



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD de GENÓMICA AVANZADA

LANGEBIO

***STOP1 y ALMT1* inhiben el crecimiento longitudinal de la raíz, a través de la excreción de malato, en respuesta a la carencia de fósforo en *Arabidopsis***

Tesis que presenta  
**JAVIER MORA MACIAS**

Para obtener el grado de  
**Doctor en Ciencias**

Con la Especialidad de  
**Biotecnología de Plantas**

Director de Tesis: **DR. LUIS R. HERRERA ESTRELLA**

Agosto de 2017 en Irapuato, Guanajuato, México.

**Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología e Ingeniería Metabólica de Plantas (Lab-5), dentro del Laboratorio Nacional de Genómicas para la Biodiversidad, ahora llamado Unidad de Genómica Avanzada (UGA) del CINVESTAV-IRAPUATO.**

Dedicada a mis Padres Javier y M Lilia.

# AGRADECIMIENTOS

A mis Padres. Simplemente, sin ustedes yo no estaría aquí.

Al Dr. Luis Herrera-Estrella. Gracias por confiar en mi y ser mi ejemplo a seguir.  
Continuaremos evolucionando la agricultura!

A mis hermanos y cómplices de vida, tu también Wend, los quiero como a nadie más en el mundo.  
Este logró también se los dedico a ustedes.

Sobrinos míos, ustedes si que no dejan de sorprenderme, sigan asombrándose!

Abuelos, Abuelas, Tíos, Tías, Primos, Primas, sin duda vamos por buen camino, gracias por su apoyo!

A la Ardilla y mi otra familia, la mitad de este trabajo es suyo.

A mis compañeros de laboratorio. Que el *Lab-5* siga siendo el mejor!

Ara, aunque al inició me exiliaste, me enseñaste a trabajar en equipo, Gracias!!!

Alfredo Cruz, Andrés Cruz, gracias por enseñarme a levantar y seguir adelante...

A mi comité tutorial, no los defraudaré!

Dora, muchas gracias por todo :)

A mis estudiantes de licenciatura y todos mis veranitos, ustedes son parte de esta historia.

Al LANGEBIO-CINVESTAV, la cuna que me vio nacer, gracias por la oportunidad.

Gracias *Real-thaliana*<sup>(VC)</sup>, Gracias *Galánticos*<sup>(FC)</sup>, la historia los recordará!

Jorge, eres un gran ser humano, gracias por ser mi amigo!!!

Familia Rámoz-Álvarez y Familia Peyron-Urrea, gracias por su amistad y dejarme ser parte de su familia :)

Gracias por su financiamiento a CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, N° de Becario:234730 y proyecto de ciencia básica 252039), a CIMMYT (Internation Maiz and Wheat Improvement Center, beca Luis Herrera-Estrella) y a HHMI (Howard Hughes Medical Institute 4367, beca Luis Herrera-Estrella).

## Especial agradecimiento al "equipo Malato"

Araceli Fernández-Cortéz y Gabriel Jiménez-Rodríguez. Gracias por su tiempo y siempre buena disponibilidad. Su habilidad y conocimiento en el campo de la bioinformática, particularmente para el análisis y visualización de genomas que facilitó el mapeo genético de mutantes químicas, y los cálculos de dinámica molecular que predijeron las interacción moléculares entre el malato y el Fe, hicieron de este trabajo un gran éxito!

A Dolores Gutiérrez-Alanís y Javier Raya-González. Gracias por su excelente trabajo histológico y por las pequeñas pláticas, pero siempre productivas que llevaban a la reflexión.

A Gabriela Chávez-Calvillo, Sandra I. Gonzalez-Morales, Lenin Yong-Villalobos, Sergio A. Cervantes-Pérez, y Jonathan O. Ojeda-Rivera. Gracias por sus extraordinarias ideas que dieron forma al análisis transcriptómico que integra a este trabajo.

A Gabriela Chávez-Calvillo y Jonathan O. Ojeda-Rivera. Gracias por el *script* para R-studio que facilitó el análisis estadístico, y llenó de estilo las gráficas aquí mostradas.

A Araceli Oropeza-Aburto. Debería escribir un libro "El Arte de la Biología Molecular", todo te sale!!! Gracias por las construcciones y el análisis de las líneas reporteras que mostraron la expresión de los genes descrito en esta tesis.

A Rubén Rellán-Álvarez. Gracias por tu ejemplo, me mostraste una perspectiva de la ciencia que me ayudará sin duda, a ser un científico más exitoso.

A Jonathan O. Ojeda-Rivera. Gracias por mostrarme el camino en el arte de la escritura y la retórica. Este triunfo es el resultado de nuestro trabajo hombro a hombro.

A Rubén Rellán-Alvaréz. Gracias por los consejos y recomendaciones que dieron claridad y orden a esta tesis.

Al Dr. Luis Herrera-Estrella. Gracias por enseñarme a pensar y conducir mis esfuerzos de forma más inteligente.

A la Escuela Forestal (CECFOR1) y a la Facultad de Agriobología (UMSNH), ambas ubicadas en Uruapan, Michoacan. La visión de este trabajo es fruto de sus enseñanzas. Gracias!!!

Gracias a todos lo que de una u otra manera contribuyeron con esta historia...

**Todo lo que escuchamos es una opinión, no un hecho.  
Todo lo que vemos es una perspectiva, no es la verdad.**

(Marco Aurelio en la Antigua Roma).

## RESUMEN

La carencia de fósforo en plantas es una de las principales causas que limita la producción agrícola. Con la Revolución Verde, el uso de fósforo de roca mineral (Pi) como fertilizante para nutrir los cultivos, resolvió el problema agrícola de carencia de Pi en la mayoría de los suelos. Sin embargo, el Pi es un recurso no renovable y se pronostica que las reservas naturales de Pi se agotarán para finales del presente siglo. Considerando que la agricultura es y será una actividad primaria que alimenta y alimentará a la humanidad, es urgente establecer herramientas biotecnológicas que mantengan y mejoren los rendimientos agrícolas alcanzados en la actualidad.

El estudio de la respuesta natural de las plantas al constante ambiente cambiante (como la disponibilidad nutrimental del medio) es fundamental para el establecimiento de estrategias biotecnológicas que mejoren la producción agrícola. *Arabidopsis* es un buen modelo para el estudio de la respuesta de las plantas a la carencia de P, por que además de conservar varios mecanismos de aclimatación observados en cultivares de interés agronómico como maíz, trigo y arroz, induce modificaciones morfológicas que potencian la exploración del sistema radicular a través del suelo. Particularmente, *Arabidopsis* inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal, mediante un mecanismo específico de la punta de la raíz, que provoca la diferenciación celular del meristemo (también conocido como agotamiento meristemático). Sorprendentemente, la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi, es determinado por la disponibilidad de hierro; durante el desarrollo de este proyecto, Muller y Colaboradores en 2015, propusieron que la acumulación de hierro en la punta de la raíz, específicamente alrededor de las células del centro quiescente (QC), modifica el estatus oxido-reductor (ROS) de la pared celular, lo cual induce un programa transcripcional que desencadena el agotamiento del meristemo radicular en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi.

Basado en la caracterización genética, celular y morfológica de las mutantes *low phosphate insensitive 5 (lpi5)* y *low phosphate insensitive 6 (lpi6)*, en esta tesis propongo que la excreción de malato (un quelante natural de metales) a través de la punta de la raíz, mediado por el módulo funcional *STOP1 (SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1)* and *ALMT1 (ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1)*, induce dicha acumulación de fierro, previamente vinculada con el agotamiento meristemático de *Arabidopsis* ante la carencia de P. Mis resultados además sugieren la existencia de un mecanismo basado en la excreción de ácidos orgánicos, que podría ser manipulado biotecnológicamente para modular el desarrollo del sistema radicular y mejorar la producción de cultivos agrícolas ante diferentes condiciones del suelo.

## SUMMARY

Phosphate-starvation in plants is a serious agricultural problem for crop production. With the Green Revolution, the mineral rock phosphate (Pi) used as crops fertilizer, alleviated the problem of low Pi availability in most soils. However, Pi is a non-renewable element and the natural Pi source will be consumed over the next century. Considering that agricultural food production is and will be a primary activity to feed humanity, it is urgent to establish biotechnological tools to maintain and improve the agricultural yields achieved to date.

The study of the natural plant response to constant environmental changes (e.g. the response to nutritional deficiency), is fundamental in establishing biotechnological strategies to improve agricultural crop production. Arabidopsis is a good model to study the natural plant response to low phosphate availability because it conserves several adaptive mechanisms that induce the acclimation response of plants to phosphate-starvation. Also, Arabidopsis induces specific root morphological modifications which redirect root soil exploration. Specifically, Arabidopsis inhibits primary root growth, through a root-tip (root meristem) specific processes than induces meristem differentiation, also know as meristem-exhaustion. Surprisingly, Arabidopsis primary root growth inhibition is an iron-dependent mechanism; during the development of this project, Muller *et al* 2015, proposed that iron accumulation in the root-tip, specifically surrounding quiescent cells, modify the reactive oxygen species (ROS) status, which induces a transcriptional response (of hundreds of genes) that trigger root meristem-exhaustion.

Based on a genetic, cellular and morphological characterization of the Arabidopsis *low phosphate insensitive 5 (lpi5)* and *low phosphate insensitive 6 (lpi6)* mutants, in this thesis I propose that malate (a natural metal chelating) release through root-tip, mediated by the functional module *STOP1 (SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1)* and, *ALMT1 (ALUMINIUM-ACTIVATED*

*MALATE TRANSPORTER 1*), induce the iron accumulation (surrounding the QC cells), that trigger root meristem-exhaustion and the consequent primary root growth inhibition under low phosphate conditions. My results also suggest the existence of a mechanism based on organic acids efflux that could be manipulated biotechnologically to modulates root development to improve crops production under different soil conditions.

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>16</b>
<i>El reto de la carencia de Pi en la agricultura actual</i>	18
<i>La respuesta natural de las plantas a la baja disponibilidad de Pi en el medio</i>	20
<i>La inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en -Pi</i>	25
<i>Percepción de Pi, señalización y respuesta a la carencia de Pi</i>	31
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>41</b>
<b>OBJETIVO</b>	<b>41</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>42</b>
<b>ESTRATEGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>56</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>58</b>
<b>Capítulo 1</b>	<b>58</b>
<i>Construcción de la línea reportera de Arabidopsis pro790::GUS-GFP/Col-0</i>	58
<b>Capítulo 2</b>	<b>67</b>
<i>Identificación de mutantes insensibles a la carencia de Pi en Arabidopsis</i>	67
<b>Capítulo 3</b>	<b>69</b>
<i>lpi5 y lpi6 son mutantes de Arabidopsis alteradas en la respuesta local a la carencia de Pi.</i>	69
<b>Capítulo 4</b>	<b>75</b>
<i>lpi5 y lpi6 presentan mutaciones en el factor de transcripción STOP1 y en el transportador de malato ALMT1, respectivamente.</i>	75
<b>Capítulo 5</b>	<b>81</b>
<i>STOP1 induce transcripcionalmente la expresión de ALMT1 en respuesta a la baja disponibilidad de Pi, antes de la diferenciación del meristemo radicular.</i>	81
<b>Capítulo 6</b>	<b>83</b>
<i>La aplicación exógena de malato restablece la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en stop1 y almt1 ante la baja disponibilidad de fósforo.</i>	83
<b>Capítulo 7</b>	<b>86</b>
<i>La aplicación exógena malato induce la acumulación apoplástica de Fe<sup>+3</sup> en meristemo radicular de stop1 y almt1 ante la carencia de fósforo.</i>	86
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>94</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>114</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>117</b>
<b>APÉNDICE</b>	<b>127</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

---

Tabla 1. Condiciones de amplificación por PCR (tiempos y temperaturas), de las regiones promotoras de los genes <i>At5g20790</i> (amplicón de 533 pares de bases), <i>At134370</i> (amplicón de 2666 pares de bases) y <i>At1g08430</i> (amplicón de 2243 pares de bases).	43
Tabla 2. Análisis de segregación (resistencia a kanamicina), de las tres líneas reporteras <i>pro790::GUS-GFP</i> utilizadas para este trabajo.	62
Tabla 3. Genotipo de las mutantes <i>lpi5</i> y <i>lpi6</i> .	73
Tabla 4. Análisis alélico entre las mutantes químicas <i>lpi5</i> y <i>lpi6</i> , y las líneas insercionales Salk <i>stop1</i> y <i>almt1</i> , respectivamente.	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

Figura 1. La baja disponibilidad de fósforo para las plantas.....	17
Figura 2. Crecimiento de un cultivo de maíz fertilizado con fósforo (en la parte del fondo), y uno sin fertilizar (al frente). (D.M.G. de Sausa, 2012).....	18
Figura 3. Estadísticas de producción agrícola, crecimiento población y demanda de fertilizantes fosforados en el mundo, a partir de la revolución verde. ....	19
Figura 4. Respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en <i>Arabidopsis</i> .....	24
Figura 5. Modificaciones morfológica del sistema radicular en <i>Arabidopsis</i> ante la baja disponibilidad de Pi. ....	27
Figura 6. Agotamiento meristemático de la raíz principal en <i>Arabidopsis</i> ante la baja disponibilidad Pi en el medio. ....	27
Figura 7. Efecto de la disponibilidad de hierro en el crecimiento longitudinal de la raíz principal ante la baja disponibilidad de fósforo en el medio. ....	29
Figura 8. La correlación positiva entre la acumulación apoplástica de Fe <sup>+3</sup> , y el agotamiento meristemático de la raíz en <i>Arabidopsis</i> ante la carencia de Pi.....	29
Figura 9. Los genes <i>LPR1</i> y <i>LPR2</i> promueven la acumulación apoplástica de Fe <sup>+3</sup> que determina la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal, ante la carencia Pi.....	30
Figura 10. Diagrama esquemático del mecanismo de regulación de Pi en <i>E. coli</i> .....	33
Figura 11. Diagrama esquemático de la ruta de regulación de Pi en <i>S. cerevisiae</i> .....	35

Figura 12. Esquema comparativo de la composición y estructura química entre el fosfato (Pi) y sus dos compuestos análogos fosfito (Phi) y arsenato (As).....	35
Figura 13. Componentes clave en el mecanismo de percepción de Pi y respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en Plantas.....	39
Figura 14. Mapa del vector de expresión <i>pKGWFS7,0</i> usado para la construcción de las líneas reporteras <i>pro790::GUS-GFP</i> , <i>proSTOP1::GUS-GFP</i> y <i>proALMT1::GUS-GFP</i> .....	45
Figura 15. Diagrama general de la estrategia experimental para cumplir los objetivos específicos de este trabajo.....	57
Figura 16. Expresión reportera de la línea <i>pro790::GUS-GFP/Col-0</i> en Arabidopsis.....	61
Figura 17. Expresión reportera de la línea <i>pro790::GUS-GFP</i> en el fondo mutante <i>phr1</i> ..	63
Figura 18. Regulación sistémica de la expresión reportera <i>pro790::GUS-GFP</i> ante la carencia de Pi.....	64
Figura 19. El efecto del fosfito, y la carencia de otros nutrientes en la expresión de la línea reportera <i>pro790::GUS-GFP</i> en Arabidopsis.....	65
Figura 20. Clasificación de las mutantes identificadas con defectos en la respuesta a la carencia de Pi en Arabidopsis..	67
Figura 21. Análisis comparativo del crecimiento longitudinal de la raíz principal entre plantas WT, y las mutantes <i>lpi5</i> y <i>lpi6</i> .....	70
Figura 22. Defectos en la respuesta morfológica del sistema radicular de plántulas mutantes <i>lpi5</i> y <i>lpi6</i> ante la carencia de Pi.....	71
Figura 23. Expresión reportera de las líneas <i>proCycB1::GUS</i> y <i>porQC46::GUS</i> en meristemo radicular de plántulas WT, <i>lpi5</i> y <i>lpi6</i> .....	72
Figura 24. Expresión reportera del marcador de respuesta sistémica <i>pro790::GUS-GFP</i> en el fondo mutante <i>lpi5</i> y <i>lpi6</i> .....	74
Figura 25. Análisis <i>in silico</i> del mapeo por secuenciación de las mutantes <i>lpi5</i> y <i>lpi6</i> .....	76
Figura 26. Electroferogramas de validación para las mutación en <i>STOP1 (lpi5)</i> y <i>ALMT1 (lpi6)</i> .....	77
Figura 27. Análisis fenotípico entre los fenotipos de las mutantes químicas <i>lpi5</i> y <i>lpi6</i> y las líneas insercionales Salk <i>stop1</i> y <i>almt1</i> .....	79
Figura 28. Análisis de la expresión transcripcional (qRT-PCR) de <i>STOP1</i> y <i>ALMT1</i> en punta de la raíz principal. (C). .....	81

Figura 29. Análisis de expresión de las líneas transcripcional <i>proSTOP1::GFP</i> y <i>proALMT1::GFP</i> en meristemo radicular de la raíz principal.....	82
Figura 30. Efecto de la complementación con malato en el desarrollo de la raíz de plántulas WT, <i>stop1</i> y <i>almt1</i> en carencia de fósforo..	84
Figura 31. Efecto de la complementación con malato en la expresión de las líneas reporteras <i>proCycB1::GUS</i> y <i>por46QC::GUS</i> en meristemo de la raíz principal de plántulas WT, <i>stop1</i> y <i>almt1</i> .	85
Figura 32. Efecto de la baja disponibilidad de hierro, en el crecimiento longitudinal de la raíz principal de Arabidopsis ante la carencia de Pi.....	87
Figura 33. Efecto del tratamiento de complementación con malato, en el crecimiento longitudinal de la raíz principal en Arabidopsis ante la carencia de Pi, pero ante la baja disponibilidad de hierro..	87
Figura 34. Efecto del malato en la acumulación de $Fe^{+3}$ en meristemo radicular de la raíz principal de plántulas WT, <i>stop1</i> y <i>almt1</i> en carencia de fósforo.....	88
Figura 35. Efecto del tratamiento de complementación con malato en la acumulación de $Fe^{+3}$ en el meristemo radicular, y el crecimiento longitudinal de raíz principal de plántulas de Arabidopsis crecidas en suficiencia de Pi.....	89
Figura 36. Efecto de la complementación con malato en la acumulación apoplástica de $Fe^{+3}$ en meristemo radicular, y crecimiento de la raíz principal de plántulas <i>lpr1</i> en carencia de fósforo.....	91
Figura 37. Cálculos de dinámica molecular entre iones de malato e iones de hierro y aluminio, respectivamente. ....	92
Figura 38. Efecto de la complementación con citrato en el crecimiento longitudinal de la raíz de plántulas WT, <i>stop1</i> y <i>almt1</i> en carencia de fósforo.....	93
Figura 39. Sitios de unión ART en el promotor de la línea reportera <i>pro790::GUS-GFP</i> ..	98
Figura 40 Sitos de unión ART en la región funcional del promotor que induce la expresión de <i>ALMT1</i> en respuesta a la toxicidad por $Al^{+3}$ .....	101
Figura 41. Expresión de <i>LPR1</i> y acumulación de $Fe^{+3}$ en meristemo radicular de la raíz principal en Arabidopsis. ....	103
Figura 42. Efecto del tratamiento de complementación con ascorbato en el crecimiento longitudinal de plántulas de Arabidopsis ante la carencia de Pi. ....	107
Figura 42. Diagrama que muestra los elementos de regulación y su posición en la ruta de señalización que induce la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en Arabidopsis .....	110

**Figura 43. Modelo en donde *STOP1* y *ALMT1*, a través de la excreción de malato al medio, desencadena la diferenciación del meristemo radicular y consecuente inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi. .... 111**

El fósforo (P) es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas, y para virtualmente cualquier organismo vivo en este planeta. Esto se debe a que el P es un componente insustituible de moléculas clave para el metabolismo, como los ácidos nucleicos (ADN/ARN), los fosfolípidos de membranas y el ATP, además de que participa en diversos procesos de comunicación celular<sup>1,2</sup>.

El P es un elemento mineral que naturalmente interactúa con el oxígeno (O), y se le encuentra ampliamente distribuido en suelos de ecosistemas naturales y terrenos agrícolas alrededor del mundo<sup>1,3-6</sup>. Se sabe que las plantas toman el P directamente de la solución del suelo, a través de la raíz. Aunque pueden tomarlo en forma de fosfito (Phi) y fosfato (Pi), sólo lo pueden metabolizar en forma de ion fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ )<sup>7-10</sup>. Los análisis químicos del suelo suele sugerir que la concentración de Pi debería ser suficiente para alimentar a las plantas durante sus diferentes estadios del desarrollo, sin embargo esto no siempre resulta ser cierto, debido a que el Pi sólo es una porción mínima del total de P en el suelo ( $<10\mu\text{M}$ ), y suele encontrarse hasta en tres órdenes de magnitud inferior a lo determinado en el interior de las plantas (entre  $75\mu\text{M}$  y  $10000\mu\text{M}$ )<sup>1,10-12</sup>. Además se sabe que el ion Pi corresponde a una molécula altamente reactiva, que al interactuar con otros minerales como el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) en suelos con pH básico, o con el aluminio ( $\text{Al}^+$ ) y el hierro ( $\text{Fe}^+$ ) en soluciones con pH ácido, provoca la formación de compuestos fosforados e insolubles que la planta no puede tomar<sup>12-14</sup>. El resto del Pi en el suelo, en su gran mayoría se encuentra formando parte de restos orgánicos que la planta tampoco puede tomar (hasta el 80% del total). Lo anterior provoca que las plantas constantemente se enfrenten a condiciones de carencia de  $\text{Pi}^{15-18}$  (Fig1).

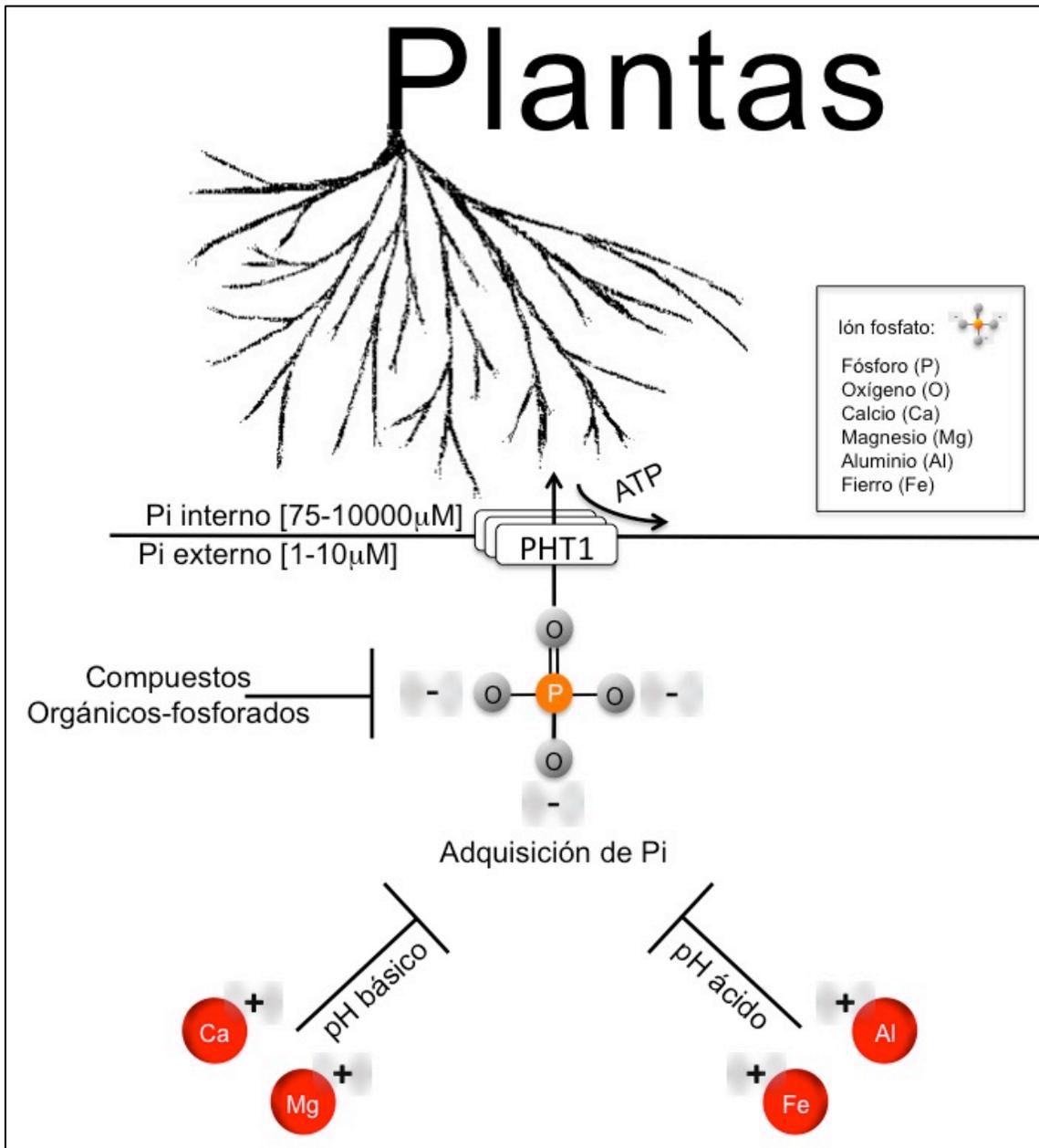


Figura 1. **La baja disponibilidad de fósforo (P) para las plantas.** El P es un elemento mineral del suelo que normalmente interactúa con el oxígeno (O), y se sabe que las plantas lo toman y metabolizan en forma de ion fosfato (Pi). Si bien los análisis químicos del suelo sugieren que la cantidad de Pi ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) es suficiente para alimentar a las plantas durante todo su ciclo de vida, esto no siempre resulta cierto, debido a que el Pi es sólo una porción mínima del suelo que normalmente se encuentra en concentraciones hasta en tres órdenes de magnitud inferior a lo observado dentro de las plantas. Además, el Pi es una molécula extremadamente reactiva lo que provoca que interactúe con otros minerales del suelo, como el calcio (Ca) y el magnesio (Mg) en suelos de pH básico, y con el aluminio (Al) y el fierro (Fe) en suelo con pH ácido, dando lugar a la formación de complejos fosforados que la planta no puede tomar. Lo anterior provoca que estos organismos constantemente se enfrenten a condiciones de carencia de Pi<sup>1,10,12</sup>.

## El reto de la carencia de Pi en la agricultura actual

Hasta el último censo de la ONU (2017), y las estadísticas más recientes de la FAO, la agricultura sigue y seguirá siendo una actividad primaria que alimenta a poco más de 6 mil millones de personas en la actualidad (toda la humanidad) y alimentará a más de 9 mil millones para el 2050, 30% más<sup>19</sup>. Actualmente la producción de alimentos agrícolas se sustenta en gran medida por la extracción, producción y uso de fertilizantes fósforados obtenidos a base de roca mineral<sup>2</sup>. Solamente para el año 2016, se reportó la producción de poco más de 160 millones de toneladas de fertilizantes a base de Pi extraído del suelo. El problema aquí es que las reservas de Pi mineral es un recurso no renovable cada vez más costoso que se está agotando. Las estadísticas más recientes pronostican que dichas reservas naturales de Pi mineral en el mundo se estarán terminando dentro de los próximos 50 a 100 años<sup>6,11</sup>. Lo anterior muestra el problema de los fertilizantes fósforados a base de roca mineral para el desarrollo agrícola y la producción de alimentos, y establece la necesidad de proponer estrategias biotecnológicas que mantengan los altos rendimiento de producción agrícola, haciendo uso de manera más eficiente de las reservas naturales "finitas" de Pi (Fig3).



Figura 2. Crecimiento de un cultivo de maíz fertilizado con fosfato (al fondo), y uno sin fertilizar (al frente). (créditos a D.M.G. de Sausa, 2012).

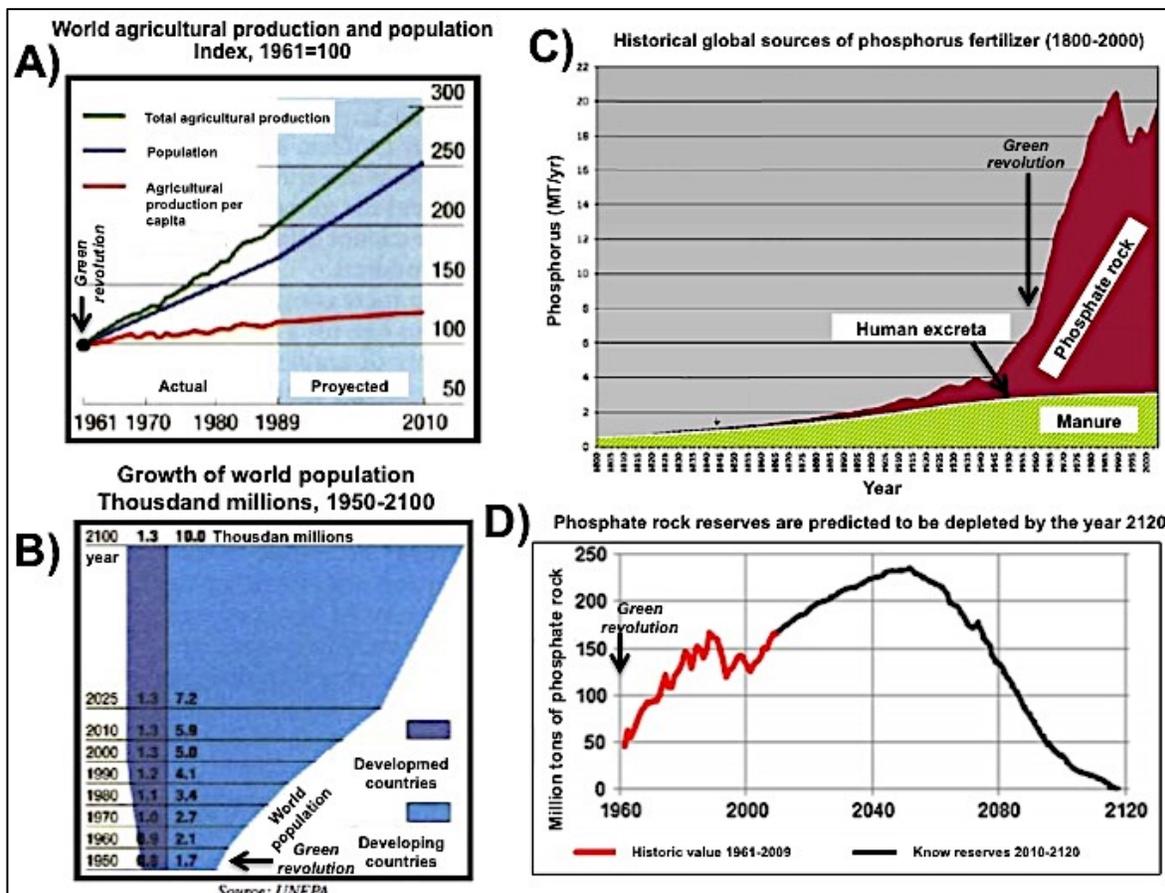


Figura 3. Estadísticas de producción agrícola, crecimiento población y demanda de fertilizantes fosforados en el mundo, a partir de la Revolución Verde. **A)** Gráfica que muestra la correlación positiva entre el crecimiento de la producción agrícola y el aumento en la población de personas en el mundo, partiendo de los inicios de la Revolución Verde en 1961, hasta finales de los años 80s. Dentro del rectángulo "en azul claro" se muestran las tendencias entre la producción de alimentos y el crecimiento poblacional, de 1989 al 2010<sup>20</sup>. **B)** Gráfica que muestra el crecimiento poblacional (en miles de millones), en marco de países en vías de desarrollo y países desarrollados, de 1950 al 2100<sup>20</sup>. **C)** Gráfica que muestra la demanda anual de fertilizantes fosforados a nivel mundial, de 1800 al 2000<sup>21</sup>. **D)** Al ritmo con el que se demanda la producción de fertilizantes fosforados a base de roca mineral, se pronostica que dichas reservas de este mineral, se terminarán dentro de los próximos 100 años. La línea roja muestra la tendencia de los millones de toneladas de fertilizantes de Pi mineral extraído, y la línea negra predice la producción de fertilizantes Pi dentro de los próximos 100 años, basados en la cantidad de Pi de las reservas naturales reportadas<sup>22</sup>.

## La respuesta natural de las plantas a la baja disponibilidad de Pi en el medio

Desde la perspectiva biotecnológica, el estudio de la respuesta natural de las plantas al ambiente cambiante, es fundamental para establecer estrategias más eficientes que contribuyan en mantener y mejorar la producción de alimentos en la agricultura<sup>7,8,10</sup>. La carencia de Pi en plantas ha sido estudiada desde hace más de un siglo, tanto en monoco como dicotiledóneas, principalmente en especies de interés agrícola como maíz, trigo y arroz<sup>6,8,11-13,23</sup>. Ahora se sabe que las plantas en respuesta a la carencia de Pi reducen dramáticamente la concentración interna de Pi, lo cual coordinadamente aumenta el nivel de ADP (adenosín difosfato) y disminuye la concentración de ATP (adenosín trifosfato) celular. También se altera la homeostasis de otras biomoléculas de metabolismo central. Por ejemplo, se reduce la concentración de nucleótidos de adenina (requeridos para la replicación y transcripción de los ácidos nucleicos)<sup>24</sup>, aumenta la síntesis de almidón en los tejidos del brote, y se translocan grandes cantidades de sacarosa hacia la raíz. Las membranas sufren de un recambio en la composición de fosfolípidos, y se incrementa la síntesis de malato y citrato, entre otros. Fisiológicamente decae la actividad fotosintética y de respiración oxidativa. A nivel morfológico la planta reduce el crecimiento del brote y magnifica el de la raíz<sup>1,23</sup>.

Con el descubrimiento de la estructura del ADN (J. Watson y F. Crick, 1953)<sup>25-27</sup>, surgió el interés por conocer la participación de los genes en la respuesta de aclimatación de las plantas al ambiente cambiante. Desde finales de los 80s, y a través de técnicas como Northern-blot y PCRs (*Polymerase chain reaction*, por su sigla en Inglés), se descubrió que las plantas responden transcripcionalmente, induciendo y reprimiendo genes en respuesta a la carencia de Pi<sup>28,29</sup>. Con la llegada de las nuevas tecnología para la secuenciación masiva de ácidos nucleicos (ADN/ARN), y el desarrollo de herramientas computacionales cada vez más poderosas, se descubrió que la carencia de Pi induce un programa transcripcional que modifica la expresión (inducción y represión), de cientos de

genes de diversas categorías funcionales, claramente relacionadas con el reciclado, la re-distribución y optimización del Pi dentro de la plantas, y el incremento en la capacidad adquisitiva de Pi externo<sup>24,30-37</sup>.

Entre los procesos que promueven el reciclado de P interno en las plantas, se encuentra el recambio de fosfolípidos de membrana, por sulfolípidos y galactolípidos<sup>38</sup>. Considerando que el sistema membranal concentra grandes cantidades de Pi en la célula, dicho mecanismo de recambio, por una parte mantiene la integridad de la membrana, y por otra, provee Pi para los procesos metabólicos básicos de la planta, al menos hasta encontrar otra fuente de Pi externo. El recambio de fosfolípidos de membrana está regulado a nivel transcripcional, a través de la inducción de varios genes que codifican para enzimas como *PLDZ2* (*PHOSPHOLIPASE-D 2*, por su sigla en Inglés), *MGDG* (*MONOGALACTOSYL-DIACYLGLYCEROL SYNTHASE*, por su sigla en Inglés), *DGD2* (*UDP-GALACTOSE-DEPENDENT DIGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE 2*, por su sigla en Inglés), *SQD1* (*UDP-SULFOQUINOVOSA SYNTHASE 1*) y *SQD2* (*UDP-SULFOQUINOVOSA SYNTHASE 2*)<sup>38</sup> (Fig4).

La adquisición y distribución de Pi dentro de las plantas es mediado por una red de transportadores proteicos de alta y baja afinidad a Pi, anclados al sistema transmembranal de las células. Las plantas codifican en su genoma para siete familias de transportador de Pi (*PHT1*, *PHT2*, *PHT3*, *PHT4*, *PHO1*, *VTC* y *PHS*), los cuales se clasifican por su localización celular y topología. La familia de los transportadores *PHT1* (*PHOSPHATE TRANSPORTER FAMILY 1*, por sus sigla en Inglés), está integrada por genes que codifican para proteínas de alta afinidad a Pi, localizadas en la membrana plasmática, que median la entrada de Pi al interior de la célula<sup>14,32,39-50</sup>. El número de transportadores *PHT1* varía entre especies de plantas, por ejemplo, mientras que en arroz se han identificado 13, en *Arabidopsis* sólo 9<sup>51</sup>. Los transportadores *PHT1* son fuertemente expresados a nivel transcripcional en respuesta a la carencia de Pi, en prácticamente todas las líneas celulares a lo largo de la raíz, aunque con mayor intensidad en la región apical y

en células de la epidermis, entre ellas los pelos radiculares. Esto en consecuencia incrementa la capacidad adquisitiva de Pi, por las raíces de las plantas. Los transportadores PHT1 también son regulados post-traduccionamente por *PHF* (*PHOSPHATE TRANSPORTER TRAFFIC FACILITATOR 1*), un gen que codifica para una proteína de retículo endoplásmico que controla la translocación de los transportadores PHT1 hacia la membrana plasmática. Aunque se ha propuesto redundancia funcional entre los transportadores de la familia *PHT1*, se sabe que PHT1;2 y PHT1;4 en *Arabidopsis* contribuyen con más del 70% de Pi adquirido por la planta (Fig4)<sup>16,40,44,48,51-56</sup>.

Un gran porcentaje del Pi presente en el suelo se encuentra como parte de complejos orgánicos (principalmente en forma de Pi-inositol, membranas lipídicas y ácidos nucleicos), compuestos que las plantas no pueden tomar directamente<sup>4,10,12,57,58</sup>. En respuesta a la carencia de Pi, las plantas inducen la expresión de enzimas fosfatasas exportadas al medio, en donde a través de su capacidad catalítica, liberan al Pi retenido en dichos compuestos orgánicos, haciéndolo disponible para su adquisición por la raíz (Fig4). Las fosfatasas involucradas en este proceso están clasificadas como fosfatasa purpuras "*PAPs*" (*PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHATASEs*, por su sigla en Inglés), las cuales reciben su nombre debido a coloración purpura resultante de su actividad hidrolítica, que libera al Pi de compuestos ésteres y anhídros<sup>39,59-61</sup>. Los genes que codifican para este tipo de enzimas se encuentran en todas las especies de plantas estudiadas, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, entre ellas frijol, soya, lupinos, jitomate, maíz, trigo, arroz y *Arabidopsis*<sup>32,39,50,59,62,63</sup>. De las 29 *PAPs* codificadas en el genoma de *Arabidopsis*, se sabe que 14 son transcripcionalmente inducidas en la raíz de plántulas crecidas en carencia de Pi<sup>61,64</sup> (Fig4).

Otra parte del Pi indisponible para las plantas, es aquella porción retenida por otros minerales del suelo, principalmente metales como el aluminio (Al) y el hierro (Fe), los cuales promueven la formación de complejos de Pi-Al, y Pi-Fe que

las plantas no pueden tomar. Sorprendentemente, las plantas aumentan la producción y excreción de ácidos orgánicos a través de la raíz al medio, los cuales por su naturaleza quelante rompen las interacciones químicas de dichos complejos Pi-metálicos, haciendo disponible al Pi para su adquisición por la planta. Aunque ha sido poco estudiada la red de transportadores que median la excreción de ácidos orgánicos ante la carencia de Pi, se sabe que, de forma general, las plantas inducen principalmente la excreción de citrato y malato, con mayor intensidad a través de la punta de la raíz<sup>41,65-67</sup> (Fig4).

A nivel morfológico las plantas también modifican el desarrollo de la raíz, alterando por completo la arquitectura del sistema radicular. En general, promueven la formación de raíces laterales, aumentan la densidad y longitud de los pelos radiculares y modifican el ángulo del crecimiento de las raíces, esto en consecuencia aumenta la superficie de contacto con el suelo, lo cual incrementa la probabilidad de tomar de Pi externo. Dichos cambios morfológicos han sido observados tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, entre ellas especies como maíz, frijol, arroz, lupinos y *Arabidopsis*<sup>35,68-72</sup>. Además, se han identificado modificaciones morfológicas específicas de ciertas especies de plantas. Por ejemplo, en *Lupinus albus* una especie de legumbre, la carencia de Pi induce la formación de pequeños cúmulos "*clusters*" de raíces laterales altamente pobladas con pelos radiculares, en pequeños segmentos de la raíz que hace contacto directo con pequeños cúmulos ricos en Pi, en el medio<sup>73-76</sup>. Otro ejemplo es justamente el modelo de estudio *Arabidopsis thaliana*, en donde la baja disponibilidad de Pi en el medio, inhibe el crecimiento longitudinal de las raíces, particularmente el de la raíz principal<sup>68,70,71,77-80</sup> (Fig5).

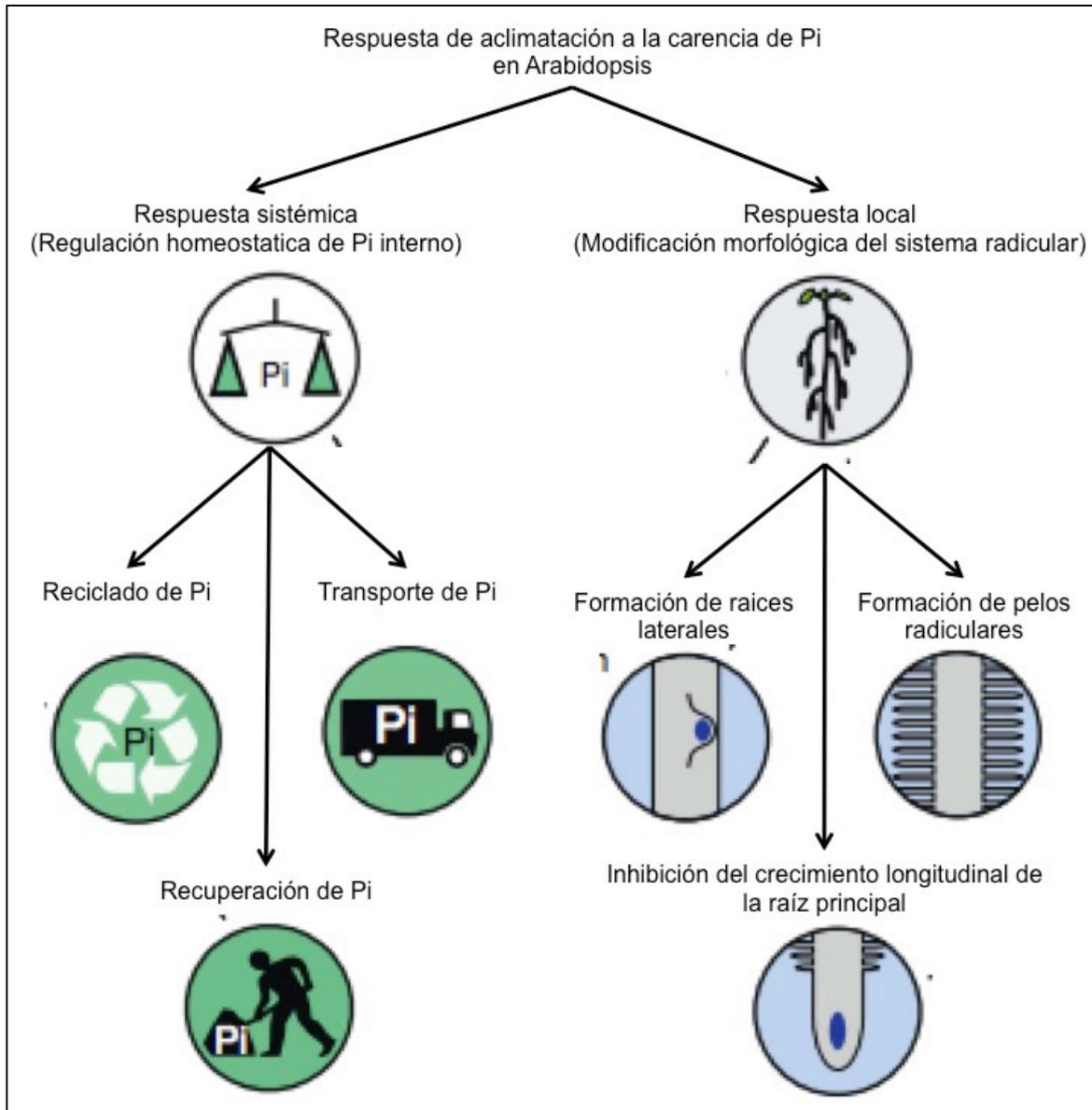


Figura 4. **Respuesta de aclimatación a la carencia de fósforo en Arabidopsis**<sup>80</sup>. Arabidopsis, al igual que el resto de las plantas analizadas ante la carencia de fósforo (Pi), induce una serie de procesos que maximizan el uso de Pi interno en la planta, y maximizan la capacidad adquisitiva de Pi externo en el medio. Al parecer la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi, está controlada tanto por la homeostasis de Pi dentro en la planta (respuesta sistémica), como por la disponibilidad del Pi disponible en el medio (respuesta local). La respuesta sistémica está relacionada con el reciclado de Pi interno, con la adquisición y translocación de Pi (transporte), y con la liberación del Pi retenido en compuesto orgánicos e inorgánicos en el medio. Por su parte, la respuesta local está relacionada con las modificaciones morfológicas del sistema radicular, particularmente, con el incremento en la formación de raíces laterales, con el aumento en la cantidad y longitud de pelos radiculares, y con la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal ante la carencia de Pi.

