



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

**“Participación de *MPK6* durante la respuesta de la raíz al
arsénico (III) en *Arabidopsis thaliana* L.”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PRESENTA
Andreina Ocampo Santana

DIRECTOR DE TESIS
D. C. Salvador Barrera Ortiz

JURADO EVALUADOR DE TESIS

D. C. Verónica Lira Ruan

CIDC-UAEM

Presidente

D. C. Nelson Avonce Vergara

CIDC-UAEM

Secretario

D. C. Ángel Arturo Guevara García

IBT-UNAM

Suplente

M.C. Angélica Ortega García

CIDC-UAEM

Suplente

RESUMEN

Los módulos de señalización formados por cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) participan en vías de transducción de señales que están conservados en eucariotas. Entre las MAPK de *Arabidopsis thaliana* L. (*A. thaliana*), MPK6 se encarga de regular la respuesta a estrés abiótico y biótico, así como los programas de desarrollo temprano de la raíz. La raíz de las plantas es el órgano que está en contacto directo con el suelo, el cual puede albergar compuestos tóxicos como el arsénico (As), que en su forma de arsenito [As (III)] afecta el crecimiento y el desarrollo. En esta investigación, mediante el uso de las líneas reporteras *CycB1;1::uidA* y *pAtEXP7::GUS* se demostró que la represión del crecimiento de la raíz primaria (RP) en plantas de *A. thaliana*, ocurre tanto por la alteración de la división celular en el meristemo como por la disminución de la zona de elongación, es decir, el As (III) afecta la proliferación y la elongación de las células, los dos procesos que regulan el crecimiento celular. Adicionalmente, la expresión de la línea *pERF115::GUS-GFP* evidenció que el daño celular ocasionado por el As (III) comienza sobre la células en elongación celular, para posteriormente afectar a las células en división celular. Por otra parte, reportes anteriores que involucran a las auxinas en la respuesta vegetal al efecto tóxico de este contaminante, permitieron diseñar experimentos para demostrar que el As (III) afecta principalmente al transporte de las auxinas a nivel del transportador PIN2, no obstante, un exceso de auxinas suplementadas de manera exógena, no es capaz de revertir los efectos negativos del As (III). Finalmente, experimentos dirigidos a evidenciar el mecanismo de señalización vegetal operando durante la intoxicación con As (III), mostraron que dicho compuesto induce la expresión de *MPK6* y *MPK3* en la raíz de *A. thaliana*, sin embargo, el uso de las mutantes para ambos genes (*mpk6-2* y *mpk3-1*) no permitió corroborar la participación de estas cinasas en la respuesta. En conjunto, los resultados de este trabajo indican que el As (III) es un represor del crecimiento y desarrollo temprano de la raíz, ocasionando daño en los tejidos que llevan a cabo los procesos de elongación y proliferación celular, donde dicho fenómeno es regulado por un mecanismo que incluye al transporte de auxinas mediado por PIN2, así como la probable participación de un módulo de MPK cinasas en el que están involucradas MPK6 y MPK3.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. <i>A. thaliana</i> como organismo modelo.....	2
2.2. La raíz de <i>A. thaliana</i>	2
2.2.1. La raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	3
2.2.2. Las raíces laterales	4
2.3. Estrés biótico y abiótico en plantas	6
2.3.1. Toxicidad de los metales pesados	6
2.3.2. Arsénico en el sistema de la raíz	7
2.4. Señalización y respuestas a estrés abiótico	8
2.5. Hormonas vegetales	9
2.5.1. Auxinas	9
2.5.2. Transporte de auxinas	11
2.6. Cascada de cinasas de proteínas activadas por mitógenos.....	14
2.7. Cascadas de MAP cinasas y su relación con el transporte de auxinas	15
2.8. El arsénico (III) y sus efectos en el crecimiento de la raíz primaria	17
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS	19
5. OBJETIVOS.....	19
5.1. General.....	19
5.2. Particulares.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
6.1. Material biológico y compuestos con actividad farmacológica.....	21

