre la mutante *ilr3-1* y las líneas transgénicas, *AtPT2:uidA*, *DR5:GFP* y *PIN1::PIN1:GFP*.

### VI.2 Desinfección de las semillas

Las semillas se desinfectaron superficialmente con 500 µl de etanol al 96% (v/v) y agitación durante 5 minutos. El etanol es retirado, se agregan 700 µl de hipoclorito de sodio al 20% (v/v) y se agita durante 7 minutos. Posteriormente, el hipoclorito de sodio es retirado y se realizan cinco enjuagues con 500 µl de agua destilada estéril. Las semillas se incuban a una temperatura de 4 °C durante 48 horas para promover y homogenizar la germinación.

### VI.3 Preparación del medio de cultivo y condiciones de crecimiento

El medio MS (Murashige y Skoog, 1962) se preparó con soluciones que contienen micronutrientes, macronutrientes, vitaminas y aminoácidos. El medio utilizado en este trabajo es medio de cultivo MS 0.2X modificado, al cual no se le añadieron vitaminas ni aminoácidos. Los tratamientos utilizados fueron: 1) control, que incluyó todos los nutrientes especificados por Murashige y Skoog (1962), 2)  $-\text{PO}_4$   $-\text{Fe}$ , es decir, medio sin fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y sin hierro ( $\text{FeSO}_4$ ), 3)  $-\text{PO}_4$ , medio sin fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y con

hierro ( $\text{FeSO}_4$ ) a una concentración de 20  $\mu\text{M}$ , 4)  $-\text{Fe}$ , medio con suficiencia de  $\text{PO}_4$  (200  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y sin hierro ( $\text{FeSO}_4$ ), 5)  $-\text{Fe} + \text{Fz}$ , medio con suficiencia de  $\text{PO}_4$  (200  $\mu\text{M}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sin hierro ( $\text{FeSO}_4$ ) y adicionado con ferrozina (Fz) a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , 6)  $-\text{P} + \text{Fz}$ , medio sin fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) sin hierro ( $\text{FeSO}_4$ ) y adicionado con ferrozina (Fz) a una concentración de 100  $\mu\text{M}$ , 7)  $+\text{PO}_4 + \text{Fz}$ , medio con suficiencia de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), sin hierro y con adición de ferrozina al 100  $\mu\text{M}$  ( $\text{FeSO}_4$ ), 8) fósforo ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a concentraciones de 0, 10, 100, 250, 1000 y 2000  $\mu\text{M}$ . La ferrozina es un quelante con alta especificidad por el hierro y se utiliza especialmente para quelar trazas de dicho elemento que pudieran incorporarse con la adición de agar. La ferrozina (3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulfonic acid sodium salt) se disuelve en solución de HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) al 50 mM. Los medios fueron enriquecidos con 0.6% de sacarosa, el pH fue ajustado a 5.7 con hidróxido de potasio (KOH) al 0.1 N y finalmente se adicionó agar para plantas (Phytotechnology) al 1% (w/v). El medio fue esterilizado durante 20 min a 120 °C y 15 libras de presión. El medio se vació en cajas de Petri de un tamaño de 100 x 15 mm y se dejó solidificar, las semillas se sembraron en el medio en una densidad de 10 plantas por caja y fueron incubadas en una cámara de crecimiento Percival AR95L con un fotoperiodo de 16 h luz/8 h de oscuridad, temperatura de 22 °C y humedad del 80%. Las cajas de Petri se colocaron en posición vertical con un ángulo de 75° de inclinación.

#### **VI.4 Análisis del desarrollo radicular *in vitro***

Las mutantes *ilr3-1*, *ilr3-2*, *pye-1* y *bts-1* fueron crecidas en deficiencia de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ). Para analizar su respuesta a dicha condición, se analizó la longitud de la raíz primaria y la densidad de raíces laterales. La longitud de la raíz primaria fue cuantificada con una regla. La densidad de raíces laterales se obtuvo dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria, para obtener el número de raíces laterales se utilizó un microscopio estereoscópico Leica MZ6/L2 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) en el objetivo 0.8X. Para cada variable se

realizaron mediciones de al menos 15 plantas provenientes de 3 placas independientes.

## VI.5 Cruzas

La polinización cruzada entre líneas transgénicas y mutantes es una herramienta utilizada para saber cómo se afecta la expresión de una proteína reportera, fusionada a la región promotora de un gen de interés. En este trabajo, se realizaron cruzas entre la mutante *ilr3-1* y las líneas reporteras *AtPT2:uidA*, *DR5:GFP* y *PIN1::PIN1:GFP*. La mutante *ilr3-1* se utilizó como receptora y las plantas transgénicas fueron las donadoras de polen. Para el caso de las plantas donadoras se seleccionaron flores maduras con los estambres y el gineceo expuestos, caso contrario para las plantas receptoras, en donde las flores seleccionadas fueron aquellas cuyo estigma se encontró parcialmente emergido, esto para evitar el uso de flores auto-polinizadas.

Con ayuda de unas pinzas de punta fina y un microscopio estereoscópico Leica MZ6/L2 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany), se ejerció presión en los pétalos de las plantas receptoras para lograr la emergencia completa del estigma, los estambres se escindieron de las flores de las plantas donadoras y el proceso de polinización se llevó a cabo mediante el contacto entre anteras y estigma. Las flores polinizadas se marcaron para su posterior identificación y cosecha. Las plantas fueron crecidas en una mezcla de materia orgánica estéril, perlita y vermiculita (sustrato) en una proporción de 3:1:1 y fueron regadas tres veces por semana en una cámara de crecimiento Percival AR95L. Durante el período de senescencia se cosecharon las silicuas de las flores polinizadas, se obtuvieron semillas heterocigotas (F1) que fueron crecidas en medio de selección con deficiencia de hierro. Debido a que la mutante *ilr3-1* es dominante y resistente a la deficiencia de hierro, las plantas seleccionadas fueron aquellas que presentaron el fenotipo de la planta mutante. Las plantas seleccionadas fueron crecidas en sustrato hasta que completaran su ciclo de vida, las semillas heterocigotas (F2) fueron colectadas y crecidas en medio carente de Fe ( $\text{FeSO}_4$ ). Se observó una segregación mendeliana de 9:3:3:1 y dominancia

incompleta, por lo que las plantas seleccionadas fueron aquellas que presentaron el fenotipo de *ilr3-1*. Para asegurar que no hubiera segregación, estas plantas fueron llevadas hasta la F3 donde finalmente se obtuvieron semillas homocigotas. Los lotes de estas semillas fueron analizadas mediante tinción histoquímica de la actividad de GUS o por microscopía confocal, para corroborar la presencia de las proteínas reporteras uidA o GFP respectivamente.

### **VI.6 Análisis histoquímico de la actividad de GUS y clareo de tejidos**

Para los análisis histoquímicos de GUS, las plántulas se incubaron toda la noche a 37 °C en el amortiguador de reacción de GUS que contiene: 0.5 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucoronido en NaHPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7.0;  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM; EDTA 10 mM; N-lauril-sarcosina 0.1%; Tritón X-100 0.1%, y el catalizador de la oxidación ferri y ferrocianuro de potasio 5 mM (Jefferson *et al.*, 1987). La clarificación de las plántulas se realizó de acuerdo al protocolo de Malamy y Benfey (1997), que consiste en los siguientes pasos: se elimina el buffer de tinción de GUS y se agrega un volumen de HCl 0.24 N en metanol al 20% colocando la muestra a 57 °C durante 60 min, transcurrido este tiempo se decanta la solución y se agrega un volumen de NaOH al 7% en etanol al 60% durante 20 min manteniendo la muestra a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega un volumen de etanol al 40, 20 y 10% sucesivamente por 15 min cada una y en este último sin decantar se agrega un volumen de glicerol al 50% por 1 h. Finalmente se elimina esta solución y se añade un volumen de glicerol al 50% en cuya solución la muestra puede ser almacenada hasta tres semanas. Para cada tratamiento al menos 10 plantas fueron analizadas. Las plántulas montadas fueron analizadas en un microscopio de contraste (Nomarsky) Leica DM 5500 B en los objetivos de 20X y 40X.

### **VI.7 Análisis mediante microscopía confocal**

Las plantas analizadas mediante microscopía confocal fueron montadas en portaobjetos y fueron teñidas con yoduro de propidio (IP) al 0.1% (v/v), para su

posterior observación en los objetivos de 20X y 40X en un microscopio confocal *Olympus Fluo-View FV1000-PME*. La cuantificación de la expresión de la proteína GFP se realizó con la ayuda del software ImageJ.

### **VI.8 Tinción de calosa con azul de anilina**

Esta tinción se realizó siguiendo el protocolo de Müller *et al.*, (2015). La tinción consiste en incubar las plantas en una caja de microtitulo durante 1.5 h con azul de anilina al 0.1% disuelta en un buffer de fosfato de sodio al 100 mM y a un pH de 7.2. Después de la incubación las plantas se montaron en un portaobjetos y se observaron en el microscopio confocal *Olympus Fluo-View FV1200-PME*.

### **VI.9 Técnica de Perls/DAB**

Para teñir  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+3}$  en los tejidos de la raíz bajo deficiencia de nutrientes se siguió la técnica Perls/DAB (Roschztardt *et al.*, 2009; Roschztardt *et al.*, 2010). Las plantas se incubaron en una solución de HCl al 4% (v/v) y ferrocianuro de potasio (solución de tinción de Perl) al 4% (v/v) durante 30 min. Transcurrido este tiempo se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Posteriormente, las plantas fueron incubadas en una solución de metanol con  $\text{NaN}_3$  al 0.01 M y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.3% (v/v) durante 1 h, al finalizar la incubación se realizaron dos lavados con buffer de fosfatos al 0.1 M y a un pH de 7.4. Para la reacción de intensificación con DAB las plantas se incubaron durante 3 minutos en una solución de buffer de fosfatos al 0.1 M (pH 7.4), con DAB al 0.025% (w/v) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0.005%. Para detener la reacción, las plántulas se enjuagaron 5 veces con agua destilada estéril. Finalmente las plántulas fueron montadas en portaobjetos con glicerol al 50% y se analizaron en un microscopio de contraste (Nomarsky) Leica DM 5500 B en los objetivos de 20X y 40X.

### **VI.10 Análisis estadístico**

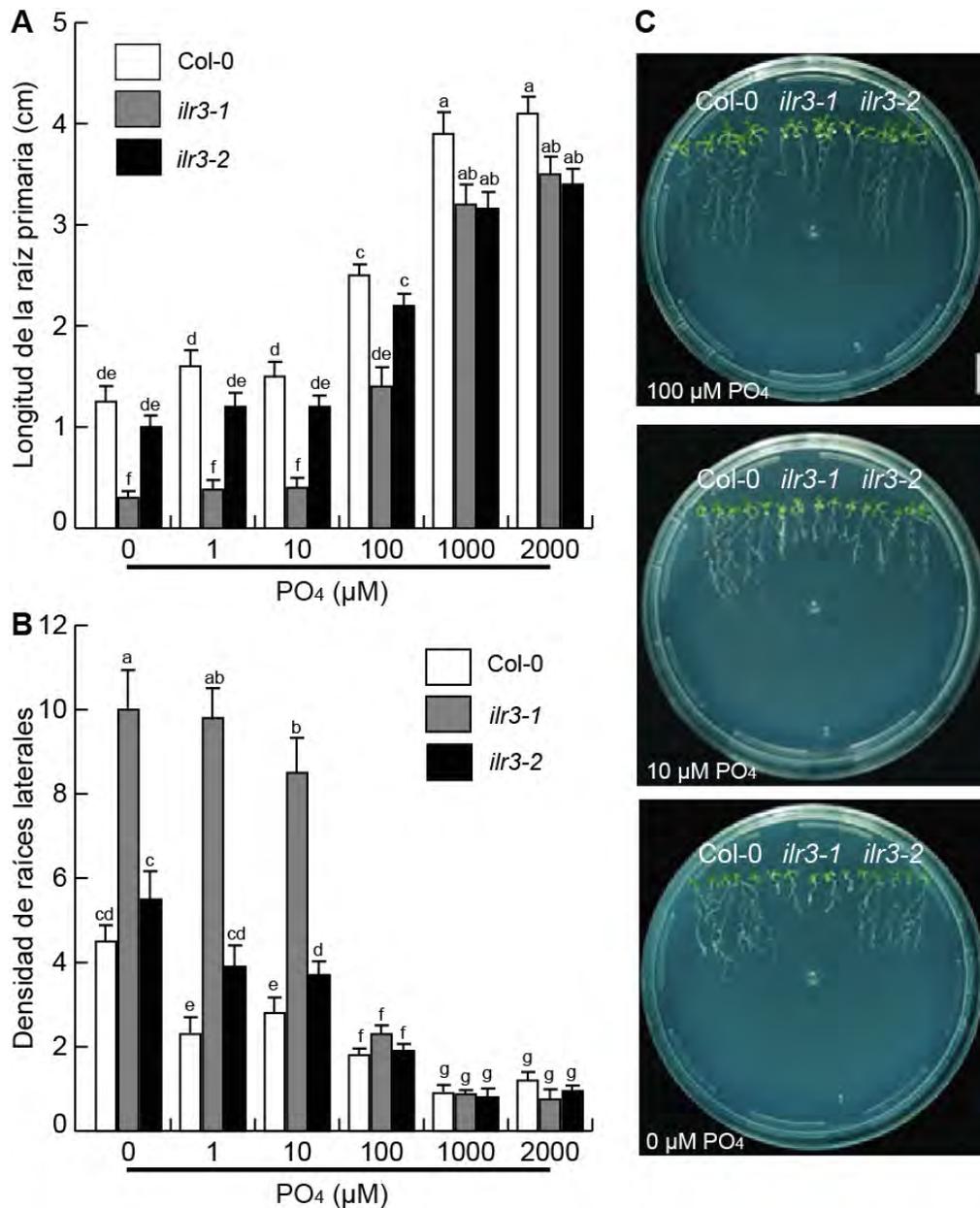
Los datos fueron sometidos a análisis de ANOVA de una sola vía, seguido de una prueba post hoc de Tukey. Las diferencias significativas se indican con letras en las gráficas de los diferentes experimentos. Se utilizó el programa STATISTICA (data analysis software system) StatSoft, Inc. (2004).