## La inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en -Pi

Desde su establecimiento como modelo de estudio (hace poco más de 50 años)<sup>81-86</sup>, *Arabidopsis* comenzó a ser utilizada para conocer la respuesta natural de las plantas a la carencia nutrimental, particularmente la carencia de Pi. *Arabidopsis* resultó ser un excelente modelo para el estudio de la respuesta de las plantas a la carencia de Pi, ya que conserva varios de los procesos que promueven el reciclado de Pi en el interior de la planta, y maximizan la capacidad adquisitiva de Pi externo en el medio<sup>40,65,66</sup>. Como se mencionó previamente, *Arabidopsis* inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal en respuesta a la baja disponibilidad de Pi en el medio<sup>68,70,79,80,87</sup>. Se ha propuesto que dicha modificación morfológica promueve el desarrollo del sistema radicular en los niveles superiores del suelo, regiones donde se han determinado las mayores concentraciones de Pi en suelos de ecosistemas naturales y terrenos agrícolas (Fig5)<sup>7,8</sup>. Dada su potencial aplicación biotecnológica para el control a conveniencia del crecimiento longitudinal de las raíces de las plantas, en función de la disponibilidad nutrimental en suelo, y el interés por conocer los procesos naturales del desarrollo de la raíz en estos organismo. El fenómeno que inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal, ha sido uno de los procesos más estudiados en *Arabidopsis* ante la baja disponibilidad de Pi en el medio.

La estructura celular del meristemo radicular en el embrión de *Arabidopsis*, comienza cuando se determinan las células del centro quiescente (QC), durante la etapa globular del desarrollo embrionario<sup>88,89</sup>. Una vez que la semilla de *Arabidopsis* germina, la raíz mantiene su crecimiento longitudinal de forma indeterminada (en condiciones de suficiencia nutrimental), a través de una intensa y continua proliferación celular, en la región distal del meristemo radicular, en células de la estela próximas al QC<sup>88,89</sup>. A través de experimentos de medios divididos, donde la plántula de *Arabidopsis* comienza su crecimiento en presencia de Pi, para después hacer contacto con un medio limitante en Pi, se descubrió que el crecimiento longitudinal de la raíz, es un mecanismo específico de la punta, y es

provocado por la baja disponibilidad de Pi en el medio<sup>71</sup>. Mediante el uso de las líneas reporteras de ciclo celular *proCYC::GUS* y de identidad del centro quiescente *proQC::GUS*, a través de tinciones histoquímicas de GUS en el meristemo radicular de la raíz principal, se descubrió que la baja disponibilidad de Pi en el medio provoca la diferenciación celular del QC, e inhibe paulatinamente los procesos de proliferación celular, dando lugar al agotamiento meristemático y consecuente inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz<sup>79</sup>(Fig6).

En 30% de los ecosistemas naturales alrededor del mundo, principalmente en aquellos con suelos ácidos (>pH5.4), la baja disponibilidad de Pi en el medio es normalmente acompañada por una alta disponibilidad de hierro (Fe) para las plantas, principalmente de cationes de Fe<sup>+3</sup><sup>10,90</sup>. Se sabe que los cambios en la relación de Pi y Fe interno modifica el desarrollo de las plantas<sup>77,91-93</sup> (lo cual no resulta extraño dada su mutua participación en el metabolismo fotosintético y de respiración oxidativa). A través de experimentos encaminados en conocer el efecto de la disponibilidad de Fe en el desarrollo radicular de Arabidopsis ante la carencia de Pi, se descubrió que la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal ante la baja disponibilidad de Pi, es determinada por la disponibilidad de Fe en el medio (Fig7)<sup>77</sup>. Considerando que la interacción química entre Pi y el Fe determina la disponibilidad de uno u otro elemento para su adquisición por las plantas en el suelo, se propuso que la carencia de Pi en el medio favorece la disponibilidad de Fe, llegando a inducir una respuesta concertada que provoca la inhibición del crecimiento de la raíz. Lo anterior, actúa quizás como un mecanismo que controla el balance para la adquisición de Pi y Fe del medio<sup>23,91-95</sup>.

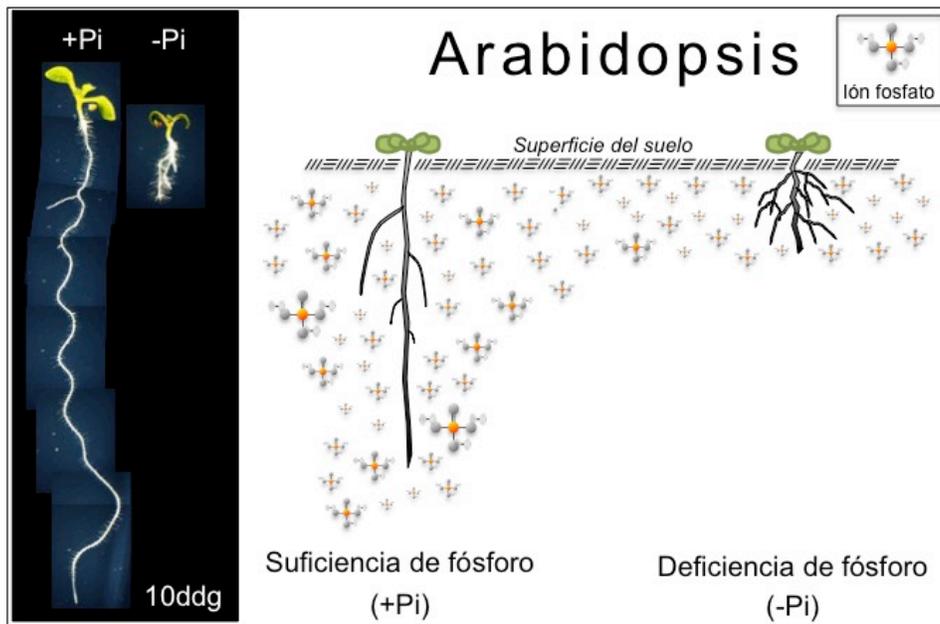


Figura 5. **Modificaciones morfológicas del sistema radicular en Arabidopsis ante la baja disponibilidad de Pi en el medio.** (Izquierda) Fenotipo de plántulas de 10 días después de germinar (10ddg) en presencia (+Pi) y carencia de fosfato (-Pi). (Derecha) Caricatura que representa el desarrollo del sistema radicular de Arabidopsis ante condiciones de suficiencia y carencia de Pi en el suelo. La distribución de Pi hace referencia a estudios de suelo realizados en ecosistemas naturales y terrenos agrícolas<sup>80</sup>.

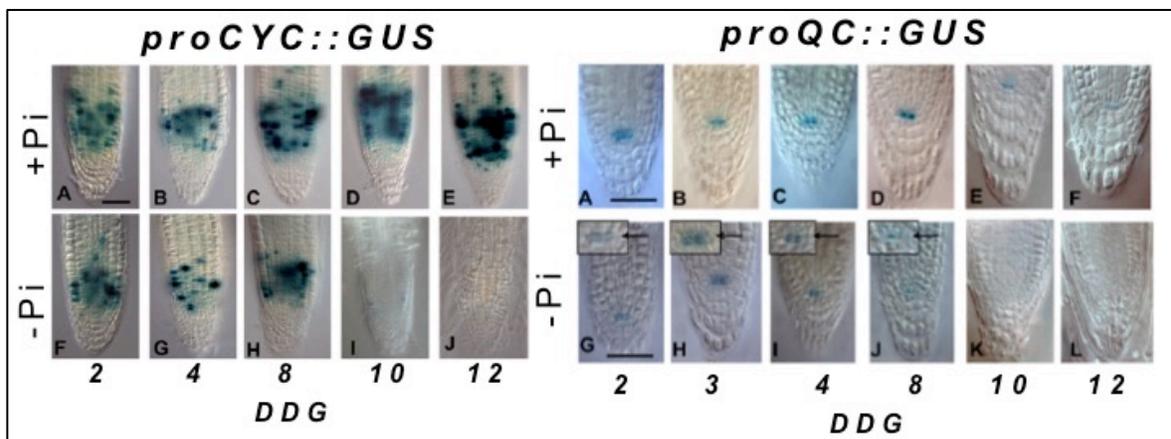


Figura 6. **Agotamiento meristemático de la raíz principal en Arabidopsis ante la baja disponibilidad Pi en el medio**<sup>79</sup>. Expresión reportera (tinciones histoquímicas de GUS,  $\beta$ -glucoronidase) de los marcadores de ciclo celular *proCYC::GUS* (Izquierda), y de identidad de centro quiescente *proQC::GUS* (Derecha), en meristemo radicular de plántulas del día 2 al día 12 después de germinar (2-10ddg) en suficiencia (+Pi) y carencia de fósforo (-Pi). Las flechas negras apuntan hacia las células del QC.

Durante la etapa experimental de este trabajo, *Muller y colaboradores* (2015), a través de tinciones histoquímicas *Tumbull-DAB* y *Perls-DAB* (para visualizar iones de  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$ , respectivamente), revelaron que *Arabidopsis* acumula preferencialmente iones de  $Fe^{+3}$  en meristemo radicular de la raíz principal, particularmente en apoplasto alrededor de las células del centro quiescente (QC)<sup>96</sup>. Aunque la acumulación de  $Fe^{+3}$  se muestra independientemente de la disponibilidad de Pi en el medio, se descubrió que determina el agotamiento meristemático y la consecuente inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal, ante la carencia de Pi en el medio<sup>96</sup>. Aunque sigue sin conocerse la naturaleza molecular por la cual la acumulación de iones de  $Fe^{+3}$  determina la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz ante la carencia de Pi, se descubrió que dicha acumulación de  $Fe^{+3}$  es concomitantemente acompañada con el engrosamiento de la pared celular y la deposición de callosa al rededor del QC<sup>96</sup>. La deposición de callosa en la pared celular se ha asociado con el bloqueo de los plasmodesmos, canales de comunicación que para tal caso, son esenciales para el mantenimiento de la identidad celular del QC<sup>96</sup>. *SHORT-ROOT (SHR)* codifica para un factor de transcripción constitutivamente expresado en células de la estela, que es transportado a través los plasmodesmos hacia las células del QC, en donde en colaboración con otros factores de transcripción como *SCARECROW (SCR)* y a través del control transcripcional, confiere la identidad celular del QC<sup>88,89</sup>. Utilizando microscopía confocal y monitoreando la expresión reportera de la línea *proSHR::SHR-GFP*, se descubrió que la baja disponibilidad de Pi en el medio inhibe la localización de SHR en células del QC, lo que provoca su diferenciación celular y consecuente agotamiento meristemático de la raíz (Fig8E)<sup>96</sup>.

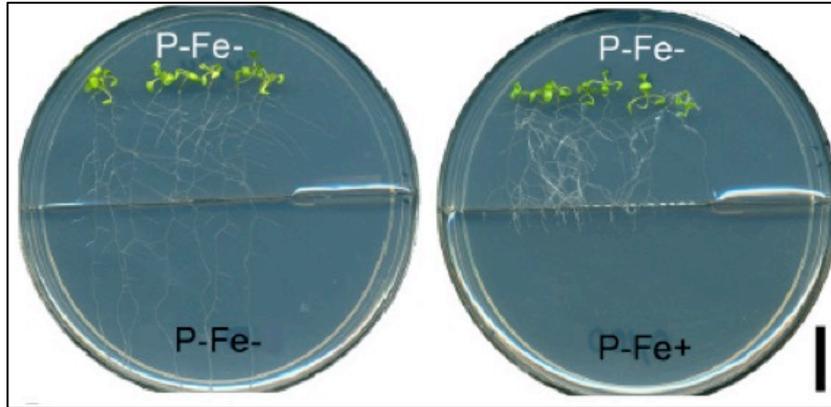


Figura 7. Efecto de la disponibilidad de hierro (Fe) en el crecimiento longitudinal de la raíz principal de *Arabidopsis*, ante la baja disponibilidad de fósforo (Pi) en el medio<sup>77</sup>. Experimentos de medio divididos que muestran el crecimiento de plántulas de 14 días después de germinar en condiciones de baja disponibilidad de fósforo y hierro (parte superior y parte inferior izquierdo: P-Fe-), y condiciones de baja disponibilidad de hierro, pero alta disponibilidad de Fe (parte inferior derecha: P-Fe+). La barra de escala equivale a 10 milímetros.

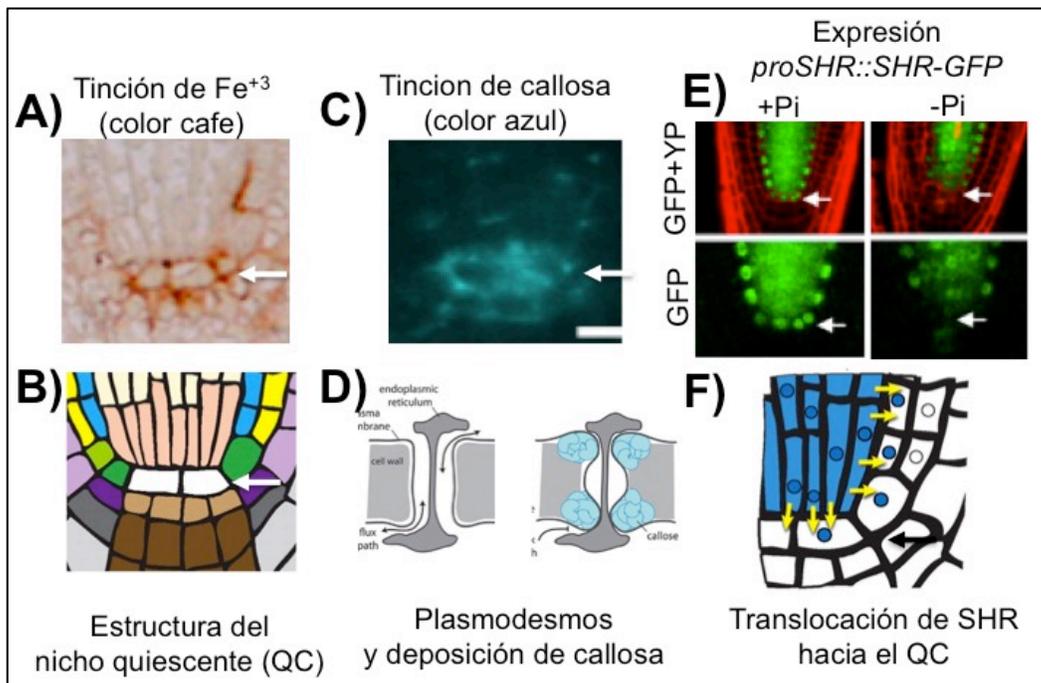


Figura 8. Correlación positiva entre la acumulación apoplástica de  $Fe^{+3}$  y el agotamiento meristemático de la raíz en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi. Durante el desarrollo de este proyecto, Muller y colaboradores (2015)<sup>96</sup> propusieron que la acumulación apoplástica de iones de  $Fe^{+3}$ , alrededor de las células del centro quiescente (QC) (A y B), promueve la deposición de callosa<sup>96</sup>, un polisacárido que bloquea físicamente los plasmodesmos (C y D), que para tal caso, bloquea las señales de comunicación intercelular, indispensables para el mantenimiento de la identidad del QC. Mediante el uso de la línea reportera *proSHR::SHR-GFP*, y la observación de GFP (Green Fluorescent Protein, por su sigla en Inglés), se observó que la carencia de Pi inhibe la localización de SHR (*proSHR::SHR-GFP*)<sup>96</sup> en el QC (E y F), lo cual desencadena la diferenciación celular del QC, y el consecuente agotamiento meristemático de la raíz principal ante la carencia de Pi. Las flechas blancas apuntan hacia las células del QC.

*LPR1* (*LOW PHOSPHATE ROOT 1*, por su sigla en Inglés) es descrito como un gen que inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal en respuesta a la baja disponibilidad de Pi en Arabidopsis<sup>71</sup>. Se sabe que *LPR1* es constitutivamente expresado en células de la estela y del centro quiescente (QC), y que codifica para una proteína multicopper oxidasa (MCO) exportada a la pared celular<sup>71,80,96</sup>. Considerando la capacidad catalítica *LPR1* para oxidar iones de  $Fe^{+2}$ , se ha propuesto que es la enzima que provee (en colaboración con su gen parálogo *LPR2*), los iones de  $Fe^{+3}$  acumulados en apoplasto alrededor las células de QC y determina el agotamiento meristemático e inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz an Arabidopsis ante la carencia de Pi<sup>71,96</sup> (Fig9).

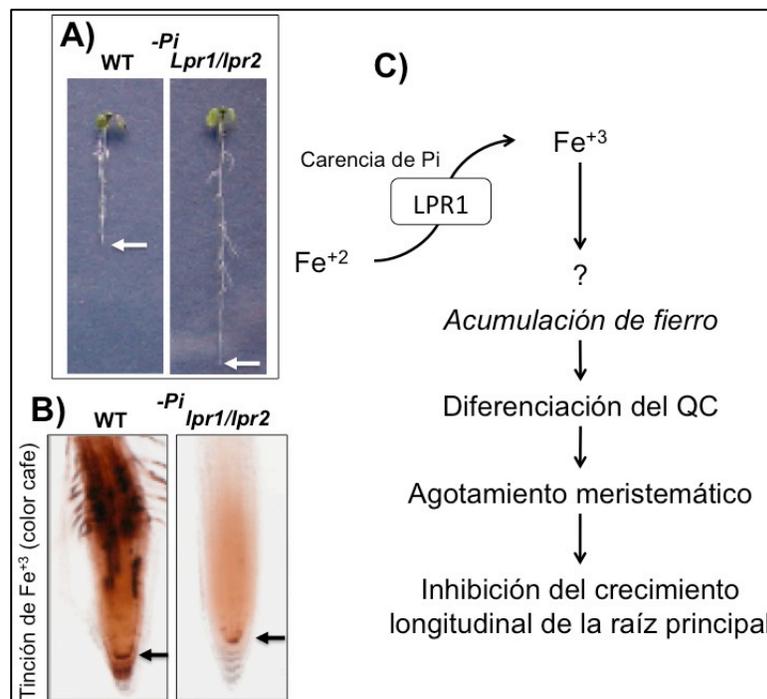


Figura 9. Los genes *LPR1* y *LPR2* promueven la acumulación apoplástica de  $Fe^{+3}$  que determina la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en Arabidopsis ante la carencia Pi. (A) *LPR1* y *LPR2* (*LOW PHOSPHATE ROOT 1* y *LOW PHOSPHATE ROOT 1*, por su siglas en Inglés) son descritos como genes parálogos que inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal en Arabidopsis ante la baja disponibilidad de Pi en el medio. (B) Como lo sugiere el fenotipo de la doble mutante *lpr1/lpr2*, la cual mantiene el crecimiento longitudinal de la raíz principal, de forma indeterminada aún en carencia de Pi<sup>97</sup>. *LPR1* codifica para una proteína MCO (Multicopper oxidasa) exportada a la pared celular, en donde a través de su capacidad catalítica para oxidar iones de  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$ , promueve la acumulación apoplástica de hierro alrededor del QC (mediante un mecanismo aun desconocido). Como lo muestran las tinciones histoquímicas Perls-DAB en la doble mutante *lpr1/2*, que acumula claramente mucho menos hierro, particularmente al rededor del QC<sup>96</sup>. (C) Lo acumulación apoplástica de  $Fe^{+3}$  determina la diferenciación del QC y el consecuente agotamiento radicular, lo que finalmente provoca la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en Arabidopsis.

## Percepción de Pi, señalización y respuesta a la carencia de Pi

Las distintas estrategias experimentales usadas para analizar la respuesta transcripcional de las plantas, principalmente en *Arabidopsis*, además de revelar la gran cantidad de genes transcripcionalmente alterados en respuesta a la carencia de Pi, también mostró la intrincada complejidad de regulación que confiere la resistencia de las plantas a este tipo de estrés<sup>24,30,34,36,65,98</sup>. Por ejemplo, a través de experimentos de transferencia, donde la planta es inicialmente crecidas en +Pi, para después transferirla a -Pi, se descubrió que la respuesta transcripcional es inducida desde los primeros minutos después de que la planta se desarrolla en carencia de Pi<sup>34,99</sup>. Los patrones de expresión y la función de los genes transcripcionalmente alterado ante la carencia de Pi varía ampliamente, pero pueden encontrarse transportadores de Pi y fosfatasa, por mencionar algunos<sup>24,99</sup>.

A través de experimentos de medios divididos, donde una porción de la raíz hace contacto con un medio carente en Pi, y el resto de la raíz en un medio con suficiencia nutricional para el crecimiento de *Arabidopsis*, se descubrió que el programa transcripcional inducido por la carencia de Pi es regulado de manera sistémica y local<sup>100</sup>. La respuesta sistémica refiere a un mecanismo de regulación a larga distancia que comunica el estatus de Pi interno entre los distintos órganos de la planta. La respuesta sistémica también hace referencia a un grupo de cientos de genes inducidos por la carencia de Pi en la raíz, pero que son inhibidos a través de una señal aún desconocida (posiblemente metabolitos como la sacarosa, fosfoinositoles o microRNAs transportados a través de la vasculatura de las plantas), inducida en la porción de la raíz que hace contacto con un medio rico en Pi<sup>62,101-109</sup>. La respuesta local está ligada con el agotamiento meristemático e inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi. También refiere a un set de genes que son transcripcionalmente controlados en la raíz, pero en este caso, son específicamente regulados por la baja disponibilidad de Pi en el medio (sin importar la concentración de Pi interno

en la planta)<sup>100</sup>. Aunque sigue sin conocerse el mecanismo molecular de percepción de Pi que desencadena la respuesta de adaptación a la carencia de Pi en plantas, se acepta la idea de que estos organismos perciben diferencialmente tanto la concentración de Pi interno en la planta, como la disponibilidad de Pi externo en el medio.

En células bacterianas, la regulación metabólica del Pi está acoplada a un mecanismo que percibe la disponibilidad de Pi en el medio, y simultáneamente media el transporte de Pi a través de la membrana plasmática hacia el interior de la célula<sup>110,111</sup>. En *E. coli* el mecanismo integra a un transportador transmembranal de alta afinidad a Pi, tipo ABC nombrado *Pst*, y un sistema de señalización de dos componentes llamado PhoR. El transportador de Pi *Pst* se encuentra integrado por una proteína periplásmica (*PstS*), un canal formado por dos proteínas transmembranales (*PstA* y *PstC*), y una ATPasa (*PstB*) citoplásmica que cataliza la energía del ATP que activa el sistema de transporte de Pi. En suficiencia de Pi la proteína *PstS* es fosforilada en periplasto, lo cual, de una forma aún desconocida, inhibe el sitio de fosforilación de la histidina quinasa que actúa como sensor en PhoR, evitando que se active la señal que desencadena la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi. Aunque tampoco se conoce la naturaleza molecular del mecanismo que lo media, se sabe que la proteína chaperona/Hsp70 conocida como PhoU es esencial. Se ha propuesto que PhoU controla la actividad de PhoR, a través de la formación de un complejo entre la proteína *PstB* del transportador ABC y el dominio PAS (Per-ARNT-Sim) que inhibe, al parecer físicamente dicho sitio de fosforilación (Fig10)<sup>110-115</sup>.

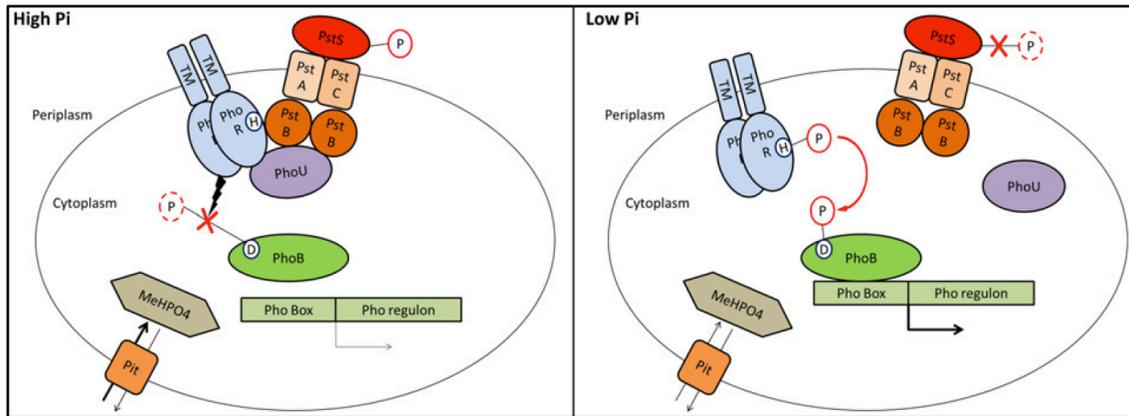


Figura 10. **Diagrama esquemático del mecanismo de regulación de fósforo (P) en *E. coli*<sup>116</sup>.** En suficiencia de P, la histidina quinasa PhoR que actúa como sensor de P, y es inhibida a consecuencia de la formación de un complejo proteico entre PhoR-PhoU-PstB, lo que resulta en la defosforilación y desactivación del factor de transcripción PhoB (**Izquierda**). En respuesta a la baja disponibilidad de P, PhoB es activado por la fosforilación del residuo de aminoácido aspartato (D), con efecto de la autofosforilación de la histidina quinasa PhoR y su enlace. Finalmente, PhoB, induce directamente la expresión de genes vinculados con la aclimatación bacteriana a la baja disponibilidad de P en el medio (**Derecha**). El modelo es complementado con el sistema Pit, el cual media la adquisición de complejos metálicos-Pi (MeHPO<sub>4</sub>) al interior de las células.

Los hongos, al igual que las bacterias, perciben la disponibilidad de Pi externo a través de transportadores de alta afinidad a Pi, insertados en la membrana plasmática<sup>117</sup>. Para el caso particular de *S. cerevisiae*, a través de los con-transportadores de alta afinidad Pho84 (H<sup>+</sup>/Pi) y Pho89 (Na<sup>+</sup>/Pi)<sup>118</sup>. Pho84 ha sido mejor caracterizado y se sabe que actúa simultáneamente como transportador y sensor de Pi externo<sup>118</sup>. El sistema de percepción de Pi se encuentra acoplado, independientemente del transporte de Pi, a un sistema de señalización por proteínas quinasa A (PKA), aún sin identificar. La subsecuente inducción transcripcional comprende a un set de genes llamada regulón Pho, entre ellos varios que codifican para fosfatasa excretadas al medio, y a los mismos transportadores de Pi Pho89 y Pho84<sup>119</sup>. En presencia de Pi PHO84 es autofosforilado, simultáneamente ubiquitinado y transportado a vacuola para su degradación<sup>118</sup>. Pho84, al igual que el resto de los genes del regulón Pho, es transcripcionalmente controlado por Pho4, un factor de transcripción BHLH que se enlaza al motivo CTGGATG ubicado en el promotor de sus genes blancos<sup>120,121</sup>.

En presencia de Pi, Pho4 es múltiplemente fosforilado por el complejo ciclina quinasa (CDK) Pho80-Pho85 dentro del núcleo, lo cual provoca que sea exportado al citoplasma, evitando con ello la activación del regulón Pho. Pho81 es una proteína inhibidora de ciclina quinasa (CDK) constitutivamente enlazado al complejo Pho80-Pho85, pero ante condiciones de carencia de Pi y debido a un incremento en la concentración de inositol heptafosfato, modifica su conformación, lo cual evita que el complejo Pho80-Pho85 fosforile a Pho4. Lo anterior mantiene a Pho4 en el núcleo, permita que se una a Pho2 y conjunto actúan como módulo funcional que activa la respuesta transcripcional del regulón Pho (Fig11)<sup>118-123</sup>.

El sistema de adquisición de Pi en *S. cerevisiae* está constituido por los dos transportadores de baja afinidad a Pi, *Pho87* y *Pho90*, que son constitutivamente expresados sin importar la disponibilidad de Pi en el medio, y por los dos transportadores de alta afinidad a Pi *Pho84* y *Pho89* que son fuertemente expresados ante la baja disponibilidad de Pi en el medio. Ambos sistemas de transporte se posicionan en la membrana plasmática<sup>118,120-125</sup>. Se sabe que en suficiencia de Pi, Pho84 es autofosforilado, ubiquitinado y transportado a la vacuola para ser degradado<sup>119</sup>. Aunque los transportadores de baja afinidad Pho87 y Pho90 son constitutivamente expresados, en carencia de Pi son conducidos hacia la vacuola para su degradación. Si bien aún se desconoce el mecanismo que conduce a la degradación de estos transportadores, se sabe que el dominio proteico SPX (Syt1-Pho81-Xpr1) es esencial y está sobre representado en proteínas que median la respuesta de los hongos a la carencia de Pi (Fig11)<sup>118-121,123,125</sup>.

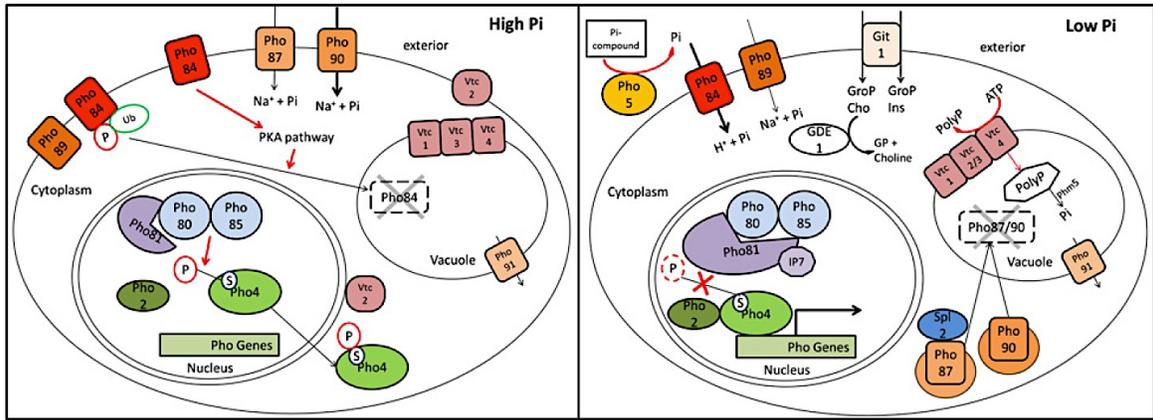


Figura 11. **Diagrama esquemático de la ruta de regulación de fosfato (Pi) en *Saccharomyces cerevisiae***<sup>116</sup>. Ante condiciones de suficiencia de Pi, Pho4 es fosforilado en múltiples residuos de serina (S) por complejo CDK Pho80-Pho85, y exportado del núcleo al citoplasma. Los transportadores de baja disponibilidad a Pi Pho87 y Pho89 son responsables de la adquisición de Pi, y el transportador de alta afinidad Pho84 es internalizado y degradado en la vacuola (**izquierda**). Ante la carencia de Pi, la interacción de IP7 cambia la conformación de Pho81 y previene la fosforilación de Pho4 mediada por el complejo Pho80-Pho85. La acumulación nuclear de Pho4 en coordinación con Pho2, induce la expresión de los transportadores de alta afinidad, e internaliza y degrada en vacuola a los transportadores de baja afinidad a Pi. La baja disponibilidad de Pi en el medio también desencadena la formación del complejo VTC, el cual promueve la acumulación de polifosfatos inorgánicos, los cuales son hidrolizados por la polifosfatasa Phm5, y el Pi resultante es transportado a través de Pho91 al citoplasma. Además, a través GDE se induce el reciclado de Pi integrado en moléculas orgánicas como el glicerofosfoinositol y el glicerofosfocolina importadas hacia el interior de la célula, a través de la proteína transportadora de membrana plasmática Git.

En plantas aún se desconoce el mecanismo de percepción de Pi. Sin embargo, se sabe que el arsenato (As) y fosfito (Phi), análogos estructurales del Pi que no lo sustituyen metabólicamente, reprimen la respuesta transcripcional de aclimatación a la carencia de Pi<sup>70,98,126,127</sup>. Esto ha sugerido que la percepción Pi en las plantas, depende de la estructura molecular del Pi, similar a la del As y el Phi (Fig12).

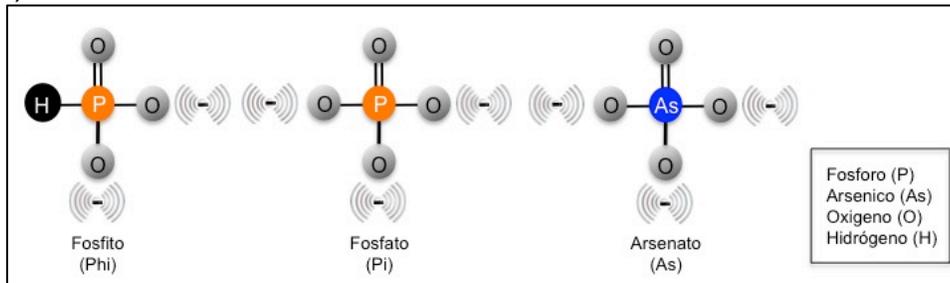


Figura 12. **Esquema comparativo de la composición y estructura química entre el fosfato (Pi) y sus análogos estructurales fosfito (Phi) y arsenato (As)**. Los cuales son transportadores a través del sistema transmembranal de adquisición de Pi localizado en la raíz, y a

través de un mecanismo desconocido, reprimen la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en Arabidopsis, a pesar de que no son sustitutos del Pi en el metabolismo de la planta.

El primer transportador de Pi identificado en plantas fue a través de un análisis de homología en secuencia con el transportador Pho84, ahora conocido como transceptor por su función dual<sup>53,128,129</sup>. Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias de que alguno de los transportadores de alta afinidad en plantas actúe como sensor de Pi. Las plantas también codifican para transportadores transmembranales tipo ABC y sistemas de señalización de dos componentes, sin embargo, tampoco existen evidencias de que dichos sistemas de transporte perciben la disponibilidad de Pi en plantas, tal como sucede en bacterias<sup>130</sup>. A pesar de lo anterior, las plantas al igual que las bacterias y los hongos, emplean factores de transcripción que controlan la respuesta transcripcional de aclimatación a la carencia de Pi. Los factores de transcripción identificados pertenecen a distintas familias de clasificación, como los BHLH (basic helix-loop-helix, por su sigla en Inglés), WRKY (WRKY protein domain) o MYB (myeloblastosis), y pueden actuar tanto de forma negativa como a favor de la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en plantas<sup>116,131,132</sup>.

PHR1 (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1, por su sigla en Inglés), es por mucho el factor de transcripción mejor estudiado ante la carencia de Pi en plantas, particularmente en arroz y Arabidopsis<sup>51</sup>. En Arabidopsis PHR1 codifica para un factor de transcripción tipo MYB constitutivamente expresado (en toda la planta) con la misma intensidad y localizado en el núcleo, independientemente de la disponibilidad de Pi en el medio<sup>133</sup>. PHR1 induce transcripcionalmente a sus blancos directos, mediante su enlace al motivo de unión P1BS (PHR1-Binding site), localizado en la región promotora de los genes<sup>133</sup>. El motivo de P1BS (GNATATNC) es acompañada por secuencias aledañas que potencian la inducción transcripcional de PHR1<sup>134</sup>. *PHR1* está clasificado dentro de una familia de 15 genes parálogos, de los cuales sólo se han descrito a *PHR1* y su parólogo *PHR1like*. Al parecer PHR1 y PHR1like inducen la respuesta transcripcional en forma de heterodímero<sup>135</sup>. Así mismo, PHR1 y PHR1like son suficientes para

controlar la respuesta sistémica, y son considerados como genes maestros que de la respuesta sistémica a la carencia de  $P_i$ <sup>65,133,134,136,137</sup>.

Los genes *SPX* (*SYG1/Pho81/XPR1*) refieren a todos aquellos que codifican para proteínas con un dominio tripartita, hidrófilico y poco conservado, hacia el amino terminal de la proteína<sup>138</sup>. Este tipo de genes es encontrado en organismos eucariotas como los hongos, los animales y las plantas, y son asociados con los procesos de señalización y percepción de  $P_i$ . Por el ejemplo *Pho81*, el inhibidor de histidina quinasa (CDK), que ante el incremento en la concentración de inositolheptafosfato, modifica su conformación y evita la fosforilación del factor de transcripción *Pho4* que activa la respuesta de aclimatación de los hongos, a la carencia de  $P_i$ <sup>116</sup>. *Arabidopsis* codifica para 20 genes con dominio *SPX*, entre los cuales se encuentra *PHO1*, un gen que codifica para una proteína involucrada en la recarga de  $P_i$  al xilema en la raíz, lo cual permite la movilización de  $P_i$  hacia la parte aérea de la planta. Tal como lo muestra la mutante *pho1*, el cual desarrolla un brote (parte aérea de la planta) similar a la WT en carencia de  $P_i$ , aún si la mutante *pho1* es crecido en suficiencia de  $P_i$ <sup>40,41,139–146</sup>. Recientemente se reportó que *SPX1* y *SPX2*, un par de genes fuertemente inducidos por la carencia de  $P_i$ , inhiben post-traduccionamente de forma negativa a *PHR1*<sup>147</sup>. Se descubrió que *SPX1* y *SPX2* forman un complejo proteína-proteína (dependiente de  $P_i$  o fosfoinositol) con *PHR1*, lo cual evita que *PHR1* se enlace al promotor de sus genes blanco e induzca su expresión<sup>147</sup>. Considerando que *PHR1* (en colaboración con su parólogo *PHR1like*), regula la gran mayoría de los genes sistémicamente controlado ante la carencia de  $P_i$ <sup>135</sup>, y debido a que la mutante *phr1* mantiene activa la respuesta local relacionada con los cambios morfológicos del sistema radicular ante la carencia de  $P_i$ <sup>133</sup>, se propuso que *PHR1* y las proteínas *SPX1* y *SPX2* actúan como módulo funcional que controla particularmente la respuesta sistémica a la carencia de  $P_i$  en *Arabidopsis*<sup>148</sup>.

*PDR2* y *LPR1* (en conjunto con su parólogo *LPR2*), son los genes mejor descritos que controlan la respuesta local a la carencia de Pi en Arabidopsis. *PDR2* actúa epistáticamente sobre los parálogos *LPR1* y *LPR2*, y se sabe que codifica para una proteína ATPasa, cuya función específica aún se desconoce<sup>71,80,97</sup>. Como se mencionó previamente en esta tesis, *LPR1* codifica para una proteína MCO que es exportada a la pared celular, en donde a través de su capacidad de óxido-reducción, promueve la oxidación de iones de Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup><sup>96</sup>. Al parecer la acumulación Fe<sup>+3</sup> promueve la producción de ROS en apoplásto alrededor de las células del QC. Esto desencadena, de forma aún desconocida, el engrosamiento de la pared celular, lo cual deja incomunicado al QC, provocando su diferenciación celular y consecuente agotamiento meristemático de la raíz principal ante la carencia de Pi en Arabidopsis<sup>71,80,96,97</sup>.

Las mutantes *lpi1-4* (*low phosphate insensite 1-4*), fueron previamente aisladas por nuestro grupo de investigación durante el escrutinio de plántulas de 14 días después de germinar en carencia de Pi. Las mutantes *lpi* fueron seleccionados porque a diferencia de la WT que inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal ante la carencia de Pi, las mutantes *lpi* lo mantienen de manera indeterminada aún ante la carencia de Pi. Aunque se desconoce la identidad de los genes responsables de los fenotipos *lpi*, dan la pauta para hipotetizar la existencia de genes aún desconocidos, que controla la respuesta local a la carencia de Pi en Arabidopsis<sup>36,87</sup>.