6.2. Condiciones de crecimiento	21
6.3. Ensayos farmacológicos con AIA, NPA y NaAsO ₂	22
6.4. Análisis de parámetros del sistema radical.....	22
6.5. Reacción de β-glucuronidasa	23
6.6. Análisis de expresión <i>GUS</i>	23
6.7. Introgresión del trasgén <i>DR5::uidA</i> en la mutante <i>eir1/pin2</i>	24
6.8. Estadística	24
7. RESULTADOS.....	25
7.1. El As (III) inhibe el crecimiento de la raíz en <i>A. thaliana</i>	25
7.2. El As (III) bloquea la proliferación y elongación celular ocasionando daño en los tejidos.....	26
7.3. El As (III) altera el patrón de distribución de auxinas	31
7.4. El As (III) afecta al transporte de auxinas	33
7.5. El As (III) induce la expresión de <i>MPK6</i> y <i>MPK3</i>	37
8. DISCUSIÓN	42
9. CONCLUSIÓN	47
10. PERSPECTIVAS.....	48
11. REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Organización de la estructura celular de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> ..	4
Figura 2. Desarrollo de la raíz lateral	5
Figura 3. Esquema de la absorción, transporte y desintoxicación del arsénico (As) en plantas	8
Figura 4. Esquema general de la transducción de señales durante la respuesta al estrés abiótico en plantas	9
Figura 5. Ejemplos de auxinas naturales.....	10
Figura 6. Representación esquemática de la localización subcelular de las proteínas PIN	12
Figura 7. Distribución de auxinas a través de los transportadores PIN en la punta de la raíz	13
Figura 8. Cascada de señalización mediada por MAP cinasas	15
Figura 9. Expresión de <i>PIN2::PIN2:GFP</i> en respuesta a la deficiencia de fosfato (Pi) en la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre Col-0 y mutantes <i>mpk6</i> de <i>A. thaliana</i> L	16
Figura 10. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO ₂) sobre el crecimiento de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> L	17
Figura 11. Crecimiento de plántulas tipo silvestre (Col-0) y mutantes <i>eir1-4/pin2</i> de <i>A. thaliana</i> en respuesta al arsenito de sodio (NaAsO ₂)	18
Figura 12. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO ₂) sobre el crecimiento del sistema de la raíz en plántulas de <i>A. thaliana</i>	26
Figura 13. Expresión de <i>CycB1;1::uidA</i> en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> durante la respuesta al NaAsO ₂	27

Figura 14. Efecto del NaAsO ₂ sobre la expresión de <i>pAtEXP7::GUS</i> en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	29
Figura 15. Expresión de <i>pERF115::GUS-GFP</i> en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> durante la respuesta al NaAsO ₂	30
Figura 16. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO ₂) sobre la expresión de <i>DR5::GUS</i> en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	32
Figura 17. Respuesta de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i> al ácido indol acético (AIA) y arsenito de sodio (As)	33
Figura 18. Efecto del arsenito de sodio (As) y al ácido <i>N</i> -1-naftiltalámico (NPA) en la raíz primaria de plántulas de <i>A. thaliana</i>	34
Figura 19. Respuesta de la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre Col-0 y de la línea mutante <i>eir1/pin2</i> de <i>A. thaliana</i> al arsenito de sodio (NaAsO ₂)	35
Figura 20. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO ₂) sobre la expresión de <i>DR5::GUS</i> en la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre Col-0 y de mutantes <i>eir1/pin2</i> de <i>A. thaliana</i>	36
Figura 21. Expresión de <i>pMPK6::uidA</i> durante la respuesta al arsenito de sodio (NaAsO ₂) en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	38
Figura 22. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO ₂) sobre la expresión de <i>pMPK3::uidA</i> en la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	39
Figura 23. Respuesta de la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre Col-0 y la mutante <i>mpk6-2</i> de <i>A. thaliana</i> al arsenito de sodio (NaAsO ₂)	40
Figura 24. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO ₂) sobre la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre Col-0 y mutantes <i>mpk3-1</i> de <i>A. thaliana</i>	41