## VII. RESULTADOS

### VII.1 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la arquitectura radicular de las mutantes *ilr3-1* e *ilr3-2*

El fenotipo de *Arabidopsis thaliana* observado en deficiencia de fosfato se ha vinculado con una intoxicación debida a la concentración interna del hierro en la planta (Misson *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2015). Para analizar si el gen *ILR3*, el cual codifica un factor transcripcional que regula genes clave en la homeostasis del hierro (Zhang *et al.*, 2015), participa en el control de la homeostasis de dicho elemento bajo deficiencia de fosfato se germinaron lado a lado semillas del ecotipo silvestre Col-0 y de las mutantes *ilr3-1* e *ilr3-2* en medio Murashige y Skoog (MS) 0.2X, con variación solamente en las concentraciones de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), las cuales oscilaron entre 0 y 2000  $\mu\text{M}$ .

Se ha reportado que el exceso de fósforo provoca en la planta clorosis en el follaje, síntoma característico de la deficiencia de hierro (Ward *et al.*, 2008); por lo cual se optó por utilizar concentraciones de alto fosfato (1000 y 2000  $\mu\text{M}$ ) para evaluar si estas condiciones estimulaban alguna respuesta en las mutantes. Las plantas fueron analizadas 10 días después de la germinación (ddg). Se observó, tanto en el ecotipo silvestre como en las mutantes, represión en la elongación de la raíz primaria en dosis bajas (0, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ ) y un crecimiento similar al control (250  $\mu\text{M}$ ) en las concentraciones de 1000 y 2000  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, la inhibición en la elongación de la raíz de *ilr3-1* fue notablemente mayor, por lo que se concluyó que dicha mutación confiere una hipersensibilidad a la deficiencia de fosfato, lo cual fue respaldado por el aumento en la densidad de las raíces laterales que también se vio aumentada en esta mutante. La mutante *ilr3-2* mostró respuestas similares a Col-0 en todos los tratamientos (Fig. 9). La inhibición de la raíz primaria y el aumento en la densidad de raíces laterales son características clásicas de la respuesta a la deficiencia de fosfato, el hecho de que ambos aspectos se vieran acentuados en la mutante *ilr3-1* señala una participación de dicho gen en la respuesta a la deficiencia de fosfato.

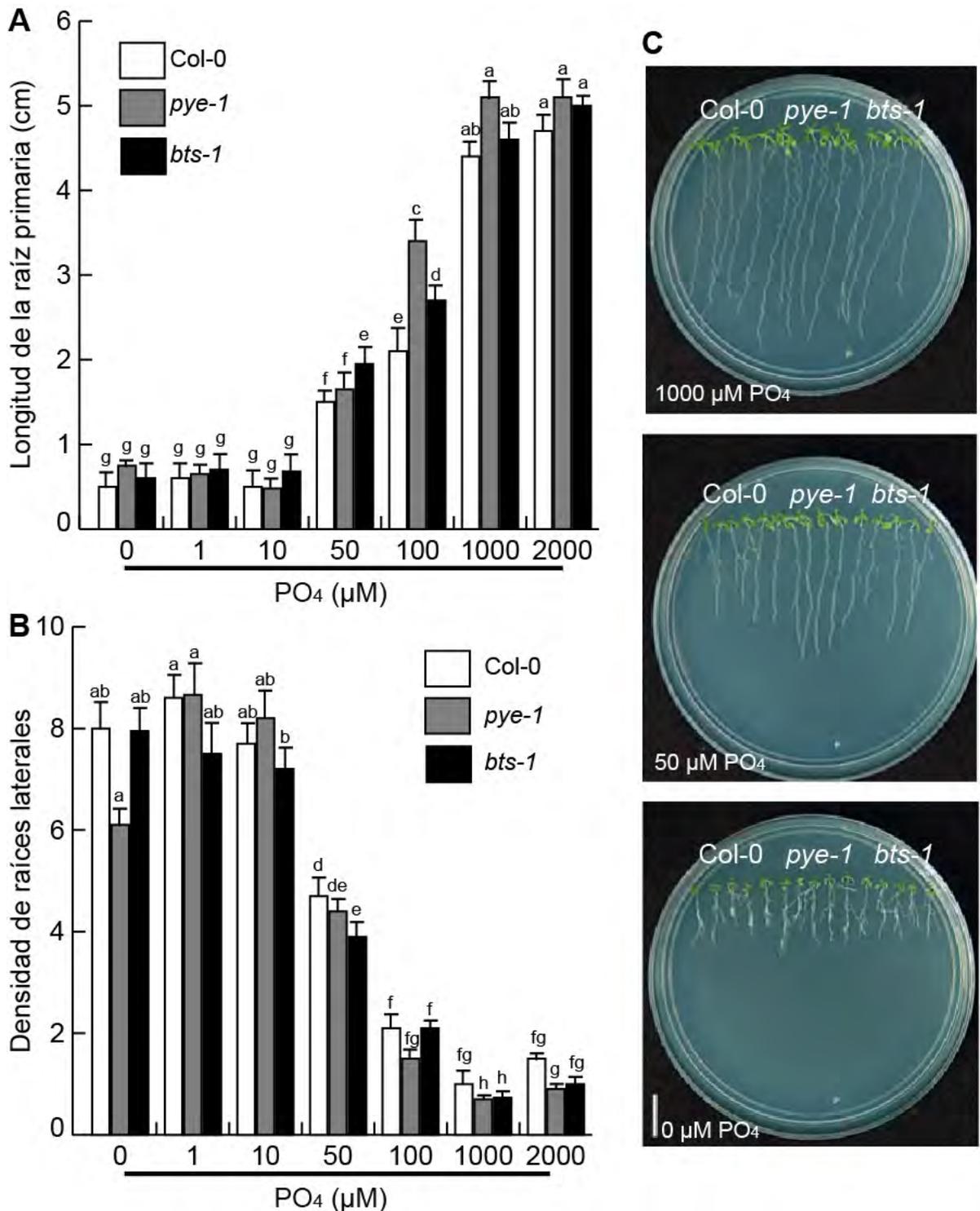


**FIGURA 9. Arquitectura del sistema radicular de las mutantes *ilr3-1* e *ilr3-2* en deficiencia de fósforo.** (A) Longitud de la raíz primaria, (B) densidad de raíces laterales, (C) Imágenes representativas de plántulas Col-0, *ilr3-1* e *ilr3-2* a los 10 ddg, crecidas en medio con deficiencia de fósforo (PO<sub>4</sub>). No se encontraron diferencias significativas entre *ilr3-2* y Col-0. Se graficó la media y la desviación estándar (n=30). Las letras indican una diferencia estadística con una P < 0.05.

## VII.2 Efecto de la deficiencia de fosfato sobre la arquitectura radicular de las mutantes *pye-1* y *bts-1*

*BTS* y *PYE* son genes clave que participan en la regulación de las respuestas a la deficiencia de hierro. *BTS* es una proteína E3 ubiquitina ligasa que regula de manera negativa a *ILR3*, mientras que *PYE* es un factor transcripcional de la familia bHLH el cual es regulado de manera positiva por *ILR3* (Long *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2015). A causa de la hipersensibilidad encontrada en *ilr3-1* a la deficiencia de fosfato, se decidió evaluar si *BTS* y *PYE*, proteínas que interactúan directamente con *ILR3* (Long *et al.*, 2010), participaban también en la regulación de la homeostasis del fosfato. Para lo cual se germinaron semillas del ecotipo silvestre Col-0 y las mutantes *pye-1* y *bts-1* en medio Murashige y Skoog (MS) 0.2X, con variaciones en la concentración de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) que fueron de 0 a 2000  $\mu\text{M}$ , las plantas fueron analizadas a los 10 ddg.

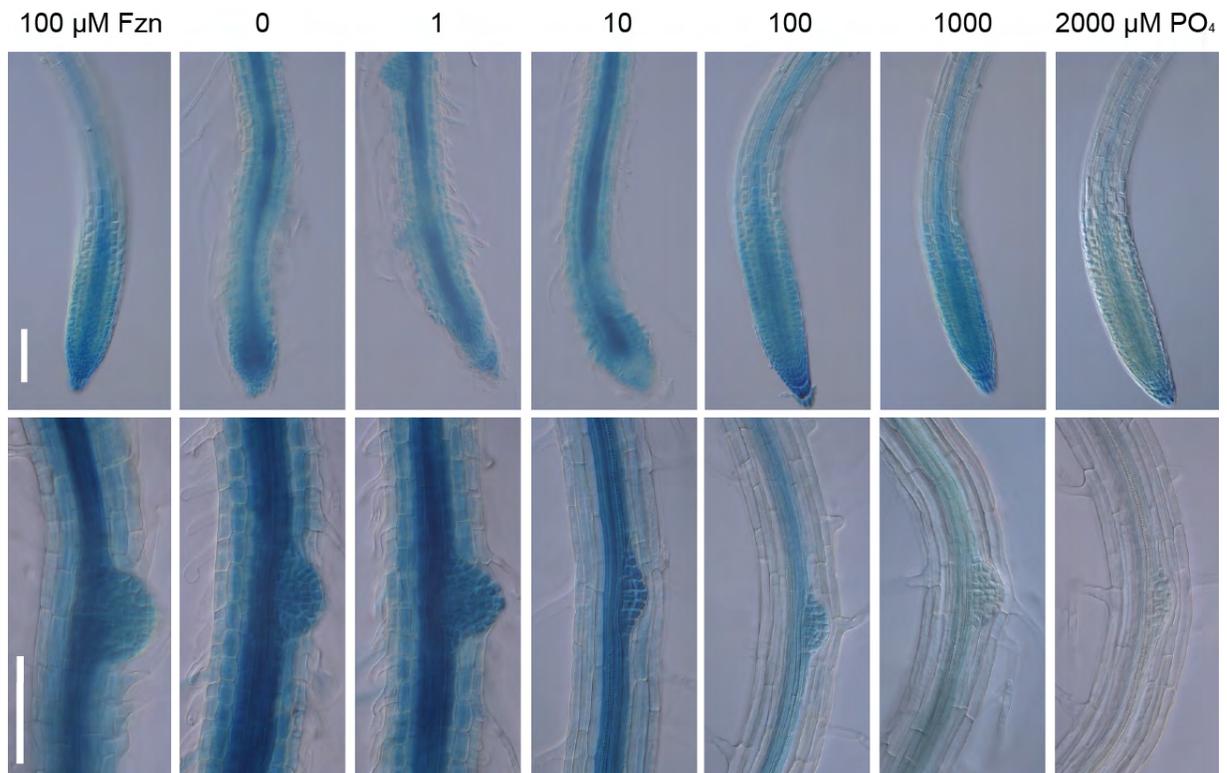
Si bien todas las líneas mostraron una inhibición en la elongación de la raíz primaria y un aumento en la densidad de raíces laterales, no se observaron diferencias significativas entre las mutantes y Col-0 (Fig. 10) lo cual indicó que las respuestas a la deficiencia de fosfato no son reguladas mediante la vía de *BTS* y *PYE*.