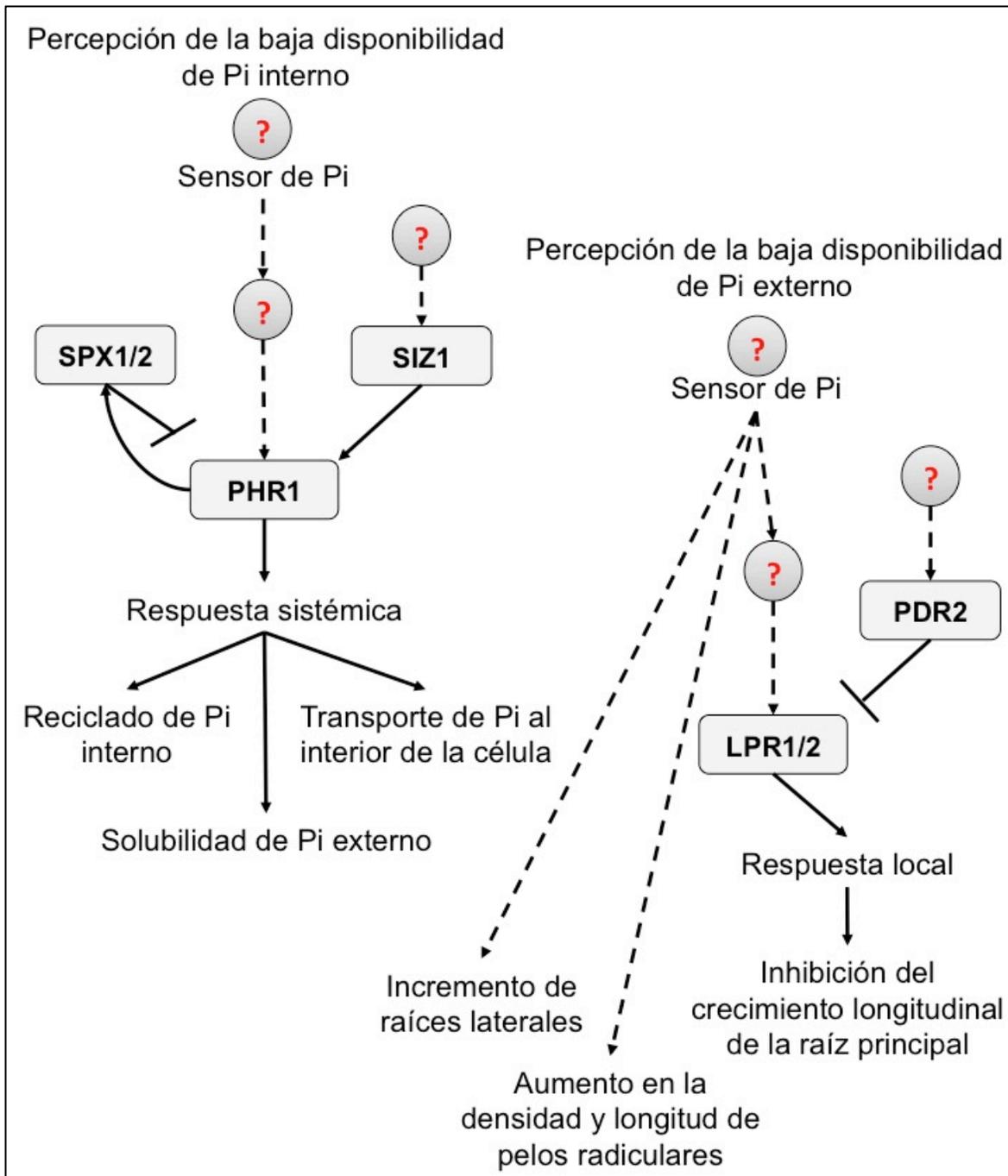


Figura 13. **Componentes clave en el mecanismo de percepción de fosfato (Pi) y respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en Plantas.** En *Arabidopsis* la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi ha sido dividida en "respuesta sistémica", la cual aparentemente es controlada por los cambios en la homeostasis de Pi interno, y "respuesta local", la cual es regulada particularmente por la disponibilidad de Pi en el medio<sup>100</sup>. La respuesta sistémica está vinculada con el reciclado de Pi interno, con la excreción de enzimas y ácidos orgánicos que liberan el Pi retenido por el suelo, y con la inducción de transportadores transmembranales que median la entrada de Pi a la planta<sup>100</sup>. Aunque se desconoce el mecanismo que percibe la disponibilidad de Pi interno, se sabe que el factor de transcripción PHR1 (PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1, por su sigla en inglés), actúa como regulador maestro que induce transcripcionalmente la mayoría de los genes relacionados con la respuesta sistémica<sup>80,133,135</sup>.

Aunque se propuso que *SIZ1* (una proteína con actividad de sumoilasa) regula a *PHR1*, aún se conoce poco del mecanismo. Y recientemente se descubrió que las proteínas *SPX1* y *SPX2* controlan negativamente a *PHR1* en presencia de  $P_i$  o Piinositol, mediante la formación de un complejo *SPX1/2-Pi-PHR1/PHR1like* incapaz de adherirse a su respectivo sitio de unión *P1BS* presente en el promotor de sus blancos directos. La respuesta local a la carencia de  $P_i$  está relacionada principalmente con las modificaciones morfológicas del sistema radicular. Aunque tampoco se conoce el mecanismo de percepción de  $P_i$  externo, se sabe que el módulo funcional *PDR2-LPR1/2* actúa como regulador clave del crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis* ante la baja disponibilidad de  $P_i$ . *PDR2* codifica para una proteína ATPasa, cuya función específica aún es desconoce, sin embargo, se sabe que regula de forma negativa a los genes parálogos *LPR1* y *LPR2* (*LOW PHOSPHATE RESPONSE 1-2*, por sus sigla en inglés). *LPR1* ha sido mejor caracterizado que su parólogo *LPR2*. *LPR1* al igual que *PDR2* es constitutivamente expresado independientemente de la disponibilidad de  $P_i$ . Las evidencias más recientes proponen que *LPR1*, al igual que *PDR2*, es constitutivamente expresado independientemente de la disponibilidad de  $P_i$  en el medio, y se sabe que codifica para una proteína multicopper oxidasa (MCO) exportada a la pared celular, en donde a través de su capacidad de oxido-reducción, modifica el desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis* ante la carencia de  $P_i$ .

## **HIPÓTESIS**

---

Existen genes "aún desconocidos" que perciben la disponibilidad de Pi y desencadenan la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi (respuesta sistémica y respuesta local) en Arabidopsis.

## **OBJETIVO**

---

Identificar genes que participan en el mecanismo que percibe la disponibilidad de Pi y desencadena la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en Arabidopsis.

### **Material biológico:**

Para este trabajo se utilizó la accesión de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 (CS70000), línea hermana de donde se secuenció el genoma de *Arabidopsis* (TAIR10). Las líneas mutantes insercionales-SALK *lpr1* (N516297), *stop1* (N614108, SALK\_114108) y *almt1* (N509629, SALK\_009629) fueron solicitadas al instituto NASC (The Nottingham Arabidopsis Stock Center, por sus sigla en Inglés). Las líneas reporteras *pro790::GUS-GFP*, *proSTOP1::GUS-GFP* y *proALMT1::GUS-GFP* fueron diseñadas y construidas como parte de este trabajo.

### **Construcción de las líneas reporteras**

#### **Amplificación de las regiones promotoras:**

Las regiones promotoras de los genes *At5g20790* (gen de función desconocida), *At134370* (*STOP1*, *SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1*, por su sigla en Inglés) y *At1g08430* (*ALMT1*, *ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1*, por su sigla en Inglés), fueron amplificadas directamente del genoma de *Arabidopsis* Col-0, utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Locus *At5g20790* (amplicón de 533 pares de bases)

Fw: **ATTB1**-GTCTAACCGACGTTTACTACTAATAAGCG

Rv: **ATTB2**-CCAACGCCTCTAATGGAGATTCC

Locus *At134370* (amplicón de 2666 pares de bases)

Fw: **ATTB1**-TTTCGCGAATCCGAATCTGC

Rv: **ATTB2**-GTTGCACAAATCGTCTTCAGTTTC

Locus *At1g08430* (amplicón de 2243pb)

Fw: **ATTB1**-GGCAGATAAAGAGGCACTCGTG

Rv: **ATTB2-CTCTCTCACTTTCTCCAT**

Sitios ATTB:

ATTB1: **GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-Fw**

ATTB2: **GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-Rv**

Los promotores fueron amplificados mediante ensayos de PCR (*Polymerase Chain Reaction*, por su sigla en Inglés) utilizando una enzima polimerasa de alta afinidad (Phusion<sup>(R)</sup>)<sup>149</sup>. Brevemente, en un tubo de microcentrifuga de 50µl, se agregaron 10µL de buffer 5X Phusion HF (*High Fidelity*, por su sigla en Inglés), 5µL de dNTPs (deoxynucleotidos) 2mM, 1.5uL del oligonucleótido forward (Fw) 10mM, 1.5uL del oligonucleótido reverse (Rv), 0.5uL de enzima polimerasa DNA Phusion Hot Star 2U/uL, 100ng de ADN genómico de Arabidopsis (1uL) y 30.5µL de agua desionizada estéril. Los tiempos y temperaturas de amplificación se describen en la siguiente tabla (Tabla1).

Tabla 1. Condiciones de amplificación por PCR (tiempos y temperaturas) de las regiones promotoras de los genes *At5g20790* (amplicón de 533 pares de bases), *At134370* (amplicón de 2666 pares de bases) y *At1g08430* (amplicón de 2243 pares de bases)

ETAPA	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (minutos)
<b>Primera etapa de desnaturalización (1 ciclo)</b>		
<i>proAt5g20790/proSTOP1/proALMT1</i>	98	3
<b>Etapas de amplificación (25 ciclos)</b>		
<b>Desnaturalización</b>		
<i>proAt5g20790/proSTOP1/proALMT1</i>	98	0.5
<b>Alineamiento</b>		
<i>proAt5g20790/proSTOP1/proALMT1</i>	69	0.5
<b>Extensión</b>		
<i>proAt5g20790 (533pb)</i>		0.5
<i>proSTOP1 (2666pb)</i>	72	1.5
<i>proALMT1 (2243pb)</i>		1.5
<b>Extensión final (1 ciclo)</b>		
<i>proAt5g20790/proSTOP1/proALMT1</i>	72	7

### ***Recombinación y clonación de las regiones promotoras:***

Como lo indica el sistema de recombinación por el método Gateway®<sup>149</sup>, se llevaron a cabo dos pasos de recombinación secuencialmente. Como primer paso se recombinó el producto de PCR de las regiones promotoras y el vector de entrada *pDONR221* (PCR-*pDONR221*). En un tubo de 50µl se agregaron 300ng del vector de entrada *pDONR221* (2-3 µl), 300ng del producto de PCR de las regiones promotoras (2-3 µl), 1µl de la enzima mix BP clonasa Gateway® y buffer TE, pH 8.0 (aforar a 10 µl). La reacción se dejó incubando a 25°C durante toda la noche. Al día siguiente se detuvo la reacción agregando 1µl de proteinasa K, y se incubó la muestra a 37°C durante 10min. El producto de recombinación se guardó a -20°C hasta su utilización. El segundo paso de recombinación consistió en recombinar el producto clonado de la recombinación PCR-*pDONR221* y el vector de expresión *pKGWFS7*<sup>149</sup> (Fig14). En un tubo de 50µl se agregaron 150ng del vector de expresión *pKGWFS7* (2-3 µl), 150ng del producto clonado de la recombinación PCR-*pDONR221* (2-3 µl), 1µl de la enzima mix LR clonasa Gateway® y buffer TE, pH 8.0 (aforar a 10µl). La reacción se dejó en incubación a 25°C durante toda la noche. Al día siguiente, la reacción se detuvo agregando 1µl de proteinasa K e incubándola a 37°C por 10min. El producto de recombinación se guardó a -20°C hasta su utilización. Los productos recombinados fueron dializados en membranas tipo V5 de 0.25µmetros (con agua destilada estéril), durante 30min a temperatura ambiente. Al término se tomaron 7µl del producto dializado, se mezcló con 50µl de células DH5-α y se incubó en hielo durante tres minutos. La mezcla se colocó en una celda para electroporar de 0.2cm y se dio un pulso eléctrico (de 2.20kV). Se recuperó la mezcla electroporada, se adicionaron 200µl de buffer SOC y se dejó incubando a 37°C con agitación durante 1hr. Posteriormente y con la finalidad de concentrar la mezcla, se centrifugó a 12 000rpm durante 30seg y se eliminaron ¾ del volumen total del medio, evitando tocar la pastilla (bacterias). La pastilla se resuspendió en el volumen restante, se plaqueó en cajas Petri con medió LB-agar y antibiótico (en función del plásmido

utilizado), y se incubó a 37°C durante 20hrs (toda la noche). Las colonias bacterianas crecidas fueron comprobadas por PCR en colonia. Para aislar las colonias positivas, se picaron con un palillo de madera esteril, el cual se colocó por cada colonia de forma independiente en 3ml de medio LB-líquido con antibiótico y se incubaron durante 20hrs en agitación a 37°C. Al término se colocaron a 4°C hasta su utilización.

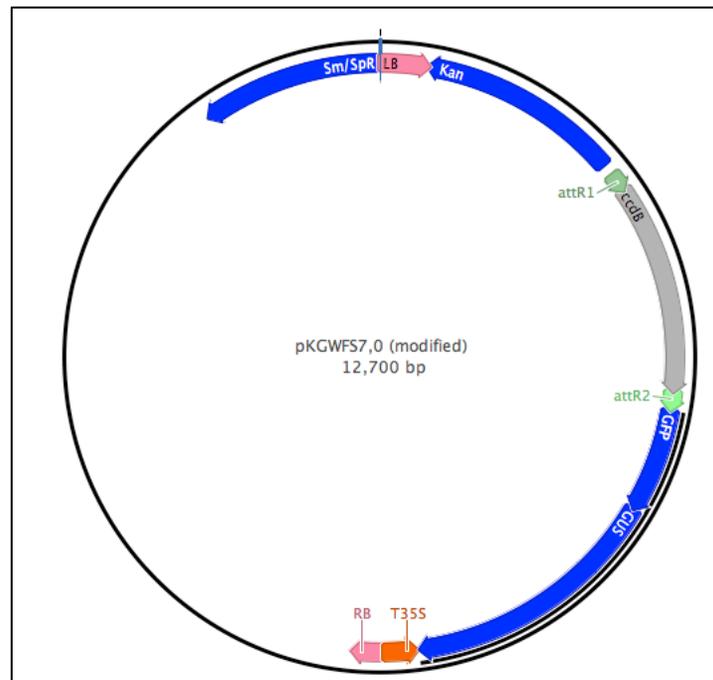


Figura 14. Mapa del vector de expresión *pKGWFS7,0* usado para la construcción de las líneas reporteras *pro790::GUS-GFP*, *proSTOP1::GUS-GFP* y *proALMT1::GUS-GFP*. El vector *pKGWFS7,0* tiene un tamaño de 12,700 pares de bases, y presenta un casete de resistencia a espectinomicina/estreptomicina (para resistencia en bacteria), y otro de resistencia a kanamicina (para resistencia en plantas). El casete *ccdB* está flanqueado por los sitios de recombinación *ATTR1* y *ATTR2* (Gateway®), lo cuales son necesarios para la incorporación de dichos promotores al vector. Después de la recombinación cada promotor queda en fase para inducir la expresión transcripcional de los genes reporteros GFP (proteína verde fluorescente) y GUS (b-glucoronidasa). T35S: terminador transcripcional 35s. LB y RB significan borde derecho y borde izquierdo, respectivamente, del fragmento a incorporarse al genoma de la planta, mediante el mecanismo de infección por *Agrobacterium tumefaciens*.

#### **Extracción de ADN plasmídico:**

Para la extracción de ADN plasmídico se utilizó el protocolo descrito por Zhou<sup>150</sup>, con algunas modificaciones. Se tomó 1.5ml de cultivo celular, se centrifugó a 12000rpm durante 5min a temperatura ambiente y se recuperó la

pastilla. La pastilla se resuspendió con 0.3ml de buffer TENS (Tris-Cl 10mM pH7.5; EDTA 1mM; NaOH 0.1N and SDS 0.5%), se agregó 0.15ml de buffer acetato de sodio 3M pH5.2 y se mezcló por vortex. Se centrifugó a 12000rpm por 5min a temperatura ambiente; se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, y se mezcló vigorosamente por vortex con ½ v/v de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y ½ v/v de fenol. La mezcla se centrifugó a 12000rpm durante 10min a 4°C; se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, se agregó 1 volumen (v/v) de isopropanol y se dejó incubando a -20°C durante 20min. Enseguida se centrifugó a 12000rpm durante 10min a 4°C; se recuperó la pastilla, y se dieron dos lavados con etanol 70%. Se eliminó el exceso de etanol y la pastilla resultante se resuspendió en 0.05ml de agua desionizada estéril. Se agregó 1µl de RNAsa, se incubó durante 30min a 37°C y finalmente se guardó a -80°C hasta su utilización.

#### ***Agroinfiltración de plántulas de Arabidopsis:***

Para transformar bacterias electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GPV2260), con las construcciones de los marcadores reporteros, por cada una y de manera independiente, se mezclaron 70ng de ADN plasmídico (construcción reportera) con 50µl de células electrocompetentes de *A. tumefaciens*, y se dejó incubar por 3min en hielo. La mezcla se colocó en una celda para electroporar de 0.2cm y se dio un pulso eléctrico (de 2.20kV). Se recuperó la mezcla electroporada, se adicionaron 200µl de buffer SOC y se dejó incubando a 28°C con agitación durante 2hrs. Con la finalidad de concentrar la mezcla bacteriana, la muestra se centrifugó a 12000rpm durante 30seg y se eliminaron ¾ del volumen total del medio, evitando tocar la pastilla. Se resuspendió la pastilla en el volumen restante, se plaqueó en medió YEB-sólido con antibiótico (en función del vector transformado), y se dejó incubando a 28°C durante 48hrs. Las colonias bacterianas crecidas fueron comprobadas por PCR en colonia. Para propagar las colonias positivas, estas se picaron y se colocaron en 10ml de medio YEB-líquido con antibiótico, y se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación. Las bacterias fueron puestas a 4°C hasta su utilización.

Para crecer el inóculo de las colonias bacterianas de *Agrobacterium* transformadas con los marcadores reporteros, se mezclaron 70µl de medio de cultivo en fase exponencial con 10ml de medio YEB-líquido con antibiótico, y se incubó durante 24hrs a 28°C con agitación. Posteriormente se tomó 1.5ml de cultivo bacteriano, se centrifugó a 5500rpm durante 20min a temperatura ambiente y se recuperó la pastilla. La pastilla fue resuspendida en 500µl medio MS para agroinfiltrar. Plantas con inflorescencias de entre 5 y 10cm fueron inoculadas con suspensión bacteriana mediante el método *drop-by-drop*. Las semillas obtenidas de las plantas agroinfiltradas fueron colectadas; secadas durante 5 días y almacenadas en oscuridad a temperatura ambiente.

### ***Selección de líneas transformantes de Arabidopsis***

Las semillas de las plantas agroinfiltradas (Transformantes generación 1=T1), fueron sembradas *in vitro* en resistencia a kanamicina 50mg/litro. Las semillas de las plantas seleccionadas por resistencia (T2=líneas segregantes), fueron re-analizadas en kanamicina (50mg/litro) y se seleccionaron aquellas líneas que mostraron una frecuencia de segregación 3:1, para plántulas con fenotipo resistente/no resistente, respectivamente. Mediante tinciones histoquímicas se seleccionaron tres líneas independientes, que mostraron un nivel de expresión promedio y similar entre ellas.

### ***Desinfección de semillas de Arabidopsis:***

La esterilización de las semillas se realizó en alícuotas de 50-100 µl en tubos de micro centrifuga de 1.5ml. Como primer paso, lavar las semillas con 1ml de etanol absoluto, en agitación durante 10min. Centrifugar las semillas con un pulso de centrifugación, y se retira el etanol. Agregar 1ml de Cloro (clorales<sup>(R)</sup>) al 20%, y dejar lavando en agitación durante 6 minutos. Centrifugar y retira el exceso de Cloralex<sup>(R)</sup>. Agregar 1ml de agua destilada estéril y dejar lavando en agitación

durante 10min. Repetir el lavado con agua dos veces más, y al final resuspender las semillas en 1ml de agua destilada estéril. Para homogenizar la germinación de las semillas (estratificación), se incubaron a 4°C en oscuridad durante al menos 72hrs.

#### ***Condiciones de crecimiento in vitro:***

La siembra de *Arabidopsis*, previamente esterilizada, hidratada y estratificada, fue sembrada directamente en cajas Petri, sobre medio nutritivo Murashigi and Skoog al 0.1X, pH5.7, solidificado con 1% de agar (TC), como fue previamente reportado por Sánchez-Calderón *et al* (2006). La solución salina consistió de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2mM,  $\text{KNO}_3$  1.9mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15 mM, KI 5uM,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  25uM,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1mM,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3mM,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1uM,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.1uM,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.1uM,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1mM, inositol 10mg/litro, y glicina 0.2 mg/litro. Para medio carente en hierro, el  $\text{FeSO}_4$  y el  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  fue remplazado por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y se adicionó ferrozina 100uM. Para un medio con suficiencia de Pi se utilizó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1mM y para uno carente 5uM. Se agregaron 10gr de sacarosa por litro de solución y MES hydrate (SIGMA) a una concentración final de 3.5mM (amortiguador de pH). Los ácidos orgánicos citrato y malato (ambos de SIGMA<sup>(R)</sup>) fueron agregados al medio antes de ajustar el pH. Después de la siembra las cajas Petri se colocaron de manera inclinada entre los 95° y 105° para permitir el crecimiento vertical del sistema radicular. Las plántulas se desarrollaron en cámara de crecimiento Percival, a 22°C, ante un fotoperiodo con 16 horas de luz, a una intensidad lumínica de >200 micromoles.

#### ***Mutagenesis de semillas de Arabidopsis con EMS:***

Para la mutagénesis se utilizó EMS (etilmetanosulfonato) a una concentración final del 0.4%, disuelto en buffer de fosfatos de sodio pH7. Aproximadamente 3,000 semillas de *Arabidopsis* (de la línea reportera

*pro790::GUS-GFP 3/6*) fueron superficialmente desinfectadas, como se mencionó anteriormente, pero extrapolado a un volumen de 10ml, y realizado en tubos Falcon de 50ml. En el último paso de la desinfección de las semillas, en lugar de resuspenderlas en agua destilada estéril, se resuspendieron en 10ml de buffer de fosfato de sodio pH7, y se dejaron en agitación "gentil" a 4°C en oscuridad, durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el buffer de fosfatos (lo mayor cantidad posible), y en "campana de extracción" se adicionaron 10 ml de la solución de EMS 0.04%, disuelto en buffer de fosfato. Enseguida las semillas fueron incubadas en agitación "gentil", durante 9 horas en oscuridad. Finalmente, se retiró el buffer con EMS y se realizaron 10 lavados con 30ml de agua destilada estéril, cada uno. Las semillas fueron resuspendidas en 5ml de agua destilada estéril y colocadas a 4°C en oscuridad, durante 72 horas para su estratificación. Las semillas mutagenizadas fueron sembradas directamente en suelo (con pipeta y dosificador, utilizando una solución de agar al 0.1%), en grupos de 60 plantas, pero manteniendo la distancia de siembra recomendada para el crecimiento de las plantas adultas de Arabidopsis (2x2cm) en invernadero. La semilla fue cosechada y colectada por grupo de 60 plantas.

### ***Mapeo genético por secuenciación:***

Las mutantes químicas-EMS aisladas del escrutinio en carencia de Pi, fueron genotipificadas y validadas para el fenotipo mutantes, en tres generaciones subsecuentes a partir de las plántulas inicialmente identificadas. Para generar la población de mapeo se siguió la estrategia descrita en el método Mutmap, para mutantes recesivas<sup>151</sup>. Cada línea mutante (homocigota) fue retrocruzada con la línea parental de Arabidopsis utilizada para la mutagénesis (*pro790::GUS-GFP/3-6*). La progenie (*F1*) fue retrocruzada. Las semillas de la generación *F2* (población segregante) de una planta, fue sembrada en carencia de Pi y reanalizada para la identificación del respectivo fenotipo mutante. 100 plántulas con fenotipo mutante y 100 con fenotipo WT fueron crecidas en invernadero para incrementa su biomasa. Se extrajo ADN total por cada grupo de 100 plantas con fenotipo WT y

100 plantas con fenotipo mutante (aproximadamente de 0.05 gr de tejido por planta).

Para la secuenciación de los genomas de plántulas WT y de plántulas mutantes se utilizó la plataforma de secuenciación Myseq (paired-end) de Illumina<sup>(R)</sup>, con un tamaño de lecturas de 250pb. La secuenciación se realizó en el Laboratorio de Genómica para la Biodiversidad (LANGEBIO), del CINVESTAV Irapuato, Gto. México. Las secuencias obtenidas fueron alineadas al genoma de Arabidopsis (TAIR), de forma independiente por cada uno de los cinco cromosomas. La relación de los programas empleados y la lista de los comandos del *script* se muestran en el apéndice (Apendice1). Para identificar las variantes (SNPs, IN-DELS entre otras mutaciones) potencialmente responsable del fenotipo de cada mutante, se identificaron todas las variantes homocigotas (por ser mutantes recesivas) presentes en los genomas de plántulas con fenotipo mutantes, y ausentes en los genomas de plántulas con fenotipo WT. Este trabajo se concentró en las variaciones de "alto impacto", aquellas que predicen la pérdida o ganancia de alguna función.

#### ***Análisis de validación a través de la secuenciación por Sanger:***

Para corroborar que las secuencias de los promotores fusionados a los genes reporteros no presentaran errores por efecto de la amplificación, los promotores (previamente incorporados en los vectores de expresión), fueron secuenciados en el Departamento de Servicios Genómicos del LANGEBIO, CINVESTAV-Campus Irapuato y posteriormente analizados *in silico* con las secuencias reportadas en el genoma de Arabidopsis (TAIR).

#### ***Extracción de ADN total de Arabidopsis:***

Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo descrito por Doyle y Doyle (Henry 1997). El buffer de extracción estuvo compuesto por CTAB 2%, Tris 100mM pH8, cloruro de sodio 1.4M, EDTA 20mM pH8, y  $\beta$ -mercaptoetanol 0.1%,

disuelto en agua destilada estéril. El tejido de cada muestra (0.05gr por cada una de las 100 plántulas) fue previamente macerado con nitrógeno líquido. Primero se incubó el tejido macerado junto con el buffer de extracción (CTAB 2%), en agitación "sutil" durante 20min a temperatura ambiente. Enseguida se centrifugó la mezcla a 12,000rpm, durante 5min a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante y se mezcló por inmersión "gentil", con un volumen (v/v) de cloroformo:isoamílico (24:1). Centrifugó la muestra a 12,000rpm, durante 1min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se mezcló por inmersión "gentil" con 2/3 (v/v) de isopropanol enfriado a -20°C, y se dejó incubando a -20°C durante 60 minutos. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12,000rpm, durante 1min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se agregó etanol 70% (grado biología molecular) y se centrifugó nuevamente a 12,000rpm, durante 1 minuto a 4°C. Se repitió el lavado con etanol 70% (paso anterior). Se eliminó el etanol 70% (se dejó ventilar la "pastilla" durante 10min) y se adicionó agua destilada estéril para resuspender el ADN extraído. La muestra fue tratada con RNAsa para eliminar los restos de ARN. Antes de mandar a secuenciar las muestras, se analizó la concentración e integridad del ADN, por espectrometría y electroforesis, respectivamente.

#### ***Extracción de ARN de Arabidopsis:***

Para la extracción de ARN se utilizó el protocolo descrito por Chomczynski *et al* (1993), donde se utiliza un buffer comercial llamado Trizol<sup>(R)</sup>. En tejido de cada muestra fue previamente macerado con nitrógeno líquido. En un tubo Eppendor de 1.5ml, se mezcló por vortex de 50-100mg de tejido macerado, con 1mL de buffer Trizol. La mezcla se dejó incubar durante 3min en hielo. Enseguida, se centrifugó a 12,000rpm, durante 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, y se mezcló por vortex con 0.2ml de cloroformo:isoamílico (24:1), previamente enfriado a -20°C. La mezcla se centrifugó a 12,000rpm, durante 10min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante, se mezcló con 0.5ml de isopropanol, previamente enfriado a 4°C y se dejó incubando durante 10min en hielo. La mezcla se centrifugó a 12,000rpm durante 10min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se

agregó 1ml de etanol 70%. La muestra se centrifugó a 12,000rpm durante 1min a 4°C, y se repitió el paso de lavado con etanol 70% (paso anterior). Finalmente se eliminó el excedente de etanol y se agregaron 30uL de agua destilada estéril. La concentración e integridad del ARN fue analizado mediante espectroscopia y electroforesis, respectivamente. Las muestras fueron almacenadas a -70%, hasta su utilización.

#### ***Ensayos de qRT-PCR:***

Las reacciones de qRT-PCR fueron realizadas por el Laboratorio de servicios genómicos del LANGEBIO-CINVESTAV Irapuato, Guanajuato, México. Para la síntesis del cDNA se utilizó el protocolo descrito por SuperScript™ (Invitrogen). Cada reacción fue realizada con 1X de la mezcla maestra de SYBR (Applied Biosystems). El programa de amplificación consistió en: 10min a 95°C, seguido de 40 ciclos, de 30seg a 95°C, 30seg a 60°C, y 40seg a 72°C. El sistema utilizado es de ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems).

#### ***Tinciones histoquímicas de GUS (pro790::GUS-GFP):***

Para las tinciones histoquímicas del reportero GUS ( $\beta$ -glucoronidasa), se utilizó el protocolo descrito por Jefferson *et al* (1987). Las plántulas fueron sumergidas en buffer X-Gluc (Buffer de fosfatos pH 7.0 [ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.1M y  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1M], EDTA 10mM,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  1mM,  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$  1mM, Triton X-100 0.1% y X-Gluc 2.0mM), e incubadas a 37°C en oscuridad dura toda la noche. La reacción se detuvo retirando el buffer X-Gluc y adicionando etanol 70%. Las plántulas teñidas fueron clareadas siguiendo el protocolo descrito por Malamy and Benfy, 1997), y fotografiadas a través de microscopía óptica con Normaski.

### ***Extracción y cuantificación de proteína total:***

Para la extracción de proteína total se utilizó el protocolo descrito por Jefferson *et al*<sup>152</sup>. Brevemente, en un tubo para 1.5ml se agregaron 100mg de tejido macerado, 0.5ml de buffer para extracción de proteína total (Buffer de fosfatos pH7; EDTA 0.5M; Sarcosina 15%; Tritón X-100 10% y  $\beta$ -mercapto etanol), y se mezcló por vórtex. Posteriormente se centrifugó a 13000rpm durante 10min a 4°C y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Las muestras fueron colocadas a -70°C hasta su utilización.

Para la cuantificación de proteína total se utilizó el protocolo descrito por Bradford<sup>153</sup>. Brevemente, el análisis se realizó en microplacas de 96 pozos. Se mezclaron 1 $\mu$ g de proteína total extraída (5-10 $\mu$ l), con 200 $\mu$ l de reactivo de Bradford 1X (Bio-Rad Protein Assay), se incubó durante 10min a temperatura ambiente en oscuridad. Las lecturas para determinar la concentración de las muestras fueron realizadas a una longitud de onda de 595nm. Las mediciones fueron realizadas en un espectrofotómetro (Tecan US SPECTRAFluor). Como control y para la realización de la curva de calibración, se utilizó BSA (*Bovine Serum Albumin*, por su sigla en Inglés).

### ***Ensayos flurométricos de la actividad de GUS (pro790::GUS-GFP):***

Para determinar cuantitativamente la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP*, se realizaron ensayos fluorométricos de GUS, siguiendo el protocolo descrito por Gallagher (1993). Brevemente, en un tubo eppendorf de 1ml se mezcló 1 $\mu$ g de la proteína total extraída (5-10 $\mu$ l), con 100 $\mu$ l de MUG 2mM (4-methylumbelliferyl B-D-glucoronide) disuelto en buffer para la extracción de proteína total (Buffer de fosfatos pH7; EDTA 0.5M; Sarcosina 15%; Tritón X-100 10% y  $\beta$ -mercaptoetanol), y se incubó a 37°C, durante 60 minutos en oscuridad. Posteriormente, la reacción se detuvo con 1ml de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 0.2M, disuelto en agua destilada estéril. La intensidad de fluorescencia se analizó en microplaca de 96 pozos, y se determinó a través de una mezcla de 10 $\mu$ l del producto de reacción

entre la proteína total extraída y el MUG, con 200 $\mu$ l de carbonato de sodio 0.2M (por cada una de las muestras). Las mediciones fueron realizadas con un espectrofotómetro (Tecan US SPECTRAFluor). Como controles se utilizaron el sustrato de GUS MUG 2mM, y el producto MU 50nM.

### ***Tinciones histoquímicas Perls-DAB:***

Para las tinciones *Perls-DAB* se siguió el protocolo descrito por Muller y *Colaboradores* (2015). Brevemente, las plántulas fueron incubadas en buffer Perls (ferrocianuro de potasio al 4% w/v y HCl al 4%, disueltos en agua), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Enseguida se retiró el buffer Perls, y se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Posteriormente se adicionó una solución metanólica con azida de sodio 10mM y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.3% (v/v), y se dejó incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente. Al termino se retiró la azida y se realizaron dos lavados con buffer de fosfato de sodio 100mM pH7.4. Finalmente, las tinciones Perls fueron intensificadas con DAB al 0.025% (w/v) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.005% (v/v) disuelto en buffer de fosfatos de sodio pH 7.4. Para detener la reacción con DAB, simplemente se realizaron dos lavados con agua destilada estéril. Las plántulas fueron clareadas con hidrato de cloral concentrado (a una proporción de 8:1:2 de hidrato de cloral:glicerol:agua) y visualizadas en microscopia óptica con Normaski (Leica DMR).

### ***Clareo de tejidos:***

Después de las tinciones de GUS, el tejido se sumergió en 1ml de etanol 70% y se incubó a 4°C durante 7 días. El etanol utilizado se cambió cada 24hrs. Al día 8 (o inmediatamente después de las tinciones, pero es menor la eficiencia del clareo), se retiró el etanol 70%, se agregó 1 ml de la solución I para clareos (HCl 0.24N y Metanol 20%), y se incubó 62°C durante 60min. Se retiró la solución I, se agregó 1 ml de solución II (NaOH 7% y Etanol 60%), y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se retiró la solución II, se adicionó 1 ml de etanol 40% y

se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se retiró el etanol 40%, se agregó 1 ml de etanol 20% y se incubó a temperatura ambiente durante 20min. Se retiró el etanol 20%, se adicionó 1ml de etanol 10% y se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Se retiró el etanol 10%, se adicionó 1ml de la mezcla etanol 10% - glicerol 50% y se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se retiró la mezcla de etanol 10% - glicerol 50%, se agregó 1ml de glicerol 50% y se incubó durante 7 días a temperatura ambiente. Finalmente, el tejido fue montado en portaobjetos de cristal con glicerol al 50% y se observó al microscopio.

***Cálculos de dinámica molecular:***

Las descripciones de los cálculos de dinámica molecular se describen en el apartado de materiales y métodos del apéndice 3.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

---

Con el objetivo de identificar "nuevos genes" que participan en el mecanismo de percepción de Pi y respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en Arabidopsis, la estrategia experimental de este trabajo se basó en el uso de una línea reportera que permitiera monitorear *in vivo* la respuesta sistémica y la respuesta local, durante el escrutinio de una población de plántulas mutagenizadas (químicamente con etilmetanosulfonato), crecidas ante condiciones de carencia de Pi.

Para ello se establecieron tres objetivos específicos (Fig15):

1) Identificar mutantes de Arabidopsis que sugirieran estar afectadas en los mecanismos de percepción de Pi y respuesta de aclimatación a la carencia de Pi (respuesta sistémica y respuesta local).

2) Conocer la identidad de los genes responsables de los fenotipos de plántulas mutantes afectadas en la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en Arabidopsis.

3) Describir la función de los genes identificados, dentro del mecanismo de percepción de Pi y/o respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en Arabidopsis.

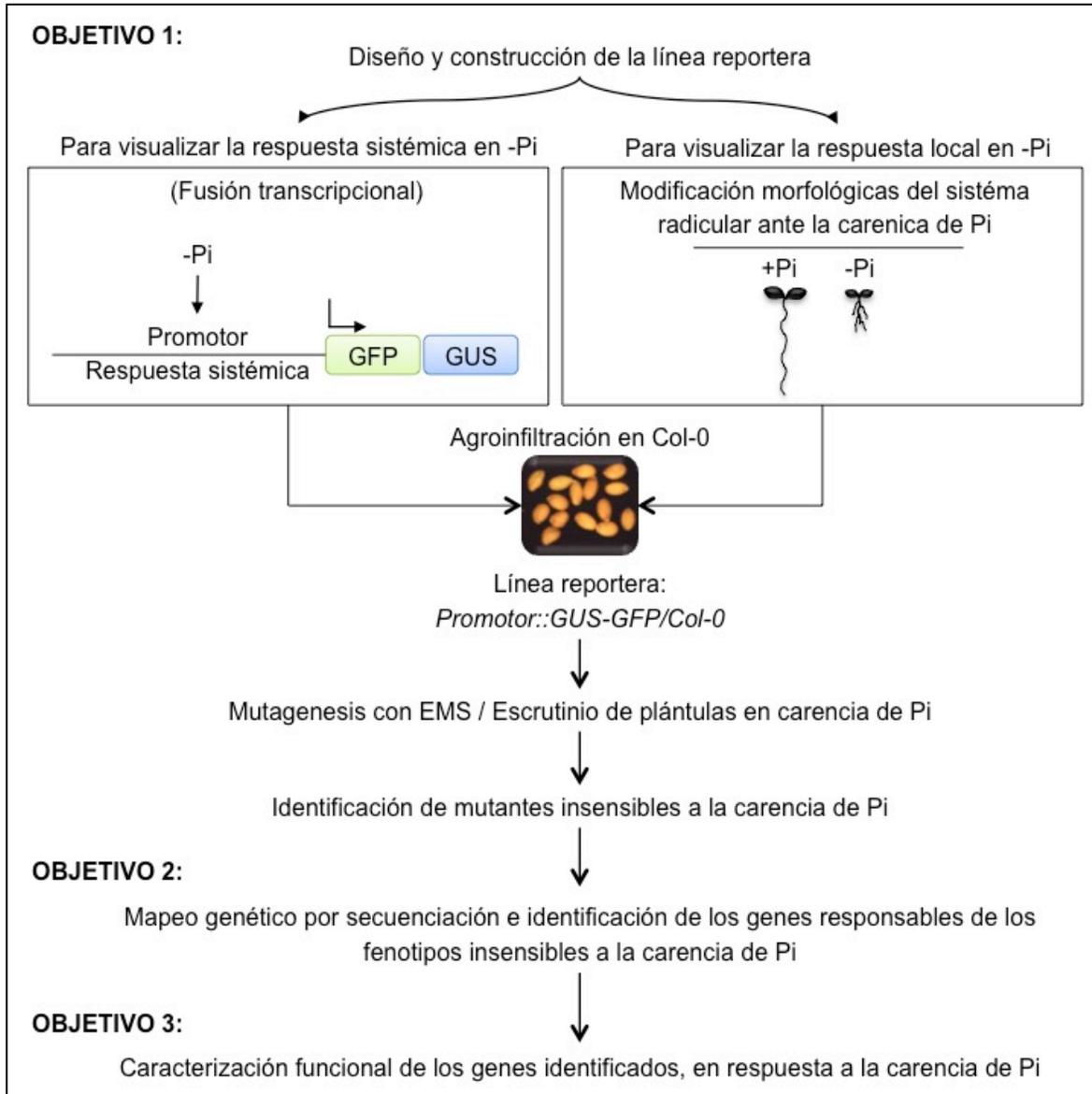


Figura 15. **Diagrama general de la estrategia experimental para cumplir con los objetivos específicos de este trabajo.** El primer objetivo específico fue diseñar y construir una línea reportera de *Arabidopsis Col-0* que permitiera monitorear *in vivo* la respuesta sistémica y respuesta local simultáneamente, durante el escrutinio de plántulas mutagenizadas con EMS (etilmetanosulfonato), crecidas ante condiciones de carencia de Pi. Esto con el fin de identificar mutantes insensibles a la carencia de Pi. El segundo objetivo específico fue identificar la identidad de los genes mutantes, responsables de los fenotipos de insensibilidad a la carencia de Pi, mediante la estrategia de mapeo genético por secuenciación de genomas. El tercer objetivo específico fue caracterizar la participación funcional de los genes identificados, dentro de los procesos de percepción de Pi y/o en la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en *Arabidopsis*.

## Capítulo 1

---

### *Construcción de la línea reportera de Arabidopsis pro790::GUS-GFP/Col-0*

La genética clásica es una de las estrategias más utilizadas para la identificación de genes que controlan la respuesta de las plantas a los cambios ambientales, principalmente a través del rastreo de plántulas mutagenizadas (insercionales/químicas-EMS), con el propósito de identificar mutantes con defectos en la respuesta de aclimatación a cierto tipo de estrés. Para cumplir con el objetivo de esta tesis, desarrollé una línea reportera que permitiera monitorear *in vivo* la respuesta sistémica y la respuesta local a la carencia de Pi en Arabidopsis, durante el escrutinio de una población de plántulas mutantes crecidas en carencia de Pi. Esto con el propósito de identificar mutantes insensibles a la carencia de Pi, que sugirieran estar afectadas en los mecanismos de percepción de Pi, y/o respuesta de aclimatación a la carencia de Pi.

Para visualizar la respuesta sistémica se utilizaron los genes reporteros GFP (*Green Fluorescent Protein*, por su sigla en Inglés) y GUS ( $\beta$ -glucoronidasa) bajo el control de la región promotora del gen *At5g20790*. Aunque se desconoce la función de este gen, se sabe que es fuertemente inducido transcripcionalmente (>100 veces) en plántulas de Arabidopsis ante la carencia de Pi (tanto en brote como en raíz). A través de experimentos de transferencias, se observó que *At5g20790* es inducido desde los primeros 10 minutos después de que la planta hace contacto con un medio carente en Pi<sup>99</sup>. Igualmente importante encontré que también se reprime, casi hasta su nivel de expresión basal, dentro de los primeros 30 minutos después de re-adicionar Pi al medio. Esto sugiere que *At5g20790* se encuentra regulado, más que por la alteración en el metabolismo de Pi, por un mecanismo que percibe directamente la disponibilidad Pi en el medio. Esta idea es

factible, considerando que la expresión transcripcional de *At5g20790* es reprimida por arsenato (As) y fosfito (Phi) en carencia de Pi<sup>7-10,98</sup>. Aunque *At5g20790* no contiene el sitio de unión P1BS (GNATATNC) en su promotor, es regulado transcripcionalmente por PHR1 de manera indirecta ya que responde a las señales sistémicas de respuesta a la estatus de Pi en la planta. Con lo anterior, y considerando que la región intergénica del gen *At5g20790* es tan sólo de 459 pares de bases (pb), resultó una buena opción para controlar la expresión de los genes reporteros GUS-GFP, y monitorear la respuesta sistémica inducida en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi. Para visualizar la respuesta local, simplemente se utilizó el ecotipo de *Arabidopsis* Columbia-0 (Col-0), ya que es el que muestra con mayor intensidad los cambios morfológicos del sistema radicular ante la carencia de Pi, entre ellos, la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal. Lo primero fue validar la respuesta de los marcadores a utilizar. La mayoría de los análisis transcripcionales y estudios morfológicos en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi se han realizado en plántulas de entre 3 y 15 días después de germinar (ddg), por ello que en este trabajo se realizó en plántulas de 10ddg (momento en el cual se observan claramente los cambios morfológicos inducidos en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi). En las condiciones de crecimiento de este trabajo (ver apartado de materiales y métodos), *Arabidopsis* Col-0 (WT) inhibió el crecimiento longitudinal de la raíz principal, alcanzando en promedio una longitud hasta cuatro veces menor en comparación con la presencia de Pi (Fig16A). Mediante qRT-PCR se confirmó que el gen *At5g20790* es transcripcionalmente inducido por la carencia de Pi, hasta más de 60 veces, en comparación con lo determinado en presencia de Pi (Fig16B).