Figura 25. Participación de *MKP6* y *MPK3* en la respuesta de la raíz de *A. thaliana*
L. al arsenito [As (II)] **47**

1. INTRODUCCIÓN

En las plantas terrestres, el sistema radical es el encargado de dar soporte estructural y anclaje al suelo, además de llevar a cabo la absorción de agua y nutrientes, e incluso la síntesis de hormonas y diversos metabolitos. Las raíces están expuestas a distintos estímulos o condiciones ambientales, que frecuentemente las someten a estrés abiótico, siendo un ejemplo de esto, el ingreso de sustancias potencialmente tóxicas a través de dicho órgano, lo que, en ambientes contaminados, es una situación constante (López -Bucio *et al.*, 2003; Schiefelbein & Benfey, 1991; Gill, 2014). La contaminación con arsénico (As) es un problema mundial, debido a su naturaleza altamente tóxica que afecta la salud de todos los seres vivos. El As se encuentra en la naturaleza en formas orgánicas e inorgánicas, las formas inorgánicas en sus estados de oxidación +3 y +5 están disponibles en el suelo en gran cantidad y son altamente tóxicas y móviles (Abbas *et al.*, 2018; Meharg & Hartley-Whitaker, 2002). Los módulos de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), están altamente conservados en eucariotas y participan en diversas rutas de señalización hormonal que regulan la respuesta a estrés y los programas de desarrollo (Colcombet & Hirt, 2008). En particular, la cinasa MPK6 de *A. thaliana* es un regulador negativo del crecimiento y desarrollo temprano de la raíz, la cual se ha demostrado que modula el transporte y la señalización de fitohormonas, como las auxinas, para permitir el crecimiento adecuado de la raíz. Las fitohormonas son moléculas reguladoras cuya señalización induce respuestas fisiológicas y moleculares ante diversos estímulos externos, como el estrés abiótico, regulando el crecimiento y desarrollo de la planta (Wani *et al.*, 2016). En el presente estudio, con la idea de eventualmente proponer estrategias y desarrollar tecnologías que ayude a controlar este problema de contaminación, el cual afecta a las plantas dentro de los ecosistemas naturales y agrícolas, se investigó la participación de la señalización de auxinas y *MPK6* durante la intoxicación por arsenito [As (III)] en *A. thaliana*, a través del uso de líneas mutantes y líneas transgénicas marcadoras de distintos procesos de desarrollo.

2. ANTECEDENTES

2.1. *A. thaliana* como organismo modelo

A. thaliana es una especie de planta angiosperma que pertenece a la familia Brassicaceae, donde están incluidas algunas plantas cultivadas como la mostaza y la coliflor. Dicha planta es utilizada como organismo modelo en estudios moleculares, genéticos, celulares y fisiológicos, debido a características que le confieren ventaja para este tipo de estudios, como son: un ciclo de vida corto (6-8 semanas), un tamaño pequeño (10-30 cm), el mapa genético totalmente descrito y un genoma relativamente pequeño que codifica para alrededor de 25,000 genes organizados en 5 cromosomas, además de generar un gran número de semillas a partir de progenie homocigota producida por autofecundación, se cuenta con una extensa colección de líneas mutantes, reporteras y transgénicas que están públicamente disponibles a través del “Arabidopsis Biological Research Center” (<http://www.arabidopsis.org>; Meinke *et al.*, 1998; Mauch-Mani *et al.*, 1993).