**FIGURA 10. Arquitectura del sistema radicular de las mutantes *bts-1* y *pye-1* bajo deficiencia de fosfato.** (A) Longitud de la raíz primaria, (B) densidad de raíces laterales, (C) Imágenes representativas de plántulas Col-0, *bts-1* y *pye-1* crecidas bajo deficiencia de fosfato (PO<sub>4</sub>), en donde no se observaron diferencias entre las plántulas silvestres y las mutantes. Se graficó la media y la desviación estándar (n=30). Las letras indican una diferencia estadística con una P < 0.05.

### VII.3 La expresión de *ILR3:uidA* aumenta durante la deficiencia de fosfato

La expresión de *ILR3* ocurre de manera constitutiva en la punta de la raíz primaria y en el sistema vascular (Rampey *et al.*, 2006). En deficiencia de Fe hay una inducción en la expresión de *ILR3:uidA* en dichas zonas (Salmerón-Barrera, 2015). Para corroborar la participación de *ILR3* en la deficiencia de fosfato se crecieron semillas de *ILR3:uidA* en medio MS 0.2X con variaciones en la concentración de fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) que fueron desde 0 hasta 2000  $\mu\text{M}$ ; así como en deficiencia de Fe con adición de ferrozina como control positivo. Según lo esperado, la expresión de *ILR3* en deficiencia de hierro fue mayor en comparación con el control tanto en la punta de la raíz como en la vasculatura. Mientras que en la curva de concentración de fosfato el nivel de expresión de *ILR3* disminuyó de manera inversamente proporcional a la concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . El mayor nivel de expresión de *ILR3* se observó en las concentraciones de 0, 1 y 10  $\mu\text{M}$ , mientras que en 1000  $\mu\text{M}$  y 2000  $\mu\text{M}$  se observó una disminución. De manera interesante la expresión de *ILR3* en la vasculatura bajo la concentración de 2000  $\mu\text{M}$  se vio prácticamente anulada (Fig. 11). Estos resultados sugieren que la expresión de *ILR3* depende de la concentración de fosfato en el medio.

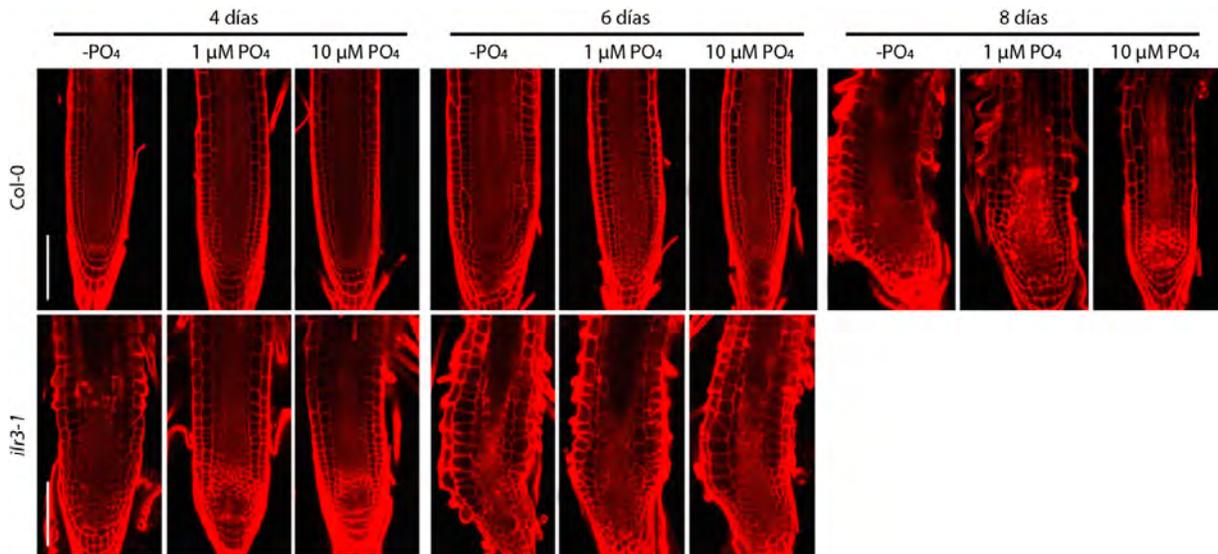


**FIGURA 11. La expresión de *ILR3:uidA* es dependiente de la concentración de fósforo.** Plántulas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* portando el gen *ILR3:uidA* crecidas en deficiencia de hierro (+PO<sub>4</sub>+Fz) y en concentraciones crecientes de fósforo. Se observa la punta de la raíz primaria, así como un acercamiento a la zona de diferenciación, en donde puede observarse un primordio de una raíz lateral. La expresión de *ILR3:uidA* fue mayor en deficiencia de fósforo en comparación a la deficiencia de hierro, mientras que en concentraciones de alto fósforo (1000, 2000 μM) la expresión disminuyó de manera considerable, especialmente en la vasculatura. Fz (Ferrozina).

#### **VII.4 Diferenciación prematura del meristemo de *ilr3-1* durante la deficiencia de fósforo**

La diferenciación del meristemo es una de las respuestas principales a la deficiencia de fósforo en *Arabidopsis thaliana* (Sánchez-Calderón, 2005). En este trabajo observamos que la mutante *ilr3-1* es hipersensible a esta deficiencia, ya que mostró una inhibición en la longitud de la raíz primaria, así como un aumento en la densidad de raíces laterales mayor a la observada en Col-0. La inhibición en la elongación de la raíz primaria en deficiencia de fosfato es debida a una activación de un programa de regulación que provoca el crecimiento determinado del meristemo. Para evaluar si dicho programa era activado de manera prematura en la mutante *ilr3-1* se germinaron lado a lado semillas de Col-0 y de *ilr3-1* en medio con deficiencia de fosfato, en las concentraciones de 0, 1 y 10  $\mu\text{M}$ , por ser estas en donde se observó la mayor inhibición de la raíz primaria; las plantas fueron analizadas mediante microscopía confocal a los 4, 6 y 8 ddg. A los 4 ddg Col-0 no mostró cambios en la punta de la raíz que evidenciaran diferenciación meristemática en las concentraciones de 1 y 10  $\mu\text{M}$ , sin embargo, en la concentración de 0  $\mu\text{M}$  se observó una disminución de la zona de elongación y de la zona meristemática.

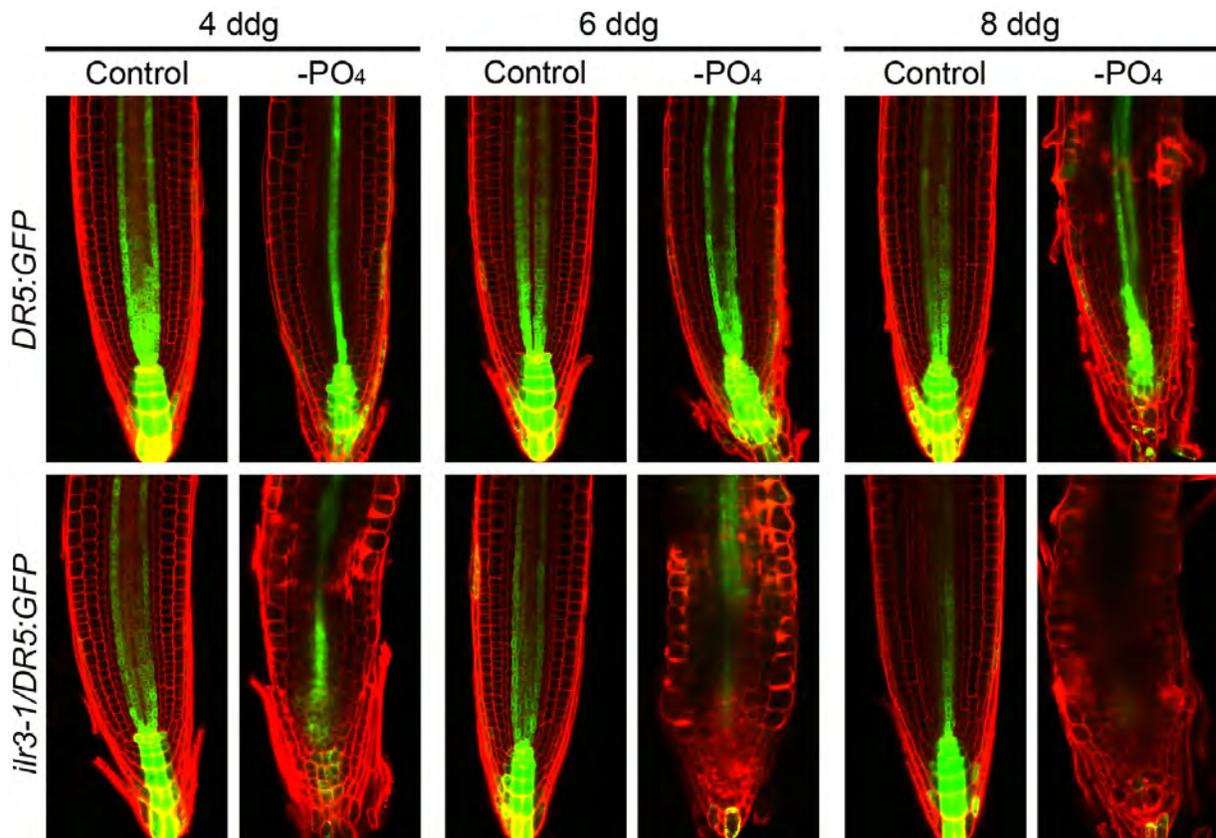
Conforme avanzó el tiempo de exposición a la deficiencia de fósforo (6 ddg) se hizo notable el desacomodo de las células del meristemo apical de la raíz (MAR), principalmente en la zona del nicho de células iniciales, así como un ensanchamiento de la punta de la raíz en la concentración de 0  $\mu\text{M}$ . A los 8 ddg en las concentraciones de 0 y 1  $\mu\text{M}$ , se perdió la actividad mitótica de las células y estas comenzaron a diferenciarse. En el caso de la mutante *ilr3-1* el cambio de crecimiento indeterminado a determinado fue evidente desde los 4 ddg en las tres concentraciones analizadas. A los 6 ddg la zona de elongación se perdió y prácticamente todas las células de la punta se diferenciaron. A los 8 ddg no se pudo analizar la punta de la raíz primaria de *ilr3-1*, debido a que la densidad de raíces laterales no permitió su observación al microscopio (Fig. 12). En conjunto, estos resultados sugieren la participación de ILR3 en la regulación de la activación del programa de crecimiento determinado durante la deficiencia de fosfato.



**FIGURA 12. Diferenciación prematura del meristemo de la mutante *ilr3-1* bajo deficiencia de fósforo.** Imágenes representativas de una cinética de 4, 6 y 8 días después de la germinación, en la cual se analizó la diferenciación meristemática en la mutante *ilr3-1*, en concentraciones de 0, 1 y 10  $\mu\text{M}$  de fósforo ( $\text{PO}_4$ ). Mientras que en Col-0 el inicio del programa de crecimiento determinado característico de la deficiencia de fósforo se observa hasta el día 6 y se acentúa hasta el día 8; en *ilr3-1* dicho programa es evidente desde el cuarto día.