Para monitorear la respuesta sistémica, en principio se fusionaron las 459 pares de bases de la región intergénica del gen *At5g20790*, a los genes reporteros GUS y GFP. La construcción fue agroinfiltrada en *Arabidopsis* Col-0, y se seleccionaron tres líneas independientes homocigotas, con una sola copia funcional de la construcción *pro790::GUS-GFP* dentro de su genoma (Cuadro2), y con un patrón de expresión promedio y similar entre ellas (Fig16D y Fig16E). La

línea reportera *pro790::GUS-GFP* 3-6 fue seleccionada para el resto de los experimentos (Fig16E). Mediante el análisis cuantitativo de GUS (a través ensayos fluorométricos), se observó que la línea reportera *pro790::GUS-GFP* es fuertemente expresada ante la carencia Pi (de forma generalizada tanto en brote como en la raíz), hasta 60 veces más que lo determinado en suficiencia de Pi (Fig16F). En el brote, particularmente en el cotiledón, la expresión se identificó en todas la líneas celulares de la lámina foliar (células de la empalizada, mesófilo, epidermis, idátodos, vasculatura y estomas). En la raíz la expresión también se localizó en prácticamente todas las tipos celulares (vasculatura, periciclo, endodermis, córtex epidermis, nicho quiescente y columnela en el meristemo radicular) (Fig16E). La expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP* también se pudo monitoreada *in vivo* a través de la observación de GFP en la raíz de plántulas crecidas en carencia de Pi (Fig16H).

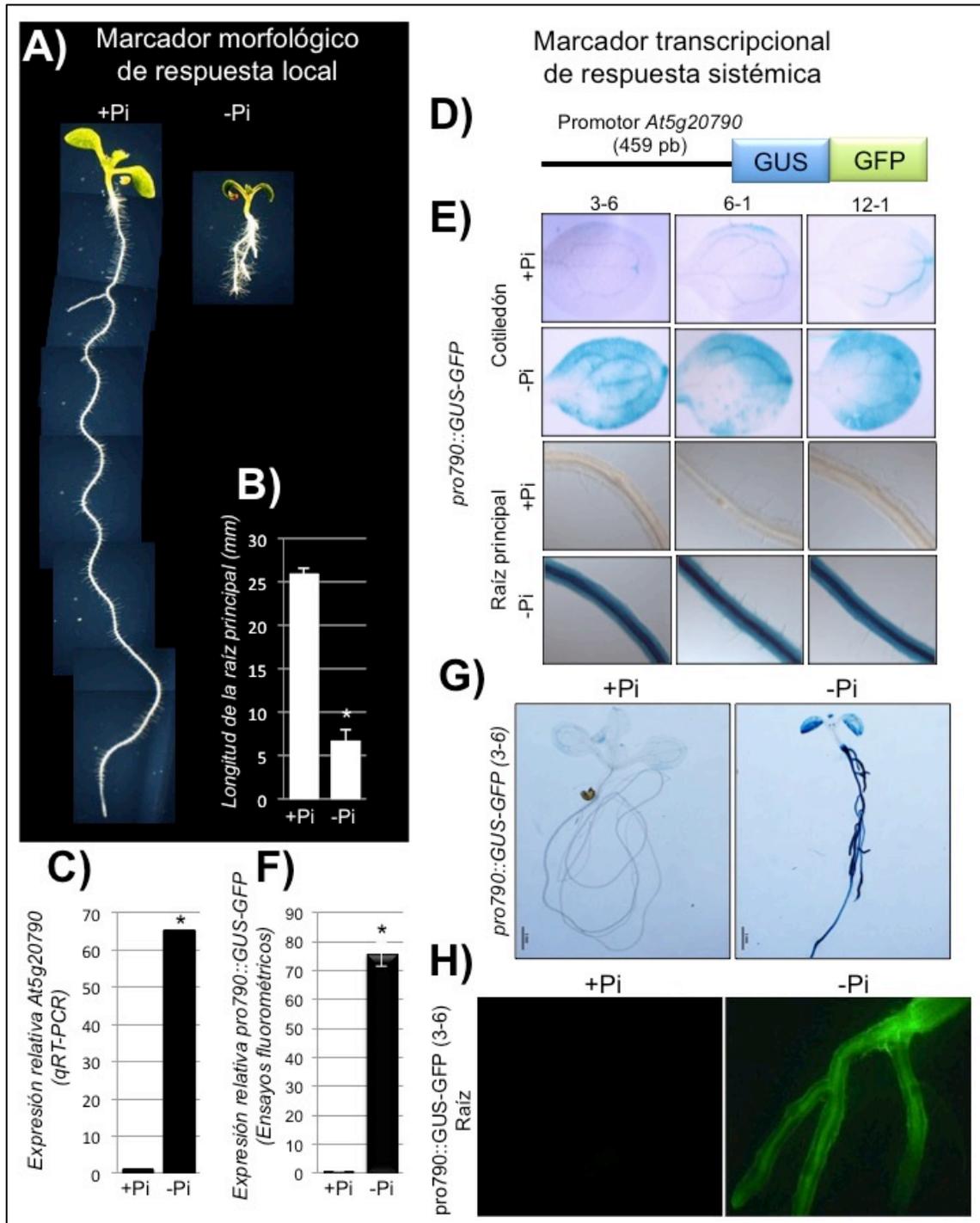


Figura 16. **Expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP/Col-0* en Arabidopsis.** A) Fenotipo de plántulas de Arabidopsis ecotipo Col-0, de 10 días después de germinar (ddg) en suficiencia (+Pi) y carencia de Pi (-Pi). B) Longitud de la raíz principal de plántulas de Arabidopsis de 10ddg en +Pi y -Pi. C) Expresión transcripcional del gen *At5g20790* (determinado por qRT-PCR) en plántulas completas de 10ddg en +Pi y -Pi. El número de veces inducido en -Pi es relativo a lo observado en +Pi. D) Diseño de la línea reportera *pro790::GUS-GFP*, GFP= proteína verde fluorescente, GUS=  $\beta$ -Glucuronidasa. E) Tinciones histoquímicas de GUS, de tres líneas transformantes homocigotas, independientes y, con una sola copia funcional de la construcción *pro790::GUS-GFP* (3-6, 6-1 y 12-2), crecidas durante 10ddg en +Pi y -Pi. F-H) Expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP* (transformante 3-6), observada a través de tinciones histoquímicas,

determinaciones fluorométricas, y por visualización *in vivo* de la proteína GFP en raíz de plántulas de 10ddg en +Pi y -Pi, respectivamente.

Tabla 2. Análisis de segregación (resistencia a kanamicina) de las tres líneas reporteras *pro790::GUS-GFP* utilizadas para este trabajo. La determinación se realizó en plántulas de 10 días después de germinar en suficiencia nutricional, complementada con kanamicina (40mg/lt). En los tres casos se cuantificó una frecuencia de segregación 3:1 (tres plántulas resistentes a kanamicina, por cada cuatro analizadas).

Frecuencias de segregación de plántulas resistentes y no resistentes a kanamicina, de tres líneas independientes <i>proAt5g20790::GUS-GFP</i>						
	Resistentes observadas	Resistentes esperadas	No resistentes observadas	No resistentes esperadas	$\chi^2$	$\chi^2$ (0.95)
Línea 3	152	156	56	52	0.4	3.8
Línea 6	138	144	54	48	1	3.8
Línea 12	148	151	54	50	0.3	3.8

Para saber si la línea reportera *pro790::GUS-GFP* era regulada por PHR1 (el factor de transcripción considerado como regulador maestro de la respuesta sistémica a la carencia de Pi en *Arabidopsis*), se movilizó la construcción al respectivo fondo mutante *phr1*. El análisis cuantitativo de GUS (ensayos fluorométricos) mostró que la expresión reportera *pro790::GUS-GFP* se reprime hasta en un 50%, en comparación a lo observado en la WT ante la carencia de Pi (Fig17A). Mediante el análisis histoquímico se observó que dicha disminución en la expresión reportera es generalizada a través de toda la planta, tanto en brote como en raíz. En presencia de Pi la expresión reportera fue similar entre la WT y la mutante *phr1* (Fig17B).

A través de experimentos de medios divididos, donde una porción de la raíz crece en suficiencia de Pi mientras que el resto se desarrolla en carencia de Pi, se descubrió que parte de la respuesta transcripcional inducida por la carencia de Pi, es reprimida a larga distancia por efecto de una señal, aún desconocida, aparentemente activada por la porción de la raíz crecida en presencia de Pi. Para conocer si la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP* era regulado sistémicamente, se analizó su expresión a través de dichos experimentos de

medios divididos. Los análisis cuantitativos de GUS mostraron que la expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP* es reprimida de manera sistémica en la porción de la raíz crecida en carencia de Pi, hasta 80% en comparación con el tratamiento control de carencia de Pi (donde ambas porciones de la raíz crecen en carencia de Pi), cuando la otra porción de la raíz se desarrolla en condiciones de suficiencia nutricional. Interesantemente, aunque la expresión reportera fue inhibida en la porción de la raíz en carencia de Pi, fue hasta 10 veces superior al tratamiento en presencia de Pi (Fig17A). Los tratamientos control, donde ambas porciones de la raíz crecieron ante las mismas concentraciones de Pi (+Pi/+Pi o -Pi/-Pi) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, respectivamente. Los tratamientos histoquímicos de GUS confirmaron los análisis cuantitativos. La expresión del reportero *pro790::GUS-GFP* fue inhibido en la porción de la raíz crecidas en carencia de Pi, como consecuencia de la otra porción de la raíz crecida en suficiencia de Pi. En cuanto a los tratamientos control no se detectó expresión reportera en la porción de las raíces crecidas en suficiencia de Pi. Caso contrario a las porciones de la raíz que crecieron en carencia de Pi, donde se observó expresión con gran intensidad, de forma generaliza tanto en brote como en raíz (Fig17B).

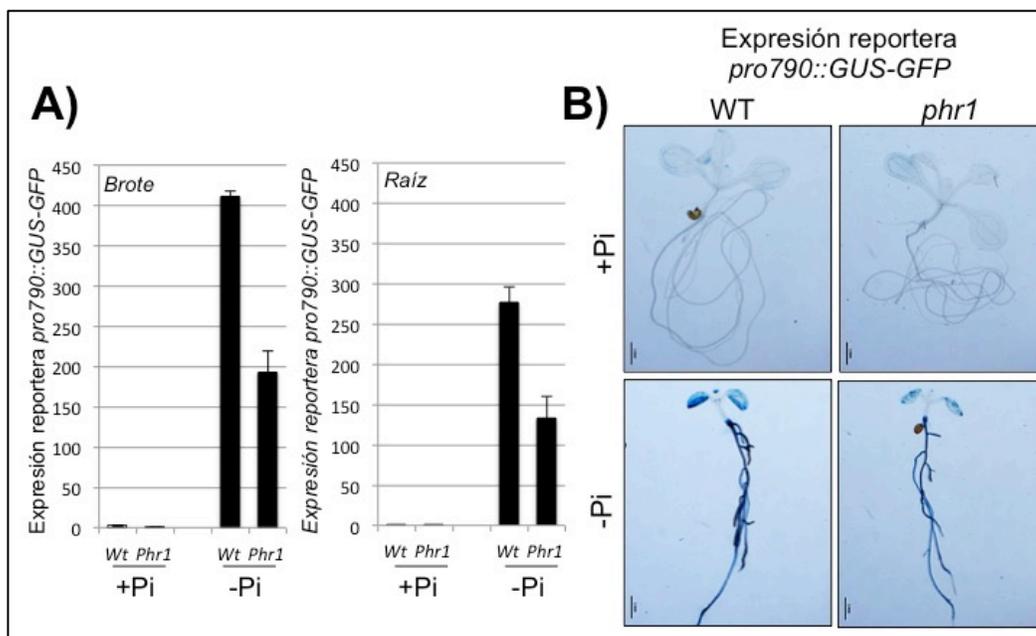


Figura 17. **Expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP* en el fondo mutante *phr1*.** A) Determinaciones cuantitativas a través de ensayos fluorométricos de la actividad de GUS

(*pro790::GUS-GFP*), de plántulas WT y mutantes *phr1*, de 10 días después de germinar en presencia (+Pi) y carencia de Pi (-Pi). Análisis de expresión en brote y raíz por separado. **B)** Tinciones histoquímicas de GUS (*pro790::GUS-GFP*) en plántulas WT y mutantes *phr1*, de 10ddg en +Pi y -Pi.

También se analizó el efecto del fosfito (Phi) y la carencia de otros nutrientes esenciales como el nitrógeno, el potasio y el hierro, en la expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP*. El tratamiento con Phi inhibió la expresión hasta 90% y 60% en brote y raíz de plántulas crecidas ante la carencia de Pi, respectivamente (Fig19A). A través de tinciones histoquímicas de GUS, se observó que el Phi reprime la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP*, de forma generaliza a través de toda la planta, aunque en brote la expresión disminuye a medida que se alejó del ápice en el cotiledón (Fig19B y Fig19D). Ante la carencia de nitrógeno y potasio la expresión fue claramente menor (tanto en brote como en raíz), en comparación con plántulas crecidas en suficiencia nutrimental. Curiosamente la expresión reportera en carencia de Pi fue inhibida cuando las plántulas se desarrollaron en un medio carente de hierro (Fe) (Fig19F y Fig19H).

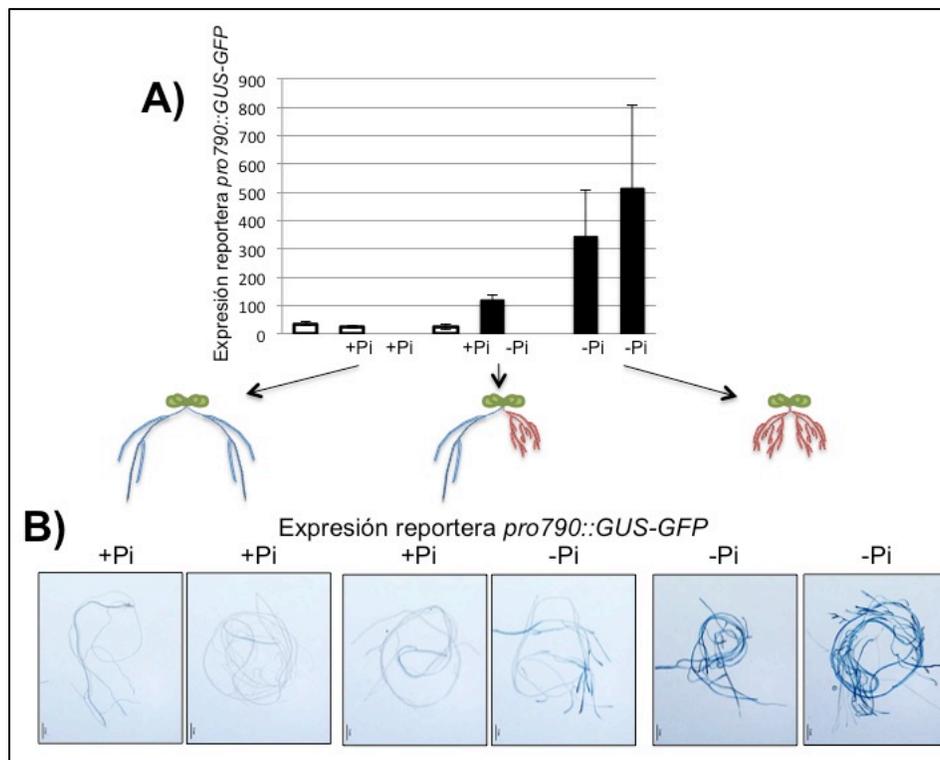


Figura 18. Regulación sistémica de la expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP* ante la carencia de Pi. **A)** Análisis cuantitativo (ensayos fluorométricos de GUS), de la

expresión del reportero *pro790::GUS-GFP* en porciones de las raíces, de tratamientos de medios divididos +Pi/+Pi, +Pi/-Pi y -Pi/-Pi. **B)** Tinciones histoquímicas de GUS de la línea reportera *pro790::GUS-GFP* en porciones de las raíces, de tratamientos de medios divididos +Pi/+Pi, +Pi/-Pi y -Pi/-Pi. Las plantas inicialmente fueron crecidas durante 10 días después de germinar en suficiencia de Pi, para después ser transferidas a sus respectivos tratamientos, y crecer durante 10 más antes del análisis transcripcional. Las raíces fueron disectadas para su análisis.

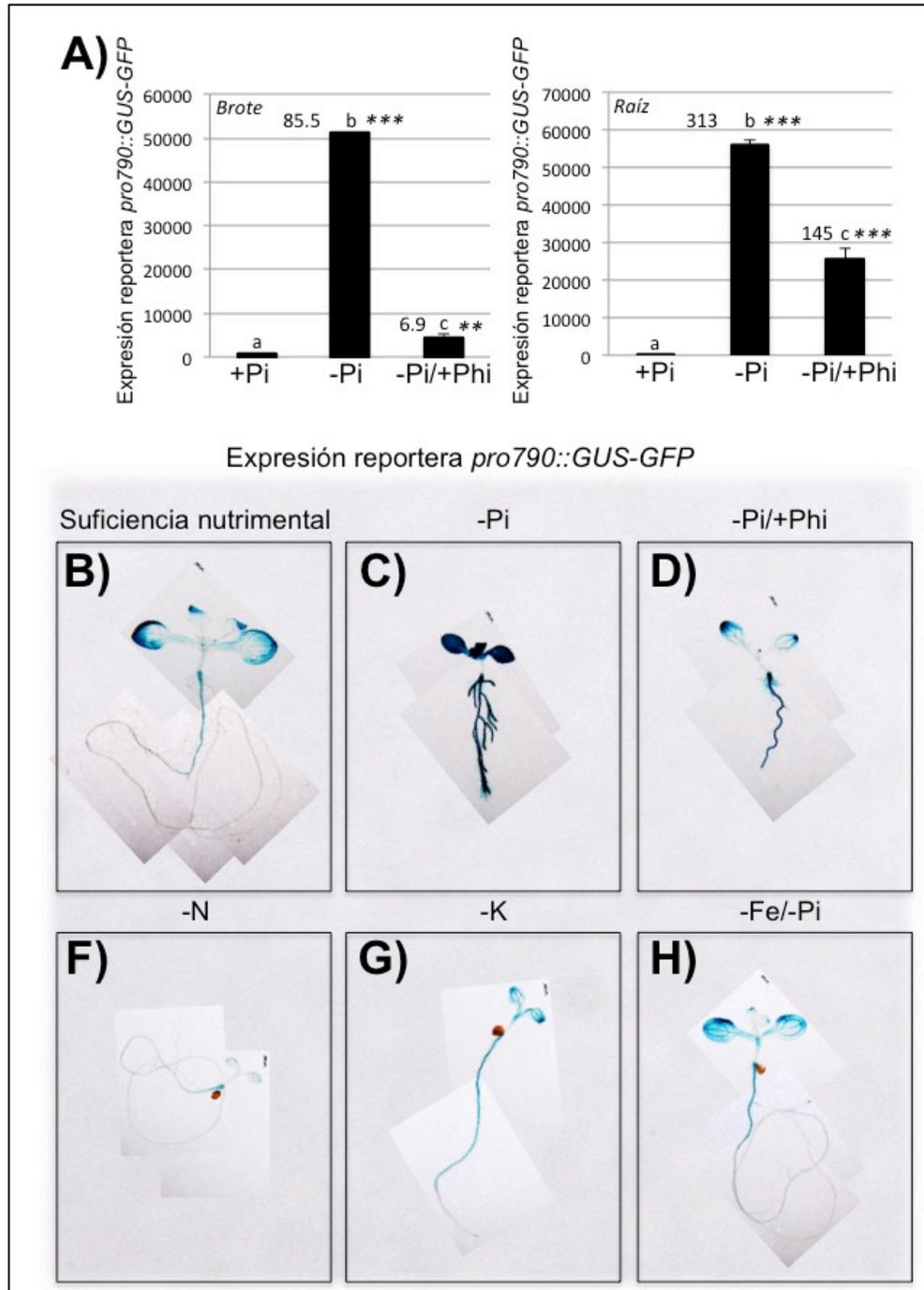


Figura 19. El efecto del fosfito, y la carencia de otros nutrientes en la expresión de la línea reportera *pro790::GUS-GFP* en *Arabidopsis*. **A)** Análisis cuantitativo, a través de ensayos fluorométricos, de la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP* en plántulas de *Arabidopsis* de 10

días después de germinar (ddg), en suficiencia de Pi (+Pi), carencia de Pi (-Pi), y carencia de Pi complementada con 1mM de fosfito (Phi), de brote y raíz. Tinciones histoquímicas de GUS, que muestran la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP* en plántulas de Arabidopsis de 10ddg en **B**) suficiencia de Pi, **C**) carencia de Pi (-Pi), **D**) carencia de nitrógeno (-N), **F**) carencia de potasio (-K), y **G**) carencia de Pi y hierro (-Pi/-Fe).

### Identificación de mutantes insensibles a la carencia de Pi en Arabidopsis

Como parte de este trabajo se mutagenizó con EMS (etilmetanosulfonato), una población de 6,000 semillas de la línea reportera *pro790::GUS-GFP/Col-0/3-6*. Las semillas hijas fueron cosechadas por grupos de 60 plantas. En promedio se analizaron 24 plántulas hijas (*F1*) por plántula mutagenizada. Como resultado del escrutinio de más de 60,000 plántulas *F1* (*pro790::GUS-GFP*) crecidas durante 10 días después de germinar en carencia de Pi, se identificaron poco más de 50 mutantes alteradas en la respuesta a la carencia de Pi. Las mutantes fueron clasificadas en tres grupos, mutantes visiblemente alteradas sólo en la expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP* (respuesta sistémica), mutantes con defectos sólo en la respuesta local (defectos en las modificaciones morfológicas del sistema radicular ante la carencia de Pi), y mutantes con alteraciones tanto en la respuesta sistémica como en la respuesta local. Las mutantes fueron nombradas como *lpi* (*low phosphate insensitive*, por su sigla en Inglés) (Fig20).

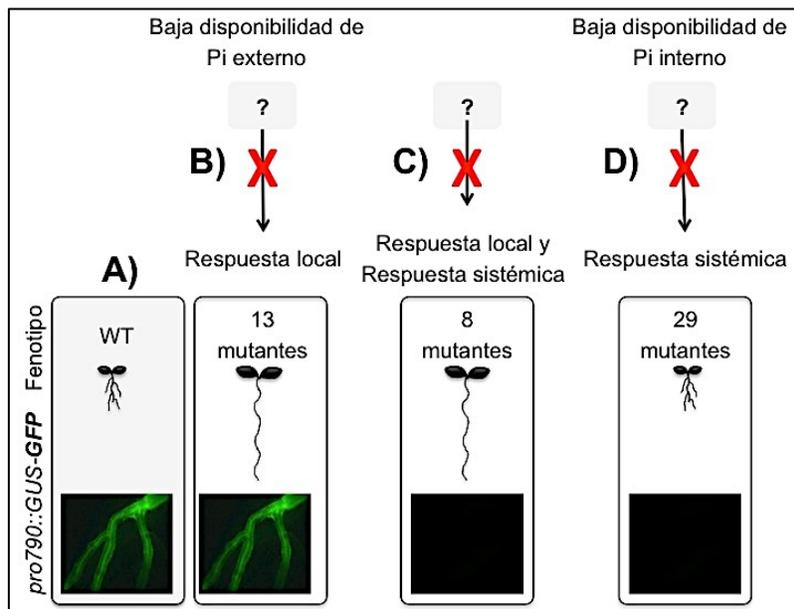


Figura 20. Clasificación de las mutantes identificadas con defectos en la respuesta a la carencia de Pi en Arabidopsis. A) Arabidopsis inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz (respuesta local), e induce sistémicamente la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP* ante la carencia de Pi. Como resultado del escrutinio de plántulas mutagenizadas, crecidas en carencia de

Pi, **B**) se identificaron 13 mutantes con defectos aparentemente sólo en la respuesta local, ya que mostraron atenuados los cambios morfológico del sistema radicular, pero mantuvieron la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP* (expresión de GFP) de forma similar a la WT, **C**) también se aislaron 29 mutantes que inhibieron la expresión de GFP, pero indujeron los cambios morfológicos de forma similar a la WT, y **D**) finalmente, también se aislaron 8 mutantes con defectos, aparentemente tanto en la respuesta sistémica como en la respuesta local a la carencia de Pi.

En esta tesis se describe la caracterización de las mutantes *lpi5* (*low phosphate insensitive 5*) y *lpi6* (*low phosphate insensitive 6*), las cuales presentaron defectos tanto en la respuesta sistémica (expresión reportera *pro790::GUS-GFP*) y en la respuesta local, particularmente en el desarrollo del sistema radicular ante la carencia de Pi.

### *lpi5 y lpi6 son mutantes de Arabidopsis alteradas en la respuesta local a la carencia de Pi.*

En cuanto a la respuesta local, a diferencia de la WT que detuvo el crecimiento longitudinal de la raíz principal desde el 4 día después de germinar (ddg), las mutantes *lpi5* y *lpi6* lo mantuvieron hasta el final del experimento (Fig21A y Fig21B). Al 10ddg en carencia de Pi, las mutantes *lpi5* y *lpi6* alcanzaron longitudes en promedio 5 y 6 veces superiores a lo mostrado por la WT (Fig21A). En presencia de Pi, *lpi5* mantuvo el crecimiento longitudinal de la raíz principal de manera indeterminada al igual que la WT y *lpi6*, sin embargo la longitud de la raíz principal en promedio fue 15% más pequeña (Fig21Ay Fig21C).

La inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi es un proceso específico de la punta de la raíz. Para analizar la estructura y funcionalidad celular del meristemo radicular, se movilizaron los marcadores de ciclo celular *proCYCB1::GUS* y de identidad del centro quiescente *proQC46::GUS* a los respectivos fondos mutante *lpi5* y *lpi6*. Mediante tinciones histoquímicas de GUS en plántulas de 10ddg en suficiencia de Pi, se observó que las mutantes *lpi5* y *lpi6* expresaron ambos marcadores al igual que la WT, ya que en ambos casos se detectó actividad de GUS (coloración azul) tanto en células del QC, como en células en proceso de mitosis (Fig23A y Fig23B). En condiciones limitantes de Pi, a diferencia de la WT donde no se detectó expresión para ninguno de los marcadores, *lpi5* y *lpi6* mostraron su expresión de forma similar a lo observado en sus respectivos genotipos ante condiciones de suficiencia de Pi (Fig23A y Fig23B).

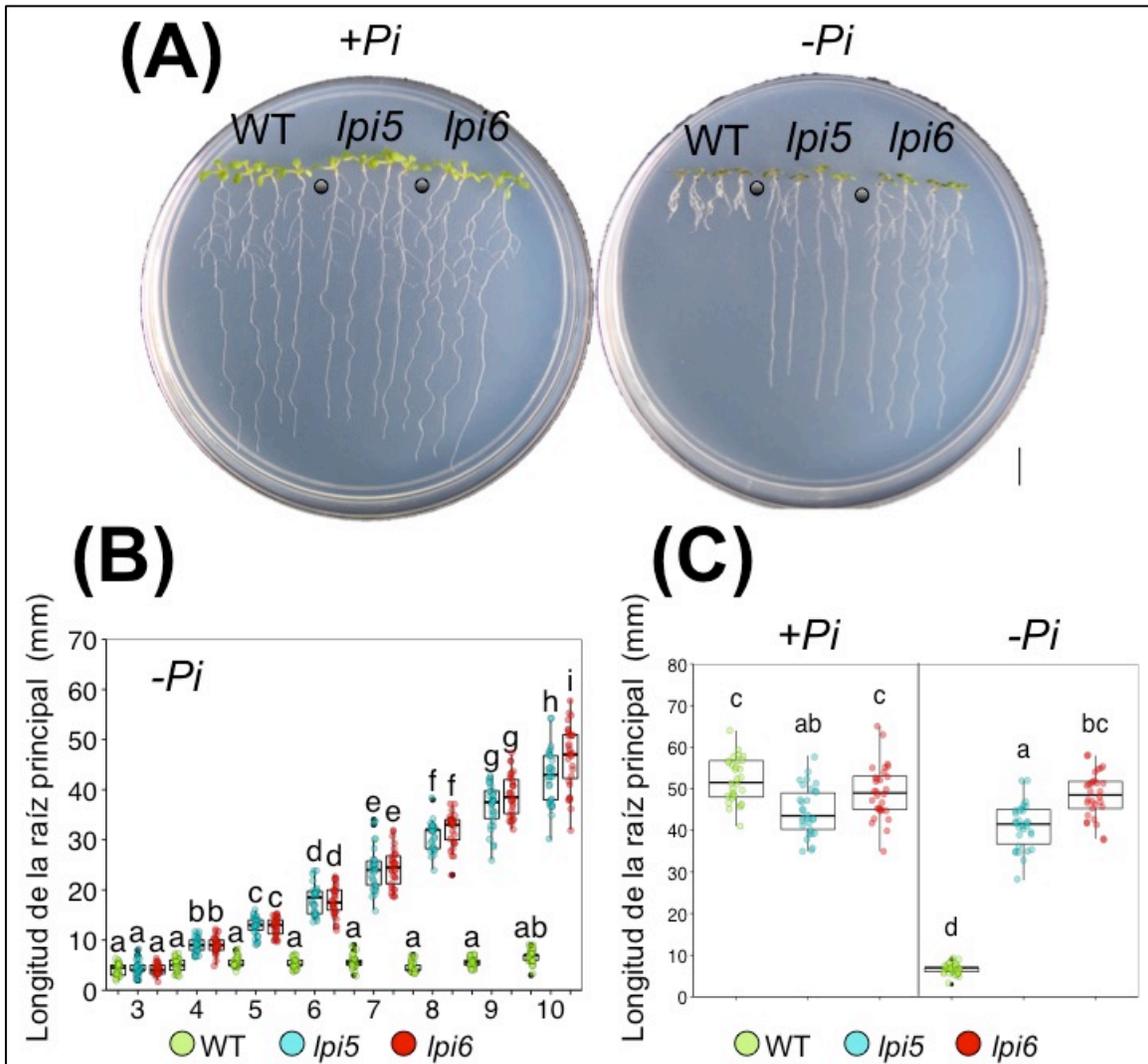


Figura 21. Análisis comparativo del crecimiento longitudinal de la raíz principal entre plantas WT, y las mutantes *lpi5* y *lpi6*. (A) Fenotipo de plántulas de 10 días después de germinar (ddg) en suficiencia (+Pi) y carencia de fósforo (-Pi). (B) Longitud de la raíz principal de plántulas del 2 al 10ddg en -Pi. (n=30 individuos analizados de tres experimentos independientes), respectivamente. Los grupos estadísticos fueron determinados con la prueba de Tukey-HSD (valor de  $P < .05$ ) y son indicados con letras diferentes. (C) Análisis comparativo de la longitud de la raíz principal entre plántulas de 10ddg en +Pi y -Pi. Los grupos estadísticos fueron determinados a través de la prueba de Tukey-HSD ( $P$ -value  $< .05$ ) los cuales son indicados con letras diferentes. Los puntos de colores, verde, azul y rojo, representa los individuos analizados. (Créditos de la figura compartidos con Chávez-Calvillo G. y Ojeda-Rivera J.O.).

Las mutantes *lpi5* y *lpi6* también presentaron defectos en la longitud y densidad de pelos radiculares, curiosamente solo en condiciones de carencia de Pi. En cuanto a la longitud de los pelos radiculares, *lpi5* y *lpi6* sólo mostraron el

10% de lo alcanzado por la WT (Fig22A). La densidad de pelos radiculares fue 10 veces menor, inclusive 10% menos que en su propio fondo genético en suficiencia de Pi (Fig22B). Adicionalmente, la mutante *lpi5* desarrollo 50% menos raíces laterales que la WT y la mutante *lpi6*, en carencia de Pi (Fig22C).

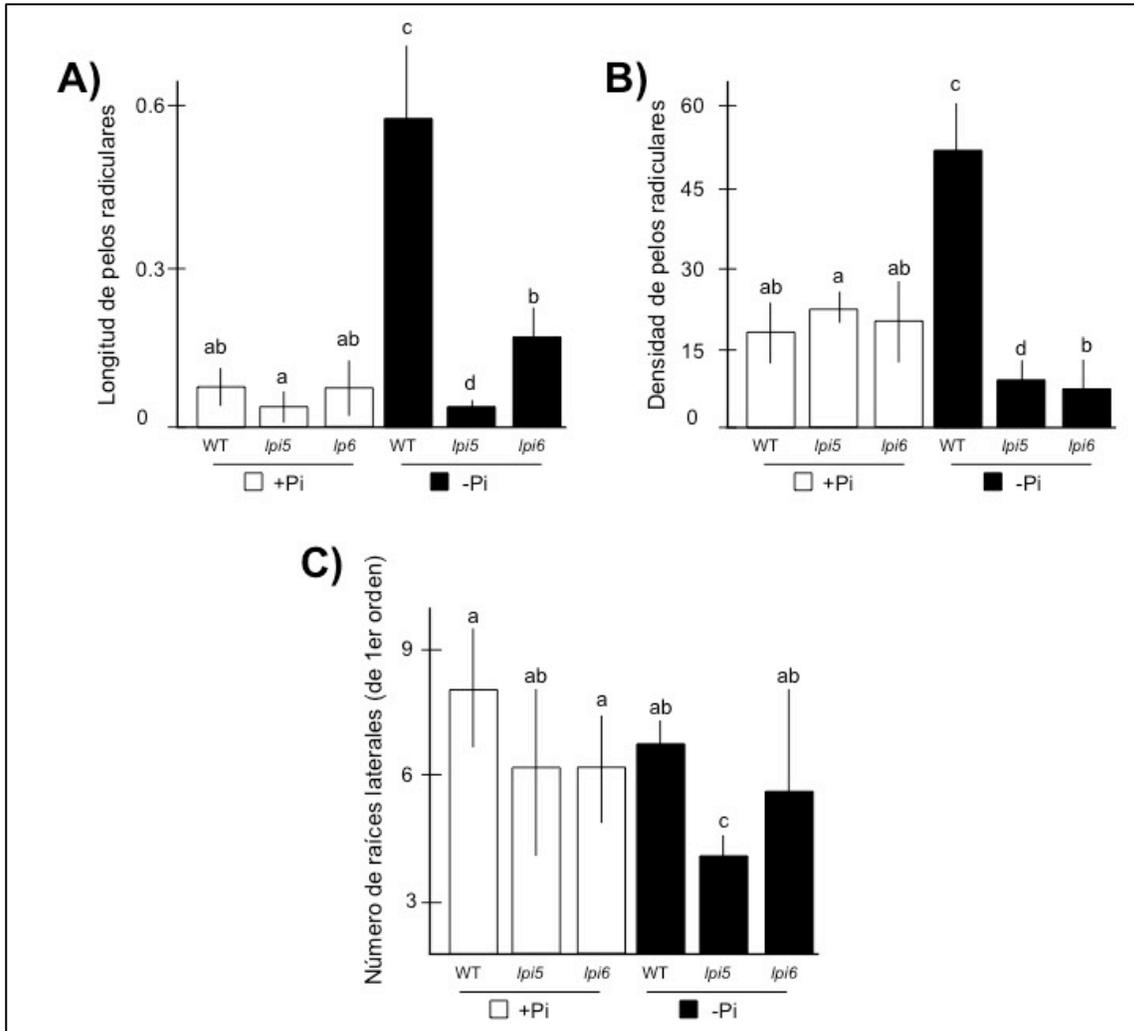


Figura 22. Defectos en la respuesta morfológica del sistema radicular de las mutantes *lpi5* y *lpi6* ante la carencia de Pi. **A)** Longitud de los pelos radicular, dentro del tercer milímetro a partir de la punta de la raíz principal (pelos completamente desarrollados en la WT), en plántulas WT, *lpi5* y *lpi6* de 10 días después de germinar en suficiencia (+Pi) y carencia de Pi (-Pi). Las letras diferentes muestran las diferencias estadísticamente significativas (considerando un error menor al 1%). **B)** Densidad de pelos radiculares dentro del tercer milímetro a partir de la punta de la raíz principal (pelos completamente desarrollados), en plántulas WT, *lpi5* y *lpi6* de 10 días después de germinar en +Pi y -Pi. Las letras diferentes muestran las diferencias estadísticamente significativas (P-value <.05), **C)** Número de raíces laterales de primer orden (que emergen de la raíz principal) en plántulas WT, *lpi5* y *lpi6*, de 10ddg en +Pi y -Pi. Las letras diferentes muestran las diferencias estadísticamente significativas (P-value <.05).

Para conocer el genotipo de las mutantes *lpi5* y *lpi6* se analizó el fenotipo de plántulas crecidas en carencia de Pi, de las generaciones *F1* y *F2* obtenido de las cruza entre *lpi5* x Col-0 y *lpi6* x Col-0. En la generación *F1* sólo se observó el fenotipo silvestre (de raíz corta). Con respecto a la generación *F2* se determinaron frecuencias de segregación fenotípica 3:1 (3 de raíz corta por una de raíz larga), demostrando que *lpi5* y *lpi6* son mutantes recesivos, cuyo fenotipo mutante es producto de la alteración en un solo gen, respectivamente (Tabla 3).

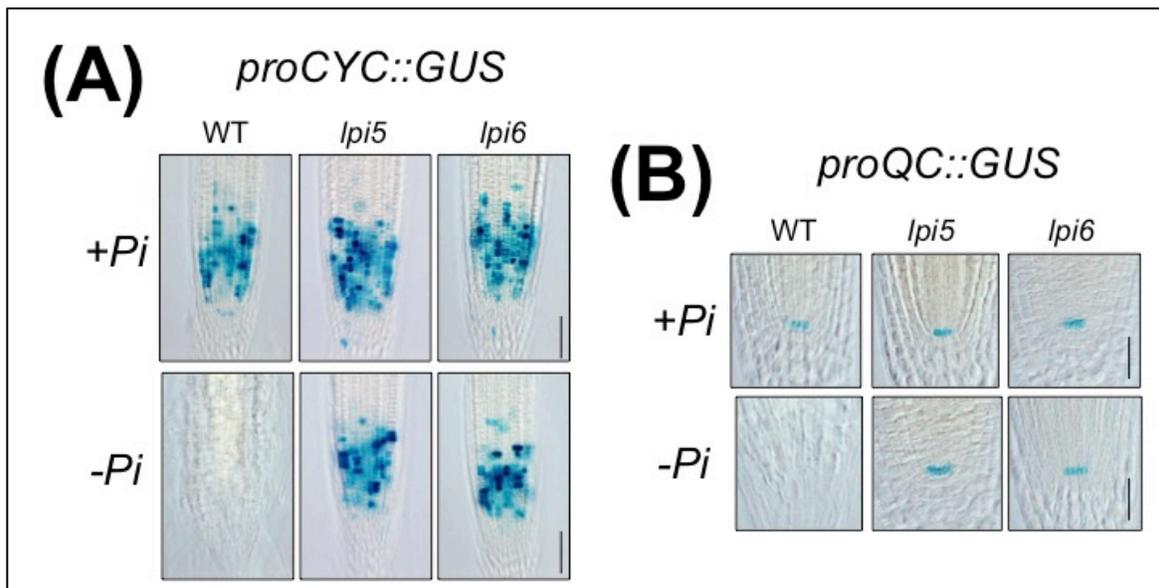


Figura 23. **Expresión reportera de las líneas *proCycB1::GUS* y *proQC46::GUS* en meristemo radicular de plántulas WT, *lpi5* y *lpi6*.** (A) Tinciones histoquímicas de GUS de la línea reportera de ciclo celular *proCYC::GUS* en meristemo radicular de plántulas de 10 días después de germinar (ddg) en presencia (+Pi) y carencia de fósforo (-Pi). (B) Tinciones histoquímicas de GUS de la línea reportera de identidad de centro quiescente *proQC::GUS* en meristemo radicular de plántulas de 10ddg en +Pi y -Pi. La barra de escala representó 100 micras.

Tabla 3. **Genotipo de las mutantes *lpi5* y *lpi6***. Frecuencias de segregación fenotípica de las generaciones *F1* y *F2*, obtenidas de las cruzas entre *lpi5* x Col-0 y *lpi6* x Col-0, respectivamente. El fenotipo WT (raíz corta) y mutante (Mut) refiere a lo observado en plántulas de 10 días después de germinar en condiciones de carencia de fósforo.

Frecuencias de segregación					
	Fenotipos <i>F1</i>	Fenotipos <i>F2</i>	Frecuencias obtenidas <i>F2</i>	Frecuencias calculadas <i>F2</i>	
	WT / Mut	WT / Mut	WT / Mut	WT / Mut	X <sup>2</sup> *
<i>lpi5</i> x Col-0	179 / 0	490 / 170	2.97 : 1.03	3 : 1	0.2
<i>lpi6</i> x Col-0	148 / 0	577 / 182	3.04 : 0.96	3 : 1	0.42

\*Con un grado de libertad y un valor crítico de 5% (error), se acepta la hipótesis de una relación 3:1 (W : Mut), si la X<sup>2</sup> (ji cuadrada) es más pequeña que el valor 3.841.

En un inicio las mutantes *lpi5* y *lpi6* también fueron elegidas por que presentaron inhibida la expresión del reportero sistémico *pro790::GUS-GFP* ante la carencia de Pi. Sin embargo, los análisis cuantitativos (ensayos de fluorométricos) de validación no mostraron diferencias significativas entre la expresión del marcador en la WT y las mutantes *lpi5* y *lpi6* (brote y raíz) (Fig24A). Esto sugiere que las mutantes *lpi5* y *lpi6* mantienen estable la respuesta sistémica a la carencia de Pi. Sin embargo, las tinciones histoquímicas de GUS, revelaron que la mutante *lpi5* inhibe la expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP*, particularmente en la punta de la raíz principal ante la carencia de Pi (Fig24A y Fig24B).