2.2. La raíz de *A. thaliana*

La raíz es un órgano vegetal que en la gran mayoría de las plantas se encuentra debajo de la superficie del suelo, se encarga principalmente de absorber nutrientes y agua, pero también participa en la síntesis de fitohormonas, así como en el almacenamiento y transporte de sustancias. Además, el sistema radical otorga un soporte estructural a la parte aérea y un anclaje de la planta en el suelo (Ingram & Malamy, 2010; Schiefelbein & Benfey, 1991). La raíz primaria, las raíces laterales y los pelos radicales conforman el sistema radical de *A. thaliana*, el cual está compuesto por distintas células epidérmicas, corticales y endodérmicas individuales que rodean la estela vascular (Ingram & Malamy, 2010).

2.2.1. La raíz primaria de *A. thaliana*

La raíz primaria (RP) se deriva de un tejido meristemático, el cual es llamado meristemo apical de la raíz (RAM, por sus siglas en inglés), que se localiza en la punta de la raíz y consta de una población de células madre mitóticas parcialmente inactivas, es decir, células indiferenciadas que se dividen lentamente para dar origen a otro tipo de células de la raíz (Petricka *et al.*, 2012; Ingram & Malamy, 2010; Jiang & Feldman, 2005). La RP está conformada por distintos tejidos como son la epidermis, el córtex y la endodermis, los cuales forman capas concéntricas que rodean la estela vascular constituida por el xilema y floema, dentro de una columna vascular central rodeada por el periciclo. (Smith & De Smet, 2012; Ingram & Malamy, 2010) (**Fig. 1a-b**).

El xilema y el floema constituyen los tejidos vasculares, el xilema se encarga del transporte de agua y nutrientes, mientras que el floema transporta los productos resultantes de la fotosíntesis. Esta vasculatura se organiza en un cilindro central o estela, en la cual el xilema y el floema están intercalados con células del procambium y el periciclo, el tejido procambial prolifera cuando las células del floema y xilema comienzan a diferenciarse, mientras que el periciclo es una capa de tejido entre la estela y la endodermis. Las células del protoxilema se diferencian tempranamente y se destruyen conforme avanza la maduración de la planta, por su parte las células del metaxilema se diferencian tardíamente formando los vasos conductores de agua, ambos son los primeros tejidos conductores (Petricka *et al.*, 2012; Smith & De Smet, 2012; Furuta *et al.*, 2014) (**Fig. 1a-b**).

La cofia lateral y las células de la columela se localizan en la punta de la raíz y funcionan como una capa protectora que se desprende constantemente. Las células de la columela junto con la epidermis, son responsables del gravitropismo de la raíz (Smith & De Smet, 2012; Petricka *et al.*, 2012).

A lo largo de la raíz se distinguen distintas zonas en las cuales ocurren procesos particulares de desarrollo tales como división, diferenciación y expansión. La zona meristemática (ZM), es el sitio donde ocurren las divisiones celulares; en la zona de

elongación (ZE), las células incrementan su tamaño y en la zona de diferenciación (ZD), una vez expandidas las células maduran para adquirir características y funciones especializadas. Sin embargo, en cada zona hay superposición de los procesos celulares descritos (Schiefelbein & Benfey, 1991; Dolan *et al.*, 1993; Petricka *et al.*, 2012) (**Fig. 1c**).