## VII.5 La concentración de auxinas disminuye en *ilr3-1* bajo deficiencia de fósforo

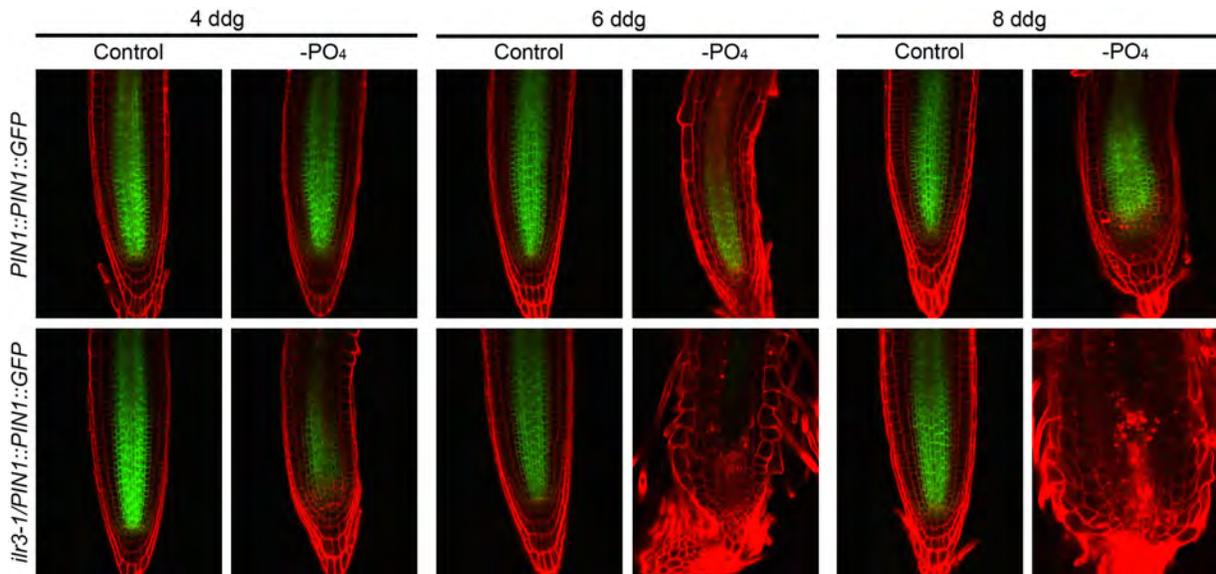
El mantenimiento del nicho celular meristemático depende del gradiente y del flujo dinámico de auxinas (Eckardt, 2009; Liu *et al.*, 2017). La concentración máxima de esta fitohormona se ve disminuida en la punta de la raíz bajo condiciones de deficiencia de fosfato, lo cual correlaciona con la pérdida del MAR (López-Bucio *et al.*, 2005; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). Para analizar si la diferenciación prematura del meristemo de *ilr3-1* era análoga a una disminución en la concentración máxima de auxinas, se germinaron lado a lado semillas de la línea reportera *DR5:GFP*, así como de la cruce de *ilr3-1xDR5:GFP* en medio Murashige y Skoog (MS) 0.2X y en deficiencia de fosfato. Las plántulas fueron analizadas mediante microscopía confocal a los 4, 6 y 8 ddg. Se encontró una disminución en la expresión de *DR5:GFP* conforme transcurría el tiempo de exposición a la deficiencia de fosfato, tanto en el fondo silvestre como en el mutante, principalmente en la columela. Sin embargo, la disminución en la expresión de *DR5:GFP* fue notablemente menor en la mutante *ilr3-1*, en donde desde los 4 ddg la expresión de *DR5:GFP* se perdió en un gran número de células de la columela, así como en la estela; mientras que a los 8 ddg no se observó expresión de *DR5:GFP* en la punta de la raíz primaria (Fig. 13). Lo anterior sugiere que ILR3 participa en la regulación de la concentración de auxinas en la punta de la raíz primaria bajo deficiencia de fósforo.



**FIGURA 13. La expresión de *DR5:GFP* en *ilr3-1* en deficiencia de fosfato.** Imágenes representativas de la expresión de *DR5:GFP* en fondo silvestre y mutante (*ilr3-1 x DR5:GFP*) en plántulas analizadas a los 4, 6 y 8 ddg, en una concentración de 0  $\mu$ M de fósforo (PO<sub>4</sub>) y en medio MS 0.2 X. En donde se puede observar la evidente disminución de la expresión de *DR5:GFP* en el fondo mutante desde el 4 ddg y como gradualmente se pierde en el día 8 ddg.

## VII.6 La expresión de *PIN1:PIN1:GFP* disminuye en *ilr3-1* bajo deficiencia de fósforo

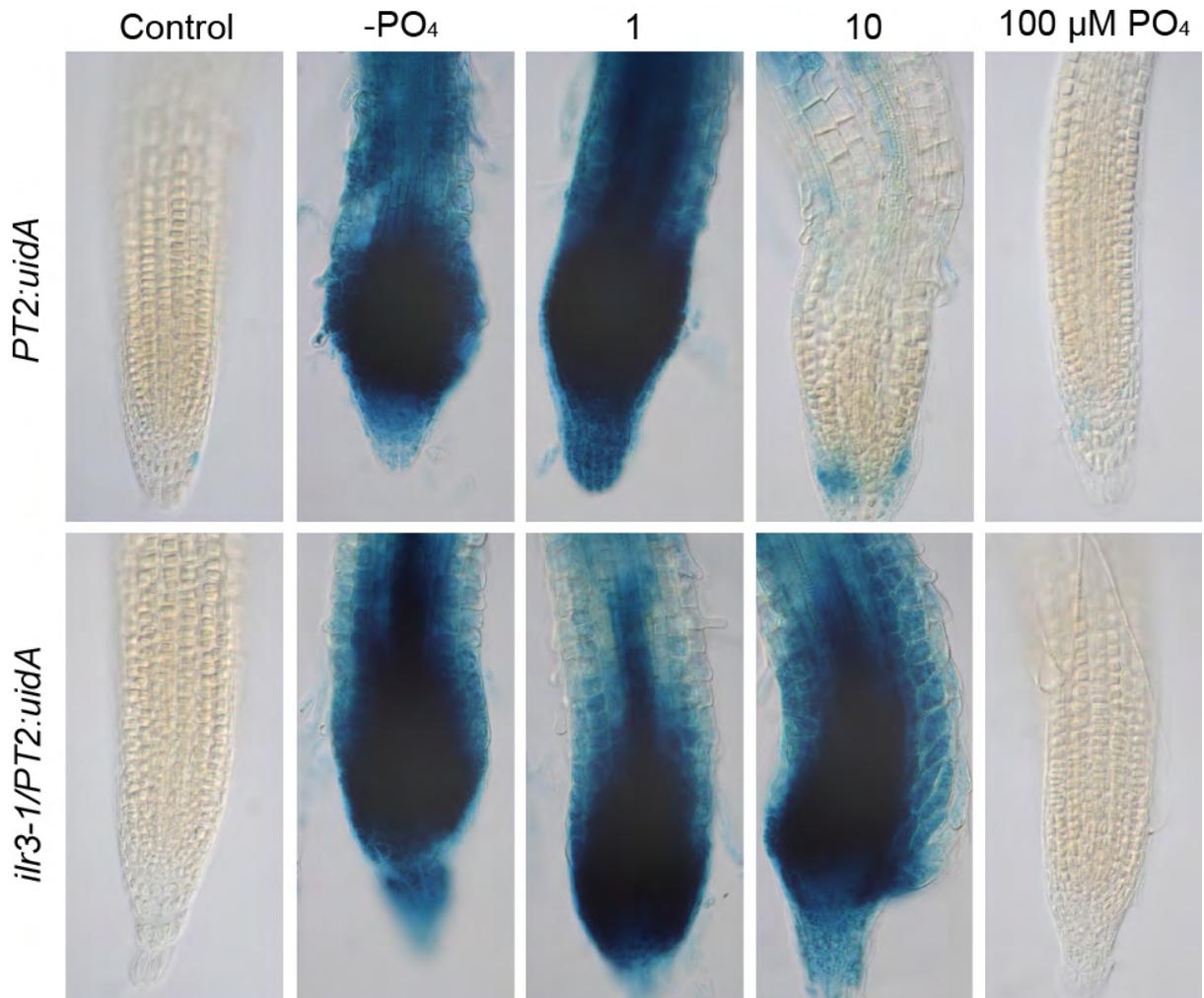
PIN1 es una proteína de eflujo que participa en el transporte polar de auxinas, desde el follaje hacia la raíz. Debido a la disminución en la concentración del máximo de auxinas en la punta de la raíz primaria observada en los resultados previos, nos preguntamos si dicha disminución era ocasionada por una inhibición en el transporte basipétalo de auxinas. Se germinaron semillas *PIN1:PIN1:GFP* y de la cruce *ilr3-1xPIN1:PIN1:GFP* en medio Murashige y Skoog (MS) 0.2X, así como en medio con deficiencia de fosfato. Las plántulas fueron analizadas a los 4, 6 y 8 días mediante microscopía confocal. Se observó una disminución en la expresión de *PIN1:PIN1:GFP* en deficiencia de fosfato dependiente del tiempo de exposición a tal condición. En el fondo silvestre a los 6 y 8 ddg se observó una disminución en el dominio de expresión de *PIN1:PIN1:GFP*, su expresión se redujo a la zona apical de la raíz y dejó de verse en la zona de diferenciación. En el caso del fondo mutante *ilr3-1* la disminución en el dominio de expresión de *PIN1:PIN1:GFP* fue notable desde los 4 ddg, mientras que a los 6 y 8 ddg la expresión se perdió por completo (Fig. 14). Estos resultados indican la posible participación de *ILR3* en la regulación del transporte polar de auxinas mediado por PIN1 en la deficiencia de fosfato.



**FIGURA 14. La expresión de *PIN1::PIN1::GFP* en el fondo mutante *ilr3-1* bajo deficiencia de fosfato.** Fotografías representativas de la punta de la raíz de *PIN1::PIN1::GFP* e *ilr3-1xPIN1::PIN1::GFP* teñidas con yoduro de propidio y analizadas mediante microscopía confocal a los 4, 6 y 8 ddg, en medio MS 0.2X y con deficiencia de fosfato (-PO<sub>4</sub>). Se observó una disminución en la expresión de *PIN1::PIN1::GFP* conforme avanzó el tiempo de exposición a la deficiencia de fósforo, tanto en el fondo silvestre como en el mutante, sin embargo, en este último la disminución de la expresión de *PIN1::PIN1::GFP* fue exacerbada ya que se perdió por completo desde el día 6.

## VII.7 La deficiencia de fosfato modifica la expresión de *AtPT2:uidA* en *ilr3-1*

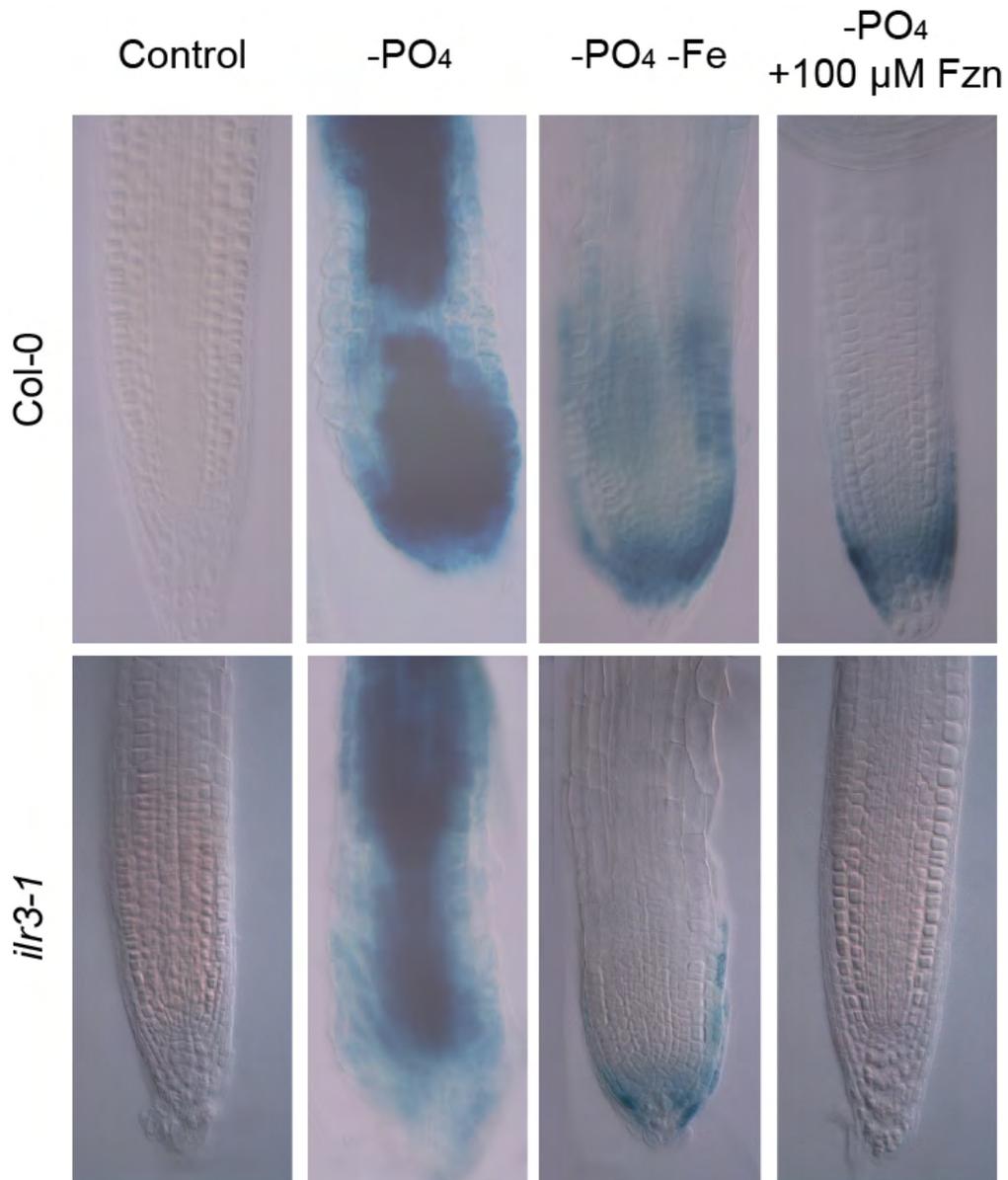
*AtPT2* es un transportador de alta afinidad del fosfato que se expresa en raíces, solamente en condiciones de deficiencia de fosfato. La inhibición de la raíz primaria, el aumento en la densidad de raíces laterales, la diferenciación prematura del meristemo y la disminución en la expresión de auxinas son características típicas de la deficiencia de fosfato, que correlacionan con un aumento en la expresión de *AtPT2:GUS* (Sánchez-Calderón, 2005). Por lo anterior decidimos evaluar si la mutación en *ilr3-1* afectaba la captación de fosfato mediante la modificación en la expresión de *AtPT2*, para lo cual se germinaron semillas de *AtPT2:uidA* y de la cruce de *ilr3-1xAtPT2:GUS* en medio Murashige y Skoog (MS) 0.2X a diferentes concentraciones de fosfato 0, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$ . Las plántulas fueron sometidas a tinción histoquímica de GUS seguida de clarificación a los 6 ddg. En general no se observaron diferencias en la expresión entre fondos genéticos. En ambos casos la mayor expresión se observó a 0  $\mu\text{M}$ , mientras que a 100  $\mu\text{M}$  no se observó expresión de *AtPT2:uidA*, lo que indica que esta concentración puede considerarse como suficiencia de fosfato. Sin embargo, en la concentración de 10  $\mu\text{M}$  la expresión de *AtPT2:uidA* en el fondo silvestre fue nula en la punta de la raíz primaria; contrario a lo observado en *ilr3-1*, donde la expresión de *AtPT2:uidA* tuvo un claro aumento (Fig. 15). Estos resultados sugieren que la mutación *ilr3-1* regula directa o indirectamente de manera positiva la expresión de *AtPT2:uidA* en la zona de diferenciación en deficiencia de fósforo.