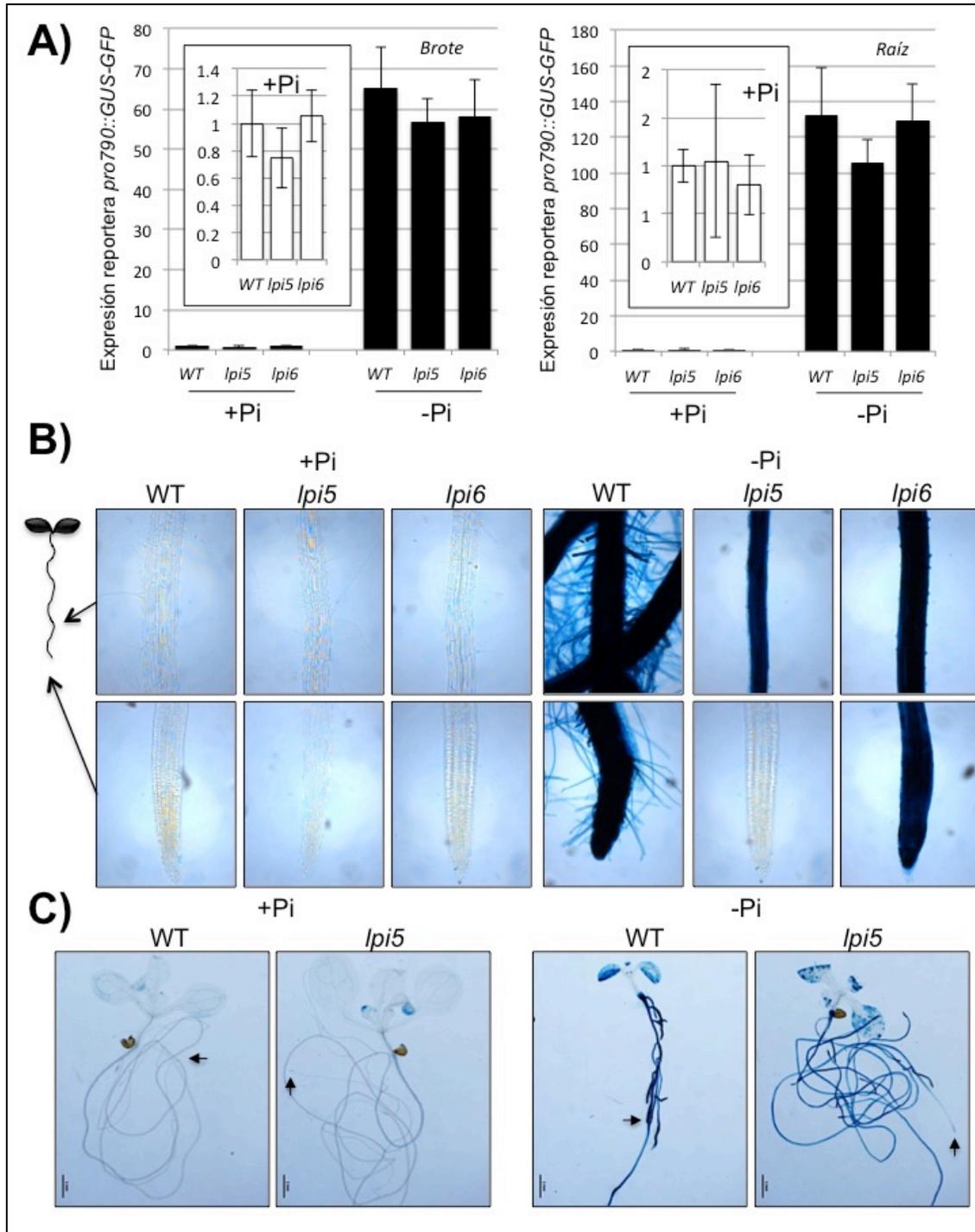


Figura 24. **Expresión reportera del marcador de respuesta sistémica *pro790::GUS-GFP* en el fondo mutante *lpi5* y *lpi6*.** (A) Análisis cuantitativo (ensayos fluorométricos de GUS) de la expresión reportera del marcador de respuesta sistémica *pro790::GUS-GFP* en plántulas WT, y mutantes *lpi5* y *lpi6*, de 10 días después de germinar en condiciones de suficiencia (+Pi) y carencia de Pi (-Pi). En las gráficas se muestra magnificada la expresión determinada en suficiencia nutricional. (B) Tinciones histoquímicas de GUS que muestran la expresión reportera del marcador de respuesta sistémico *pro790::GUS-GFP* en raíz principal de plántulas WT y mutantes *lpi5* y *lpi6* de 10ddg en +Pi (panel superior) y -Pi (panel inferior). (C) Tinciones histoquímicas de GUS que

muestran la expresión del marcador *p790::GUS-GFP* en plántulas WT y *lpi5*, de 10ddg en +Pi y -Pi. Las flechas negras apuntan hacia la punta de la raíz principal.

## Capítulo 4

---

### *lpi5* y *lpi6* presentan mutaciones en el factor de transcripción *STOP1* y en el transportador de malato *ALMT1*, respectivamente.

Para conocer la identidad de los genes mutantes (mutagenizados con EMS) responsables de los fenotipos *lpi5* y *lpi6*, se utilizó la estrategia de mapeo genético por secuenciación basada en el método MutMap<sup>151,154–156</sup>, previamente reportado. La estrategia del mapeo genético se centró en identificar genes con variantes homocigotas (por ejemplo SNPs, deleciones e inserciones) dentro de los genomas mutantes (*lpi5* y *lpi6*) y ausentes en el genoma de referencia WT. Como resultado se identificaron 12 y 18 genes mutantes potencialmente responsables de los fenotipos *lpi5* y *lpi6*, respectivamente (dato no mostrado). El análisis de genotipado de *lpi5* y *lpi6* sugirió que ambas mutantes son el resultado de la alteración en un sólo gen (Tabla 2). Para reducir el número de genes candidatos, el trabajo se concentró en aquellos previamente relacionados con el desarrollo de la raíz y la respuesta a estrés abiótico en plantas. Entre los genes candidatos se encontró a *STOP1* (*SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1*) y a *ALMT1* (*ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER*) en *lpi5* y *lpi6* respectivamente, genes previamente relacionados con la excreción de malato al medio a través de la raíz, y protección contra la toxicidad por Al<sup>+3</sup> en plantas.

El mapeo por secuenciación de *lpi5* reveló una sustitución de base C:T (CAT:TAT) en la base +84 dentro del gen *STOP1* (*At1g34370*) (Fig25A). El análisis de predicción *in silico* mostró que la mutación C:T en *lpi5* causó una sustitución de aminoácido (H168Y; H=Histidina y Y=Tirosina), que reemplaza una de los dos residuos de histidina cruciales para la formación del primer dedo de zinc, indispensable para la interacción de *STOP1* con el promotor de sus genes blancos (entre ellos *ALMT1*) (Fig25B). El mapeo por secuenciación de la mutante

*lpi6* reveló una deleción de 13 bases, a partir de la base +757 dentro del primer exón del gen *ALMT1* (*At1g08430*) (Fig25C). El análisis de predicción *in silico* mostró que la deleción de las 13 bases modifica el marco de lectura y provoca un codón de paro prematuro, dando lugar a la síntesis de una proteína aberrante con 272 aminoácidos menos en dirección del carboxilo terminal (Fig25D).

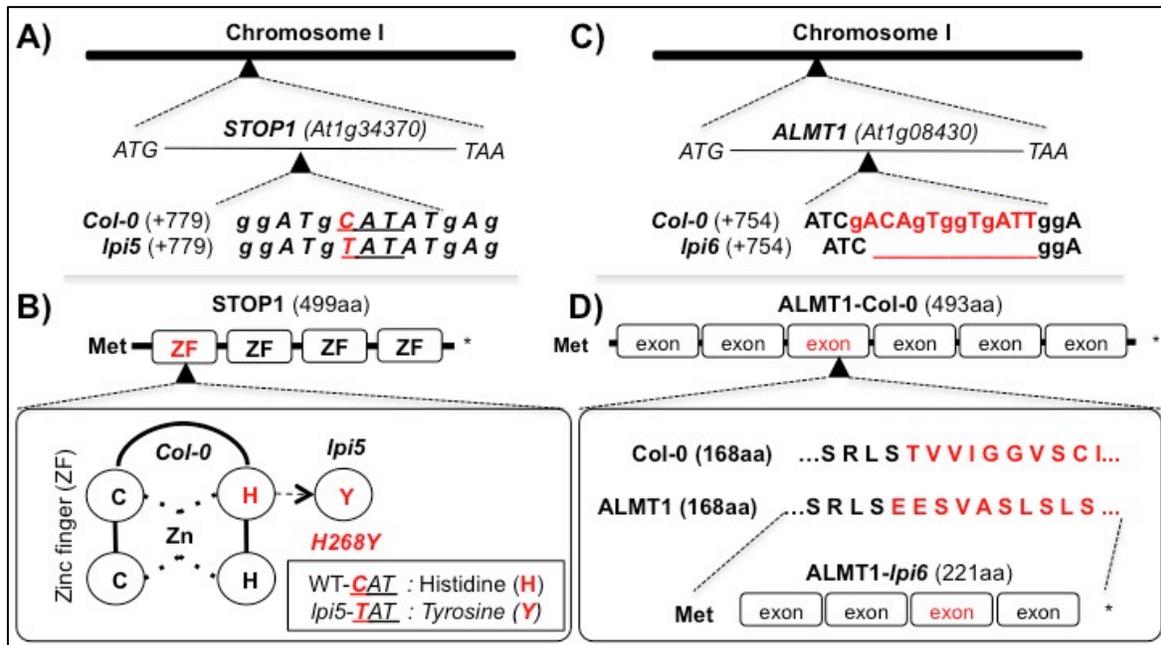


Figura 25. Análisis *in silico* del mapeo por secuenciación de las mutantes *lpi5* y *lpi6*. (A) Sustitución C:T (CAT:TAT) en la base +784 dentro de gen *STOP1* (*At1g34370*) en el genoma *lpi5*. (B) La mutación en *STOP1* causó una sustitución de aminoácido H168Y, que reemplaza uno de los dos residuos de histidina dentro del primero de los cuatro dedos de zinc del factor de transcripción. (C) Deleción de 13 bases en la posición +757 dentro del primer exón del gen *ALMT1* (*At1g08430*) en el genoma *lpi6*. (D) La deleción de las 13 bases en *ALMT1* originó un codo de paro prematuro que da lugar a la síntesis de una proteína aberrante con 272 residuos de aminoácido menos que la WT. (Créditos de la figura compartidos con Fernández-Cortéz A.).

Para confirmar las mutaciones identificadas en los genes *stop1* y *almt1*, dentro de los genomas mutantes *lpi5* y *lpi6*, respectivamente (a través del mapeo por secuenciación), se resecuenció (por Sanger) un fragmento de la región donde se identificaron dichas mutaciones. En ambos casos se encontraron las mutaciones previamente identificadas, una sustitución C:T en la base +784 dentro

de *STOP1*, y una delección de 13 bases en la posición +757 dentro de *ALMT1* (Fig26).

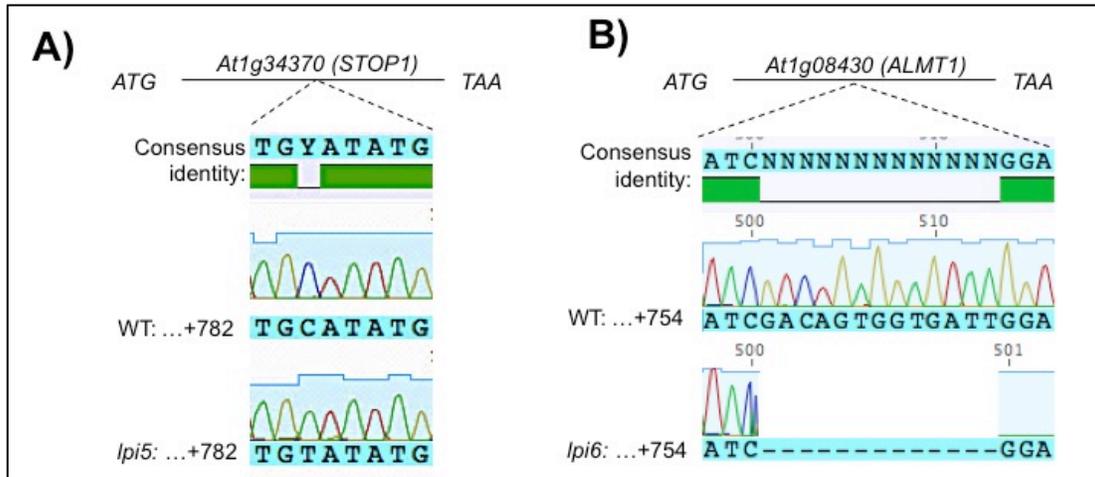


Figura 26. **Electroferogramas de validación para las mutaciones en *stop1* (*lpi5*) y *almt1* (*lpi6*).** **A)** Electroferograma de la base +787 a la +789 del gen *At1g34370* (*STOP1*) de una plántula WT (accesión línea hermana de donde se secuenció el genoma de Arabidopsis depositado en TAIR), y una plántula mutantes *lpi5*. En la secuencia de la mutante *lpi5* se muestra una sustitución de base C:T, en la posición +784 del gen *STOP1*. **B)** Electroferograma de la base +754 a la +772, o +759 del gen *At1g08430* (*ALMT1*) de la plántula WT y la plántula mutante *lpi6*, respectivamente. En la secuencia de la mutante *lpi6* se muestra la delección de 13 bases, a partir de la posición +757 dentro del gen *ALMT1*. Los electroferogramas fueron obtenidos mediante secuenciación por Sanger. Y: timina o cisteína. N: desconocido.

Para saber si *lpi5* y *lpi6* eran alelos mutantes de *STOP1* y *ALMT1* respectivamente, se comparó su crecimiento longitudinal de la raíz principal con el de las líneas insercionales SALK *stop1* y *almt1* (con pérdida de función), previamente descritas<sup>157,158,159</sup>. *STOP1* codifica para un factor de transcripción, que además de conferir resistencia a la toxicidad por Al<sup>+3</sup> (a través de la inducción transcripcional de *ALMT1*), protege a la raíz contra la acidez del suelo. Como lo muestra el fenotipo mutante hipersensible *stop1* que inhiben drásticamente el crecimiento longitudinal de la raíz principal en comparación la WT ante condiciones de pH ácido en el medio<sup>159-163</sup>. Diez días después de germinar en condiciones de pH ácido, *lpi5* al igual que *stop1* inhibieron con mayor intensidad el crecimiento de la raíz principal en comparación con la WT, ya que en promedio

sólo alcanzaron el 25% de la longitud total de la raíz principal mostrada por WT (Fig27A y Fig27B). También se analizó el efecto del pH ácido en el crecimiento longitudinal de la raíz en las mutantes *lpi6* y *almt1*, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con la WT (Fig27A y Fig27B). *ALMT1* conduce hasta el 90% del malato excretado a través de la raíz en plántulas de *Arabidopsis* ante la toxicidad por  $Al^{+3}$  <sup>164</sup>. Se ha propuesto que el malato, a través de su efecto quelante induce la agregación de los iones de  $Al^{+3}$  en el medio, lo cual los hace indisponibles para planta protegiéndola de la intoxicación. Como lo sugiere el fenotipo mutante hipersensible *almt1* que reduce con mayor intensidad la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en comparación con la WT ante la toxicidad por  $Al^{+3}$  (20% más cortas) (Fig27A y Fig27B). También se analizó el efecto de la carencia de Pi, en el desarrollo de las mutantes insercionales *Salk stop1* y *almt1*. En ambos casos se mantuvo el crecimiento longitudinal de la raíz principal, similar a lo mostrado por las mutantes *lpi5* y *lpi6* respectivamente, ya que alcanzaron en promedio una longitud 7 y 8 veces superior a lo mostrado por la WT en carencia de Pi, respectivamente. La mutante *stop1*, al igual que *lpi5*, mostró en promedio una longitud 15% menor a lo alcanzada por la WT, *lpi6* y *almt1* (Fig27A y Fig27B).

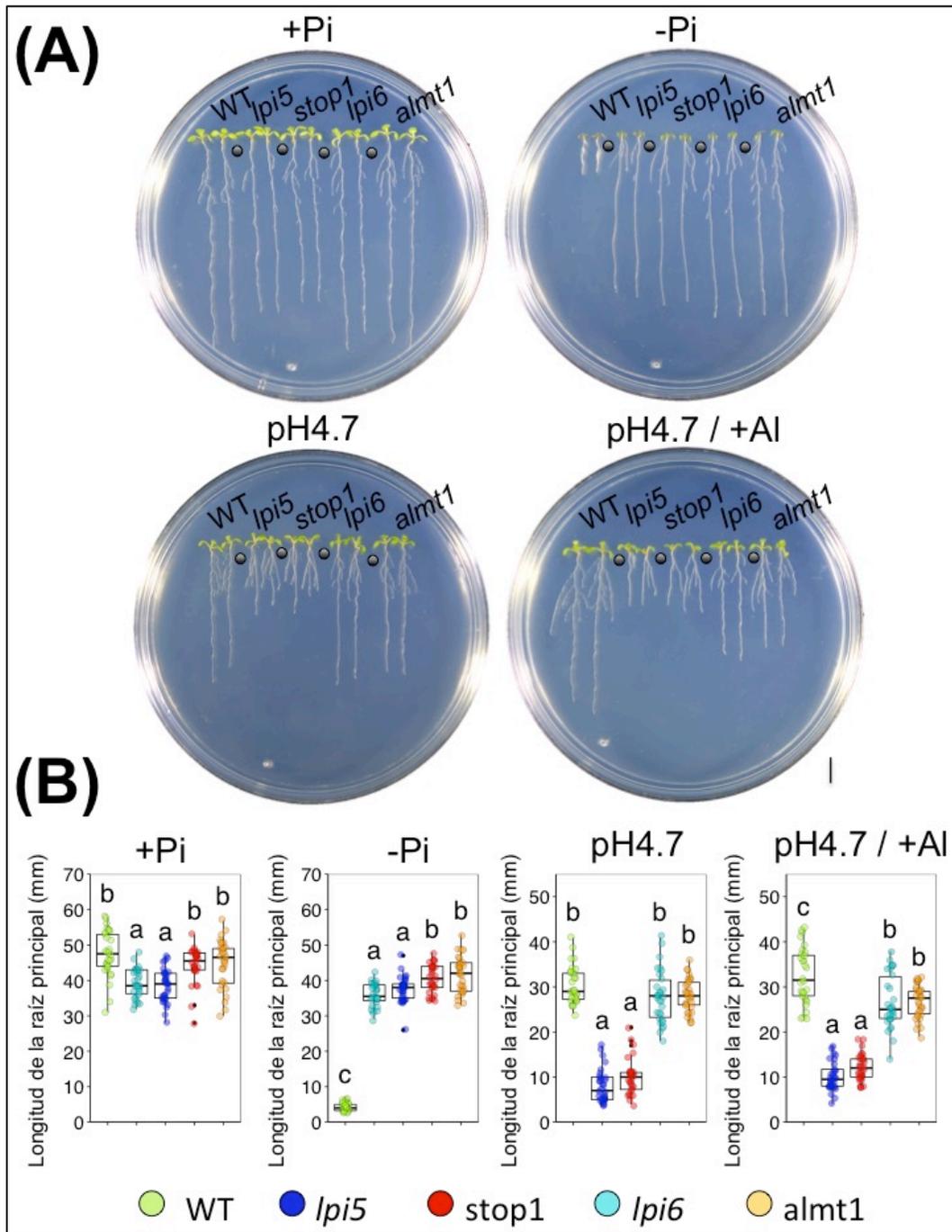


Figura 27. Análisis comparativo entre los fenotipos de las mutantes químicas *lpi5* y *lpi6* y las líneas insercionales Salk *stop1* y *almt1*, respectivamente. **A)** Fenotipo de plántulas de 10 días después de germinar (ddg) en presencia de fósforo (+Pi), carencia de fósforo (-Pi), pH ácido (pH4.7) y toxicidad por aluminio ( $Al^{+3}$  2mM). **B)** Longitud de la raíz principal de plántulas de 10 días después de germinar (ddg) en +Pi y -Pi, pH ácido (pH4.7) y toxicidad por aluminio ( $Al^{+3}$ ). Los puntos de colores representan a los 30 individuos WT, *lpi5*, *stop1*, *lpi6* y *almt1* analizados de tres experimentos independientes. Los grupos estadísticos fueron determinados a través de la prueba Tukey HSD (P-value <.05) y son indicados con letras diferentes. (Créditos de la figura compartidos con Chávez-Calvillo G y Ojeda-Rivera J.O.).

Finalmente se analizó el fenotipo de las plántulas de la generación *F1* obtenidas de las cruzas entre *lpi5 x stop1* y *lpi6 x almt1*. En ambos casos sólo se observaron fenotipos mutantes, plántulas que mantuvieron el crecimiento longitudinal de la raíz principal en condiciones limitantes de Pi (Tabla 4), lo que confirmó que *lpi5* y *lpi6* son mutantes alélicas de *STOP1* y *ALMT1*, respectivamente.

Tabla 4. **Análisis alélico entre las mutantes químicas *lpi5* y *lpi6*, y las líneas insercionales *Salk stop1* y *almt1*, respectivamente.** Análisis de las frecuencias de segregación fenotípica (ji cuadrada) de plántulas *F1* (de 10 días después de germinar ante condiciones de carencia de Pi), obtenidas de las cruzas entre *stop1 x lpi5* y *almt1 x lpi6*.

<i>Frecuencias de segregación en la generación F1</i>		
<i>Fenotipos de plántulas de 10ddg en carencia de Pi</i>		
	<i>Wt</i> <i>(raíz corta)</i>	<i>Mutante</i> <i>(raíz larga)</i>
<i>stop1 x lpi5:</i>	0	120
<i>almt1 x lpi6:</i>	0	82

### *STOP1* induce transcripcionalmente la expresión de *ALMT1* en respuesta a la baja disponibilidad de Pi, antes de la diferenciación del meristemo radicular.

En *Arabidopsis* *STOP1* es constitutivamente expresado en la punta de la raíz principal, e induce transcripcionalmente la expresión de *ALMT1* en respuesta a la toxicidad por  $Al^{+3}$  <sup>159</sup>. Considerando que el crecimiento longitudinal de la raíz es un procesos vinculado con el mantenimiento y funcionalidad del meristemo radicular, y con el objetivo de conocer los patrones de expresión de *STOP1* y *ALMT1* en respuesta a la baja disponibilidad de Pi, se analizó su actividad transcripcional (mediante qRT-PCRs) en puntas de la raíz principal (meristemos) de plántulas de cinco días después de germinar en condiciones de suficiencia y carencia de Pi (momento en que se detuvo el crecimiento longitudinal de la raíz principal en la WT). *STOP1* fue constitutivamente expresado con la misma intensidad independientemente de la disponibilidad de Pi el medio (Fig28A). Por su parte, *ALMT1* también fue constitutivamente expresado, mostrando expresión basal en presencia de Pi, pero a diferencia de *STOP1*, *ALMT1* fue hasta cuatro veces inducido en respuesta a la carencia de Pi (Fig28B). También se analizó la expresión de *ALMT1* en el fondo mutante *stop1*, pero no se detectó expresión ni en presencia ni en carencia de Pi (Fig28C).

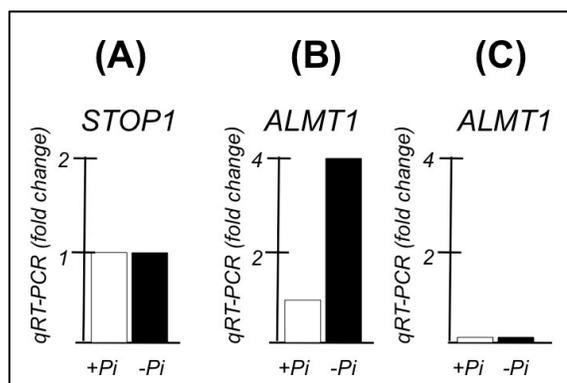


Figura 28. Análisis transcripcional (qRT-PCR) de la expresión de *STOP1* y *ALMT1* en punta de la raíz principal de plántulas WT de *Arabidopsis*. **A)** Expresión de *STOP1* en plántulas WT de cinco días después de germinar (ddg) en presencia (+Pi) y carencia de fósforo (-Pi). **B)** Expresión de *ALMT1* en plántulas WT de 5ddg en +Pi y -Pi. **C)** Expresión de *ALMT1* en plántulas mutantes *stop1* de 5ddg +Pi y -Pi. (Créditos de la figura compartidos con Chávez-Calvillo G.).

Para conocer la localización celular de la expresión de *STOP1* y *ALMT1*, se generaron y utilizaron las líneas reporteras *proSTOP1::GUS-GFP* y *proALMT1::GUS-GFP*, y se analizó su expresión en meristemo radicular de plántulas WT de cinco días después de germinar (ddg) en presencia y carencia de Pi. A través de microscopía confocal se detectó expresión de la línea *proSTOP1::GUS-GFP* (GFP) en células de la epidermis, cofia, columela y centro quiescente (QC) dentro del meristemo radicular, de forma similar e independientemente de la disponibilidad de Pi en el medio (Fig29A). La línea *proALMT1::GUS-GFP* sólo se detectó ante condiciones de carencia de Pi, localizándose en células de la vasculatura, periciclo, córtex, endodermis, columela cofia y, dentro del nicho quiescente en células iniciales del córtex, estela y en QC) (Fig29B).

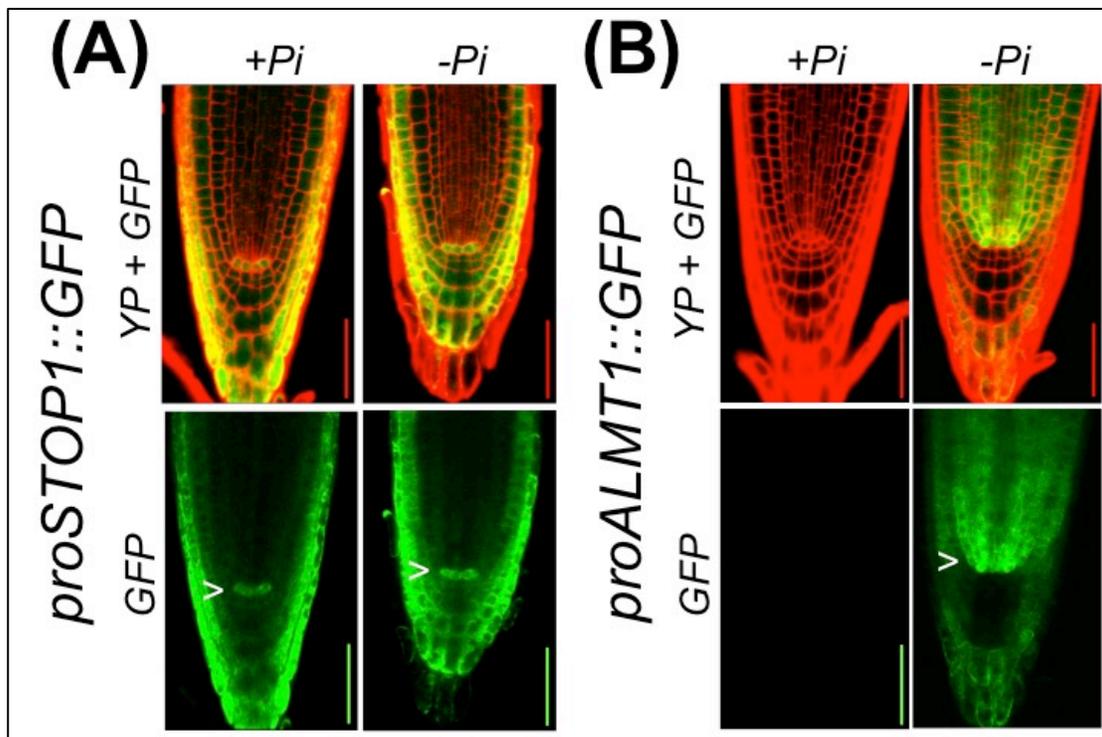


Figura 29. Análisis de la expresión transcripcional de las líneas reporteras *proSTOP1::GUS-GFP* y *proALMT1::GUS-GFP* en meristemo radicular de la raíz principal de plántulas WT de *Arabidopsis*. **A**) Expresión reportera de la línea *proSTOP1::GUS-GFP* (promotor del gen *STOP1* funcionado a la proteína verde fluorescente GFP), en presencia (+Pi) y carencia de fósforo (-Pi). **B**) Expresión reportera de la línea *proALMT1::GUS-GFP* (promotor del gen *ALMT1* funcionado a la proteína verde fluorescente GFP) en +Pi y -Pi. La barra de escala representa 100micras. YP= yoduro de propidio (color rojo), que muestra la estructura celular del meristemo radicular. (Créditos de la figura compartidos con Ojeda-Rivera J. O. y Oropeza-Aburto A.).

### *La aplicación exógena de malato restablece la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en stop1 y almt1 ante la baja disponibilidad de fósforo.*

*STOP1* y *ALMT1* actúan como modulo funcional que media la excreción de malato a través de la raíz en Arabidopsis, en respuesta a la toxicidad por  $Al^{+3}$  <sup>105,113,114</sup>. Para saber si la excreción de malato al medio controlaba la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal ante la carencia de Pi, se analizó el efecto de complementación con malato (malato adicionado al medio nutritivo) en el crecimiento de plántulas WT y las mutantes *stop1* y *almt1*, crecidas durante 10 días después de germinar (10ddg). Se utilizaron tres concentraciones de malato 0.1, 0.5 y 1mM. La complementación con malato inhibió el crecimiento de la raíz en ambas mutantes *stop1* y *almt1*, proporcionalmente a medida que aumentó la concentración de malato en el medio (Fig30A). En la concentración más alta de malato (1mM), *almt1* inhibió el crecimiento de las raíces de forma similar a la WT en carencia de Pi (Fig30-A,B). Aunque la complementación con malato también inhibió el crecimiento de la raíz en *stop1* ante la carencia de Pi, esta sólo fue parcial, ya que ante la concentración más alta de malato, la longitud de la raíz principal fue hasta tres veces superior a la WT y *almt1* (Fig30A y Fig30B). También se analizó el efecto del malato en suficiencia de Pi, pero no se observaron cambios significativos que comprometieran el crecimiento longitudinal de las raíces, ni en la WT ni en las mutantes *stop1* y *almt1* (Fig33).

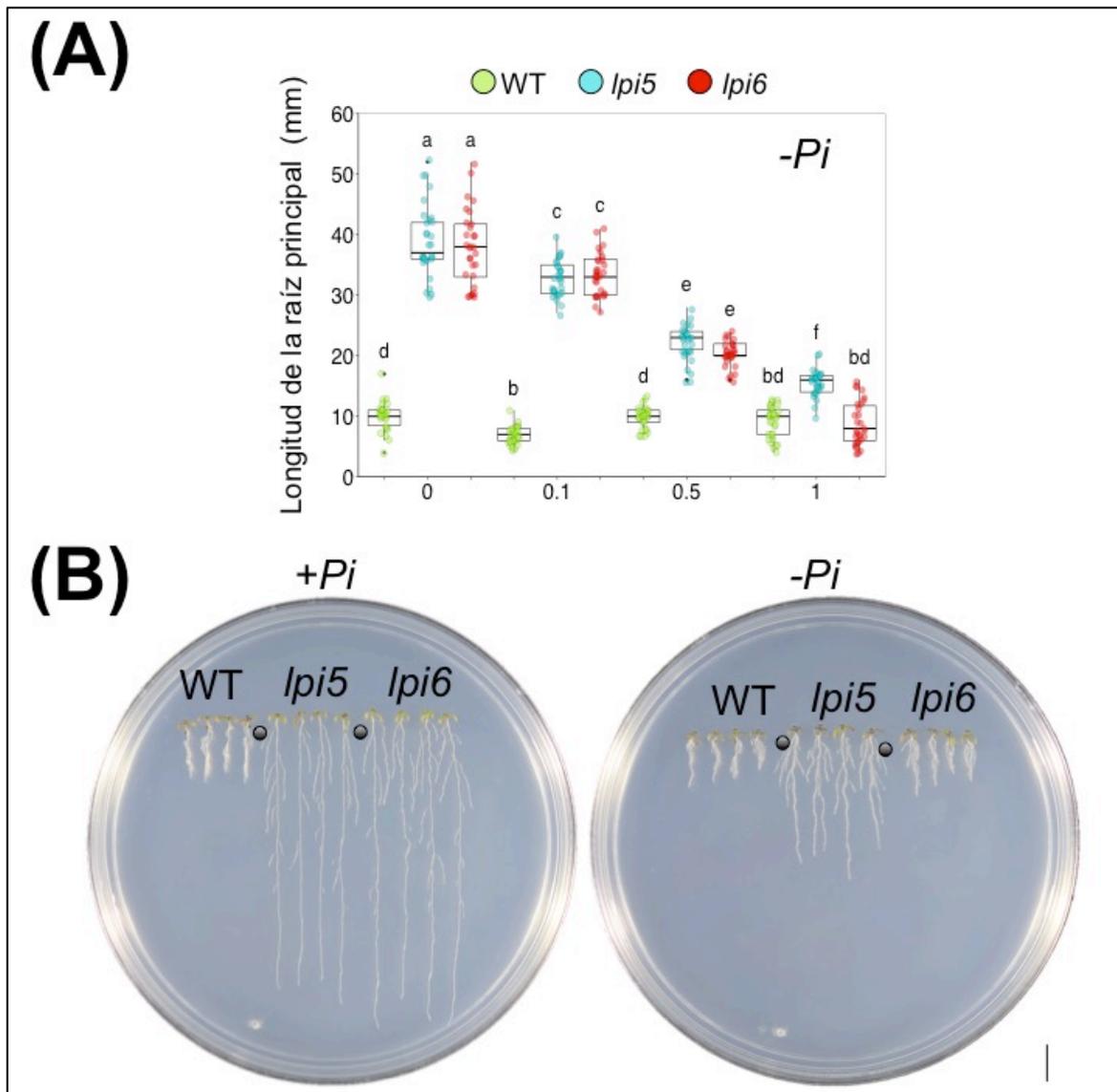


Figura 30. **Efecto del tratamiento de complementación con malato en el desarrollo de la raíz de plántulas WT, y las mutantes *stop1* y *alm1* ante la carencia de fósforo.** **A)** Longitud de la raíz principal de plántulas de 10 días después de germinar (ddg) en carencia de Pi, sin tratar y tratadas con 0.1, 0.5 y 1 mM de malato. En las gráficas los puntos verdes, azules y rojos representan a los individuos WT, *stop1* y *alm1* (n=30 individuos analizados de tres experimentos independientes), respectivamente. Los grupos estadísticos fueron determinados a través de la prueba de Tukey HSD (P-value <.05), y son indicados por letras diferentes. **B)** Fenotipo de plántulas de 10 (ddg) en carencia de fósforo (Pi), sin tratar, y tratadas con 1mM de malato. (Créditos de la figura compartidos con Chávez-Calvillo G. y Ojeda-Rivera J. O.).

También se analizó el efecto de la complementación con malato (1mM) en la estructura y funcionalidad celular del meristemo radicular de *stop1* y *almt1* ante la carencia de Pi. Para ello se realizaron tinciones histoquímicas de GUS de los marcadores de ciclo celular *proCYC::GUS* y de identidad del centro quiescente *proQC::GUS*, en plántulas de 10 días después de germinar. El tratamiento con malato inhibió por completo la expresión reportera de ambos marcadores en *almt1*, de forma similar a lo mostrado por la WT ante la carencia de Pi sin malato adicionado al medio (Fig31A y Fig31B). El tratamiento con malato en *stop1* sólo inhibió parcialmente la expresión reportera del marcador *proCYC::GUS* (menor número de células en mitosis), y mantuvo la expresión del reportero de ciclo celular *proQC::GUS* (Fig31A y Fig31B).

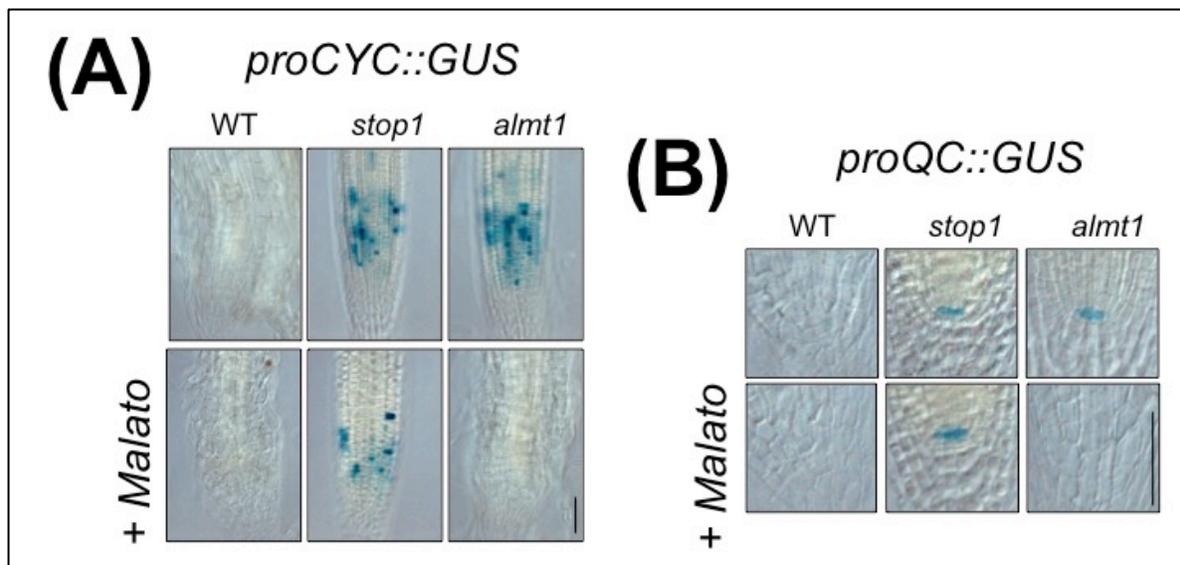


Figura 31. Efecto de la complementación con malato en la expresión de las líneas reporteras *proCycB1::GUS* y *pro46QC::GUS* en meristemo de la raíz principal de plántulas WT, *stop1* y *almt1*. **A)** Tinciones histoquímicas de GUS del reportero de ciclo celular *proCYC::GUS* en plántulas de 10 días después de germinar (ddg) en carencia de fósforo (-Pi), sin tratar y tratadas con 1mM de malato. **B)** Tinciones histoquímicas de GUS del reportero de identidad del centro quiescente *proQC::GUS* en plántulas de 10ddg en -Pi, sin tratar y tratadas con 1mM de malato. La barra de escala representa 100 micras.

### La aplicación exógena malato induce la acumulación apoplástica de Fe<sup>+3</sup> en meristemo radicular de *stop1* y *almt1* ante la carencia de fósforo.

Se sabe que la disponibilidad de hierro (Fe) en el medio determina la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en respuesta a la carencia de Pi en Arabidopsis<sup>77</sup>. Durante la etapa experimental de este trabajo Muller y Colaboradores (2015) propusieron un mecanismo en donde la acumulación apoplástica de Fe y su capacidad de óxido-reducción, induce la diferenciación celular del QC, lo cual en consecuencia desencadena el agotamiento meristemático<sup>96</sup>. Considerando que el malato es un quelante natural de Fe capaz de inhibir el crecimiento longitudinal de la raíz en *stop1* y *almt1* ante la carencia de Pi, se decidió analizar la relación entre el malato y el Fe, con los procesos que inhiben el crecimiento longitudinal de la raíz principal en respuesta a la baja disponibilidad de Pi. Lo primero fue validar el efecto de la disponibilidad de Fe en la inhibición del crecimiento de la raíz en carencia de Pi. Para ello se analizó el crecimiento de plántulas WT (y las mutantes *stop1* y *almt1*) en condiciones de carencia de Pi. Como se esperaba, la baja disponibilidad de Fe en el medio evitó la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en plántulas WT, de forma indeterminada hasta el final del experimento (10ddg), de forma similar a lo mostrado por *stop1* y *almt1* (Fig32).

Para saber si el efecto del malato en la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en *stop1* y *almt1*, dependía de la disponibilidad de Fe en el medio, se analizó el crecimiento de plántulas WT, *stop1* y *almt1* en carencia de Pi, complementadas con malato pero ante condiciones de baja disponibilidad de Fe. El tratamiento con malato no inhibió el crecimiento de la raíz, ni en la WT ni en las mutantes (Fig33). En todos los casos se observaron longitudes de la raíz principal de forma similar a las observadas en plántulas crecidas en carencia de Pi y Fe, sin la adición de malato al medio (Fig32).

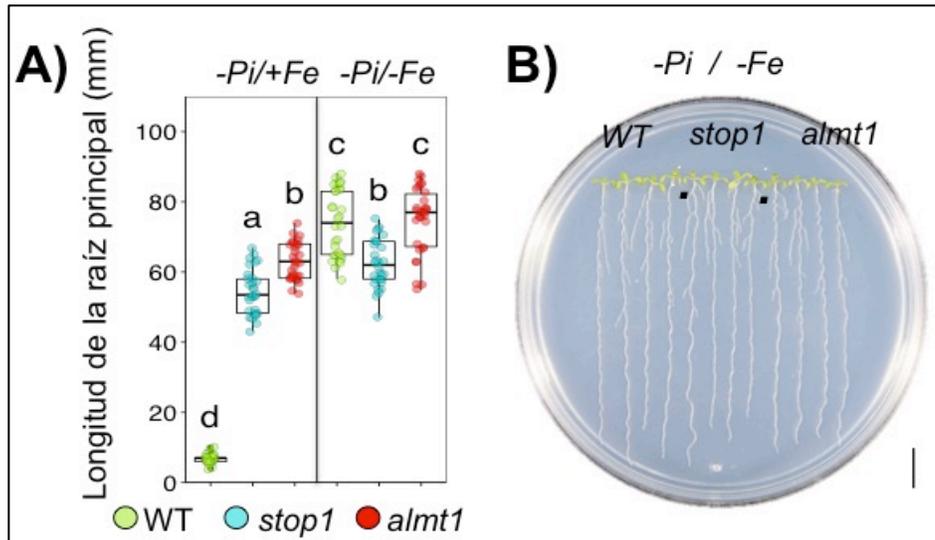


Figura 32. Efecto de la baja disponibilidad de hierro en el crecimiento longitudinal de la raíz principal de *Arabidopsis* ante la carencia de Pi. **A)** Gráfica que muestra el crecimiento longitudinal de la raíz principal en plántulas WT, *stop1* y *almt1* de 10 días después de germinar en carencia de Pi. Los puntos de color verde, azul y rojo representan a los individuos WT, *stop1* y *almt1* (n=30 individuos analizados de tres experimentos independientes), respectivamente. Los grupos estadísticos fueron determinados a través de la prueba de Tukey HSD (P-value <.05), y son indicados por letras diferentes. **B)** Fenotipo de plántulas WT, *stop1* y *almt1* de 10ddg en +Pi y -Pi. (Créditos de la figura compartidos con Chávez-Calvillo G. y Ojeda-Rivera J. O.).

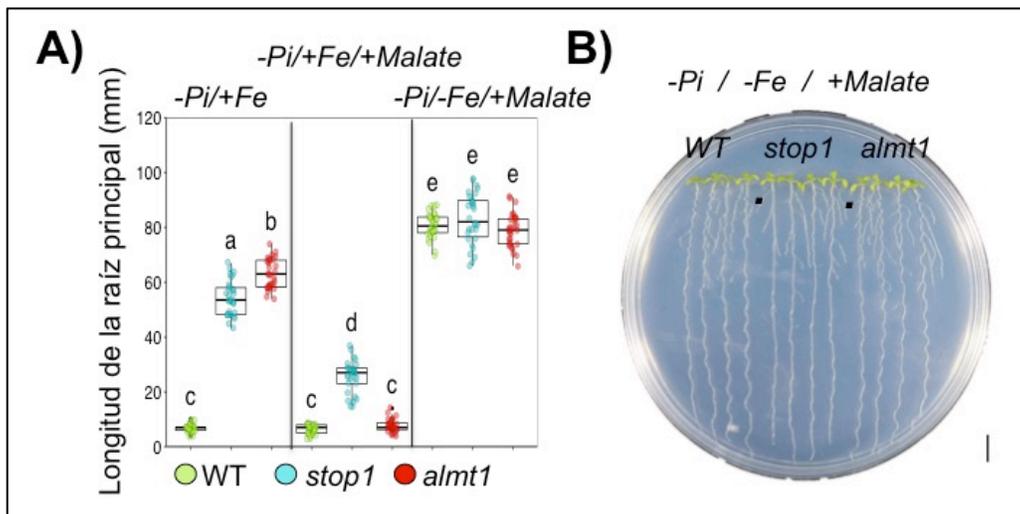


Figura 33. Efecto del tratamiento de complementación con malato en el crecimiento longitudinal de la raíz principal de *Arabidopsis* ante la carencia de Pi, pero ante baja disponibilidad de hierro. **A)** Longitud de la raíz principal de plántulas WT, *stop1* y *almt1*, de 10 días después de germinar en carencia de Pi en suficiencia de hierro (-Pi/+Fe), carencia de Pi en suficiencia de Fe complementado con 1mM de malato (-Pi/+Fe/+malato), y carencia de Pi, complementado con 1mM de malato, pero en carencia de Fe (-Pi/-Fe/+malato). Los puntos de colores verde, azul y rojo representan a los individuos WT, *stop1* y *almt1* (n=30 individuos analizados de tres experimentos independientes), respectivamente. Los grupos estadísticos fueron determinados a través de la prueba de Tukey HSD (P-value <.05), y son indicados por letras diferentes. **B)** Fenotipo de plántulas WT, *stop1* y *almt1* de 10ddg en carencia de Pi, complementadas con 1mM de malato, pero en baja disponibilidad de hierro (-Pi/-Fe/+Malato). (Créditos de la figura compartidos con Chávez-Calvillo G. y Ojeda-Rivera J. O.).