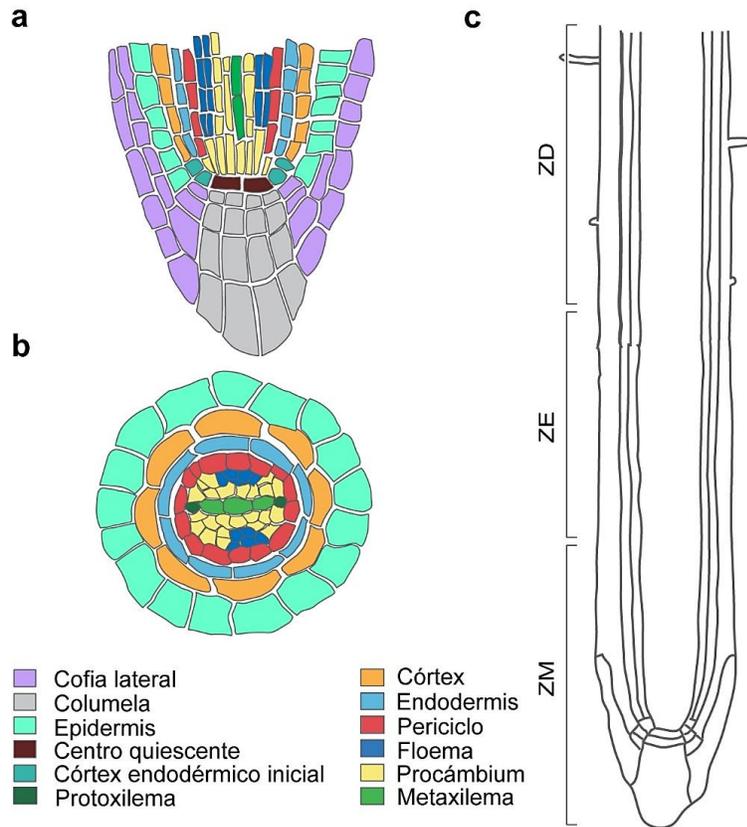


Figura 1. Organización y estructura celular de la raíz primaria de *A. thaliana*. a) Sección longitudinal del meristemo apical de la raíz donde se muestra la organización de los distintos tipos de tejido que la constituyen. b) Sección transversal de la punta de la raíz mostrando los diferentes tipos celulares dentro de la estela. c) Sección longitudinal de las distintas zonas de desarrollo de la raíz primaria (Adaptado de Petricka *et al.*, 2012).

2.2.2. Las raíces laterales

Las raíces laterales (LR, por sus siglas en inglés) comienzan a formarse en la zona de diferenciación a partir de algunas células del periciclo que se denominan activadas y son conocidas como células fundadoras del periciclo, que se localizan adyacentes a los polos del xilema. El periciclo es un tejido que está conformado por

células en los polos del floema, que si bien inactivas son células competentes que dan lugar a primordios de las raíces laterales adyacentes a los polos del xilema (Petricka & Benfey, 2012; Péret *et al.*, 2009) (**Fig. 2a**).

Al primer proceso morfológico de la formación de la LR se le conoce como estadio I, en el cual las células fundadoras del periciclo sufren divisiones asimétricas anticlinales para dar lugar a un primordio de una sola capa posteriormente, en el estadio II, las células continúan dividiéndose, pero ahora de manera periclinal para formar una capa externa y una interna. Durante los estadios III-VII, las células sufren una serie de divisiones tanto anticlinales como periclinales, creando grupos de células a lo largo del primordio de la raíz lateral (LRP, por sus siglas en inglés), el cual finalmente surge de la epidermis de la raíz primaria parental como una LR, la cual ahora tiene su propio meristemo activo (Petricka & Benfey, 2012; Péret *et al.*, 2009; Lavenus *et al.*, 2013; Casimiro *et al.*, 2003) (**Fig. 2b**).