**FIGURA 15. Alteración en la expresión de *AtPT2:uidA* en el fondo mutante *ilr3-1* bajo deficiencia de fosfato.** Fotografías representativas de la punta de la raíz de plántulas de *AtPT2:uidA* e *ilr3-1xAtPT2:uidA* analizadas a los 6 ddg. Se puede observar que la expresión de *AtPT2:uidA* ocurre desde la concentración de 10 μM en el fondo *ilr3-1*, debido a la hipersensibilidad de esta mutante.

### VII.8 Expresión de *AtPT2:GUS* en deficiencia de hierro y fósforo

De acuerdo a reportes previos y de acuerdo a los resultados de este trabajo, ILR3 participa en la regulación de las respuestas a la deficiencia de hierro (Salmerón-Barrera, 2015; Zhang *et al.*, 2015;) y fósforo. Por lo cual nos preguntamos cómo se afecta la expresión de *AtPT2:GUS* en *ilr3-1* en diferentes combinaciones de ambas deficiencias. Para contestar esta pregunta se germinaron semillas de *AtPT2:GUS* y de *ilr3-1xAtPT2:GUS* en los tratamientos control,  $-PO_4$ ,  $-Fe$ ,  $-PO_4-Fe$ ,  $-PO_4+Fz$  y  $+PO_4+Fz$ , las plántulas fueron procesadas para analizar la expresión histoquímica de GUS seguida de clarificación de tejidos a los 6 ddg y microscopía de Nomarsky. En deficiencia de fósforo ( $-PO_4$ ) la expresión de *AtPT2:GUS* se observó a lo largo de toda la raíz primaria. En deficiencia de hierro y fósforo ( $-PO_4-Fe$ ) la expresión de *AtPT2:GUS* disminuyó considerablemente en comparación a la observada en  $-P$ , además el dominio de expresión se vio restringido a la punta de la raíz primaria principalmente en la región de la cofia, lo cual se acentuó al adicionar ferrozina ( $-PO_4+Fz$ ). En *ilr3-1* disminuyó la expresión de *AtPT2:GUS* pero se mantuvo el patrón de expresión en el tratamiento de  $-PO_4-Fe$ . En el tratamiento de  $-PO_4+Fz$  la expresión de *AtPT2:GUS* se perdió completamente (Fig. 16). Estos resultados sugieren la participación de ILR3 en la regulación de la expresión de *AtPT2* en deficiencia de fósforo dependiente de la concentración de hierro en el medio.

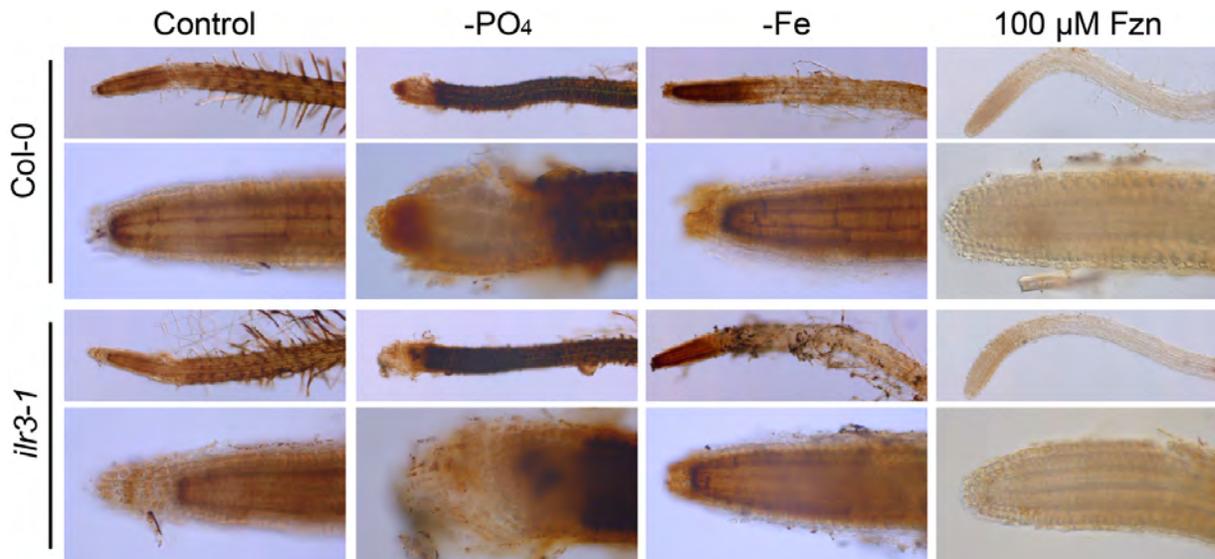


**FIGURA 16. La expresión de *AtPT2:uidA* en el fondo mutante *ilr3-1* en deficiencia de hierro y fósforo.** Imágenes representativas de la punta de la raíz primaria de plántulas crecidas en diferentes combinaciones de deficiencia de hierro y fósforo, las plantas fueron teñidas y analizadas a los 6 ddg mediante microscopía de Nomarsky. No se observaron diferencias en la expresión de *AtPT2:uidA* en los fondos silvestre y mutante en los tratamientos Control, -PO<sub>4</sub> y -Fe. Sin embargo, en los tratamientos de deficiencia de hierro y fósforo combinados, la expresión de *AtPT2:uidA*, disminuyó notablemente en el fondo mutante *ilr3-1*.

## **VII.9 La concentración de hierro en el ápice de la raíz primaria no se modifica en la mutante *ilr3-1* en deficiencia de fosfato**

Diversas investigaciones sugieren que la inhibición de la raíz primaria observada en deficiencia de fosfato es debida a una intoxicación por hierro, ya que al retirarlo del medio la elongación de la raíz primaria se re-establece (Hirsch *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que para observar tal fenotipo, se requiere que el aumento en la concentración de hierro ocurra específicamente en la punta de la raíz (Müller *et al.*, 2015). Como se ha evidenciado, la mutante *ilr3-1* muestra una hipersensibilidad a la deficiencia de fosfato y de manera contraria muestra una resistencia a la deficiencia de hierro, lo que correlaciona con una mayor elongación de la raíz primaria en comparación a las plantas silvestres, así como ausencia de clorosis en el follaje (Salmerón-Barrera, 2015). ILR3 parece regular a AtPT2 de manera dependiente de la concentración de hierro en el medio; por lo que nos preguntamos si la concentración de hierro interno en *ilr3-1* se modifica en deficiencia de hierro y fósforo. Para analizar lo anterior, se germinaron lado a lado semillas de las líneas Col-0 y de *ilr3-1* en medio control Murashige y Skoog (MS) 0.2X, así como en los tratamientos  $-\text{PO}_4$ ,  $-\text{Fe}$ , y  $-\text{Fe}+\text{Fz}$ , a los 6 ddg las plantas fueron teñidas mediante la técnica de DAB/Perls (Roschztardt *et al.*, 2009; Roschztardt *et al.*, 2010). Contrario a lo esperado no hubo diferencias en la concentración de hierro entre Col-0 e *ilr3-1* en el tratamiento de  $-\text{PO}_4$ , sin embargo, tanto en la planta silvestre como en la mutante se pudo observar un aumento en la concentración de hierro en deficiencia de fosfato, lo cual concuerda con reportes previos (Misson *et al.*, 2005; Müller *et al.*, 2015). Por otra parte, bajo deficiencia de hierro, la concentración de este elemento se mantuvo en la punta de la raíz primaria, pero disminuyó considerablemente en la zona de diferenciación, mientras que en el tratamiento  $-\text{Fe}+\text{Fz}$ , la concentración de hierro en la planta fue casi imperceptible (Fig. 17). Estos resultados sugieren que la mutación en *ilr3-1* no modifica la concentración de hierro en la mutante *ilr3-1* por lo tanto, la hipersensibilidad a la deficiencia de fosfato, así

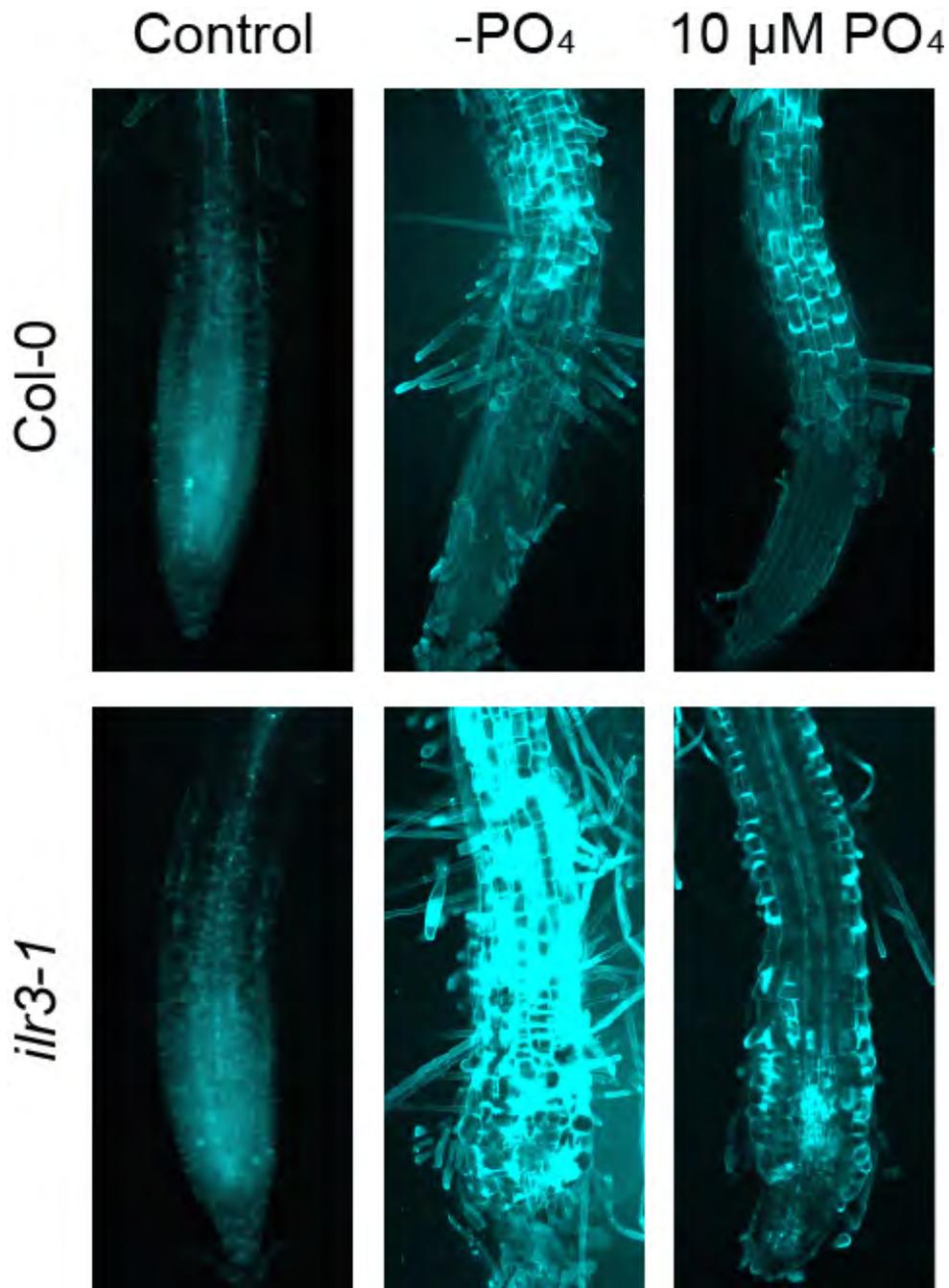
como la resistencia a la deficiencia de hierro no son debidas a una mayor concentración de hierro en *ilr3-1*.