Con el objetivo de conocer si la presencia de malato en el medio inducía la acumulación apoplástica de  $\text{Fe}^{+3}$  en meristemo radicular de plántulas en carencia de Pi, se realizaron tinciones histoquímicas Perls-DAB (para visualizar iones de  $\text{Fe}^{+3}$ ) en plántulas WT, *stop1* y *almt1* de 5ddg (momento en el que se detiene el crecimiento longitudinal de la raíz principal en la WT ante la carencia de Pi, pero aún mantiene la identidad del meristemo radicular), sin complementar y complementadas con 1mM de malato. En carencia de Pi sin malato adicionado, como fue descrito previamente, la WT acumuló  $\text{Fe}^{+3}$  de forma ubicua en todo el meristemo radicular incluyendo alrededor de las células del centro quiescente (QC). *stop1* y *almt1* acumularon mucho menos  $\text{Fe}^{+3}$  que la WT (Fig34). La complementación con malato restableció la acumulación de  $\text{Fe}^{+3}$  en *stop1* y *almt1* (con menor intensidad en *stop1*), y estableció un patrón de acumulación mucho más definido en células del QC y sus alrededores (Fig34).

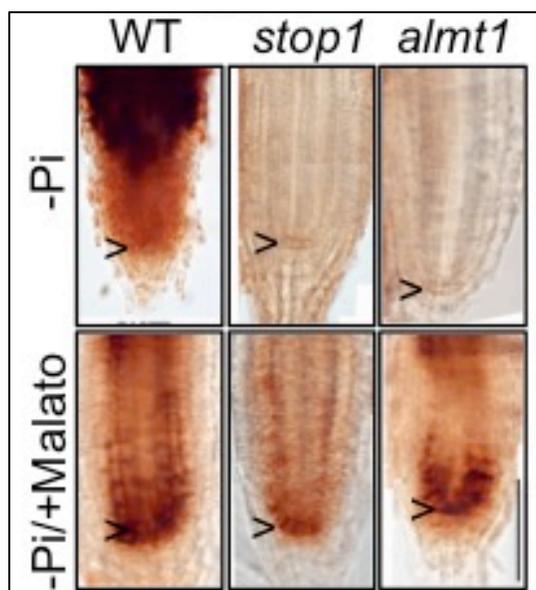


Figura 34. Efecto del malato en la acumulación de iones de  $\text{Fe}^{+3}$  en meristemo radicular de la raíz principal de plántulas WT, *stop1* y *almt1* en carencia de fósforo. Tinciones histoquímicas Perls-DAB (para visualizar iones de  $\text{Fe}^{+3}$ , color café) en meristemo radicular de la raíz principal de plántulas de 5 días después de germinar en carencia de fósforo (-Pi), sin tratar (panel superior) y tratadas con 1mM de malato (panel inferior). La barra de escala representa 100 micras. (Créditos de la figura compartidos con Gutiérrez-Alanís D.).

También se analizó el efecto del malato en el crecimiento longitudinal de la raíz principal de plántulas crecidas en suficiencia de Pi, sin embargo no se detectaron diferencias significativas que comprometieran el crecimiento longitudinal de la raíz principal, ni en la WT ni en las mutantes *stop1* y *almt1* (Fig35). Las tinciones histoquímicas Perls-DAB en plántulas crecidas en suficiencia de Pi, revelaron que al igual que la WT, *stop1* y *almt1* también acumulan hierro en meristemo radicular, inclusive alrededor de las células del QC. Aunque el tratamiento de complementación con malato aumento la intensidad con la que se acumular  $Fe^{+3}$  en el meristemo radicular ante la presencia de Pi, se mantuvo el crecimiento longitudinal de las raíces, tanto en la WT como en las mutantes *stop1* y *almt1* (Fig35).

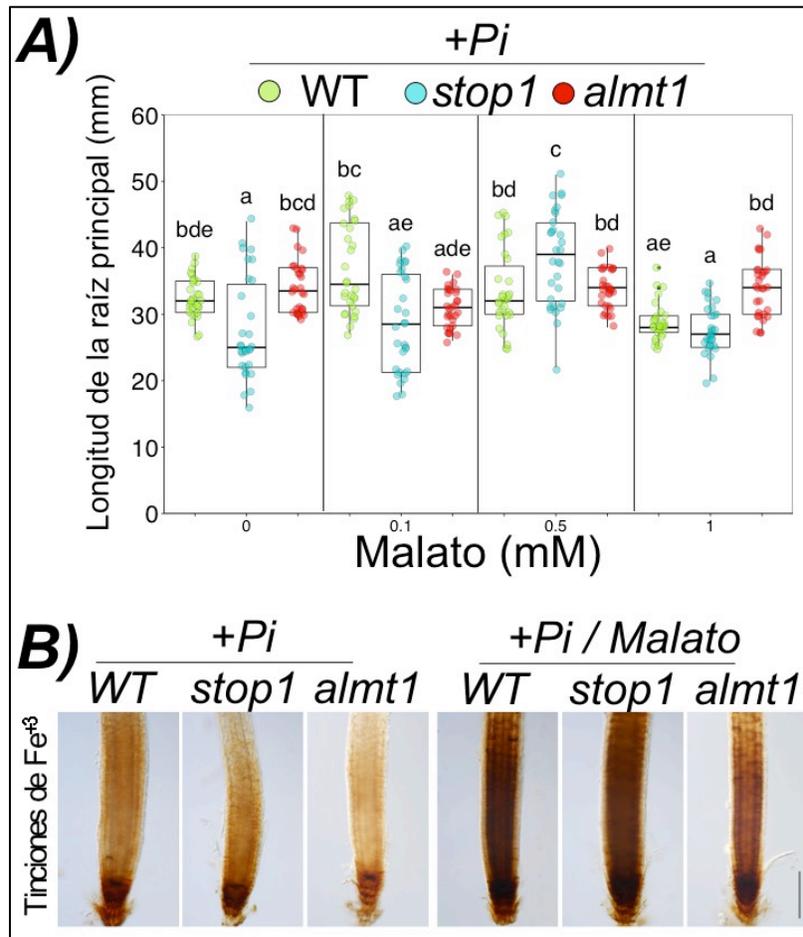


Figura 35. Efecto del tratamiento de complementación con malato en la acumulación de  $Fe^{+3}$  en meristemo radicular, y el crecimiento longitudinal de raíz principal de plántulas WT y las mutantes *lpi5* y *lpi6* en suficiencia de Pi. A) Longitud de la raíz principal de plántulas WT, *stop1* y *almt1*, de 10 días después de germinar en suficiencia de Pi, sin complementar y

complementadas con tres concentraciones de malato (0.1, 0.5 y 1mM de malato), independientemente. **B)** Tinciones histoquímicas Perls-DAB para visualizar iones de  $Fe^{+3}$  (color café) en meristemo radicular de plántulas WT, *stop1* y *almt1*, de 10ddg en +Pi, sin complementar y complementadas con 1mM de malato. (Créditos de la figura compartidos con Chávez-Calvillo G., Ojeda-Rivera J. O. y Raya-González J.).

*LPR1* (*LOW PHOSPHATE RESPONSE 1*, por su sigla en Inglés) es descrito como un gen que inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi. Se sabe que es constitutivamente expresado en células del QC y que codifica para una proteína exportada a la pared celular. Tomando en cuenta la capacidad catalítica de *LPR1* para oxidar  $Fe^{+2}$  y producir  $Fe^{+3}$  (determinada a través de ensayos enzimáticos con proteína recombinante), y considerando que *lpr1* falla en la acumulación de  $Fe^{+3}$  en meristemo radicular ante la carencia de Pi, se estableció que *LPR1* provee los iones de  $Fe^{+3}$  vinculados con el agotamiento meristemático de la raíz principal en *Arabidopsis* ante la carencia de  $Pi^{71,80,96,167,168}$ . Para saber si se requería a *LPR1* para inducir la acumulación de  $Fe^{+3}$  en el meristemo radicular de plántulas mutantes *stop1* y *almt1* ante la carencia de Pi, se analizó el efecto de la complementación con malato en la acumulación de  $Fe^{+3}$  en meristemo radicular de la raíz principal de plántulas mutantes *lpr1* crecidas en carencia de Pi. El tratamiento con malato no logró restablecer, ni la acumulación de  $Fe^{+3}$  en el meristemo radicular, ni la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal ante la carencia de Pi, ya que la raíz principal en *lpr1*, inclusive, fue en promedio hasta 10% más larga que la WT (Fig36A, Fig36B y Fig36C).

Para obtener pistas de la naturaleza molecular del mecanismo por el cual el malato induce preferencialmente la acumulación de  $Fe^{+3}$  en carencia de Pi, se analizó (a través de cálculos de dinámica molecular) la interacción entre los iones de malato y los iones de Fe, en sus estados de oxidación  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$ . Se diseñaron cuatro grupos de simulación con 0, 40, 80 y 120 moléculas de malato, todos con 120 molecular de  $Fe^{+2}$  o  $Fe^{+3}$ , respectivamente. Los resultados de la simulación mostraron que los iones el malato indujeron la agregación de los iones de  $Fe^{+3}$  en forma de complejos estables de malato- $Fe^{+3}$ , cuyo tamaño se

incrementó a medida que aumentó la concentración de malato en el sistema (Fig37A). Aunque también se formaron agregados de iones de  $Fe^{+2}$  con malato, estos fueron inestables y mucho más pequeños (Fig37A). Los iones de  $Fe^{+2}$  y  $Fe^{+3}$  no formaron agregados en ausencia de iones de malato, respectivamente (Fig37). Finalmente se realizaron los cálculos de dinámica molecular entre iones de  $Al^{+3}$  y los cuatro grupos de simulación con malato (0, 40, 80 y 120 moléculas). Al igual que con los iones de  $Fe^{+3}$  el malato promovió la formación de agregados de  $Al^{+3}$ , de forma estable y en aumentó a medida que se adicionó malato al sistema (Fig37).

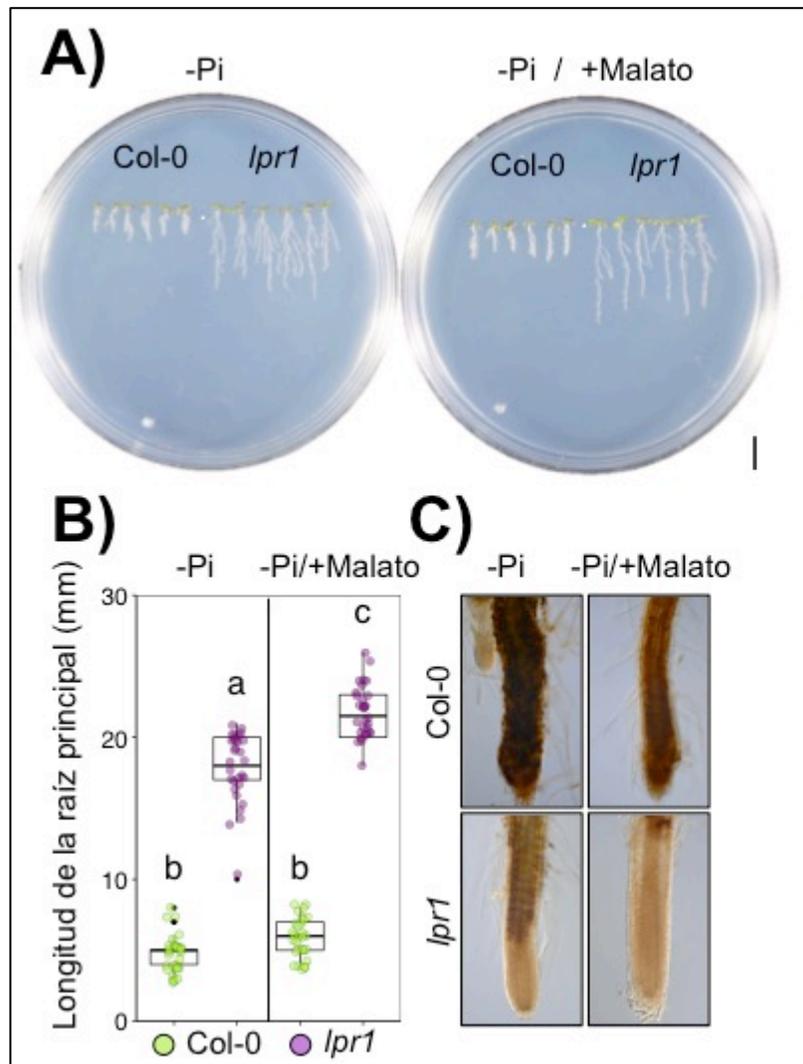


Figura 36. Efecto del tratamiento de complementación con malato en la acumulación apoplástica de  $Fe^{+3}$  en meristemo radicular, y crecimiento de la raíz principal de plántulas mutantes *lpr1* ante la carencia de fósforo. A) Fenotipo de plántulas de 10 días después de

germinar (ddg) en carencia de fósforo (-Pi), sin tratar y tratadas con 1mM de malato. **B)** Longitud de la raíz principal de plántulas de 10ddg en -Pi, sin tratar y tratadas con 1mM malato. Los puntos de colores representan a los 30 individuos WT y *lpr1*, analizados de tres experimentos independientes. Los grupos estadísticos fueron determinados a través de la prueba Tukey HSD (P-value <.05) y son indicados con letras diferentes. **C)** Tinciones histoquímicas Perls-DAB de meristemo radicular de plántulas de 10ddg en -Pi, sin tratar y tratadas con 1mM de malato. La barra de escala representa 100 micras. (Créditos de la figura compartidos con Chávez-Calvillo G., Ojeda-Rivera J. O. y Raya-González J.).

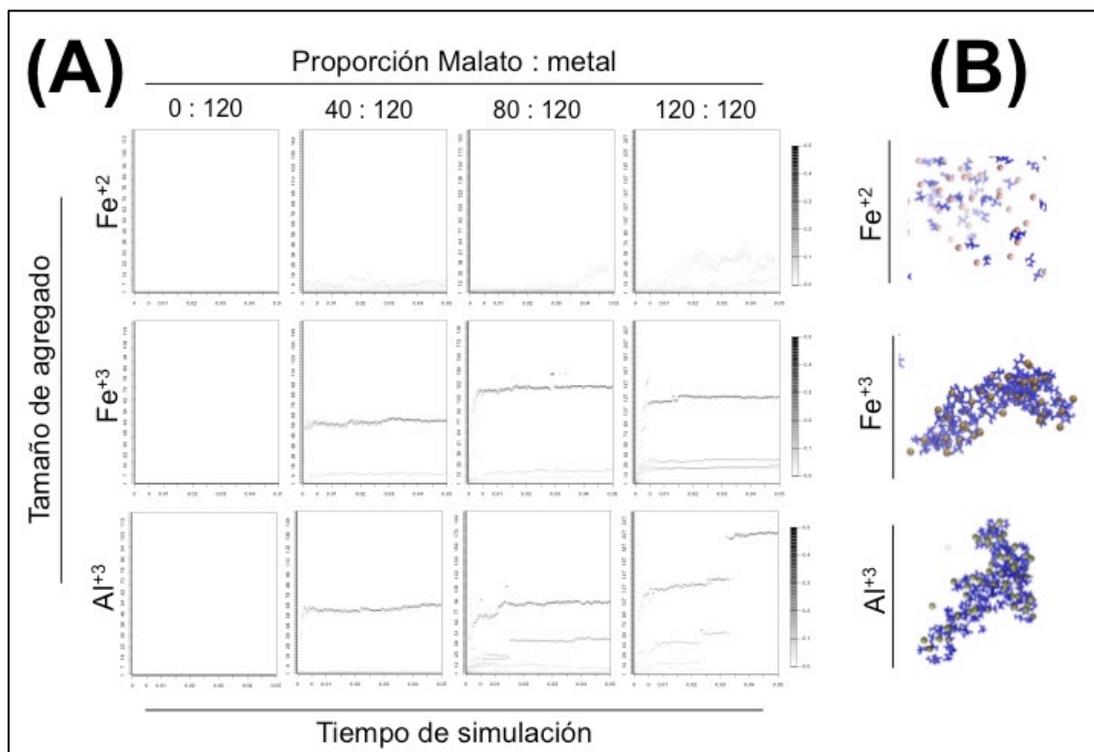


Figura 37. **Cálculos de dinámica molecular entre iones de malato, e iones de hierro y aluminio respectivamente.** **A)** Sistemas de dinámica molecular *in silico*, donde se muestra la formación y el tamaño de los agregado de malato-Fe<sup>+2</sup>, malato-Fe<sup>+3</sup> y malato-Fe<sup>+Al</sup>, a través del tiempo de simulación, respectivamente. **B)** Representación de los agregados de malato-Fe<sup>+2</sup>, malato-Fe<sup>+3</sup> y malato-Fe<sup>+Al</sup>, al tiempo final de la simulación entre 120 malatos y 120 metales respectivamente. (Créditos de la figura compartidos con Jiménez-Domínguez G.).

El citrato, al igual que el malato, es un quelante natural de aluminio y hierro, excretado al medio a través de la raíz de *Arabidopsis* en respuesta a la carencia de Pi<sup>169-173</sup>. Curiosamente se reportó que el tratamiento de complementación con citrato atenúa la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal y reduce la acumulación apoplástica de Fe<sup>+3</sup> en meristemo radicular ante la carencia de Pi<sup>87,172</sup>. Para contrastar el efecto del malato con el del citrato, se analizó el efecto de complementación con citrato, en el crecimiento longitudinal de la raíz principal

de plántulas WT y las mutantes *stop1* y *almt1* ante condiciones de carencia de Pi. Como se esperaba (y fue previamente reportado), el tratamiento con citrato atenuó la inhibición del crecimiento de la raíz principal en la WT (Fig38). El tratamiento de complementación con citrato, a diferencia del de malato, no restableció el crecimiento longitudinal de la raíz principal en las mutantes *stop1* y *almt1*. En ambos casos (*stop1* y *almt1*) se alcanzaron longitudes de la raíz principal, similares a lo observado en sus respectivos fondos genéticos pero sin citrato (Fig38).

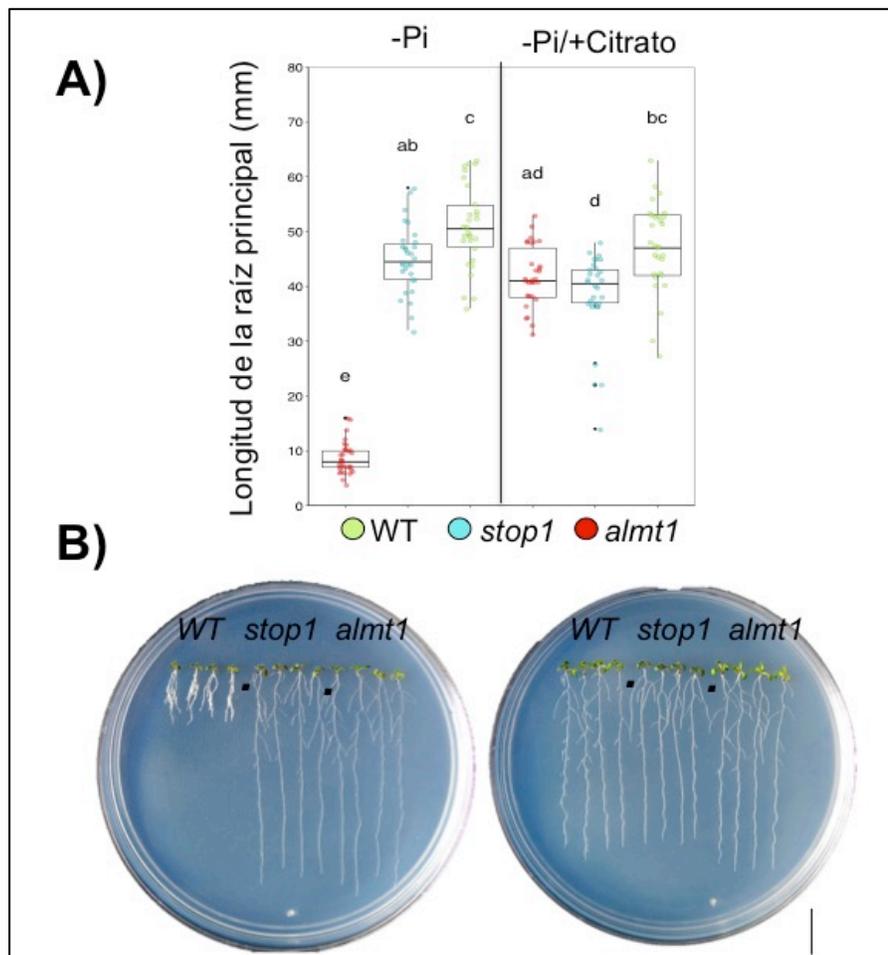


Figura 38. Efecto de la complementación con citrato en el crecimiento de la raíz de plántulas WT, *stop1* y *almt1* en carencia de fósforo. **A)** Longitud de la raíz principal de plántulas de 10 días después de germinar (ddg) en carencia de Pi (-Pi), sin tratar y tratadas con 1 mM de citrato. Los puntos de color verde, azul y rojo representa a los individuos WT, *stop1* y *almt1* (n=30 individuos analizados de tres experimentos independientes), respectivamente. Los grupos estadísticos fueron determinados a través de la prueba de Tukey HSD (P-value <.05), y son indicados por letras diferentes. **B)** Fenotipo de plántulas de 10ddg en -Pi sin tratar, y tratadas con 1mM de citrato. (Créditos de la figura compartidos con Chávez-Calvillo G. y Ojeda-Rivera J. O.).

La agricultura es una de las actividades primarias que sustenta la alimentación de la especie humana en la actualidad, y seguramente lo seguirá haciendo en el próximo siglo<sup>2,19</sup>. Una de las principales causas que usualmente compromete el desarrollo de las plantas en cultivos agrícolas, es la carencia nutrimental, entre ellas la carencia de Pi<sup>7,8,10</sup>. Como producto de la Revolución Verde, poco después de los años 60s, la baja disponibilidad de fosfato (Pi) para las plantas en cultivos agrícolas, comenzó a ser corregida con la aplicación de fertilizantes fosforados, principalmente aquellos obtenidos de roca mineral. El problema aquí es que el Pi es un recurso no renovable y las reservas naturales de Pi mineral en el mundo se están agotando, está predicho que se terminarán dentro de los próximos 50-100 años. Eso sin mencionar que los costos de los fertilizantes son cada vez más altos<sup>20-22</sup>. Lo anterior hace evidente la urgencia de establecer estrategias biotecnológicas que lleven a mantener los grandes rendimientos de producción agrícola alcanzados hasta el día de hoy, pero haciendo un uso más eficiente de las reservas "finitas" del Pi mineral<sup>7,8,10</sup>.

El estudio de la respuesta natural de las plantas a la carencia nutrimental (o estrés en general), es uno de los recursos más valiosos de la biotecnología para el mejoramiento de la agricultura. Ahora se sabe que las plantas en respuesta a la carencia de Pi inducen una serie de procesos genéticos, bioquímicos, celulares y morfo-fisiológicos, que promueven el reciclado de Pi interno y maximizan la capacidad adquisitiva de Pi externo<sup>8,24,31,34,37,65,70,131</sup>. *Arabidopsis* es un buen modelo para el estudio de la respuesta a la carencia de Pi en plantas, ya que además de ofrecer una vasta diversidad de herramientas bioinformáticas y experimentales que facilitan su estudio<sup>82-86</sup>, conserva varias de las respuestas de aclimatación a la carencia de Pi, observadas en otras especies de plantas silvestres y de interés agrícola<sup>80,171,174</sup>.

El Pi es un elemento virtualmente esencial para cualquier organismo vivo en la tierra. Las bacterias y los hongos utilizan un mecanismo (con variaciones significativas entre sus componentes genéticos), que les permite percibir la disponibilidad de Pi externo, y responder con procesos que maximizan el uso de Pi interno y potencia la adquisición de Pi externo<sup>116,175-178</sup>. A diferencia de las bacterias y los hongos, en las plantas aún se desconoce el mecanismo de percepción de Pi, sin embargo se sabe que responden diferencialmente, tanto a los cambios en la homeostasis de Pi interno<sup>100</sup> (llamada respuesta sistémica<sup>100</sup>), y a las variaciones en la disponibilidad de Pi externo (llamada respuesta local<sup>71,80,131</sup>). La respuesta sistémica está controlada transcripcionalmente por el módulo funcional heterodímero *SPX1-PHR1* (en coordinación con sus respectivos genes parálogos *SPX2* y *PHR1like*, respectivamente<sup>147</sup>). *PHR1* codifica un factor de transcripción de la familia MYB, que induce transcripcionalmente a sus blancos directos mediante su unión al dominio P1BS (*GNATATNC*, localizado en la secuencia promotora de los genes blanco). En presencia de Pi (o fosfoinositol), las proteínas *SPX1* y *SPX2* establecen una interacción proteína-Pi-proteína con *PHR1*, lo cual impide a *PHR1* unirse al motivo P1BS de sus blancos directos, manteniéndolos reprimidos<sup>133,134,137,148</sup>. La respuesta local está controlada por el módulo funcional *PDR2-LPR1* (y su parálogo *LPR2*); genes que epistáticamente modulan el estatus oxido-reductor de Fe en el apoplásto de células del meristemo radicular. *PDR2* codifica una proteína ATPasa (de función específica aún desconocida), que se localiza en retículo endoplásmico (al igual que *LPR1*), y regula de forma negativa a los genes *LPR1* y *LPR2*. *LPR1* ha sido mejor caracterizado y se sabe que codifica para una proteína con actividad de multicopper oxidasa (MCO) que es localizada en la pared celular, en donde a través de su capacidad óxido-reductiva cataliza la oxidación de los iones  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$ <sup>71,80,96,167,172</sup>.

Con el objetivo de identificar "nuevos genes" involucrados en los mecanismos de percepción de Pi y/o respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en *Arabidopsis* (respuesta sistémica y respuesta local). La estrategia experimental

de este trabajo se basó en el uso de una línea reportera que permitiera monitorear simultáneamente la respuesta sistémica y la respuesta local *in vivo*, durante el escrutinio de plántulas químicamente mutagenizadas con EMS (etilmetanosulfonato), crecidas en condiciones de carencia de Pi. Esto con el fin de identificar plántulas insensibles a la carencia de Pi, que pudieran estar afectadas en los mecanismos de percepción de Pi y respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en *Arabidopsis*. Como resultado se identificaron 50 líneas mutantes con distintos niveles de alteración en la respuesta local, en la respuesta sistémica, o en algunos casos con alteraciones tanto en la respuesta sistémica y la respuesta local a la carencia de Pi (Fig20). Estos resultados sugieren la existencia de un punto de intersección (*cross-talk*) en la ruta de señalización que regula la respuesta sistémica y la respuesta local a la carencia de Pi (Fig20). La respuesta sistémica fue monitoreada a través de la expresión de la línea reportera *pro790::GUS-GFP*, y la respuesta local a través de las modificaciones morfológicas del sistema radicular, naturalmente inducida en el ecotipo de *Arabidopsis Columbia-0* (Col-0) ante condiciones de carencia de Pi en condiciones de laboratorio (Fig16).

Dos de las mutantes aisladas en este trabajo fueron nombradas *low phosphate insensitive 5* (*lpi5*) y *low phosphate insensitive 6* (*lpi6*), y su descripción es el tema de esta tesis. Aunque en un inicio *lpi5* y *lpi6* sugirieron estar afectadas tanto en la respuesta sistémica como en la respuesta local, el análisis de validación de la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP*, sugiere que sólo la mutante *lpi5* (*stop1*) está afectada en ambas respuestas (Fig21-Fig24). Aunque el análisis cuantitativo del reportero *pro790::GUS-GFP* no mostró diferencias significativas en su expresión entre las líneas WT y la mutante *stop1* (independientemente de la disponibilidad de Pi en el medio), las tinciones histoquímicas mostraron que la mutante *stop1* falla en la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP* en la punta de la raíz principal (Fig24). Sin bien el gen *At5g20790* (promotor utilizando para la construcción de la línea reportera *pro790::GUS-GFP*) es descrito como blanco directo de PHR1, su promotor no

contiene ningún sitio de unión P1BS, y la expresión del reportero *pro790::GUS-GFP* permanece activa en plántulas *phr1* crecidas en condiciones de carencia de Pi (Fig17), lo cual sugiere que la expresión de la respuesta sistémica del gen *At5g20790* es regulada indirectamente por la ruta de señalización PHR1, y por una ruta alterna hasta el momento desconocida.

Se ha propuesto que STOP1 puede enlazarse a distintas secuencias del ADN en la región promotora de sus genes blanco, entre ellas la secuencia del sitio de unión denominado ART (AL RESISTANCE TRANSCRIPTION FACTOR, por su sigla en Inglés,  $GGN(T/g/a/C)V(C/A/g)S(C/G)$ )<sup>179,180</sup>. Curiosamente el gen *At5g20790* contiene siete sitios de unión ART en su región promotora (Fig39). Es posible que PHR1 y STOP1 regulen coordinadamente algunos genes de respuesta sistémica, al menos en la punta de la raíz principal de plántulas de *Arabidopsis* sometidas al ayuno de Pi. Será interesante analizar la expresión del gen *At5g20790* (y otros genes regulados sistémicamente) en el doble fondo mutante *phr1/stop1*.

Actualmente se está trabajando con cinco variantes de la línea reportera *pro790::GUS-GFP*, cuyas diferencias están en el tamaño del promotor utilizado para conducir la expresión de los genes reporteros (Fig39). Los resultados preliminares mostraron una correlación positiva, entre la intensidad de la expresión reportera, con el número de motivos ART dentro del promotor utilizado (dato no mostrado).

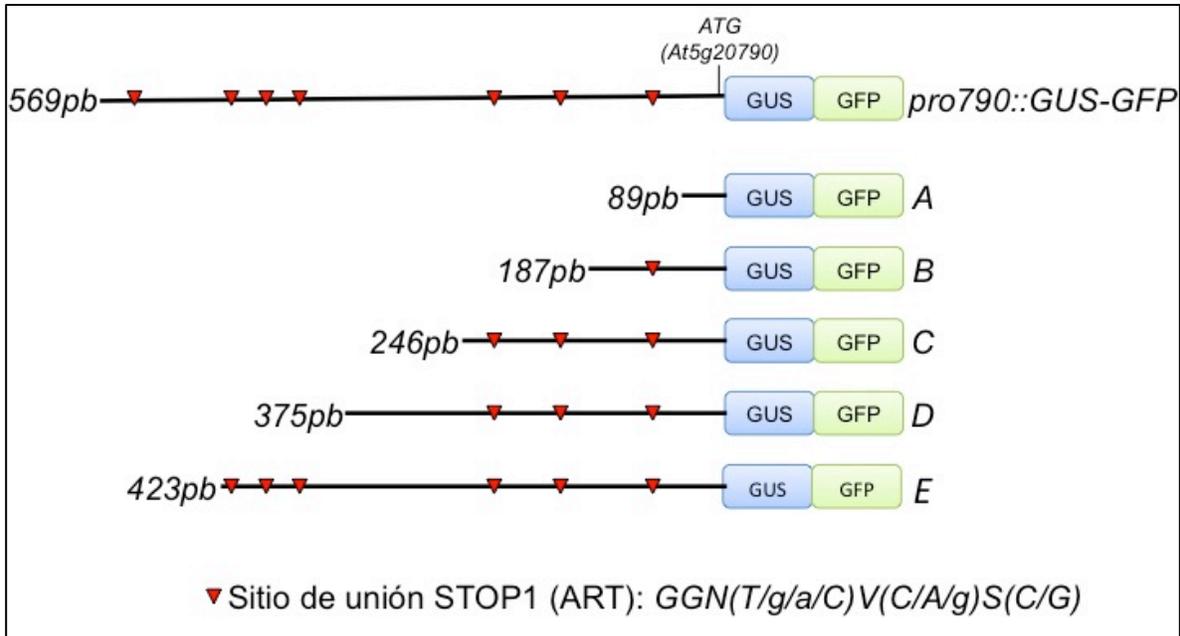


Figura 39. Sitios de unión de STOP1 (ART) en el promotor de la línea reportera *pro790::GUS-GFP*. La línea reportera *pro790::GUS-GFP* fue construida con los genes reporteros GUS ( $\beta$ -glucoronidasa) y GFP (*Green fluorescent protein*, por su sigla en Inglés) bajo el control transcripcional de la región promotora del gen *At5g20790* (482 pares de bases). Un gen fuertemente inducido ante la carencia de Pi (Fig16). La línea reportera *pro790::GUS-GFP* también es fuertemente inducida a lo largo de la raíz de plántulas de *Arabidopsis* crecidas en carencia de Pi. Curiosamente la expresión de la línea reportera se muestra inhibida, particularmente en la punta de la raíz principal de plántulas mutantes *stop1* ante la carencia de Pi (Fig24). STOP1 es un factor de transcripción (dedos de zinc) que se ha propuesto, induce transcripcionalmente a sus genes blancos, a través de su enlace al sitio de unión ART1 (GGN(T/g/a/C)V(C/A/g)S(C/G)), secuencia de cinco nucleótidos reconocida como sitio de unión a ADN, por factores de transcripción dedos de zinc, relacionados con la respuesta a la toxicidad por  $Al^{+3}$  en *Arabidopsis*. Considerando que el promotor de la línea *pro790::GUS-GFP* está enriquecida con siete sitios ART1 (en tan sólo 569 pares de bases), es posible que el gen *At5g20790* sea un blanco directo de STOP1, ante la carencia de Pi. En el esquema de esta figura se muestra el diseño de la línea reportera *pro790::GUS-GFP*, acompañada de sus cinco variantes con distintos tamaños en la longitud de la región promotora (A-F). Además se localizan los siete sitios de unión ART ( $Al^{+3}$  resistance transcripción factor 1) dentro de promotor *At5g20790*.

Las mutantes *stop1* (*lpi5*) y *almt1* (*lpi6*) también fueron seleccionadas por que se mostraron alteradas en la respuesta morfológica del sistema radicular inducida por la carencia de Pi (respuesta local). Particularmente, porque a diferencia de la WT que inhibió el crecimiento longitudinal de la raíz principal, *stop1* y *almt1* lo mantuvieron de forma indeterminada hasta el final del experimento (Fig21-Fig23). *stop1* y *almt1* además fallan en inducir la respuesta que incrementa la densidad y longitud de los pelos radicular en carencia de Pi, lo cual sugiere que la excreción de malato también controla el desarrollo de los pelos

radiculares ante la carencia de Pi (Fig22). La mutante *stop1* además presentó defectos en la formación de raíces laterales (Fig22), estableciendo con ello a STOP1, como un factor de transcripción que modula la formación de raíces laterales en Arabidopsis, ante la carencia de Pi.

La inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en Arabidopsis fue inicialmente descrita como una respuesta inducida sólo por la carencia de Pi<sup>71,79</sup>, sin embargo resultó estar determinada también por disponibilidad de hierro (Fe) en el medio<sup>77</sup>. Durante el desarrollo de este proyecto Muller y colaboradores (2015)<sup>96</sup> reportaron que Arabidopsis acumula iones de Fe<sup>+3</sup> en apoplasto entre las células del meristemo radicular, particularmente alrededor de las células del centro quiescente (QC). Se descubrió que dicha acumulación de Fe<sup>+3</sup> ocurre independientemente de la disponibilidad de Pi en el medio, pero determina la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz sólo ante la carencia de Pi<sup>96</sup>. El crecimiento longitudinal de la raíz principal se sustenta en la estructura y funcionalidad celular del meristemo radicular (mediada principalmente por una red factores de transcripción y las auxinas)<sup>88,89</sup>, y se sabe que la diferenciación del QC es suficiente para desencadenar el agotamiento meristemático o también conocido como diferenciación del meristemo<sup>89</sup>. El reporte de Muller y colaboradores sugieren que la acumulación apoplástica de Fe<sup>+3</sup> ante la baja disponibilidad de Pi en el medio induce la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales a su vez inducen una respuesta celular que provoca el engrosamiento de la pared celular, lo que bloquea físicamente los plasmodesmos (como un mecanismo general de defensa al estrés ambiental)<sup>181,182</sup>. Debido a que el bloqueo de los plasmodesmos interrumpe el flujo de señales intercelulares, como es el movimiento de SHR (*SHORT-ROOT*, por su sigla en Inglés) de células de la estela hacia el QC, desencadena el agotamiento meristemático<sup>96</sup>. *LPR1* (*LOW PHOSPHATE RESPONSE 1*, por su sigla en Inglés) es un gen constitutivamente expresado en la punta de la raíz, particularmente en las células del QC (Fig38). Y se sabe que codifica para una proteína multicopper oxidasa (MCO) transportada hacia la pared celular, en donde a través de su capacidad oxido-reductiva, se ha

propuesto que cataliza la oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  y provee los iones de  $\text{Fe}^{+3}$  acumulados alrededor del QC ante la carencia de Pi. Si bien se ha propuesto que la transferencia de electrones durante el ciclo de oxido-reducción del  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  es la fuente de ROS que desencadena el agotamiento meristemático ante la carencia de Pi, hasta este trabajo se desconocía la naturaleza molecular del mecanismo que promueve la acumulación apoplástica de  $\text{Fe}^{+3}$ , y su participación en el mecanismo que modifica el desarrollo radicular de Arabidopsis ante la carencia de Pi<sup>96</sup>.

Con base en la caracterización genética, celular y morfológica de las mutantes *lpi5* y *lpi6*, en esta tesis se propone a *STOP1* (*SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICIT 1*, por su sigla en Inglés) y a *ALMT1* (*ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRASPORTER 1*, por su sigla en Inglés) como modulo funcional (*STOP1/ALMT1*), que a través de la excreción de malato, induce la acumulación apoplástica de los iones de  $\text{Fe}^{+3}$  previamente vinculados con el agotamiento meristemático de la raíz principal de Arabidopsis ante la baja disponibilidad de Pi en el medio. *STOP1* y *ALMT1* fueron inicialmente vinculados con la excreción de malato al medio en respuesta a la toxicidad por aluminio ( $\text{Al}^{+3}$ )<sup>157,159,161,163,166,183–187</sup>. *STOP1* codifica para un factor de transcripción (de la familia dedos de zinc), constitutivamente expresado en la raíz<sup>159–161,163,180,183,188–190</sup>, que induce transcripcionalmente la expresión de *ALMT1*, un transportador de membrana plasmática, que media la excreción de malato, a través de la raíz al medio<sup>157,166,180,183,184,186,191,192</sup>. Como lo muestra el análisis transcripcional de este trabajo (qRT-PCR), *STOP1* es constitutivamente expresado, en induce transcripcionalmente la expresión de *ALMT1*, al menos en la punta de la raíz principal ante la carencia de Pi (Fig28 y Fig29). Tomando en cuenta que los sitios ART han sido propuesto como motivo funcional reconocido por STOP1, será interesante buscar sitios ART en el promotor de genes inducidos por la carencia de Pi. Su presencia podría conducir la respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en plantas, como ocurre con *ALMT1*, el cual contiene cuatro motivos ART en la región funcional de su promotor, ante la toxicidad por  $\text{Al}^{+3}$  (Fig40).

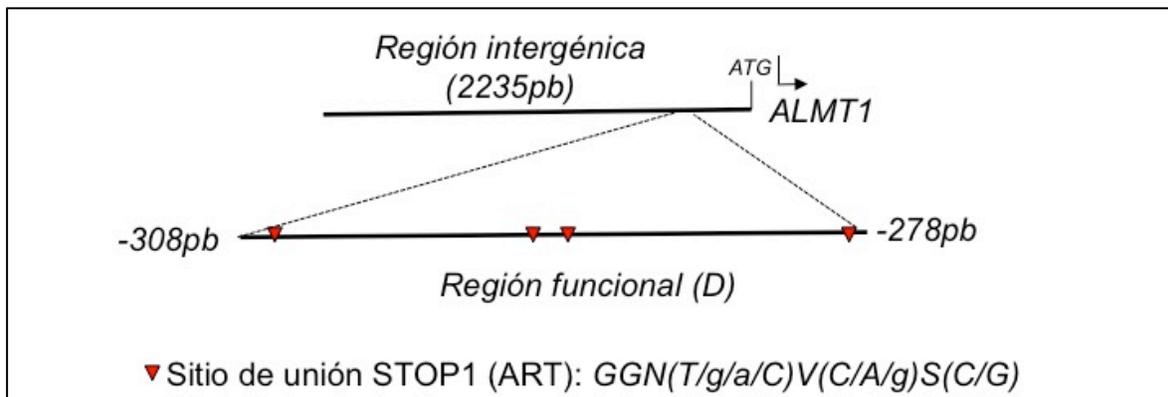


Figura 40. Sitios de unión ART en la región promotora que induce transcripcionalmente la expresión de *ALMT1* en respuesta a la toxicidad por  $Al^{+3}$ . La región promotora descrita técnicamente como "región D", refiere a la región promotora de 30 pares de bases que promueve la inducción transcripcional de *ALMT1* (*At1g08430*), ante la toxicidad por  $Al^{+3}$ .

El módulo funcional *STOP1/ALMT1* han sido asociados hasta con el 90% del malato excretado a través de la raíz de *Arabidopsis* en respuesta a la toxicidad por  $Al^{+3}$ , y la expresión transcripcional de *ALMT1* ha sido correlacionada positivamente con la excreción de malato al medio<sup>158,162,183,188,191,193-195</sup>. Aunque será necesario determinar la porción de malato excretado al medio, a través del módulo funcional *STOP1/ALMT1* ante la carencia de Pi, considerado que las mutantes *stop1* y *almt1* mantienen el crecimiento longitudinal de la raíz principal en carencia de Pi (Fig21 y 27), y tomando en cuenta que el tratamiento de complementación con malato restablece los procesos que inhiben dicho crecimiento longitudinal de la raíz (Fig30), propongo que el módulo funcional *STOP1/ALMT1* controla la mayor parte de la secreción de malato en respuesta a la carencia de Pi y que el malato es necesario para desencadenar la diferenciación de su meristemo radicular, y reducir el crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis*.

Los tratamientos de complementación con malato en *stop1* y *almt1* mostraron que la intensidad de la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi, está positivamente correlacionada con concentración de malato adicionado al medio (Fig30). Considerando que la

inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal es una característica genética controlada como QTL (*Quantitative Trait Locus*, por su sigla en Inglés), es posible que la actividad funcional *STOP1/ALMT1* (a través de la excreción de malato) actúe como *QTLs* que controlan el rango de intensidad con la que se presentan los cambios morfológicos del sistema radicular entre los diferentes ecotipos de *Arabidopsis* ante la carencia de  $Pi^{71}$ .