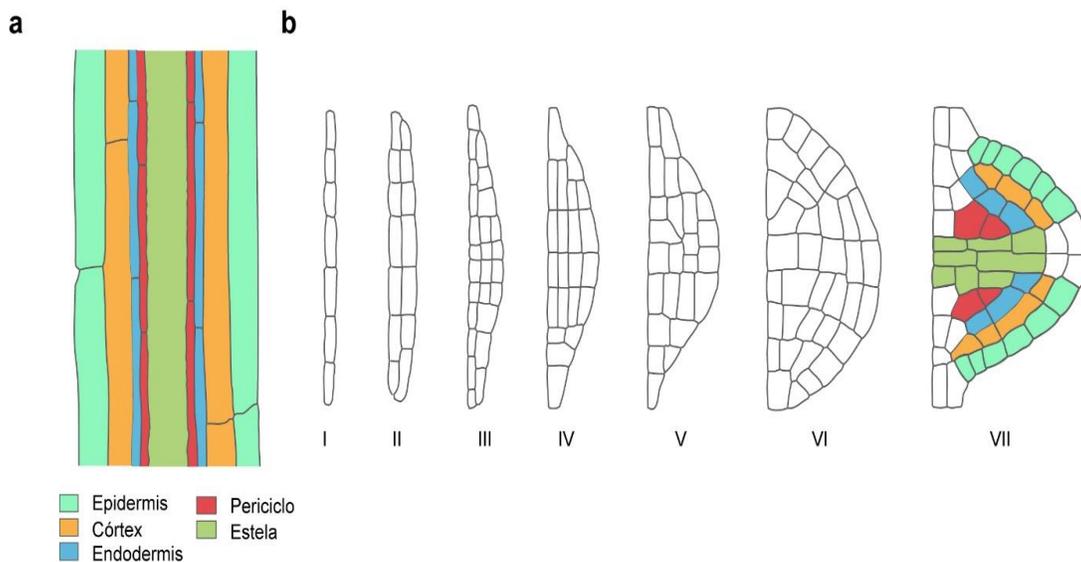


Figura 2. Desarrollo de la raíz lateral. a) Sección longitudinal de la raíz primaria en la zona de diferenciación. El desarrollo de las raíces laterales comienza a partir divisiones celulares anticlinales de células del periciclo. **b)** Etapas del desarrollo de la raíz lateral (Modificada de Petricka & Benfey, 2012).

2.3. Estrés biótico y abiótico en plantas

El estrés es una condición que altera el equilibrio fisiológico, causado por cambios físicos, químicos y biológicos en el entorno de la planta. En la naturaleza, los diversos tipos de estrés afectan el crecimiento y desarrollo vegetal, lo que conlleva a modificaciones en procesos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Suzuki *et al.*, 2014; Mickelbart *et al.*, 2015).

El estrés se divide en biótico y abiótico, donde el primero ocurre por la actividad de distintos organismos como virus, bacterias, hongos, parásitos, insectos e incluso, otras plantas, mientras que el estrés abiótico es la condición en la que factores ambientales alteran procesos fisiológicos y metabólicos. Dichas condiciones ambientales pueden ser la sequía, el calor, la deficiencia de nutrientes, el exceso de sal, metales tóxicos en el suelo, etc. (Zhang *et al.*, 2022).

2.3.1. Toxicidad de los metales pesados

Los metales pesados son elementos químicos que tienen una densidad mayor a 5 g·cm⁻³ y que no se pueden degradar de forma biológica por los organismos, como es el caso del plomo, cadmio, mercurio y arsénico, que causan daños en distintos seres vivos (Chibuike & Obiora, 2014; Gill, 2014; Guevara-García *et al.*, 2017). En el caso de las plantas, el sistema radical es el primer sitio de contacto con los iones de metales pesados que pueden encontrarse solos o interactuando con otros elementos del suelo. Los metales pesados se acumulan principalmente en la raíz y posteriormente son transportados hasta el follaje causando un daño generalizado (Gill, 2014; Chibuike & Obiora, 2014; Cheng, 2003; Asati *et al.*, 2016).

2.3.2. Arsénico en el sistema de la raíz

El arsénico (As) es un elemento altamente tóxico presente en la corteza terrestre, donde se moviliza naturalmente debido a la meteorización geoquímica y a las actividades microbianas, sin embargo, las actividades antropogénicas tales como la industria, minería y agricultura, incrementan el As en el suelo y facilitan su movilización (Hou *et al.*, 2020; Amaral *et al.*, 2013; Tripathi *et al.*, 2007). En la naturaleza existen diversas especies orgánicas e inorgánicas de As, las principales especies inorgánicas presentes son el arsenato [As (V)] y arsenito [As (III)]. El arsenato es estructuralmente semejante al fosfato, por lo que su absorción, a través de transportadores de fosfato, tiene como consecuencia la interrupción de procesos celulares fundamentales como la fosfo y fotofosforilación oxidativa acopladas a la síntesis de ATP. Por su parte, el As (III) es altamente tóxico debido a su capacidad de unirse a los grupos sulfidrilos de las proteínas, lo que impide su correcto funcionamiento, ocasionando el daño, o incluso la muerte celular (Ashraf *et al.*, 2020; Abbas *et al.*, 2018; Amaral *et al.*, 2013; Tripathi *et al.*, 2007).