**FIGURA 17. Concentración de hierro en la punta de la raíz en plántulas silvestres (Col-0) y mutantes *ilr3-1*.** Imágenes representativas de la punta de la raíz de plántulas crecidas en deficiencia de fosfato (-PO<sub>4</sub>), deficiencia de hierro (-Fe) y deficiencia de hierro con adición de ferrozina (-Fe+Fz). Las plantas fueron teñidas a los 6 ddg mediante la técnica de Perls/DAB y se analizaron mediante microscopía de Nomarsky. Se observa una tenue disminución en la concentración de hierro en los tratamientos control y -Fe en la mutante *ilr3-1*; sin embargo no se observaron diferencias en el tratamiento de -P entre Col-0 e *ilr3-1*.

## **VII.10 El aumento en la acumulación de calosa en la punta de la raíz primaria en *ilr3-1* bajo deficiencia de fósforo**

La concentración de hierro en *Arabidopsis* regula la acumulación de calosa en el meristemo de la raíz durante la deficiencia de fosfato (Müller *et al.*, 2015). Al no encontrar diferencias en la concentración de hierro en *ilr3-1* en deficiencia de fosfato, supusimos que la acumulación de calosa tampoco se vería modificada; para comprobar esta hipótesis germinamos semillas de plantas Col-0 y de *ilr3-1*, en medio control y bajo deficiencia de fosfato (0 y 10  $\mu\text{M}$  Pi); las plántulas fueron teñidas con azul de anilina (Müller *et al.*, 2015) y se analizaron mediante microscopía confocal a los 6 ddg. No se observaron diferencias en la acumulación de calosa en el tratamiento control entre Col-0 e *ilr3-1*, sin embargo, en deficiencia de fosfato hubo un aumento significativo en la deposición de calosa en la mutante *ilr3-1*, principalmente en la concentración de 0  $\mu\text{M}$  (Fig. 18). Estos resultados sugieren que ILR3 participa en la regulación de la acumulación de calosa bajo deficiencia de fósforo.



**FIGURA 18. Deposición de calosa en la punta de la raíz primaria bajo deficiencia de fosfato.** Imágenes representativas de la punta de la raíz primaria de Col-0 e *ilr3-1*, crecidas en medios con deficiencia de fósforo, las plántulas fueron analizadas a los 6 ddg, se tiñeron con azul de anilina y se fotografiaron mediante microscopía confocal. Se observó un aumento en la deposición de callosa en la punta de la raíz primaria de la mutante *ilr3-1*.

## VIII. DISCUSIÓN

En *Arabidopsis thaliana* se han realizado varios estudios que han dilucidado aspectos clave sobre las respuestas de la raíz a la deficiencia de fósforo, sin embargo, aún no se han establecido cuáles son los componentes moleculares que median esta vía de señalización (Steffen *et al.*, 2002; Yang y Finnegan, 2010; Młodzińska y Zboińska, 2016; Wang *et al.*, 2017). En años recientes las respuestas a dicha deficiencia se han vinculado a un aumento en la concentración del hierro interno de la planta (Misson *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2008, Bournier *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2015).

Una de las respuestas típicas a la deficiencia de fósforo es la inhibición de la elongación de la raíz primaria, provocada por el inicio de un programa de crecimiento determinado (López-Bucio *et al.*, 2002, 2005; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005). En un análisis hecho por Ward y colaboradores (2008) se observó que esta respuesta es debida a una intoxicación por hierro, ya que al retirarlo del medio, el crecimiento de la raíz primaria se re-establece. Además, se ha observado un aumento en la concentración de hierro en follaje y raíz durante la deficiencia de fósforo (Misson *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 2006); así como una represión en la expresión del gen *IRT1* (transportador de hierro reducido en la epidermis) y aumento en la expresión de los genes *FER1*, que codifica a una proteína que participa en el almacenamiento de hierro en los cloroplastos, *NAS3* y *ZIP5*, que participan en el transporte de metales (Misson *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 2006). También se ha observado un aumento en la expresión de *AtPT2* (*PHOSPHATE TRANSPORTER 1*, que participa en la captación de fosfato en condiciones de exceso de hierro y suficiencia de fósforo (Hirsch *et al.*, 2006).

Estos antecedentes evidencian un cruce de las vías de señalización que regulan la captación y homeostasis del hierro y del fosfato, sin embargo, se desconoce mediante qué elementos y a qué nivel ocurre lo anterior. Debido a esto, analizamos el modelo de la vía de señalización del hierro propuesto por Zhang y colaboradores (2015) (Fig. 6) y decidimos evaluar en este trabajo la participación de ILR3, por ser el regulador de las dos redes principales que controlan la captación y el transporte del

hierro, moduladas por los factores transcripcionales bHLH *FIT* y *PYE* (Hindt y Guerinot, 2012; Zhang *et al.*, 2015).

ILR3 es un factor transcripcional de la familia bHLH con un dominio de cierres de leucina. Rampey y colaboradores (2006) aislaron dos mutantes con respuestas antagónicas a auxinas conjugadas, dependientes de la concentración de metales en el medio (*ilr3-1* e *ilr3-2*, con ganancia y pérdida de función respectivamente). Salmerón-Barrera (2015) analizó la respuesta de dichas mutantes a la deficiencia de hierro y encontró resistencia a esta deficiencia en la mutante *ilr3-1* e hipersensibilidad en *ilr3-2*, de manera similar Zhang y colaboradores (2015) encontraron hipersensibilidad de *ilr3-2* a la deficiencia de hierro, lo cual evidenció la participación de *ILR3* (bHLH105) en dicho estrés. En el presente trabajo se hipotetizó la participación del gen *ILR3* en la regulación de las respuestas a la deficiencia de fósforo. Para lo cual nos enfocamos en las respuestas fenotípicas de las mutantes *ilr3-1* e *ilr3-2*, en las cuales se esperaba encontrar una respuesta contraria a la observada en deficiencia de hierro; si bien *ilr3-1* efectivamente mostró una respuesta hipersensible, la mutante *ilr3-2* se comportó de manera similar a la planta silvestre (Fig. 9). Las plantas tienen mecanismos de adaptación que les permiten responder de manera dinámica a su ambiente altamente cambiante (Plaxton y Tran, 2011), uno de estos mecanismos es la redundancia genética, la cual puede explicar por qué la mutante nula *ilr3-2* no respondió a la deficiencia de fósforo, en contraparte a la mutante *ilr3-1* (Fig. 9). La participación de ILR3 en la deficiencia de fósforo se corroboró por la inducción en la expresión de la línea reportera *ILR3:uidA* en la punta de la raíz y en la vasculatura (Fig. 11), dicho patrón de expresión correlacionó con el observado en deficiencia de hierro, sin embargo, la inducción de *ILR3:uidA* en deficiencia de fósforo fue mayor (Salmerón-Barrera, 2015).

La diferenciación meristemática es un síntoma típico de la deficiencia de fósforo en *A. thaliana* y correlaciona con la disminución en la expresión de *DR5:uidA* (Sánchez-Calderón, 2005). Müller y colaboradores (2015) propusieron un modelo en el cual durante la deficiencia de fósforo y en altas concentraciones de hierro interno en conjunto con la participación del módulo PDR2-LPR se produce un aumento en la

cantidad de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual activa la deposición de callosa en la punta de la raíz primaria e impide la correcta comunicación célula-célula, impactando directamente en la actividad meristemática. La mutante *ilr3-1* mostró una diferenciación meristemática prematura (Fig.12), que supusimos era debida a un aumento en la concentración de hierro, sin embargo, no se observaron diferencias entre Col-0 e *ilr3-1* (Fig. 17) en condiciones de deficiencia de fósforo. Es probable que la técnica de DAB/Perls no sea lo suficientemente sensible a las diferencias en la concentración de hierro interno en este caso particular, y quizás técnicas más finas como la espectrometría de masas acoplada a plasma arrojen resultados más precisos. Por otra parte, en caso de que la concentración de hierro en *ilr3-1* efectivamente no cambie, o incluso sea menor, esto llevaría a pensar que las respuestas fenotípicas de *ilr3-1* observadas en deficiencia de hierro y fósforo, no dependen de la concentración total de hierro, si no tal vez de modificaciones en el transporte interno de dicho elemento, o de la concentración acumulada en zonas específicas, por ejemplo, alrededor del centro quiescente, ya que con la tinción de Perls/DAB se puede observar que esta zona se encuentra más fuertemente teñida que el resto del MAR (meristemo apical de la raíz).

Por otra parte, cabe señalar que en deficiencia de hierro, la mayor concentración de este metal se observó en la zona de la punta de la raíz primaria, en primera instancia quizás porque el hierro es necesario para completar el ciclo celular y la planta lo acumula en la zona meristemática, pero también podría funcionar como un mecanismo de señalización local. Otros reportes han mencionado la importancia de la punta de la raíz en la respuesta a la deficiencia de nutrientes (Shimotohno *et al.*, 2015; Ruiz Herrera *et al.*, 2015; Müller *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2016). Si bien no hubo cambios en la concentración de hierro en deficiencia de fósforo, si hubo un claro aumento en la deposición de callosa en la punta de la raíz primaria (Fig. 18), lo cual concuerda con el modelo propuesto por Müller *et al.* (2015), así como una disminución en la expresión de *DR5:GFP* (Fig. 13) y *PIN1:PIN1:GFP* (Fig. 14) probablemente provocada por la deposición de callosa. Posiblemente *ILR3* regule la formación de especies reactivas de oxígeno mediante el control del módulo PDR2-LPR1 o mediante otro mecanismo aún desconocido, que provoca el aumento en la

deposición de callosa. Es interesante notar que la deposición de callosa en Col-0 se observó en la zona de diferenciación, pero no en la punta, lo cual sugeriría que *ilr3-1* tiene respuesta exacerbada y prematura a la deficiencia de fosfato. No se descarta que si la deposición de callosa en Col-0 se analiza a un mayor tiempo de exposición a la deficiencia de fosfato, se encontraría una respuesta similar a *ilr3-1*. Debido a la acumulación de callosa relacionada a una inhibición en la comunicación célula-célula, supusimos que la concentración del máximo de auxinas en la punta de la raíz se vería afectada. Esta hipótesis fue confirmada por la disminución en la expresión de las líneas reporteras *DR5:GFP* y *PIN1:PIN1:GFP*, esta disminución además de la imposibilidad de SHR de movilizarse hacia el centro quiescente (Müller *et al.*, 2015) ocasionan la diferenciación meristemática bajo deficiencia de fósforo. Sería interesante analizar qué ocurre en el nicho de células fuente del meristemo de la mutante *ilr3-1* en deficiencia de fosfato.

Cabe mencionar que en la deficiencia de fosfato se ha reportado la participación del factor transcripcional bHLH32, que regula negativamente los procesos inducidos por deficiencia de fosfato en *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2017). ILR3 se expresa constitutivamente (Rampey *et al.*, 2006) y debido al alto porcentaje de dimerización entre las proteínas de la familia bHLH, no sería extraño que ILR3 interactuara de alguna manera con bHLH32 o con otros bHLH durante la deficiencia de fosfato.