Aunque el tratamiento con malato inhibió el crecimiento longitudinal de la raíz principal en ambas mutantes *stop1* y *almt1*, sólo provocó el agotamiento meristemático en *almt1* (tal y como ocurre en la WT ante la carencia de Pi). En *stop1* solo reduce el número de células en proceso de mitosis (Fig31), y reduce la longitud celular de las células maduras a lo largo de la raíz (dato no mostrado). Considerando que *STOP1* es un factor de transcripción, es posible que además de inducir la expresión transcripcional de *ALMT1*, controle la expresión de otros genes requeridos para desencadenar el agotamiento meristemático de la raíz ante la carencia de Pi. *STOP1* además de conferir resistencia a la toxicidad por  $Al^{+3}$ , protege a la raíz en contra de la acidez del medio (pH ácidos <5.4)<sup>159-163,180,183,190,196,196,197</sup>. Considerando que la raíz de *Arabidopsis* (y otras especies de plantas), acidifican la rizósfera en respuesta a la carencia de Pi, es posible que *STOP1* controle la acidificación del medio, favoreciendo con ello la solubilidad de los iones de Fe y la consecuente formación y acumulación de complejos malato- $Fe^{+3}$  relacionados con el agotamiento meristemático. Será interesante analizar el efecto del malato en el crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis*, ante un gradiente de pH en el medio.

Se ha propuesto que la excreción de malato al medio por un parte promueve la agregación de los iones de  $Al^{+3}$ , lo cual evita que la planta los tome y se intoxique, y por otro parte rompe los enlaces entre los complejos de  $Pi-Al^{+3}$  y  $Pi-Fe^{+3}$  (formando consecuentemente agregados de malato- $Al^{+3}$  y malato- $Fe^{+3}$ , respectivamente), haciendo disponible al Pi para su adquisición por la planta. Las tinciones histoquímicas Perls-DAB revelaron que las mutantes *stop1* y *almt1* fallan

en la acumulación apoplástica de  $\text{Fe}^{+3}$  en meristemo radicular ante la carencia de Pi (Fig34). Considerando que el tratamiento de complementación con malato restablece dicha acumulación de  $\text{Fe}^{+3}$  (Fig34), y que los cálculos de dinámica molecular sugieren que el malato promueve la agregación de  $\text{Fe}^{+3}$  (Fig36), en este trabajo propongo que la excreción de malato, mediado por el modulo funcional *STOP1/ALMT1* promueve la agregación de los iones de  $\text{Fe}^{+3}$  catalizados por *LPR1* (en complejos malato- $\text{Fe}^{+3}$ ) lo suficientemente grandes y estables para quedar retenidos entre los polímeros de la pared celular en meristemo radicular ante la carencia de Pi. El tratamiento de complementación con malato en las mutantes *stop1* y *almt*, reveló que la acumulación de  $\text{Fe}^{+3}$  es determinada por la expresión de *LPR1*, como lo sugiere la expresión de la línea reportera *proLPR1::GUS* (tinciones histoquímicas de GUS)<sup>96</sup> en el meristemo radicular de la raíz principal de Arabidopsis ante la carencia de Pi (Fig41).

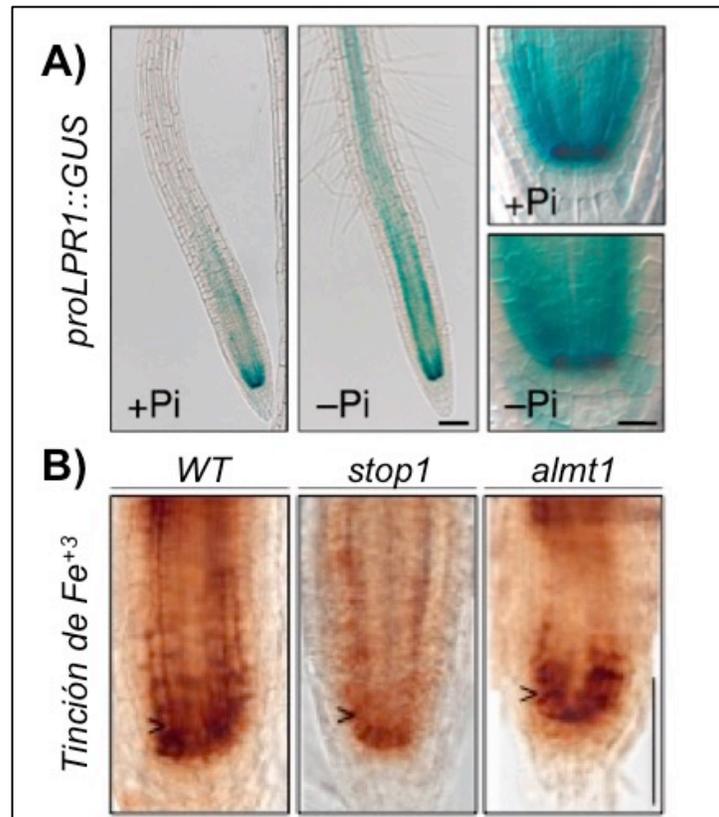


Figura 41. Comparación entre la expresión de *LPR1* y la acumulación de  $\text{Fe}^{+3}$  en meristemo radicular de la raíz principal en Arabidopsis. A) Tinciones histoquímicas de GUS de la expresión del reportera *proLPR1::GUS* en meristemo radicular de plántulas WT crecidas en suficiencia (+Pi) y carencia de Pi (-Pi)<sup>96</sup>. B) Tinciones histoquímicas Perls-DAB, para teñir iones de

Fe<sup>+3</sup> (color café), en meristemo radicular de la raíz principal de plántulas WT, *stop1* y *almt1* en carencia de Pi, complementadas con 1mM de malato.

*LPR1* es descrito como un gen que inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal en Arabidopsis ante la carencia de Pi<sup>71,96,97,168</sup>. *LPR1*, como se mencionó previamente, es constitutivamente expresado en meristemo radicular, particularmente en las células del QC, y codifica para una proteína multicopper oxidasa (MCO) de pared celular, en donde cataliza la oxidación de Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup>, lo cual produce el ROS relacionado con el agotamiento meristemático ante la carencia de Pi<sup>96</sup>. Considerando que el tratamiento de complementación con malato no restableció, ni la acumulación apoplástica de Fe<sup>+3</sup>, ni la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en la mutante *lpr1*, ante la carencia de Pi (Fig35). Sugiero que la excreción de malato al medio, a través del módulo funcional *STOP1/ALMT1*, induce la acumulación apoplastica de los iones de Fe<sup>+3</sup> catalizados por *LPR1* (y su parálogo *LPR2*), en el meristemo radicular de Arabidopsis ante la carencia de Pi.

El agotamiento meristemático y consecuente inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en Arabidopsis en carencia de Pi, ha sido asociado con la activación de un programa transcripcional específico de la punta de la raíz, controlado por la baja disponibilidad de Pi en el medio<sup>36,80,87</sup>. Con el objetivo de conocer el efecto de la excreción de malato a través del módulo funcional *STOP1/ALMT1*, se analizó el transcriptoma (RNAseq) de la punta de la raíz principal (2-3mm) de plántulas WT y las mutantes *stop1* y *almt1*, de cinco días después de germinar (momento en el que se detiene el crecimiento longitudinal de la raíz principal, pero se mantiene la identidad celular del meristemo radicular), en suficiencia y carencia de Pi, sin complementar y complementadas con 1mM de malato (trabajo de colaboración con el proyecto de tesis de maestría de Ojeda-Rivera J. O.). La descripción completa de los resultados se muestra en el apéndice (Apéndice3). Brevemente, en respuesta a la carencia de Pi la línea WT alteró la expresión de un poco más de 1,400 genes de diversas categorías funcionales, particularmente de un grupo de genes vinculados con el engrosamiento de la

pared celular y el cierre de los plasmodesmos, que potencialmente están involucrados en el agotamiento meristemático de la raíz principal. Si bien las mutantes *stop1* y *almt1* inducen cambios transcripcionales en respuesta a la carencia de Pi, sólo es parcial, ya que mantienen reprimido poco más del 50% del programa transcripcional observado en la WT. Como se esperaba, el grupo de genes diferencialmente expresados (respuesta local) en *stop1* y *almt1*, se mostró enriquecido con aquellos relacionados con la respuesta local a la carencia de Pi. Tomando en cuenta que un gran set de genes transcripcionalmente desregulado en las mutantes *stop1* y *almt1* están relacionados con procesos de organización de la pared celular, y que el tratamiento de complementación con malato restablece la expresión de genes que codifican para proteínas exportadas al apoplasto y enzimas con actividad de óxido-reducción (que posiblemente participan en el metabolismo redox del meristemo radicular durante la carencia de Pi). En este trabajo se propone que la acumulación apoplástica de  $Fe^{+3}$ , mediada por la excreción de malato al medio a través del módulo funcional *STOP1/ALMT1*, induce transcripcionalmente la respuesta local que desencadena el agotamiento meristemático y consecuente inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en Arabidopsis ante la carencia de Pi.

Aunque en este trabajo las plántulas de Arabidopsis fueron alimentadas con iones de  $Fe^{+2}$ , que es la principal fuente de hierro tomada por las plantas dicotiledóneas, entre ellas Arabidopsis, es la forma iónica  $Fe^{+3}$  la que prevalece de forma natural en la solución de los suelos<sup>69,90,94,95,198</sup>. Ante la baja disponibilidad de  $Fe^{+2}$  en el medio, Arabidopsis induce la expresión de *FRO2* (*FERRIC REDUCTASE-OXIDASE*, por su sigla en Inglés) e *IRT1* (*IRON-REGULATED TRANSPORT*, por su sigla en Inglés), un par de proteínas ancladas en la membrana plasmática en la epidermis de la raíz, que actúan como un módulo funcional que media la toma de hierro por la planta<sup>95</sup>. Mientras que *FRO2* codifica para una proteína Fe-reductasa que reduce los iones de  $Fe^{+3}$  a  $Fe^{+2}$  en apoplasto, *IRT1* codifica para un transportador que media la entrada de los iones de  $Fe^{+2}$  al interior de la célula. Aunque en un principio se propuso que *FRO2* podría proveer

los iones de  $\text{Fe}^{+2}$  catalizados por *LPR1* y *LPR2* en pared celular ante la carencia de Pi, *FRO2* al igual que *IRT1*, son transcripcionalmente reprimidos en la raíz de *Arabidopsis* ante la carencia de Pi, y los fenotipos mutantes de *fro2* e *irt1*, al igual que la WT, siguen siendo sensibles a la carencia de Pi (inhiben el crecimiento longitudinal de la raíz principal ante la carencia de Pi). Recientemente se reportó el modelo para un nuevo mecanismo que reduce los iones de  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$ , en la región extracelular de las raíces de las plantas, entre ellas *Arabidopsis*. Se descubrió que la excreción de ascorbato al medio (por un transportador aún desconocido), reduce los iones de  $\text{Fe}^{+3}$  que forman parte de complejos con malato. *VTC4* (*VITAMIN C4*, por sus sigla en Inglés) codifica para una proteína bifuncional, con actividad de myo-inositol-monofosfato y síntesis de ascorbato, la cual está relacionada con la síntesis del ascorbato que conduce a la reducción extracelular de  $\text{Fe}^{+3}$  en la raíz de *Arabidopsis*. Debido a que *VTC4* es un blanco directo de *PHR1* (el factor de transcripción que actúa como regulado maestro de la respuesta sistémica a la carencia de Pi), y es transcripcionalmente inducido en la punta de la raíz principal tanto en plántulas WT como en las mutantes *stop1* y *almt1*, se sugiere que *VTC4* es transcripcionalmente controlado de manera sistémica ante la carencia de Pi, a través del módulo funcional *PHR1/SPX1*. Resultados preliminares del tratamiento de complementación con ascorbato, indican que la excreción de ascorbato al medio a través de la raíz también inhibe el crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi (como ocurre con la mutante *lpi4*)<sup>36</sup>(Fig42). Lo anterior permite argumentar que la excreción de ascorbato activada por la ruta de señalización de *PHR1/SPX1*, y la excreción de malato a través del módulo funcional *STOP1/ALMT1*, actúa como un punto de intersección (*Cross-talk*) entre la respuesta sistémica y la respuesta local a la carencia de Pi. Dicho *Cross-talk* establece un ciclo de óxido-reducción de hierro, potencialmente responsable de la generación de ROS vinculada con el agotamiento meristemático de la raíz principal ante la carencia de Pi. Mientras la excreción de malato y ascorbato promueven la reducción de  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$ , la oxidación de  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  está controlada por el módulo funcional *PDR2/LPR1*. Es posible que la excreción de ascorbato de lugar a la formación de complejos

malato-Fe<sup>+3</sup>-ascorbato que promueve la reducción de los iones de Fe<sup>+2</sup> a Fe<sup>+3</sup>. Será necesario conocer si el ascorbato también promueve la acumulación apoplástica de Fe<sup>+3</sup>.

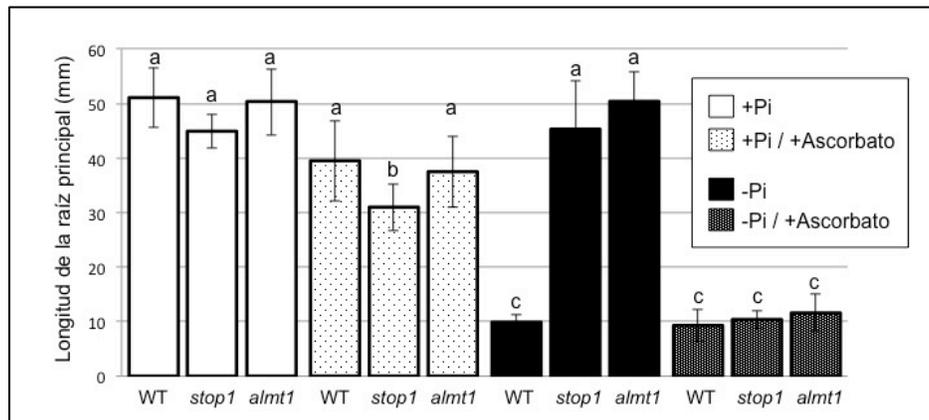


Figura 42. **Efecto del tratamiento de complementación con ascorbato en el desarrollo radicular de plántulas de Arabidopsis.** Gráfica que muestra el crecimiento longitudinal de la raíz principal de plántulas de WT, y las mutantes *stop1* y *almt1*, de 10 días después de germinar en suficiencia y carencia de Pi, sin complementar y complementadas con 1mM de ascorbato. Las letras distintas representan las diferencias estadísticamente significativas (error del 0.05) entre los tratamientos.

Los experimentos de complementación con malato también se realizaron en plántulas crecidas en suficiencia de Pi, pero los resultados no mostraron diferencias significativas que comprometieran la identidad del meristemo radicular, o el crecimiento longitudinal de la raíz principal en plántulas WT, *stop1* y *almt1*. Curiosamente, tanto la WT como las mutantes *stop1* y *almt1* acumulan iones de Fe<sup>+3</sup> en apoplasto alrededor de las células del QC en el meristemo radicular. Esto sugiere que la acumulación apoplástica de Fe<sup>+3</sup> mediada por la excreción de malato a través del módulo funcional *STOP1/ALMT1*, es un mecanismo específico, al menos de la punta de la raíz de plántulas de Arabidopsis crecidas ante condiciones de carencia de Pi.

Con base en lo discutido hasta este punto (diagrama de la Fig42 y modelo molecular de la Fig43), se establece a PHR1 como un factor de transcripción que funciona como regulador maestro del programa transcripcional de respuesta

sistémica a la carencia de Pi en Arabidopsis. Aunque PHR1 es múltiplemente sumoilado por SIZ1 (una proteína sumoilasa), poco se conoce de la ruta de señalización que regula su actividad. Por su parte, la presencia de Pi o Pi-inositol induce la interacción proteína-Pi-proteína entre PHR1 y las proteínas SPX1 y SPX2, lo cual evita la unión de PHR1 a su sitio de unión (P1BS) en la región promotora de sus genes blanco. Esto mantiene reprimido el programa transcripcional de respuesta sistémica a la carencia de Pi, particularmente los procesos de reciclado de Pi interno (remodeladores membranales), de transporte de Pi al interior de la planta (transportadores de Pi), y del incremento en la solubilidad de Pi en el medio (síntesis y excreción de ácidos orgánicos). Paralelamente en el esquema, se localiza a *PDR2*, un gen constitutivamente expresado en la raíz, que codifica para una proteína ATPasa de función desconocida, pero que regula epistémicamente de forma negativa a *LPR1*. *LPR1* codifica para una proteína multicopper oxidasa exportada a la pared celular, en donde a través de su capacidad óxido-reductiva cataliza la oxidación de  $Fe^{+2}$  a  $Fe^{+3}$ . Por su parte *STOP1*, al igual que *PHR1* regula un programa de transcripcional, pero de respuesta local a la carencia de Pi. *STOP1* codifica un factor de transcripción constitutivamente expresado en el núcleo, en donde ante condiciones de carencia de Pi, induce transcripcionalmente la expresión de *ALMT1*, un transportador transmembranal que media la excreción de malato al medio. El malato excretado al medio induce la acumulación apoplástica de los iones de  $Fe^{+3}$  catalizados por LPR1 y LPR2, a través de la formación de complejos malato- $Fe^{+3}$  lo suficientemente grandes y estables para quedar retenido entre los polímeros de la pared celular alrededor de las células del centro quiescente (QC), en el meristemo radicular de plántulas crecidas en carencia de Pi. Es probable que STOP1 a través de la inducción transcripcional de otros genes, modifique el pH del apoplasto y contribuya con la reactividad química del  $Fe^{+3}$  en la solución del medio. El citrato al igual que el malato, es un quelante natural de metales excretado al medio a través de la raíz de Arabidopsis ante la carencia de Pi, sin embargo, contrariamente al malato, atenúa la inhibición del crecimiento longitudinal de raíz principal, y evita la acumulación apoplástica de  $Fe^{+3}$

relacionada con el agotamiento meristemático. Es posible que la naturaleza estructural de los complejos de citrato- $\text{Fe}^{+3}$  se menos estables, lo cual evita su retención entre los polímeros de la pared celular. Aunque ha sido poco estudiado el tema de los transportadores de ácidos orgánicos en respuesta a la carencia de Pi, es probable que STOP1 controle la excreción de citrato al medio, a través de la inducción de transportadores MATE, tal y como ocurre ante la toxicidad por  $\text{Al}^{+3}$ , donde STOP1 induce la expresión tanto de transportadores ALMT como MATE<sup>188,197,199</sup>. Tampoco se conoce mucho de las enzimas que median el aumento en la acumulación de citrato y malato en el interior de las plantas ante la carencia de Pi, sin embargo, se ha propuesto que el aumento en la síntesis de estos ácidos orgánicos es controlado de manera sistémica por los cambios en la homeostasis de Pi interno<sup>200,201</sup>. Mientras que la síntesis de citrato podría ser mediada por la enzima citrato sintasa (CS), la producción de malato estaría coordinada por las enzimas fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEP) y malato deshidrogenasa (MDH)<sup>200-203</sup>. Por otra parte, *VTC4 (VITAMINE-C 4)* codifica para una proteína bifuncional con la capacidad de sintetizar ascorbato en el interior de la planta, y es un blanco directo del factor de transcripción *PHR1*<sup>204,205</sup>. Aunque permanece desconocida la identidad del transportador que media la excreción de ascorbato a través de la raíz, su presencia en el medio ante la carencia de Pi, puede estar catalizando la reducción de los iones de  $\text{Fe}^{+3}$  agregados en los complejos con malato retenidos en la pared celular. Lo anterior, en conjunto con la oxidación de  $\text{Fe}^{+3}$  catalizada por LPR1 (y LPR2), establece un ciclo de óxido-reducción de los iones de Fe en apoplasto, el cual podría ser la fuente de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), relaciona con los cambios morfológicos del sistema radicular de *Arabidopsis* ante la carencia de Pi (Fig42).

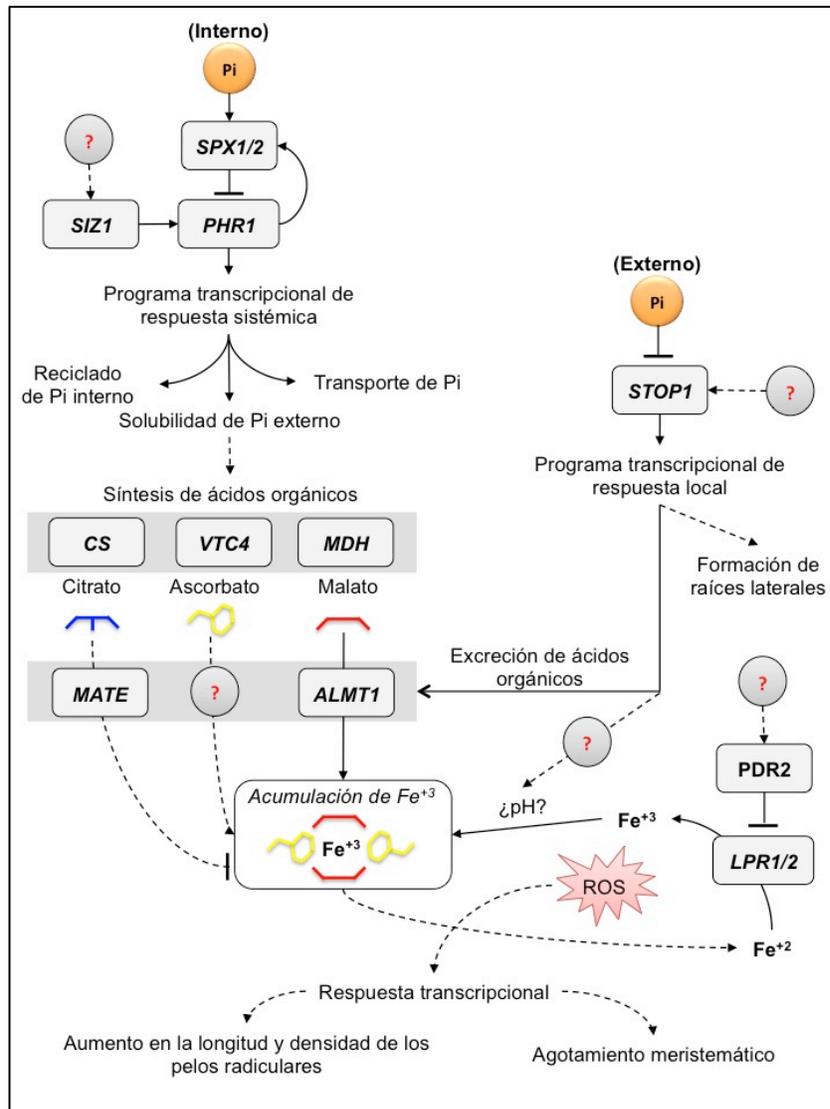


Figura 43. **Propuesta esquemática que integra la respuesta sistémica y la respuesta local a la carencia de Pi en Arabidopsis.** En el diagrama se muestra la ruta de regulación controlada por el estatus de Pi interno en la planta, la ruta de señalización controlada por la disponibilidad de Pi externo en el medio, y la interacción entre ambas rutas que conducen a la producción especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), que desencadena las modificaciones morfológicas del sistema radicular en Arabidopsis ante la carencia de Pi. STOP1 (*SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1*), PDR2 (*PHOSPHATE DEFICIENCY RESPONSE 2*), LPR1 (*LOW PHOSPHATE ROOT 1*), SPX (*SYG/PHO81/XPR1*), SIZ1 (*SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER*), PHR1 (*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1*), CS (*CITRATE SUNTHASE*), VTC4 (*VITAMIN-C 4*), MDH (*MALATE DEHYDROGENASE*), MATE (*MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUION TRANSPORTER*), ALMT1 (*ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1*). El signo de interrogación hace referencia a la posible participación de genes aún desconocidos en el mecanismo de percepción de Pi y respuesta de aclimatación a la carencia de Pi en Arabidopsis. Las figuras azul, amarillo y rojo, representan a las moléculas de citrato, ascorbato y malato, respectivamente. Las líneas llenas indican interacción experimentalmente confirmadas, y las líneas punteadas indican conexiones sugeridas.

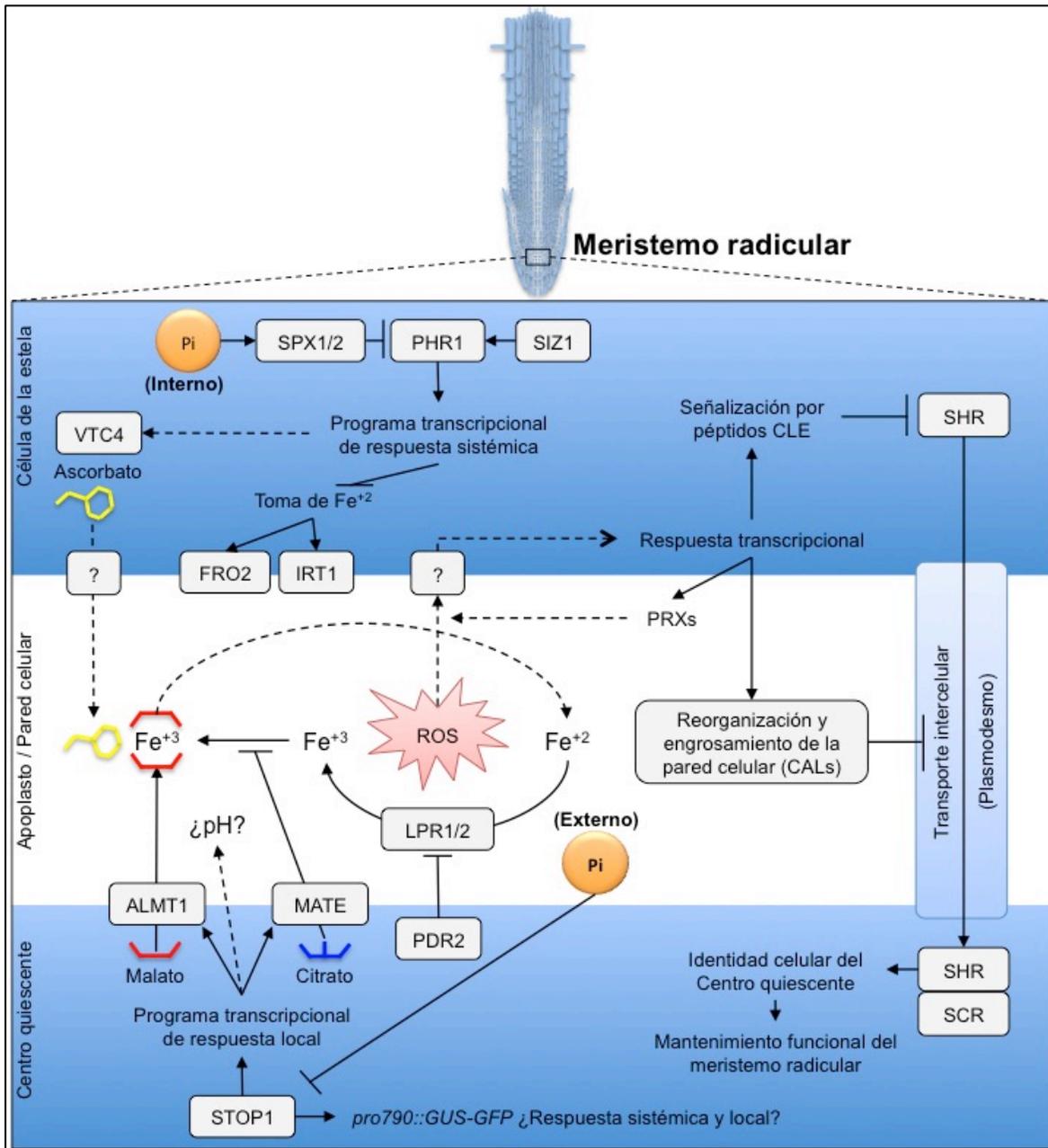


Figura 44. Modelo en donde *STOP1* y *ALMT1*, a través de la excreción de malato al medio, median la diferenciación celular del centro quiescente, lo cual provoca el agotamiento meristemático e inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi. *STOP1* (*SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1*) codifica para un factor de transcripción constitutivamente expresado en células del centro quiescente (QC) e induce la expresión de *ALMT1* (*ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1*) en respuesta a la baja disponibilidad de Pi externo. *ALMT1* codifica para un transportador transmembranal que media la excreción de malato al medio. Aunque se desconoce la función específica de *PDR2*, se sabe que codifica para una proteína ATPasa que inhibe epistáticamente de forma negativa a *LPR1*, un gen constitutivamente expresado en QC. *LPR1* codifica para una proteína multicopper oxidasa (MCO), exportada a la pared celular en donde a través de su capacidad oxido-reductiva, media la oxidación de iones de  $Fe^{2+}$  a  $Fe^{3+}$ . El malato excretado al medio promueve la agregación de los iones de  $Fe^{3+}$  (catalizados por *LPR1*), en

agregados de malato  $\text{Fe}^{+3}$ , lo suficientemente grandes y estables para quedar retenidos entre los polímeros de la pared celular. Es posible que el factor de transcripción STOP1 también controle la formación del tamaño y estructura del agregado de malato- $\text{Fe}^{+3}$ , a través de acidificación del medio (cambios en el pH de la rizósfera), y la inducción de transportadores MATE que media la excreción de citrato a través de la raíz, lo que por una parte aumenta la solubilidad de los iones de Fe, y por otra altera las proporciones de ácidos orgánicos (quelantes naturales de metales) en el medio. Paralelamente, *PHR1* (*PHOSPHATE STARVATION RESPONSE1*, por sus sigla en Inglés) es constitutivamente expresado en los diferentes tejidos de Arabidopsis, y codifica para un factor de transcripción (tipo MYB), que actúa como regulador maestro del programa transcripcional de respuesta sistémica ante la carencia de Pi. *SIZ1* codifica para una proteína que sumoila múltiples veces a *PHR1*, lo cual se ha propuesto lo activa en carencia de Pi. Por su parte las proteínas *SPX1* y *SPX2* (*Syg/Pho81/Xpr1*) secuestran a *PHR1* (interacción proteína-proteína dependiente de Pi o Pi-inositol), impidiendo que se una al sitio de unión P1BS (*GNATATNC*) en el promotor de sus genes blanco, inhibiendo con ello la activación del programa transcripcional de respuesta sistémica a la carencia de Pi. *VTC4* es descrito como un blanco directo de *PHR1*, y codifica para una proteína bifuncional que sintetiza ascorbato en el interior de la planta. Aunque se desconoce si la carencia de Pi induce la excreción de ascorbato al medio (un agente reductor), es posible que su excreción a través de la raíz (por un transportador aún desconocido), reduzca el estado de oxidación de los iones de  $\text{Fe}^{+3}$  aglomerados con malato entre la pared celular. Estableciendo con ello un circuito de óxido-reducción potencialmente involucrado en la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS), que desencadenan el agotamiento del meristemo radicular. La inhibición de *FRO2* ( $\text{Fe}^{+3}$ -reductasa) y de *IRT1* (*IRON-REGULATED TRANSPORTER 1*, transportador transmembranal de  $\text{Fe}^{+2}$ ) en respuesta a la carencia de Pi, mantiene a los iones de  $\text{Fe}^{+2}$  en el apoplasto (posiblemente para contrarrestar el desbalance en la relación de Pi-Fe interno). De cualquier forma, la acumulación y óxido-reducción de  $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$  alrededor del QC (posiblemente potenciada por enzimas peroxidasa PRXs), puede ser la fuente de producción de ROS que induce el programa de transcripción que desencadena la diferenciación de meristemo radicular ante la carencia de Pi. Aparentemente el mecanismo presenta múltiples puntos de control que impiden la localización del factor de transcripción SHR en las células del QC, lo cual en consecuencia provoca la diferenciación del QC, y consecuentemente el agotamiento del meristemo radicular. Por una parte, se induce el engrosamiento de la pared celular que cierra físicamente los plasmodemos (a través de la deposición de callosa sintetizada por proteínas callosa sintasas CALs), lo cual interrumpen el transporte de SHR, de células de la estela hacia las células del QC. Y por otra parte (recientemente publicado por nuestro grupo de investigación)<sup>206</sup>, se induce una señal mediada por péptidos CLE, que inhibe transcripcionalmente la expresión de SHR, lo que en consecuencia también evita la localización de SHR en células del QC, provoca con ello el agotamiento meristemático de la raíz principal ante la carencia de Pi. En el modelo, STOP1 regula localmente la expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP*.

*STOP1* al igual que *PHR1*, codifica para un factor de transcripción constitutivamente expresado y localizado en el núcleo, independientemente de la disponibilidad de Pi. Mientras que *PHR1* actúa como un regulador maestro que controla el programa transcripcional de respuesta sistémica a la carencia de Pi, es posible que *STOP1* actúe como un regulador maestro del programa transcripcional de respuesta local a la carencia de Pi. El estudio de *STOP1* a nivel postranscripcional, traduccional y postraduccional, revelará si forma parte del mecanismo de percepción de Pi en plantas, y en que parte de la ruta de señalización se encuentra.

Paralelamente a la publicación de los resultados científicos de este proyecto, se publicó otro artículo científico en la revista *Nature communication*, con resultados similares a los aquí descritos, los cuales validan la participación de *STOP1* y *ALMT1* como reguladores del desarrollo radicular en *Arabidopsis* ante la carencia de  $Pi^{207}$ . La diferencia es que el grupo de investigación (Francia/Alemania) liderado por el Dr. Desnos, propone que la excreción de malato mediado por el módulo funcional *STOP1/ALMT1*, acelera rápidamente el engrosamiento de la pared de células en proceso de elongación (en la región proximal al meristemo radicular), provocando con ello el acortamiento longitudinal de la raíz principal ante la carencia de Pi. Por lo anterior, se establece a *STOP1* y *ALMT1* como módulo funcional que a través de la excreción de malato al medio, determina el desarrollo del sistema radicular en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi.

*Arabidopsis* naturalmente se desarrolla en suelos con pH ácido, los cuales curiosamente suelen estar acompañados de condiciones tóxicas por  $Al^{+3}$ , carencia de Pi, y una alta disponibilidad de  $Fe^{+3}$ . Con base en los resultados de este trabajo, propongo que la excreción de malato mediada por el módulo funcional *STOP1/ALMT1*, actúa simultáneamente como un mecanismo que además de proteger a la raíz contra la toxicidad por  $Al^{+3}$  y promover la solubilidad de Pi retenido en el medio, modifica el desarrollo del sistema radicular ante el estrés por carencia de Pi. Es posible que la excreción de ácidos orgánicos al medio actúe como un mecanismo que promueva la adquisición o exclusión de metales del suelo, en función del tipo de ácido orgánico excretado por la raíz. Considerando que las raíces de las plantas excretan diversos tipos de ácidos orgánicos (por ejemplo varios de los ácidos orgánicos que componen el ciclo de Krebs), será interesante analizar el efecto de otros ácidos orgánicos en el desarrollo del sistema radicular de plantas crecidas ante diversas condiciones de estrés por carencia o toxicidad mineral.

El uso de la línea reportera *pro790::GUS-GFP/Col-0* resultó eficaz para la identificación de plántulas mutantes (químicamente mutagenizadas con etilmetanosulfonato) afectadas en la respuesta sistémica y respuesta local a la carencia de Pi en Arabidopsis ante la carencia de Pi.

El mapeo genético por secuenciación reveló la identidad de *STOP1* (*SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY 1*) y *ALMT1* (*ALUMINIUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER 1*) como genes que controlan el desarrollo del sistema radicular de Arabidopsis ante la carencia de Pi.

La excreción de malato al medio, regulada por el modulo funcional *STOP1/ALMT1*, modula la acumulación apoplástica de los iones  $\text{Fe}^{+3}$  (entre células del meristemo radicular), previamente relacionada con el agotamiento meristemático e inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal en Arabidopsis ante la carencia de Pi. La intensidad de la inhibición es proporcional a la concentración de malato en el medio.

El factor de transcripción *STOP1* induce la expresión transcripcional de *ALMT1* en la punta de la raíz principal de plántulas de Arabidopsis crecidas en medio con baja disponibilidad de Pi, de manera similar a lo observado cuando la plántula es crecida en concentraciones tóxicas de  $\text{Al}^{+3}$ .

La excreción de ácidos orgánicos al medio (citrato, ascorbato, malato) controla diferencialmente el desarrollo del sistema radicular de Arabidopsis ante la carencia de Pi.

Determinar la región mínima del promotor *At5g20790* necesaria para inducir la expresión reportera de la línea *pro790::GUS-GFP*, y considerar su potencial aplicación como "*marcador inteligente*", para monitorear *in vivo* el estatus de Pi dentro de las plantas, y calendarizar la fertilización con Pi, antes de que ocurran los efectos fisiológicos que comprometen el crecimiento de los cultivos agrícolas.

Analizar la funcionalidad de los siete sitios de unión ART (GGN(T/g/a/C)V(C/A/g)S(C/G)) en el promotor de la línea reportera *pro790::GUS-GFP*, y determinar si *At5g20790* (así como otros genes de respuesta sistémica a la carencia de Pi), es un blanco directo de STOP1.

Cuantificar la cantidad de malato y establecer su región de excreción en la raíz, particularmente para la porción de malato excretado a través del módulo funcional *STOP1/ALMT1* en plántulas de *Arabidopsis* ante la carencia de Pi. Determinar si existen puntos de regulación postranscripcional, traduccional o postraduccional, en el proceso de excreción de malato. Analizar su variación natural de dicho proceso en otros ecotipos de *Arabidopsis* (la inhibición del crecimiento longitudinal de la raíz principal de *Arabidopsis* es un proceso controlado cuantitativamente).

Evaluar la redundancia funcional del parálogo de *STOP1*, *STOP2*, y los 12 genes restantes de la familia de transportadores *ALMT* en *Arabidopsis*.

Integrar el estudio genético de la respuesta a estrés por toxicidad de  $Al^{+3}$  y toxicidad por  $Fe^{+3}$  (y otros metales) ante condiciones de carencia de Pi. Es posible que STOP1 esté controlado por la disponibilidad de metales. No se descarta la posibilidad de que funcione como sensor de Pi, para lo cuál será interesante caracterizar su regulación a nivel postranscripcional, traduccional o

postraducciona en Arabidopsis (y otras especies de plantas) ante condiciones de carencia de Pi.

Analizar el efecto de la excreción de otros ácidos orgánicos (por ejemplo de los del ciclo de Krebs), en el desarrollo del sistema radicular de plantas crecidas ante condiciones tóxicas, o en deficiencia nutricional por otros elementos minerales del suelo. Y determinar si los ácidos orgánicos funcionan como reguladores de la adquisición/exclusión mineral a través de las raíces, en respuesta al desbalance en la homeostasis mineral dentro de las plantas.

Continuar realizando los cálculos de dinámica molecular, para predecir la interacción entre ácidos orgánicos y elementos minerales. Finalmente, considerar la potencial aplicación biotecnológica, del manejo en la excreción de ácidos orgánicos al medio, para conducir el desarrollo del sistema radicular de las plantas, a voluntad en función de la estructura y composición mineral de los suelos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hawkesford, M. *et al.* in *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants: Third Edition* (2011). doi:10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6
2. Godfray, H. C. J. *et al.* Food Security: The Challenge of Feeding 9 Billion People. *Science* (80-. ). (2010). doi:10.1126/science.1185383
3. Marschner, H. in *Mineral Nutrition of Higher Plants* 229–312 (Elsevier, 1995). doi:10.1016/B978-012473542-2/50010-9
4. Sillanpää, M. Micronutrients and the nutrient status of soils: A global study. (1982).
5. Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. *Miner. Nutr. High. Plants* (1995). doi:10.1016/B978-012473542-2/50017-1
6. Cordell, D. in *Eating the Earth - How Should We Eat to Ensure a Sustainable Future? 18th February 2009, UTS, Sydney* (2009).
7. López-Arredondo, D., González-Morales, S. I., Bello-Bello, E., Alejo-Jacuinde, G. & Herrera, L. Engineering food crops to grow in harsh environments. *F1000Research* (2015). doi:10.12688/f1000research.6538.1
8. Lizbeth Opez-Arredondo, D., Leyva-González, M. A., González-Morales, S. I., Opez-Bucio, J. & Herrera-Estrella, L. Phosphate Nutrition: Improving Low-Phosphate Tolerance in Crops. *Annu. Rev. Plant Biol* (2014). doi:10.1146/annurev-arplant-050213-035949
9. López-Arredondo, D. L. & Herrera-Estrella, L. A novel dominant selectable system for the selection of transgenic plants under in vitro and greenhouse conditions based on phosphite metabolism. *Plant Biotechnol. J.* (2013). doi:10.1111/pbi.12063
10. López-Arredondo, D. L., Leyva-González, M. A., Alatorre-Cobos, F. & Herrera-Estrella, L. Biotechnology of nutrient uptake and assimilation in plants. *International Journal of Developmental Biology* (2013). doi:10.1387/ijdb.130268lh
11. Gilbert, N. Environment: The disappearing nutrient. *Nature* (2009). doi:10.1038/461716a
12. Schachtman, D. P., Reid, R. J. & Ayling, S. M. Phosphorus Uptake Phosphorus Uptake by Plants : From Soil to Cell. *Plant Physiol.* (1998). doi:http://dx.doi.org/10.1104/pp.116.2.447
13. Vance, C. P., Uhde-Stone, C. & Allan, D. L. Phosphorus acquisition and use: Critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource. *New Phytologist* (2003). doi:10.1046/j.1469-8137.2003.00695.x
14. Raghothama, K. G. & Karthikeyan, A. S. Phosphate acquisition. *Plant and Soil* (2005). doi:10.1007/s11104-004-2005-6
15. Smith, F. W., Mudge, S. R., Rae, A. L. & Glassop, D. in *Structure and Functioning of Cluster Roots and Plant Responses to Phosphate Deficiency* **97**, 71–83 (Springer Netherlands, 2003).
16. Liu, J. *et al.* A vacuolar phosphate transporter essential for phosphate homeostasis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2015). doi:10.1073/pnas.1514598112
17. Liu, T.-Y. *et al.* Identification of plant vacuolar transporters mediating phosphate storage. *Nat. Commun.* (2016). doi:10.1038/ncomms11095
18. Pratt, J. *et al.* Phosphate (Pi) starvation effect on the cytosolic Pi concentration and Pi exchanges across the tonoplast in plant cells: an in vivo <sup>31</sup>P-nuclear magnetic resonance study using methylphosphonate as a Pi analog. *Plant Physiol.* **151**, 1646–57 (2009).
19. United Nations. World Population Prospects - Population Division - United Nations. *World Population Prospects - 2015 Revision* (2015).
20. Tian, J., Bryksa, B. C. & Yada, R. Y. Feeding the world into the future - food and nutrition security: the role of food science and technology. *Front. Life Sci.* (2016). doi:10.1080/21553769.2016.1174958
21. Cordell, D., Drangert, J. & White, S. The story of phosphorus: global food security and food for thought. *Glob. Environ. Chang.* (2009). doi:10.1016/j.gloenvcha.2008.10.009
22. Koppelaar, R. H. E. M. & Weikard, H. P. Assessing phosphate rock depletion and phosphorus recycling options. *Glob. Environ. Chang.* (2013). doi:10.1016/j.gloenvcha.2013.09.002
23. Marschner, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. *Acad. Press* 379–396 (1995). doi:10.1016/B978-012473542-2/50011-0
24. Morcuende, R. *et al.* Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks

- of Arabidopsis in response to phosphorus. *Plant, Cell Environ.* (2007). doi:10.1111/j.1365-3040.2006.01608.x
25. WATSON, J. D. & CRICK, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
  26. FRANKLIN, R. E. & GOSLING, R. G. Molecular Configuration in Sodium Thymonucleate. *Nature* (1953). doi:10.1038/171740a0
  27. Franklin, R. E. & Gosling, R. G. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* (1953). doi:10.1038/172156a0
  28. Taylor, C. B., Bariola, P. A., Delcardayrtt, S. B., Rainest, R. T. & Green, P. J. RNS2: A senescence-associated RNase of Arabidopsis that diverged from the S-RNases before speciation. *Plant Biol.* **90**, 5118–5122 (1993).
  29. Liu, C., Muchhal, U. S. & Raghothama, K. G. Differential expression of TPS11, a phosphate starvation-induced gene in tomato. *Plant Mol. Biol.* (1997). doi:10.1023/A:1005729309569
  30. Wu, P. *et al.* Phosphate Starvation Triggers Distinct Alterations of Genome Expression in Arabidopsis Roots and Leaves 1[w]. doi:10.1104/pp.103.021022
  31. Jain, A., Nagarajan, V. K. & Raghothama, K. G. Transcriptional regulation of phosphate acquisition by higher plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* (2012). doi:10.1007/s00018-012-1090-6
  32. Lin, H.-J. *et al.* Transcriptional responses of maize seedling root to phosphorus starvation. *Mol. Biol. Rep.* **40**, 5359–5379 (2013).
  33. Qing Wang, Jiao Wang, Yuming Yang, Wenkai Du, Dan Zhang, D. Y. and H. C. A genome-wide expression profile analysis reveals active genes and pathways coping with phosphate starvation in soybean. *BMC Genomics* (2016). doi:10.1186/s12864-016-2558-9
  34. Misson, J. *et al.* A genome-wide transcriptional analysis using Arabidopsis thaliana Affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2005). doi:10.1073/pnas.0505266102
  35. Calderon-Vazquez, C., Ibarra-Laclette, E., Caballero-Perez, J. & Herrera-Estrella, L. Transcript profiling of Zea mays roots reveals gene responses to phosphate deficiency at the plant- and species-specific levels. *J. Exp. Bot.* (2008). doi:10.1093/jxb/ern115
  36. Chacón-López, A., Ibarra-Laclette, E., Sánchez-Calderón, L., Gutiérrez-Alanis, D. & Herrera-Estrella, L. Global expression pattern comparison between low phosphorus insensitive 4 and WT Arabidopsis reveals an important role of reactive oxygen species and jasmonic acid in the root tip response to phosphate starvation. *Plant Signal. Behav.* **6**, 382–92 (2011).
  37. Woo, J. *et al.* The response and recovery of the Arabidopsis thaliana transcriptome to phosphate starvation.
  38. Cruz-Ramírez, A., Oropeza-Aburto, A., Razo-Hernández, F., Ramírez-Chávez, E. & Herrera-Estrella, L. Phospholipase DZ2 plays an important role in extraplasmidic galactolipid biosynthesis and phosphate recycling in Arabidopsis roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006). doi:10.1073/pnas.0600863103
  39. Smith, F., Mudge, S., Rae, A. & Glassop, D. in *Structure and Functioning of Cluster Roots and Plant Responses to Phosphate Deficiency SE - 6* (2003). doi:10.1007/978-94-010-0243-1\_6
  40. Nussaume, L. *et al.* Phosphate import in plants: focus on the PHT1 transporters. *Front. Plant Sci.* (2011). doi:10.3389/fpls.2011.00083
  41. Poirier, Y. & Jung, J.-Y. in *Annual Plant Reviews Volume 48* 125–158 (John Wiley & Sons, Inc., 2015). doi:10.1002/9781118958841.ch5
  42. Shu, B., Xia, R. X. & Wang, P. Differential regulation of Pht1 phosphate transporters from trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf) seedlings. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. (2012). doi:10.1016/j.scienta.2012.08.014
  43. Liu, J. *et al.* Closely related members of the Medicago truncatula PHT1 phosphate transporter gene family encode phosphate transporters with distinct biochemical activities. *J. Biol. Chem.* (2008). doi:10.1074/jbc.M802695200
  44. Bayle, V. *et al.* Arabidopsis thaliana high-affinity phosphate transporters exhibit multiple levels of posttranslational regulation. *Plant Cell* (2011). doi:10.1105/tpc.110.081067
  45. Wu, Z. *et al.* Molecular cloning, characterization and expression analysis of two members of the Pht1 family of phosphate transporters in Glycine max. *PLoS One* (2011).