El As es absorbido principalmente por el sistema radical de las plantas y su acumulación afecta diversas funciones, incluyendo procesos del desarrollo y el crecimiento vegetal, por esta razón, las plantas han desarrollado mecanismos para la desintoxicación por este elemento (Kumar *et al.*, 2015; Carbonell-Barrachina *et al.*, 1998; Ashraf *et al.*, 2020; Tripathi *et al.*, 2007). Una vez que el As se absorbe por el sistema de raíces, se transporta hacia otros tejidos a través del xilema en la forma de As (V), el cual puede ser absorbido mediante transportadores de fosfato (Pht1;1 y Pht1;4) y una vez en el citoplasma, es reducido por la As reductasa (ACR2) a As (III), utilizando como agente reductor glutatión reducido (GSH) (Kumar *et al.*, 2015; Abbas *et al.*, 2018) (**Fig. 3**).

Por su parte, el As (III) es absorbido mediante acuaporinas y también puede ser transportado al interior de la célula por transportadores de influjo de silicio (Lsi1), de igual forma, puede ser expulsado de la célula hacia el medio externo a través de transportadores de eflujo de silicio (Lsi2) presentes en los tejidos de la estela y del

de información a través de una vía de transducción de señales, que conducen a cambios fisiológicos acompañados de modificaciones de procesos moleculares y celulares que terminan impactando la expresión de genes (Zhang *et al.*, 2022; Biswal *et al.*, 2011; Knight & Knight, 2001) (**Fig. 4**).

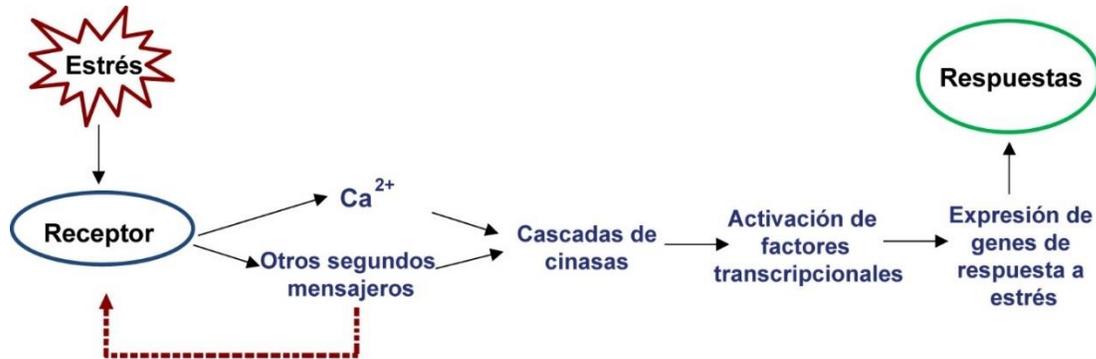


Figura 4. Esquema general de la transducción de señales durante la respuesta al estrés abiótico en plantas. Representación esquemática general de una vía de transducción de señales durante la respuesta de la planta a estrés abiótico (Modificado de Gupta *et al.*, 2015).

2.5. Hormonas vegetales

Las hormonas vegetales, también conocidas como fitohormonas, son sustancias que regulan diferentes procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como también participan en la señalización de las respuestas a estímulos externos e internos. La actividad y efecto de cada fitohormona depende de su disponibilidad y localización en los tejidos, siendo las más ampliamente estudiadas: las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el ácido abscísico, el etileno, el ácido jasmónico y los brasinoesteroides. (Vanstraelen & Benková, 2012; Wani *et al.*, 2016; Peleg & Blumwald, 2011; Gray, 2004).