En conjunto los resultados anteriores indican la participación de ILR3 en la deficiencia de fosfato, por lo que se decidió evaluar la expresión del transportador de alta afinidad de fosfato *AtPT2* en el fondo mutante *ilr3-1*; bajo deficiencia de hierro y fosfato. El patrón de expresión de *AtPT2:uidA* en diferentes concentraciones de deficiencia de fosfato (0, 1 y 10  $\mu$ M) fue diferente al observado en Col-0. En Col-0 a excepción de la concentración de 10  $\mu$ M, la expresión fue homogénea en la punta de la raíz primaria y en la zona de diferenciación, mientras que en *ilr3-1*, la expresión se mantuvo en la punta de la raíz primaria, pero disminuyó en la zona de diferenciación conforme menor fue la concentración de fosfato. Se ha demostrado que la cofia de la raíz primaria contribuye con un 20% del total del fosfato absorbido por las raíces (Kanno *et al.*, 2016), lo cual podría explicar por qué la expresión de *AtPT2:uidA*

aumenta en la punta de la raíz primaria. El hecho de que en el fondo Col-0 en la concentración de 10  $\mu\text{M}$  no se haya observado expresión de *AtPT2:uidA* en la punta de la raíz primaria podría indicar 1) que a esta concentración la deficiencia de fósforo aún no es tan extrema, o 2) que la expresión de *AtPT2* en la punta de la raíz aumenta conforme avanza el programa de crecimiento y ya que dicho programa se da prematuramente en *ilr3-1*, esto es lo que ocasionó que su expresión se observara en el fondo mutante pero no en el silvestre. Debido a que la expresión de *AtPT2:uidA* está alterada en el fondo mutante *ilr3-1* y se sabe que ILR3 participa en las respuestas a la deficiencia de hierro (Salmerón-Barrera, 2015; Zhang *et al.*, 2015) y fósforo (resultados presentados en este trabajo), se analizó la expresión de *AtPT2:uidA* en diferentes combinaciones de dichos nutrientes. Tal como se esperaba no hubo expresión en las condiciones de deficiencia de hierro, pues esta línea reportera es típica de la deficiencia de fósforo (Karthikeyan *et al.*, 2002). Mientras que en las condiciones de deficiencia de hierro y de fósforo ( $-\text{PO}_4\text{-Fe}$ ,  $-\text{PO}_4\text{+Fz}$ ) se observó una disminución y cambios en el patrón de expresión, lo cual fue más evidente en el tratamiento con ferrozina. De acuerdo a la concentración de hierro observada con la tinción Perls/DAB en este trabajo y por la disminución en la expresión de *AtPT2:uidA* en los tratamientos que combinan ambas deficiencias, puede sugerirse que al retirar el hierro del medio, la concentración de este elemento en la planta disminuye, lo cual puede estar facilitando el transporte pasivo de fósforo, lo que ocasiona un incremento en la concentración de fósforo interno y por lo tanto una disminución en la expresión de *AtPT2*, debido a que el transporte activo de fósforo ya no sería necesario. Esta hipótesis concuerda con las respuestas observadas en el fondo mutante *ilr3-1*, en donde el patrón de expresión de *AtPT2:uidA* disminuyó considerablemente (más que en el fondo silvestre) e incluso en el tratamiento de  $-\text{PO}_4\text{+Fz}$ , la expresión cesó por completo, lo que sería explicado por el hecho de que al parecer, la mutante *ilr3-1* muestra una menor concentración de hierro interno en condiciones de deficiencia de hierro.

Paralelamente a estos resultados se analizó, mediante el uso de las mutantes nulas *bts-1* y *pve-1*, la respuesta a la deficiencia de fósforo de los genes *BTS* y *PVE*, los cuales interactúan con ILR3 en la vía de señalización del hierro (Long *et al.*, 2010).

Contrario a lo esperado, dichas mutantes no presentaron modificaciones fenotípicas en deficiencia de fosfato, lo cual indicó que las respuestas a la deficiencia de fosfato no son reguladas mediante la vía de señalización de hierro que involucra a BTS y PYE. Sin embargo, debido a que PYE regula genes que participan en la homeostasis del hierro, tales como *FRO3* (*FERRIC REDUCTION OXIDASE 3*), *NAS4* (*NICOTIANAMINE SYNTHASE 4*) y *ZIF1* (*ZINC-INDUCED FACILITATOR 1*), sería interesante analizar su expresión para descartar por completo su participación en la regulación a la deficiencia de fosfato.

Se ha propuesto que la mutación en *ilr3-1* aumenta los niveles de la proteína ILR3 y afecta la actividad o la estabilidad en la formación de homo o heterodímeros (Rampey *et al.*, 2006); lo cual estaría provocando una respuesta acelerada a la deficiencia de fósforo. Dicha aceleración estaría dada por un aumento en la deposición de calosa, que bloquea la comunicación célula-célula en la zona meristemática e impide el transporte de auxinas, provocando la diferenciación prematura del meristemo. Estos resultados sugieren la participación de ILR3 en la regulación de dichas respuestas, aunque se desconoce cuáles son los genes blanco a los que se une en deficiencia de fosfato, así como la posible formación de homo o heterodímeros. Adicionalmente se encontró que ILR3 participa en la regulación de AtPT2, aunque aún no se tiene esclarecido si este control es directo o existen otros componentes moleculares intermedios.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. ILR3 participa en la regulación de las respuestas de la raíz a la deficiencia de fosfato.
2. ILR3 regula de manera positiva la deposición de callosa, lo cual modifica los niveles de auxinas en la punta de la raíz primaria e impacta en el mantenimiento del meristemo bajo deficiencia de fosfato.
3. ILR3 regula de manera negativa la expresión de AtPT2 y podría incidir de esta manera en la capacidad de la planta para captar fosfato del suelo.

## X. REFERENCIAS

- Abel S., Ticconi C. A., Delatorre C. A. (2002)** Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum* 115: 1-8.
- Adler P.R, Cumming J. R., Arora R. (2009)** Agricultural sciences – Vol. I. United Kingdom. EOLSS/UNESCO.
- Alvarez J. M., Vidal E. A., Gutiérrez R. A. (2012)** Integration of local and systemic signaling pathways for plant N responses. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 185-191.
- Archibald F. (1983)** *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters* 19: 29–32.
- Arizmendi-Galicia N., Rivera-Ortiz P., Cruz-Salazar F. de I., Castro-Meza B.I., de la Garza-Requena F. (2011)** Lixiviación de hierro quelatado en suelos calcáreos. *Terra Latinoamericana* 29: 231-237.
- Ayadi A., David P., Arrighi J.-F., Ciarrenza S., Thibaud M.-C. Nussaume L., Marin E. (2015)** Reducing the genetic redundancy of Arabidopsis PHOSPHATE TRANSPORTER1 transporters to study phosphate uptake and signaling. *Plant Physiology* 167: 1511-1526.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. (2003)** Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591-602.
- Barker A. V., Pilbeam D. J. (2007)** Handbook of plant nutrition. United States of America. CRC Press Taylor & Francis Group.
- 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.
- Bournier M., Tissot N., Mari S., Boucherez J., Lacombe e., Briat J.-F., Gaymard F. (2013)** Arabidopsis ferritin 1 (AtFer1) gene regulation by the phosphate starvation

response 1 (AtPHR1) transcription factor reveals a direct molecular link between iron and phosphate homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* 288: 22670-22680.

**Briat J. F., Curie C., Gaymard F. (2007)** Iron utilization and metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 276 -282.

**Briat J. F., Rouached H., Tissot N., Gaymard F., Dubos C. (2015)** Integration of P, S, Fe, and Zn nutrition signals in *Arabidopsis thaliana*: potential involvement of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 (PHR1). *Frontiers in Plant Science* 6:290.

**Butusov M., Jernelöv A. (2013)** The Role of Phosphorus in the Origin of Life and in Evolution. In: Phosphorus. Springer Briefs in Environmental Science, vol 9. Springer.

**Cassin G., Mari S., Curie C., Briat J. F., Czernic P. (2009)** Increased sensitivity to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana* overaccumulating nicotianamine. *Journal of Experimental Botany* 60: 1249-1259.

**Chibuike G. U., Obiora S. C. (2014)** Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. *Applied and environmental soil science* 2014: 1-12.

**Clemens S., Weber M. (2015)** The essential role of coumarin secretion for Fe acquisition from alkaline soil. *Plant signaling & Behavior* 11: e1114197

**Connorton J.M., Balk J., Rodríguez-Celma J. (2017)** Iron homeostasis in plants – a brief review. *Metallomics* 9: 813-823.

**Coruzi G., Bush D. R. (2001)** Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiology* 125: 61-64.

**Curie C., Mari S. (2016)** New routes for plant iron mining. *New Phytologist* 214: 521-525.

**Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poething S., Roberts K., Scheres B. (1993)** Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119: 71-74

**Eckardt N. A. (2009)** A high-resolution map of auxin distribution in the *Arabidopsis* root apex. *The Plant Cell* 21: 1621.

- Fink J. R., Vasconcellos Inda A., Tiecher T., Barrón V. (2016)** Iron oxides and organic matter on soil phosphorus availability. *Ciência e Agrotecnologia*. 40: 369-379.
- Fischer A. P., Sozzani R. (2016)** Uncovering the networks involved in stem cell maintenance and asymmetric cell division in the Arabidopsis root. *Current Opinion in Plant Biology* 29: 38-43.
- Gayomba S. R., Zhai Z., Jun H., Vatamaniuk O. K. (2015)** Local and systemic signaling of iron status and its interactions with homeostasis of other essential elements. *Frontiers in Plant Science* 6: 716.
- Giehl R. F. H., Gruber B. D., von Wirén N. (2013)** It's time to make changes: modulation of root system architecture by nutrient signals. *Journal of Experimental Botany* 65: 769-778.
- Grierson C., Nielsen E., Ketelaarc T., Schiefelbein J. (2014)** Root hairs. *Arabidopsis Book* 12: e0172.
- Gruber B. D., Giehl R. F. H., Friedel S., von Wirén N. (2013)** Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiology* 163: 161-179.
- Gu M., Chen A., Sun S., Xu G. (2016)** Complex regulation of plant phosphate transporters and the gap between molecular mechanisms and practical application: what is missing? *Molecular Plant* 9: 396-416.
- Ham B. -K., Chen J., Yan Y., Lucas W. J. (2018)** Insights into plant phosphate sensing and signaling. *Current Opinion in Biotechnology* 49: 1-9.
- Hartemink A.E. (2016)** The definition of soil since the early 1800s. *Advances in Agronomy* 137: 73-12.
- Heim M. A., Jakoby M., Werber M., Martin C., Weisshaar B., Bailey P. C. (2003)** The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology Evolution* 20: 735-747.

- Herrera-Estrella L., López-Arredondo D. (2016)** Phosphorus: the underrated element for feeding the world. *Trends in Plant Science* 21: 461-463.
- Hirsch E.M., Floriani M., Chiarenza S., Richaud P., Nussaume L., Thibaud M.C. (2006)** Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in Arabidopsis plants. *Biochimie* 88: 1767-1771.
- Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W. (1987)** GUS fusions: betaglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The European Molecular Biology Organization Journal* 6:3901–3907.
- Jeong J., Merkovich A., Clyne M., Conolly E. L. (2017)** Directing iron transport in dicots: regulating of iron acquisition and translocation. *Current Opinion in Plant Biology* 39: 106-113.
- Jin C. W., You G. Y., Zheng S. J. (2008)** The iron deficiency-induced phenolics secretion plays multiple important roles in plant iron acquisition underground. *Plant Signaling & Behavior* 3:60-61.
- Jones S (2004)** An overview of the basic-helix-loop-helix proteins. *Genome Biology* 5: 226.
- Juárez-Sanz M., Cerdán M., Sánchez-Sánchez A. (2007)** Hierro en el sistema suelo planta. Departamento de agroquímica y bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante.
- Kanno S., Arrighi J. -F., Chiarenza S., Bayle V., Berthomé R., Péret B., Javot H., Delannoy E., Marin E., Nakanishi T. M., Thibaud M.-C., Nussaume L. (2016)** A novel role for the root cap in phosphate uptake and homeostasis. *eLIFE* 5:e14577.
- Karthikeyan S.A., Varadarajan D.K., Mukatira U.T., D’Urzo M.P., Damsz B. and Raghothama K.G. (2002)** Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiology* 130: 221–233.
- Kim S. A., Guerinot M. L. (2007)** Mining iron: iron uptake and transport in plants. *Federation of European Microbiological Societies Letters* 581: 2273-2280

- Kobayashi T., Nishizawa N. K. (2014)** Iron sensors and signals in response to iron deficiency. *Plant science* 224: 36-43.
- Kobayashi T., Nishizawa N.K. (2015)** Intracellular iron sensing by the direct binding of iron regulators. *Front Plant Science* 6: 155.
- Koevoets I. T., Venema J. H., Elzenga J.T.M., Testerink C. (2016)** Roots whitstanding their environment: exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. *Front Plant Science* 7: 1335.
- Koornneef M., Meinke D. (2010)** The development of Arabidopsis as a model plant. *The Plant Journal* 61: 909-921.
- Krämer U. (2015)** The natural history of model organisms: planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* 4:e06100.
- Lešková A., Giehl R. F. H., Hartmann A., Fargašová A., von Wirén N. (2017)** Heavy metals induce iron-deficiency responses at different hierarchic and regulatory levels. *Plant Physiology Preview*.
- Li G. Kronzucker H. J., Shi W. (2016)** The response of the root apex in plant adaptation to iron heterogeneity in soil. *Frontiers in Plant Science* 7:344.
- Li L. H., Guo N., Wu Z. Y., Zhao J. M., Sun J. T., Wang X. T., Xing H. (2015)** P1BS, a conserved motif involved in tolerance to phosphate starvation in soybean. *Genetics and Molecular Research* 14: 9384-94.
- Li W., Lan P. (2015)** Genome-wide analysis of overlapping genes regulated by iron deficiency and phosphate starvation reveals new interactions in Arabidopsis roots. *Biomedical Research Notes* 8:555.
- Li X., Zhang H., Ai Q., Liang G., Yu D. (2016)** Two bHLH Transcription Factors, bHLH34 and bHLH104, Regulate Iron Homeostasis in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology* 170: 2478-2493.