- doi:10.1371/journal.pone.0019752
46. Volpe, V., Giovannetti, M., Sun, X. G., Fiorilli, V. & Bonfante, P. The phosphate transporters LjPT4 and MtPT4 mediate early root responses to phosphate status in non mycorrhizal roots. *Plant, Cell Environ.* (2016). doi:10.1111/pce.12659
  47. Wang, D., Lv, S., Jiang, P. & Li, Y. Roles, Regulation, and Agricultural Application of Plant Phosphate Transporters. *Front. Plant Sci.* (2017). doi:10.3389/fpls.2017.00817
  48. Muchhal, U. S. & Raghothama, K. G. Transcriptional regulation of plant phosphate transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (1999). doi:10.1073/pnas.96.10.5868
  49. Poirier, Y. & Jung, J.-Y. *chapter 5 Phosphate Transporters. Annual Plant Reviews Volume 48* (2015). doi:10.1002/9781118958841.ch5
  50. Lin, H. J. *et al.* Transcriptional responses of maize seedling root to phosphorus starvation. *Mol. Biol. Rep.* (2013). doi:10.1007/s11033-013-2636-x
  51. Młodzińska, E. & Zboińska, M. Phosphate Uptake and Allocation - A Closer Look at *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L. *Front. Plant Sci.* (2016). doi:10.3389/fpls.2016.01198
  52. Bari, R., Pant, B. D., Stitt, M. & Scheible, W.-R. R. PHO2, MicroRNA399, and PHR1 Define a Phosphate-Signaling Pathway in Plants. *PLANT Physiol.* (2006). doi:10.1104/pp.106.079707
  53. Smith, F. W., Ealing, P. M., Dong, B. & Delhaize, E. The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant J.* (1997). doi:10.1046/j.1365-313X.1997.11010083.x
  54. Daram, P. *et al.* Pht2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from *Arabidopsis*. *Plant Cell* (1999). doi:10.2307/3871016
  55. Ai, P., Sun, S., Zhao, J. & Xu, G. Regulation and function of Pht1 family phosphate transporters in rice. *Proc. Int. Plant Nutr. Colloq. XVI UC Davis* (2009). doi:10.1093/pcp/pcp073
  56. Karthikeyan, A. S. *et al.* Regulated expression of *Arabidopsis* phosphate transporters. *Plant Physiol.* (2002). doi:10.1104/pp.020007
  57. Sillanpää, M. *Micronutrients and the nutrient status of soils: a global study. FAO soils bulletin CN - S592.6.T7 S538 1982* (1982).
  58. Marschner, P. *et al. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants* (2012). doi:10.1016/B978-0-12-384905-2.00030-3
  59. Tran, H. T., Hurley, B. A. & Plaxton, W. C. Feeding hungry plants: The role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition. *Plant Science* (2010). doi:10.1016/j.plantsci.2010.04.005
  60. Duff, S. M., Plaxton, W. C. & Lefebvre, D. D. Phosphate-starvation response in plant cells: de novo synthesis and degradation of acid phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1991).
  61. Li, D. *et al.* Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M204183200
  62. Liu, J. Q., Allan, D. L. & Vance, C. P. Systemic signaling and local sensing of phosphate in common bean: Cross-talk between photosynthate and microRNA399. *Mol. Plant* (2010). doi:10.1093/mp/ssq008
  63. Li, D. *et al.* Purple acid phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. Comparative analysis and differential regulation by phosphate deprivation. *J Biol Chem* (2002). doi:10.1074/jbc.M204183200
  64. Li, D. *et al.* Purple Acid Phosphatases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* (2002). doi:10.1074/jbc.M204183200
  65. Franco-Zorrilla, J. M. *et al.* The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation. *J. Exp. Bot.* (2004).
  66. Pittman, J., Versaw, W., Spetea, C., Młodzi, E. & Zboi, M. Phosphate Uptake and Allocation – A Closer Look at *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L. doi:10.3389/fpls.2016.01198
  67. Mitsukawa, N., Okumura, S. & Shibata, D. High-affinity phosphate transporter genes of *Arabidopsis thaliana*. *Soil Sci. Plant Nutr.* (1997).
  68. Williamson, L. C., Ribrioux, S., Fitter, A. H. & Leyser, H. M. O. Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* (2001).

- doi:10.1104/pp.126.2.875
69. López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A. & Herrera-Estrella, L. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* (2003). doi:10.1016/S1369-5266(03)00035-9
  70. Sato, A. & Miura, K. Root architecture remodeling induced by phosphate starvation. *Plant Signal. Behav.* (2011). doi:10.4161/psb.6.8.15752
  71. Svistoonoff, S. *et al.* Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat. Genet.* (2007). doi:10.1038/ng2041
  72. Ruiz Herrera, L. F., Shane, M. W. & Lopez-Bucio, J. Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* (2015). doi:10.1002/wdev.183
  73. Wang, Z. *et al.* Hormonal interactions during cluster-root development in phosphate-deficient white lupin (*Lupinus albus* L.). *J. Plant Physiol.* (2015). doi:10.1016/j.jplph.2014.10.022
  74. Wang, Z., Shen, J., Ludewig, U. & Neumann, G. A re-assessment of sucrose signaling involved in cluster-root formation and function in phosphate-deficient white lupin (*Lupinus albus*). *Physiol. Plant.* (2015). doi:10.1111/ppl.12311
  75. Wang, Z. *et al.* The regulatory network of cluster-root function and development in phosphate-deficient white lupin (*Lupinus albus*) identified by transcriptome sequencing. *Physiol. Plant.* (2014). doi:10.1111/ppl.12187
  76. Gardner, W. K., Parbery, D. G. & Barber, D. A. The acquisition of phosphorus by *Lupinus albus* L. - I. Some characteristics of the soil/root interface. *Plant Soil* (1982). doi:10.1007/BF02374724
  77. Ward, J. T., Lahner, B., Yakubova, E., Salt, D. E. & Raghothama, K. G. The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol.* (2008). doi:10.1104/pp.108.118562
  78. Sánchez-Calderón, L. *et al.* Characterization of low phosphorus insensitive Mutants Reveals a Crosstalk between Low Phosphorus-Induced Determinate Root Development and the Activation of Genes Involved in the Adaptation of *Arabidopsis* to Phosphorus Deficiency. *Plant Physiol.* **140**, (2006).
  79. Sánchez-Calderón, L. *et al.* Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* (2005). doi:10.1093/pcp/pci011
  80. Péret, B., Clément, M., Nussaume, L. & Desnos, T. Root developmental adaptation to phosphate starvation: Better safe than sorry. *Trends in Plant Science* (2011). doi:10.1016/j.tplants.2011.05.006
  81. *Arabidopsis*, L. *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* (1983).
  82. Arabidopsis Genome Initiative, A. G. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* (2000).
  83. Assmann, S. M. Natural variation in abiotic stress and climate change responses in *Arabidopsis*: Implications for twenty-first century agriculture. *Int. J. Plant Sci.* (2013). doi:10.1086/667798
  84. Reiter, W.-D. *Arabidopsis thaliana* as a model system to study synthesis, structure, and function of the plant cell wall. *Plant Physiol. Biochem.* (1998).
  85. Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D. & Koornneef, M. *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* (80-. ). (1998). doi:10.1126/science.282.5389.662
  86. Meyerowitz, E. M. & Pruitt, R. E. *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science* (80-. ). (1985). doi:10.1126/science.229.4719.1214
  87. Sánchez-Calderó, L. *et al.* Characterization of low phosphorus insensitive Mutants Reveals a Crosstalk between Low Phosphorus-Induced Determinate Root Development and the Activation of Genes Involved in the Adaptation of *Arabidopsis* to Phosphorus Deficiency 1. doi:10.1104/pp.105.073825
  88. Aichinger, E., Kornet, N., Friedrich, T. & Laux, T. Plant Stem Cell Niches. *Annu. Rev. Plant Biol* (2012). doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105555
  89. Bennett, T. & Scheres, B. Root development-two meristems for the price of one? *Curr. Top. Dev. Biol.* (2010). doi:10.1016/S0070-2153(10)91003-X
  90. Ruiz Herrera, L. F., Shane, M. W. & López-Bucio, J. Nutritional regulation of root

- development. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* (2015). doi:10.1002/wdev.183
91. Hirsch, J. *et al.* Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in Arabidopsis plants. *Biochimie* **88**, 1767–1771 (2006).
  92. Bournier, M. *et al.* 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. *J. Biol. Chem.* (2013). doi:10.1074/jbc.M113.482281
  93. WALLACE, P. EXCESS PHOSPHORUS and IRON CHLOROSIS. *Calif. Agric.* (1965).
  94. Brumbarova, T. & Bauer, P. *Iron uptake and transport in plants. Plant Membrane and Vacuolar Transporters* (2008).
  95. Curie, C. & Mari, S. New routes for plant iron mining. *New Phytologist* (2017). doi:10.1111/nph.14364
  96. Müller, J. *et al.* Iron-Dependent Callose Deposition Adjusts Root Meristem Maintenance to Phosphate Availability. *Dev. Cell* (2015). doi:10.1016/j.devcel.2015.02.007
  97. Ticconi, C. A. *et al.* ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2009). doi:10.1073/pnas.0901778106
  98. Abercrombie, J. M. *et al.* BMC Plant Biology Transcriptional responses of Arabidopsis thaliana plants to As (V) stress. doi:10.1186/1471-2229-8-87
  99. Alatorre-Cobos, F. *et al.* An improved, low-cost, hydroponic system for growing Arabidopsis and other plant species under aseptic conditions. *BMC Plant Biol.* (2014). doi:10.1186/1471-2229-14-69
  100. Thibaud, M. C. *et al.* Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in Arabidopsis. *Plant J.* (2010). doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04375.x
  101. Bari, R. PHO2, MicroRNA399, and PHR1 Define a Phosphate-Signaling Pathway in Plants. *PLANT Physiol.* (2006). doi:10.1104/pp.106.079707
  102. Lin, S. I. *et al.* Regulatory network of microRNA399 and PHO2 by systemic signaling. *Plant Physiol.* (2008). doi:10.1104/pp.108.116269
  103. Liu, J. & Vance, C. P. Crucial roles of sucrose and microRNA399 in systemic signaling of P deficiency: a tale of two team players? *Plant Signal. Behav.* (2010). doi:10.4161/psb.5.12.13293
  104. Pant, B. D., Buhtz, A., Kehr, J. & Scheible, W. R. MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. *Plant J.* (2008). doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03363.x
  105. Aung, K. pho2, a Phosphate Overaccumulator, Is Caused by a Nonsense Mutation in a MicroRNA399 Target Gene. *PLANT Physiol.* (2006). doi:10.1104/pp.106.078063
  106. Lin, S.-I. & Chiou, T.-J. Long-distance movement and differential targeting of microRNA399s. *Plant Signal. Behav.* (2008). doi:10.4161/psb.3.9.6488
  107. Chiou, T.-J. Regulation of Phosphate Homeostasis by MicroRNA in Arabidopsis. *PLANT CELL ONLINE* (2006). doi:10.1105/tpc.105.038943
  108. Lenburg, M. E. & O'Shea, E. K. Signaling phosphate starvation. *Trends in Biochemical Sciences* (1996). doi:10.1016/0968-0004(96)10048-7
  109. Lei, M. *et al.* Genetic and Genomic Evidence That Sucrose Is a Global Regulator of Plant Responses to Phosphate Starvation in Arabidopsis. *PLANT Physiol.* (2011). doi:10.1104/pp.110.171736
  110. Rosenberg, H., Gerdes, R. G. & Chegwidden, K. Two Systems for the Uptake of Phosphate in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* 505–511 (1977).
  111. Chekabab, S. M., Harel, J. & Dozois, C. M. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence* **5**, 786–93 (2014).
  112. Bergwitz, C. & Jüppner, H. Phosphate sensing. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **18**, 132–44 (2011).
  113. Wanner, B. L. Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of Escherichia coli. *Kidney Int.* **49**, 964–967 (1996).
  114. Hsieh, Y.-J. & Wanner, B. L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 198–203 (2010).
  115. Torriani, A. From cell membrane to nucleotides: The phosphate regulon in Escherichia coli. *BioEssays* **12**, 371–376 (1990).
  116. Qi, W., Baldwin, S. A., Muench, S. P. & Baker, A. Pi sensing and signalling: from

- prokaryotic to eukaryotic cells. *Biochem. Soc. Trans.* **44**, (2016).
117. Wykoff, D. D. & O'Shea, E. K. Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae* 1 469 469. *Genetics* (2001).
  118. Wykoff, D. D. & O'Shea, E. K. Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* (2001).
  119. Mouillon, J. M. & Persson, B. L. New aspects on phosphate sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* (2006).
  120. Bun-ya, M. *et al.* Two new genes, PHO86 and PHO87, involved in inorganic phosphate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* (1996). doi:10.1007/s002940050055
  121. Yompakdee, C. *et al.* A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* (1996). doi:10.1016/0378-1119(96)00079-0
  122. Nieuwenhuis, B. J. W. M. & Borst-Pauwels, G. W. F. H. Derepression of the high-affinity phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *BBA - Biomembr.* (1984). doi:10.1016/0005-2736(84)90071-3
  123. Pattison-Granberg, J. & Persson, B. L. Regulation of cation-coupled high-affinity phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* (2000). doi:10.1128/JB.182.17.5017-5019.2000
  124. Smith, F. W. The phosphate uptake mechanism. *Plant Soil* (2002). doi:10.1023/A:1020660023284
  125. Carter-O'Connell, I., Peel, M. T., Wykoff, D. D. & O'Shea, E. K. Genome-wide characterization of the phosphate starvation response in *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Genomics* (2012). doi:10.1186/1471-2164-13-697
  126. Fairbanks, M. M., Hardy, G. E. S. J. & McComb, J. A. Mitosis and meiosis in plants are affected by the fungicide phosphite. *Australas. Plant Pathol.* (2002). doi:10.1071/AP02025
  127. Willsky, G. R. & Malamy, M. H. Effect of arsenate on inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* (1980).
  128. Daram, P. *et al.* Pht2;1 Encodes a Low-Affinity Phosphate Transporter from Arabidopsis. *Plant Cell Online* **11**, (1999).
  129. Lagerstedt, J. O., Voss, J. C., Wieslander, Å. & Persson, B. L. Structural modeling of dual-affinity purified Pho84 phosphate transporter. *FEBS Lett.* (2004). doi:10.1016/j.febslet.2004.11.012
  130. Kang, J. *et al.* Plant ABC Transporters. *Arab. B.* **9**, e0153 (2011).
  131. Zhang, Z., Liao, H. & Lucas, W. J. Molecular mechanisms underlying phosphate sensing, signaling, and adaptation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* (2014). doi:10.1111/jipb.12163
  132. Rouached, H. & Tran, L.-S. Regulation of Plant Mineral Nutrition: Transport, Sensing and Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 29717–29719 (2015).
  133. Rubio, V. *et al.* A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev.* (2001). doi:10.1101/gad.204401.availability
  134. Acevedo-Hernández, G., Oropeza-Aburto, A. & Herrera-Estrella, L. A specific variant of the PHR1 binding site is highly enriched in the Arabidopsis phosphate-responsive phospholipase DZ2 coexpression network. *Plant Signal. Behav.* (2012). doi:10.4161/psb.20749
  135. Bustos, R. *et al.* A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in arabidopsis. *PLoS Genet.* (2010). doi:10.1371/journal.pgen.1001102
  136. Wang, J. *et al.* A phosphate starvation response regulator Ta-PHR1 is involved in phosphate signalling and increases grain yield in wheat. *Ann. Bot.* (2013). doi:10.1093/aob/mct080
  137. Sun, L., Song, L., Zhang, Y., Zheng, Z. & Liu, D. Arabidopsis PHL2 and PHR1 Act Redundantly as the Key Components of the Central Regulatory System Controlling Transcriptional Responses to Phosphate Starvation. *Plant Physiol.* (2016). doi:10.1104/pp.15.01336
  138. Duan, K. *et al.* Characterization of a sub-family of Arabidopsis genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation. *Plant J.* (2008).

- doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03460.x
139. Poirier, Y., Thoma, S., Somerville, C. & Schiefelbein, J. Mutant of Arabidopsis deficient in xylem loading of phosphate. *Plant Physiol.* (1991). doi:10.1104/pp.97.3.1087
  140. Delhaize, E. & Randall, P. J. Characterization of a Phosphate-Accumulator Mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* (1995). doi:107/1/207 [pii]
  141. Secco, D., Baumann, A. & Poirier, Y. Characterization of the Rice PHO1 Gene Family Reveals a Key Role for OsPHO1;2 in Phosphate Homeostasis and the Evolution of a Distinct Clade in Dicotyledons. *PLANT Physiol.* (2010). doi:10.1104/pp.109.149872
  142. Wang, Y., Ribot, C., Rezzonico, E. & Poirier, Y. Structure and expression profile of the Arabidopsis PHO1 gene family indicates a broad role in inorganic phosphate homeostasis. *Plant Physiol.* (2004). doi:10.1104/pp.103.037945
  143. Wege, S. *et al.* The EXS Domain of PHO1 Participates in the Response of Shoots to Phosphate Deficiency via a Root-to-Shoot Signal. *Plant Physiol.* (2016). doi:10.1104/pp.15.00975
  144. Stefanovic, A. *et al.* Over-expression of PHO1 in Arabidopsis leaves reveals its role in mediating phosphate efflux. *Plant J.* (2011). doi:10.1111/j.1365-313X.2011.04532.x
  145. Rouached, H. *et al.* Uncoupling phosphate deficiency from its major effects on growth and transcriptome via PHO1 expression in Arabidopsis. *Plant J.* (2011). doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04442.x
  146. Stefanovic, A. *et al.* Members of the PHO1 gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways. *Plant J.* (2007). doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03108.x
  147. Puga, M. I. *et al.* SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 in Arabidopsis. doi:10.1073/pnas.1404654111
  148. Puga, M. I. *et al.* SPX1 is a phosphate-dependent inhibitor of PHOSPHATE STARVATION RESPONSE 1 in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2014). doi:10.1073/pnas.1404654111
  149. Phusion DNA Polymerases.
  150. Zhou, C., Yang, Y. & Jong, A. Y. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172–3 (1990).
  151. Abe, A. *et al.* Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. *Nat. Biotechnol.* (2012). doi:10.1038/nbt.2095
  152. Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. & Bevan, M. W. GUS fusions: B-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker. *EMBO J.* **6**, 3901–3907. (1987).
  153. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–54 (1976).
  154. Takagi, H. *et al.* MutMap-Gap: Whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene Pii. *New Phytol.* (2013). doi:10.1111/nph.12369
  155. Fekih, R. *et al.* MutMap+: Genetic Mapping and Mutant Identification without Crossing in Rice. *PLoS One* (2013). doi:10.1371/journal.pone.0068529
  156. Takagi, H. *et al.* MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. *Nat. Biotechnol.* (2015). doi:10.1038/nbt.3188
  157. Yamaguchi, M. *et al.* Evidence for the plasma membrane localization of Al-activated malate transporter (ALMT1). *Plant Cell Physiol.* (2005). doi:10.1093/pcp/pci083
  158. Hoekenga, O. A. *et al.* AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2006). doi:10.1073/pnas.0602868103
  159. Iuchi, S. *et al.* Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2007). doi:10.1073/pnas.0700117104
  160. Iuchi, S., Kobayashi, Y., Koyama, H. & Kobayashi, M. STOP1, a Cys2/His2 type zinc-finger protein, plays critical role in acid soil tolerance in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* (2008).
  161. Kobayashi, Y. *et al.* STOP2 activates transcription of several genes for Al- and low pH-tolerance that are regulated by STOP1 in Arabidopsis. *Mol. Plant* (2014). doi:10.1093/mp/sst116
  162. Iuchi, S. *et al.* Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2007).

- doi:10.1073/pnas.0700117104
163. Sawaki, Y. *et al.* STOP1 Regulates Multiple Genes That Protect Arabidopsis from Proton and Aluminum Toxicities. *PLANT Physiol.* (2009). doi:10.1104/pp.108.134700
  164. Liu, J. *et al.* A promoter-swap strategy between the AtALMT and AtMATE genes increased Arabidopsis aluminum resistance and improved carbon-use efficiency for aluminum resistance. *Plant J.* (2012). doi:10.1111/j.1365-313X.2012.04994.x
  165. Ding, Z. J., Yan, J. Y., Xu, X. Y., Li, G. X. & Zheng, S. J. WRKY46 functions as a transcriptional repressor of ALMT1, regulating aluminum-induced malate secretion in Arabidopsis. *Plant J.* (2013). doi:10.1111/tpj.12337
  166. Hoekenga, O. A. *et al.* AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2006). doi:10.1073/pnas.0602868103
  167. Ticconi, C. A. *et al.* ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 14174–14179 (2009).
  168. Reymond, M., Svistoonoff, S., Loudet, O., Nussaume, L. & Desnos, T. Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in Arabidopsis thaliana. *Plant, Cell Environ.* (2006). doi:10.1111/j.1365-3040.2005.01405.x
  169. López-Bucio, J., de La Vega, O. M., Guevara-García, A. & Herrera-Estrella, L. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat. Biotechnol.* (2000). doi:10.1038/74531
  170. Tanaka, N. *et al.* Characteristics of a root hair-less line of Arabidopsis thaliana under physiological stresses. *J. Exp. Bot.* (2014). doi:10.1093/jxb/eru014
  171. Gerke, J. The acquisition of phosphate by higher plants: Effect of carboxylate release by the roots. A critical review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* (2015). doi:10.1002/jpln.201400590
  172. Hoehenwarter, W. *et al.* Comparative expression profiling reveals a role of the root apoplast in local phosphate response. *BMC Plant Biol.* (2016). doi:10.1186/s12870-016-0790-8
  173. Chen, Z. C. & Liao, H. Organic acid anions: An effective defensive weapon for plants against aluminum toxicity and phosphorus deficiency in acidic soils. *Journal of Genetics and Genomics* (2016). doi:10.1016/j.jgg.2016.11.003
  174. Fageria, N. K., Moreira, A. & dos Santos, A. B. Phosphorus Uptake and Use Efficiency in Field Crops. *J. Plant Nutr.* (2013). doi:10.1080/01904167.2013.816728
  175. Qi, W., Baldwin, S. A., Muench, S. P. & Baker, A. Pi sensing and signalling: from prokaryotic to eukaryotic cells. *Biochem. Soc. Trans.* (2016). doi:10.1042/BST20160026
  176. Dick, C. F., Dos-Santos, A. L. A. & Meyer-Fernandes, J. R. Inorganic phosphate uptake in unicellular eukaryotes. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (2014). doi:10.1016/j.bbagen.2014.03.014
  177. Chang, C. & Stewart, R. C. The two-component system. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes and eukaryotes. *Plant Physiol.* (1998). doi:10.1104/pp.117.3.723
  178. Tomar, P. & Sinha, H. Conservation of PHO pathway in ascomycetes and the role of Pho84. *Journal of Biosciences* (2014). doi:10.1007/s12038-014-9435-y
  179. Tsutsui, T., Yamaji, N. & Feng Ma, J. Identification of a Cis-Acting Element of ART1, a C2H2-Type Zinc-Finger Transcription Factor for Aluminum Tolerance in Rice. *PLANT Physiol.* (2011). doi:10.1104/pp.111.175802
  180. Tokizawa, M. *et al.* SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1, CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR2, and other transcription factors are involved in ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER1 expression. *Plant Physiol.* (2015). doi:10.1104/pp.114.256552
  181. Benitez-Alfonso, Y., Jackson, D. & Maule, A. Redox regulation of intercellular transport. *Protoplasma* (2011). doi:10.1007/s00709-010-0243-4
  182. Sager, R. & Lee, J. Y. Plasmodesmata in integrated cell signalling: Insights from development and environmental signals and stresses. *Journal of Experimental Botany* (2014). doi:10.1093/jxb/eru365
  183. Tokizawa, M. *et al.* STOP1, CAMTA2 and other transcription factors are involved in aluminum-inducible AtALMT1 expression. *Plant Physiol.* (2015). doi:10.1104/pp.114.256552

184. Shavrukov, Y. & Hirai, Y. Good and bad protons: Genetic aspects of acidity stress responses in plants. *J. Exp. Bot.* (2016). doi:10.1093/jxb/erv437
185. Raman, H. *et al.* Molecular characterization and mapping of ALMT1, the aluminium-tolerance gene of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome* (2005). doi:10.1139/g05-054
186. Ryan, P. R., Delhaize, E. & Randall, P. J. Characterisation of Al-stimulated efflux of malate from the apices of Al-tolerant wheat roots. *Planta An Int. J. Plant Biol.* (1995). doi:10.1007/BF00193223
187. Osawa, H. & Matsumoto, H. Possible involvement of protein phosphorylation in aluminum-responsive malate efflux from wheat root apex. *Plant Physiol.* (2001). doi:10.1104/pp.126.1.411
188. Liu, J., Magalhaes, J. V., Shaff, J. & Kochian, L. V. Aluminum-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer Arabidopsis aluminum tolerance. *Plant J.* (2009). doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03696.x
189. Iuchi, S., Kobayashi, Y., Koyama, H. & Kobayashi, M. STOP1, a Cys2/His2 type zinc-finger protein, plays critical role in acid soil tolerance in Arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* (2008). doi:10.4161/psb.3.2.5037
190. Sawaki, Y. *et al.* Identification of a STOP1-like protein in Eucalyptus that regulates transcription of Al tolerance genes. *Plant Sci.* (2014). doi:10.1016/j.plantsci.2014.02.011
191. Motoda, H. *et al.* The Membrane Topology of ALMT1, an Aluminum-Activated Malate Transport Protein in Wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Signal. Behav.* (2007). doi:10.4161/psb.2.6.4801
192. Ryan, P., Delhaize, E. & Randall, P. Malate Efflux From Root Apices and Tolerance to Aluminium Are Highly Correlated in Wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* (1995). doi:10.1071/PP9950531
193. Fan, W., Lou, H. Q., Yang, J. L. & Zheng, S. J. The roles of STOP1-like transcription factors in aluminum and proton tolerance. *Plant Signal. Behav.* (2016). doi:10.1080/15592324.2015.1131371
194. Hoekenga, O. A. *et al.* AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9738–43 (2006).
195. Inostroza-Blancheteau, C., Soto, B., Ulloa, P., Aquea, F. & Reyes-Díaz, M. RESISTANCE MECHANISMS OF ALUMINUM (Al<sup>3+</sup>) PHYTOTOXICITY IN CEREALS: PHYSIOLOGICAL, GENETIC AND MOLECULAR BASES. *J. Soil Sc. Plant Nutr* (2008).
196. Sawaki, Y. *et al.* STOP1 regulates multiple genes that protect arabidopsis from proton and aluminum toxicities. *Plant Physiol.* (2009). doi:10.1104/pp.108.134700
197. You, J. *et al.* Transcriptomic responses to aluminum stress in soybean roots. *Genome* (2011). doi:10.1139/g11-060
198. Christ, R. a. Iron requirement and iron uptake from various iron compounds by different plant species. *Plant Physiol.* (1974).
199. Inostroza-Blancheteau, C. *et al.* Molecular and physiological strategies to increase aluminum resistance in plants. *Mol. Biol. Rep.* (2012). doi:10.1007/s11033-011-0954-4
200. Hammond, J. P. & White, P. J. Sucrose transport in the phloem: integrating root responses to phosphorus starvation. *J. Exp. Bot.* **59**, 93–109 (2007).
201. Nilsson, L., Müller, R. & Nielsen, T. H. Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. *Physiol. Plant.* **139**, 129–143 (2010).
202. Herrera-Estrella, L., López-Bucio, J., de la Vega, O. M. & Guevara-García, A. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nat. Biotechnol.* **18**, 450–453 (2000).
203. Rouached, H., Arpat, A. B. & Poirier, Y. Regulation of Phosphate Starvation Responses in Plants: Signaling Players and Cross-Talks. *Mol. Plant* **3**, 288–299 (2010).
204. Bustos, R. *et al.* A Central Regulatory System Largely Controls Transcriptional Activation and Repression Responses to Phosphate Starvation in Arabidopsis. *PLoS Genet.* **6**, e1001102 (2010).
205. Grillet, L. *et al.* Ascorbate Efflux as a New Strategy for Iron Reduction and Transport in Plants. *J. Biol. Chem.* **289**, 2515–2525 (2014).
206. Gutiérrez-Alanís, D. *et al.* Phosphate Starvation-Dependent Iron Mobilization Induces CLE14

- Expression to Trigger Root Meristem Differentiation through CLV2/PEPR2 Signaling. *Dev. Cell* (2017). doi:10.1016/j.devcel.2017.05.009
207. Balzergue, C. *et al.* Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat. Commun.* **8**, 15300 (2017).

### Índice del apéndice:

Apéndice 1. Serie de comandos "Script" utilizados para el mapeo por secuenciación de la mutante *low phosphate insensitive 5 (lpi5)*.

Apéndice 2. Serie de comandos "Script" para la construcción de las gráficas "box-plots" en R-Studio, mostradas en este trabajo y descritas en el artículo científico publicado como parte de los resultados de esta tesis (Apéndice 3).

Apéndice 3. Publicación científica en la revista *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate 2017)*, como parte de los resultados presentados en la presente tesis, donde se propone a los genes *STOP1* y *ALMT1* como módulo funcional que, a través de la excreción de malato al medio, modifica el desarrollo del sistema radicular en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi.

Apéndice 4. Publicación científica, en colaboración con Dolores Gutiérrez-Alanís, reportada en la revista *Developmental Cell 2017 (Phosphate starvation-dependent iron mobilization induce CLE14 expression to trigger root meristem differentiation through CLV2/PEPR2 signaling)*. Donde se describe la participación de los péptidos CLE, como mecanismo dependiente de la disponibilidad de hierro, en el proceso de agotamiento meristemático en *Arabidopsis* ante la carencia de Pi.

Apéndice 5. Publicación científica, en colaboración con Araceli Oropeza-Aburto, reportada en la revista *Plant Biotechnology Journal 2016 (A phosphate starvation-driven bidirectional promoter as a potential tool for crop improvement and in vitro plant biotechnology)*. Donde se describe y se propone el uso del motivo P1BS (GNATATNC), como elemento genético inteligente para el manejo y mejoramiento de los cultivos agrícolas ante condiciones limitantes de fósforo.

Apéndice 6. Curriculum vitae, Mora-Macias Javier.

# Apéndice 1. Serie de comandos "Script" utilizado para el mapeo por secuenciación de la mutante *low phosphate insensitive 5 (lpi5)*.

```
#PBS -N samtools
#PBS -l nodes=1,ppn=4,vmem=8gb,walltime=5:00:00
#PBS -q default
#PBS -V

cd $PBS_O_WORKDIR

#module load bwa/0.7.12
#module load samtools/1.3.1
module load java/1.8
#module load picard/1.94
#module load GATK/3.5.0
module load SnpEff/4.1
#module load tabix/0.2.6
#module load vcftools/0.1.13

#bwa index -a bwtsv TAIR10.1.fa
#bwa index -a bwtsv TAIR10.2.fa
#bwa index -a bwtsv TAIR10.3.fa
#bwa index -a bwtsv TAIR10.4.fa
#bwa index -a bwtsv TAIR10.5.fa

#WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq
#bwa aln TAIR10.1.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr1.sai
#bwa aln TAIR10.2.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr2.sai
#bwa aln TAIR10.3.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr3.sai
#bwa aln TAIR10.4.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr4.sai
#bwa aln TAIR10.5.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr5.sai

#WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq
#bwa aln TAIR10.1.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr1.sai
#bwa aln TAIR10.2.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr2.sai
#bwa aln TAIR10.3.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr3.sai
#bwa aln TAIR10.4.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr4.sai
#bwa aln TAIR10.5.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr5.sai

#bwa aln TAIR10.1.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr1.sai
#bwa aln TAIR10.2.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr2.sai
#bwa aln TAIR10.3.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr3.sai
#bwa aln TAIR10.4.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr4.sai
#bwa aln TAIR10.5.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr5.sai

#bwa aln TAIR10.1.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr1.sai
#bwa aln TAIR10.2.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr2.sai
#bwa aln TAIR10.3.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr3.sai
#bwa aln TAIR10.4.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr4.sai
#bwa aln TAIR10.5.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr5.sai

#bwa sampe TAIR10.1.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr1.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr1.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr1.sam
#bwa sampe TAIR10.2.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr2.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr2.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr2.sam
#bwa sampe TAIR10.3.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr3.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr3.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr3.sam
#bwa sampe TAIR10.4.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr4.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr4.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr4.sam
#bwa sampe TAIR10.5.fa WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE_chr5.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE_chr5.sai WT_LH1AT2SS07-L001a4_R1_001_PE.fastq WT_LH1AT2SS07-L001a4_R2_001_PE.fastq > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr5.sam

#bwa sampe TAIR10.1.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr1.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr1.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr1.sam
#bwa sampe TAIR10.2.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr2.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr2.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr2.sam
#bwa sampe TAIR10.3.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr3.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr3.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr3.sam
#bwa sampe TAIR10.4.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr4.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr4.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr4.sam
#bwa sampe TAIR10.5.fa lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE_chr5.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE_chr5.sai lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R1_PE.fastq lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R2_PE.fastq > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr5.sam

#samtools view -Sb -q 30 WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr1.sam > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr1.bam
#samtools view -Sb -q 30 WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr2.sam > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr2.bam
#samtools view -Sb -q 30 WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr3.sam > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr3.bam
#samtools view -Sb -q 30 WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr4.sam > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr4.bam
#samtools view -Sb -q 30 WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr5.sam > WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr5.bam

#samtools view -Sb -q 30 lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr1.sam > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr1.bam
#samtools view -Sb -q 30 lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr2.sam > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr2.bam
#samtools view -Sb -q 30 lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr3.sam > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr3.bam
#samtools view -Sb -q 30 lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr4.sam > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr4.bam
#samtools view -Sb -q 30 lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr5.sam > lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr5.bam

#samtools faidx TAIR10.1.fa
#samtools faidx TAIR10.2.fa
#samtools faidx TAIR10.3.fa
#samtools faidx TAIR10.4.fa
#samtools faidx TAIR10.5.fa

#java -jar $HOME_PICARD/CreateSequenceDictionary.jar REFERENCE=TAIR10.1.fa OUTPUT=TAIR10.1.dict
#java -jar $HOME_PICARD/CreateSequenceDictionary.jar REFERENCE=TAIR10.2.fa OUTPUT=TAIR10.2.dict
#java -jar $HOME_PICARD/CreateSequenceDictionary.jar REFERENCE=TAIR10.3.fa OUTPUT=TAIR10.3.dict
#java -jar $HOME_PICARD/CreateSequenceDictionary.jar REFERENCE=TAIR10.4.fa OUTPUT=TAIR10.4.dict
#java -jar $HOME_PICARD/CreateSequenceDictionary.jar REFERENCE=TAIR10.5.fa OUTPUT=TAIR10.5.dict

#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr1.bam OUTPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr1_sort.bam SORT_ORDER=coordinate
#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr2.bam OUTPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr2_sort.bam SORT_ORDER=coordinate
#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr3.bam OUTPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr3_sort.bam SORT_ORDER=coordinate
#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr4.bam OUTPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr4_sort.bam SORT_ORDER=coordinate
#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr5.bam OUTPUT=WT_LH1AT2SS07-L001a4_R12_001_PE_chr5_sort.bam SORT_ORDER=coordinate

#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr1.bam OUTPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr1_sort.bam SORT_ORDER=coordinate
#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr2.bam OUTPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr2_sort.bam SORT_ORDER=coordinate
#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr3.bam OUTPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr3_sort.bam SORT_ORDER=coordinate
#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr4.bam OUTPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr4_sort.bam SORT_ORDER=coordinate
#java -jar $HOME_PICARD/SortSam.jar INPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr5.bam OUTPUT=lpi5_LH1AT2SS08_L001a4_R12_001_PE_chr5_sort.bam SORT_ORDER=coordinate
```









Apéndice 2. Serie de comandos *"Script"* para la construcción de las gráficas *"box-plots"* en R-Studio, mostradas en este trabajo y descritas en el artículo científico publicado como parte de los resultados de esta tesis.

```

library(plyr)
library(ggplot2)
library(multcompView)
library(cowplot)

Rootlength <- read.csv("prl.csv", header=TRUE, quote = "\"")
bp <- boxplot(Root_lenght ~ (Condition*Genotype), Rootlength,
             ylab="Root Length (cm)", main="Kinetics of Root Length")
y <- Rootlength$Root_lenght
set.seed(0)
lev <- gl(6, 30)
d <- data.frame(lev=lev, y=y, Genotype=Rootlength$Genotype, Condition=Rootlength$Condition)
a <- aov(y~lev, data=d)
tHSD <- TukeyHSD(a, ordered = FALSE, conf.level = 0.95)
generate_label_df <- function(HSD, flew){
  Tukey.levels <- HSD[[flew]][,4]
  Tukey.labels <- multcompLetters(Tukey.levels)[!Letters]
  plot.labels <- names(Tukey.labels[[Letters]])
  boxplot.df <- ddply(d, flew, function (x) max(fivenum(x$y)) + 1.7)
  plot.levels <- data.frame(plot.labels, labels = Tukey.labels[[Letters]],
                          stringsAsFactors = FALSE)
  labels.df <- merge(plot.levels, boxplot.df, by.x = 'plot.labels', by.y = flew, sort = FALSE)
  return(labels.df)
}

#aesthetics
r1 <- ggplot(d, aes(x= lev, y=y, colour=Genotype)) +
  geom_text(position=position_nudge(y=1.5), size=4.5, color= "black", data = generate_label_df(tHSD, 'lev'),
            aes(x = plot.labels, y = V1, label = labels)) +
  geom_boxplot(color="black", size=0.8, aes(fill = Genotype), alpha=0.8) +
  geom_jitter(position=position_jitter(0.3), cex=2, alpha=0.8, aes(fill = Genotype), shape = 21, color = "black") +
  labs(title= "", x= "", y = "") +
  theme(legend.position="none") +
  scale_fill_manual(values = c("darkturquoise", "greenyellow", "firebrick1"))
r1

r2 <- r1 + scale_x_discrete( limits=c("1", "2", "3", "4", "5", "6"),
                          breaks=c("1", "2", "3", "4", "5", "6"),
                          labels=c("", "", "", "", "", ""))
r2 + theme(axis.text.x = element_text(size=0 ,color= "black")) +
  theme (axis.text.y = element_text(size=11.5 ,color= "black"))+
  theme (axis.title.y = element_text(size=11.5 ,color= "black")) +
  theme (axis.title.x = element_text(size=0 ,color= "black")) +
  scale_y_continuous(expand = c(0,0), breaks=c(seq(0, 75, 10)), limits = c(0, 75)) +
  panel_border(colour = "black", size = 1, linetype = 1, remove = FALSE)

ggsave("prl.pdf", height=8, width=9, units="cm", useDingbats = FALSE)

```