- Liang G., Zhang H., Li X., Ai Q., Yu D. (2017)** bHLH transcription factor bHLH115 regulates iron homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 68: 1743-1755.
- Lipiec J., Doussan C., Nosalewicz A., Kondracka K. (2013)** Effect of drought and heat stresses on plant growth and yield. *International agrophysics* 27: 463-477.
- Liu T. Y., Huan T.- K., Yang S.-Y., Hong Y.-T., Huang S.-M., Wang F.-N., Chiang S.-F., Tsai S.-Y., Lu W.-C., Chiou T.-J. (2016)** Identification of plant vacuolar transporters mediating phosphate storage. *Nature Communications* 7: 11095.
- Liu Y., Xu M., Liang N., Zheng Y., Yu Q., Wu S. (2017)** Symplastic communication spat ally directs local auxin biosynthesis to maintain root stem cell niche in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 4005-4010.
- Long T.A., Tsukagoshi H., Busch W., Lahner B., Salt D. E., Benfey P. N. (2010)** The bHLH transcription factor POPEYE regulates response to iron deficiency in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* 22: 2219-2236.
- 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.
- Lopez-Bucio L., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M.R., Simpson J., Herrera-Estrella L. (2002)** Phosphate sensitivity alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* 129: 244-256.
- López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Pérez-Torres A., Rampey R. A., Bartel B., Herrera-Estrella L. (2005)** An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress- induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation. *Plant Physiology* 137: 681-691.
- Lutz Ehrlich H. (2002)** Geomicrobiology. Fourth Edition. Marcel Dekker, Inc.

- Malamy J. E., Benfey P. N. (1997)** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.
- McCauley A., Jones C., Jacobsen J. (2005)** Basic soil properties. Soil and Water Management Module I. Montana State University [http://landresources.montana.edu/swm/documents/Final\\_proof\\_SW1.pdf](http://landresources.montana.edu/swm/documents/Final_proof_SW1.pdf) (Accesado en Noviembre de 2017).
- Meyerowitz E. M. (2001)** Prehistory and history of Arabidopsis research. *Plant Physiology* 125: 15-19.
- Misson J., Rahgothama K. G., Jain A., Jouhet J., Block M. A., Bligny R., Ortet P., Creff A., Somerville S., Rolland N., Doumas P., Nacry P., Herrera-Estrella L., Nussaume L., Thibaud M. C. (2005)** A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 11934-11930
- Młodzińska E., Zboińska M. (2016)** Phosphate uptake and allocation – A closer look at *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science* 7:1198
- Murashige T., Skoog F. (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Müller J., Toev T., Bürstenbinder K., Abel S. (2015)** Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Developmental Cell* 33: 216-230
- Nibau C., Gibbs D. J., Coates J.C. (2008)** Branching out in the new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytologist* 179: 595-614.
- Oelkers E. H., Valsami-Jones E. (2008)** Phosphate Mineral Reactivity and Global Sustainability. *Elements* 4: 83-87.
- Ortiz-Castro R., Contreras-Cornejo H. A., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J. (2009)** The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 4:701-712

- Ottensschläger I., Wolff P., Wolverton C., Bhalerao R. P., Sandberg G., Ishikawa H., Evans M. Palme K. (2003).** Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 2987-2991.
- Pagliari P. H., Kaise D. E., Rosen C. J., Lamb J. A. (2017)** The nature of phosphorus in soils. Nutrient Management. University of Minnesota Extension. <https://www.extension.umn.edu/agriculture/nutrientmanagement/phosphorus/the-nature-of-phosphorus/docs/the-nature-of-phosphorus.pdf> (Accesado en Noviembre de 2017).
- Parida A. K., Das A. B. (2005)** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60: 324-349.
- Peñaloza E., Santiago M., Cabrera S., Muñoz G., Corcuera L. J. Silva H. (2016)** Characterization of the high-affinity phosphate transporter PHT1;4 gene promoter of *Arabidopsis thaliana* in transgenic wheat. *Biologia Plantarum* 61: 453-462.
- Péret B., Clément Mathilde, Nussaume L., Desnos T. (2011)** Root developmental adaptation to phosphate starvation: better safe than sorry. *Trends in Plant Science* 16: 442-450.
- Pires N., Dolan L. (2009)** Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular Biology and Evolution* 27: 862-874.
- Plaxton W. C., Tran H. T. (2011)** Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiology* 156: 1006-1015.
- Posey J. E., Gherardini F. C. (2000)** Lack of iron in the Lyme disease pathogen. *Science* 288: 1651-1653.
- Provart N. J., Alonso J., Assmann S. M., Bergmann D., Brady S. M., Brkjacic J., Browse J., Chapple C., Colot V., Cutler S., Dangl J., Ehrhardt D., Friesner J. D., Frommer W. B., Grotewold E., Meyerowitz E., Nemhauser J., Nordborg M., Pikaard C., Shanklin J., Somerville C., Stitt M., Torii K. U., Waese J., Wagner D.,**

- McCourt P. (2016)** 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytologist* 209: 921-944.
- Puig S., Ramos-Alonso L., Romero A. M., Martínez-Pastor M. T. (2017)** The elemental role of iron in DNA synthesis and repair. *Metallomics* 9: 1483-1500.
- Rampey R. A., Woodward A. W., Hobbs B. N., Tierney M. P., Lahner B., Salt D. E., Bartel B. (2006)** An Arabidopsis basic helix-loop-helix leucine zipper protein modulates metal homeostasis and auxin conjugate responsiveness. *Genetics* 174: 1841-1857.
- Rao K. V. M., Raghavendra A. S., Reddy K. J. (2006)** Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants. Springer.
- Raven J. A. (2013)** The evolution of autotrophy in relation to phosphorus requirement. *Journal of Experimental Botany* 64: 4023-4046.
- Rédei G. P. (1975)** Arabidopsis as a genetic tool. *Annual Review of Genetics* 9: 111-127.
- Roschttardt H., Conéjero G., Curie C., Mari S. (2009)** Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the Arabidopsis embryo. *Plant Physiology* 151: 1329-1338.
- Roschttardt H., Conéjero G., Curie C., Mari S. (2010)** Straightforward histochemical staining of Fe by the adaptation of an old-school technique. *Plant Signaling & Behavior* 5: 56-57.
- Rubio V., Linhares f., Solano R., Martín A. C., Iglesias J., Leyva A., Paz-Ares J. (2001)** A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and unicellular algae. *Genes and Development* 15: 2122-33.
- Ruíz-Herrera L. F. (2012)** Regulación de la arquitectura de la raíz por cationes trivalentes y su impacto en las respuestas a la deficiencia de fosfato. Tesis de doctorado. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán, México. 151 pp.

- Ruiz Herrera L. F., Shane M. W., López-Bucio J. (2015)** Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* 4: 431-443.
- Saaltink R. M., Dekker S. C., Eppinga M. B., Griffioen J., Wassen M. J. (2017)** Plant-specific effects of iron-toxicity in wetlands. *Plant and Soil* 416: 83-96.
- Salmerón-Barrera G. J. (2015)** Análisis de la arquitectura radicular de mutantes afectadas en la respuesta a la deficiencia de hierro en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Micoacán, México. 62 pp.
- Sánchez-Calderón L., López-Bucio J., Chacón-López A., Cruz-Ramírez A., Nieto-Jacobo F., Dubrovsky J. G., Herrera-Estrella L. (2005)** Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 46: 174-184.
- Santi S., Schmidt W. (2009)** Dissecting iron deficiency-induced proton extrusion in *Arabidopsis* roots. *New Phytologist* 183: 1072-1084.
- Schachtman P., Reid R. J., Ayling S. M. (1998)** Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. *Plant Physiology* 116: 447-453.
- Shimotohno A., Sotta N., Sato T., De Ruvo M., Marée A. F., Grieneisen V.A. Fujiwara T. (2015)** Mathematical modeling and experimental validation of the spatial distribution of boron in the root of *Arabidopsis thaliana* identify high boron accumulation in the tip and predict root tip uptake function. *Plant & Cell Physiology* 56: 620-630.
- Shin H., Shin H.-S., Dewbre G. R., Harrison M. J. (2004)** Phosphate transport in *Arabidopsis*: Pht1;1 and Pht1;4 play a major role in phosphate acquisition from both low- and high- phosphate environments. *The Plant Journal* 39: 629-642.
- Schmidt H., Günther C., Weber M., Spörlein C., Loscher S., Böttcher C., Schobert R., Clemens S. (2014)** Metabolome analysis of *Arabidopsis thaliana* roots identifies a key metabolic pathway for iron acquisition. *Public Library of Science ONE* 9: e102444.

- Selote D., Samira R., Matthiadis A., Gillikin J. W., Long T. A. (2015)** Iron-binding E3 ligase mediates iron response in plants by targeting basic helix-loop-helix transcription factors. *Plant Physiology* 167: 273-286.
- Sigel A., Sigel H. (1998)** Metal ions in biological systems. Volumen 35. Marcel Dekker Inc.
- Sivitz A. B., Hermand V., Curie C., Vert G. (2012)** Arabidopsis bHLH100 and bHLH101 control iron homeostasis via a FIT-Independent pathway. *Public Library of Science One* 7: e44843.
- Smith F. W. (2002)** The phosphate uptake mechanism. *Plant and Soil* 245: 105-114.
- Smith S., De Smet I. (2012)** Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 367: 1441-1452.
- Somerville C., Koornneef M. (2002)** A fortunate choice: the history of Arabidopsis as a model plant. *Nature Reviews Genetics*. 3: 883-889.
- Strunnikov A. V., Aravind L., Koonin E. V. (2001)** Saccharomyces cerevisiae SMT4 encodes an evolutionary conserved protease with a role in chromosome condensation regulation. *Genetics* 158: 95-107.
- Sun T., Li M., Shao Y., Yu L., Ma F. (2017)** Comprehensive genomic identification and expression analysis of the phosphate transporter (PHT) gene family in Apple. *Frontiers in Plant Science* 8:426.P
- Taiz L., Zeiger E. (2005)** Plant Physiology. United States of America. Sinauer Associates Inc., Publishers.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000)** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
- Thibaud M. C., Arrighi J. F., Bayle V., Chiarenza S., Creff A., Bustos R., Paz-Ares J., Poirier Y., Nussaume L. (2010)** Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in Arabidopsis. *The Plant Journal* 64: 775-789.

- Toledo-Ortíz G., Huq E., Quail P. H. (2003)** The *Arabidopsis* basic/Helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell* 25: 1749-1770.
- Vilches-Barro A., Maizel A. (2015)** Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 23: 31-38.
- Walker E. L., Connolly E. L. (2008)** Time to pump iron: iron-deficiency signaling mechanisms on higher plants. *Current Opinion in Plant biology* 11: 530–535.
- Wang F., Deng M., Xu J., Zhu X., Mao Ch. (2017)** Molecular mechanism of phosphate signaling in plants. *Cell & Developmental Biology* 74: 114-122.
- Ward J. T., Lahner B., Yakubova E., Salt D.E., Raghothama K. G. (2008)** The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiology* 147: 1181 -1191.
- Warren C. R. (2011)** How does P affect photosynthesis and metabolite profiles of *Eucalyptus globulus*? *Tree Physiology* 31: 727-739.
- White P. J., Hammond J. P. (2008)** The ecophysiology of plant-phosphorus interactions. Vol. 7. Netherlands. Springer.
- Wu H., Li L., Du J., Yuan Y., Cheng X., Ling H. - Q. (2005)** Molecular and biochemical characterization of the Fe (III) chelate reductase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 46: 1505-1514
- Yang X. J., Finnegan P. M. (2010)** Regulation of phosphate starvation responses in higher plants. *Annals of Botany* 105: 513-526.
- Zhang J., Liu B., Li M., Feng., Jin H., Wang P., Liu J., Xiong F., Wang J., Wang H.-B. (2015)** The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 27: 787-805.

**Zhang Z., Liao H., Lucas W. J. (2014)** Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 56: 192-220.