2.5.1. Auxinas

Las auxinas, cuyo nombre proviene de la palabra griega “*auxein*”, que significa crecer, son las principales fitohormonas que regulan y promueven el desarrollo y crecimiento vegetal (Pacifici *et al.*, 2015; Sauer *et al.*, 2013). Modulan la respuesta

a la luz y a la gravedad, la organogénesis, la diferenciación del tejido vascular, la dominancia apical y la arquitectura de las raíces. Así mismo, regulan la división y la elongación celular modificando la plasticidad de la pared celular. En el sistema radical, las auxinas inhiben la elongación de la raíz principal e incrementan la formación de raíces laterales y adventicias (Paciorek & Friml 2006; Sauer *et al.*, 2013; Woodward & Bartel, 2005).

Una de las auxinas naturales más abundantes es el ácido indol-3-acético (AIA), el cual es un ácido débil ($pK = 5.4$) que se encuentra en forma libre en el medio para activar procesos de señalización, o bien, conjugado con carbohidratos o aminoácidos para su almacenamiento. Además del AIA, existen otros compuestos naturales con actividad de auxinas en las plantas, como son el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido 4-cloroindol-3-acético (Cl-AIA) y el ácido fenilacético (APA) (Pacificali *et al.*, 2015; Sauer *et al.*, 2013; Zhao 2010) (**Fig. 5**).

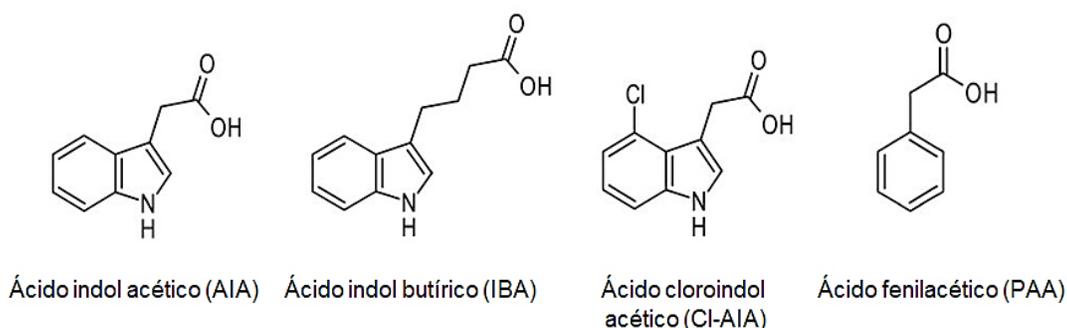


Figura 5. Ejemplos de auxinas naturales. Estructura química de los diversos compuestos con propiedades de auxinas. (Modificado de Sauer *et al.*, 2013).

El estudio de las auxinas involucra los procesos de biosíntesis, transporte y transducción de señales (Woodward & Bartel, 2005; Sauer *et al.*, 2013). Actualmente, se han descrito dos vías de biosíntesis del AIA en plantas: la independiente de triptófano (Trp) y dependiente de Trp. Por su parte, el transporte se lleva a cabo por distintas proteínas de membrana que se encargan de distribuir y direccionar las auxinas a los diversos tejidos vegetales mediante gradientes de concentración. En tanto que la percepción de las auxinas ocurre por tres receptores:

TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT1 (TIR1), S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN 2A (SKP2A) y AUXIN-BINDING PROTEIN1 (ABP1) (Paciorek & Friml, 2006; Voß *et al.*, 2014).

2.5.2. Transporte de auxinas

Las auxinas se distribuyen a los distintos tejidos desde la parte aérea hasta la punta de la raíz, mediante dos vías de transporte: una de transporte pasivo a larga distancia a través los tejidos vasculares, conocido como transporte no polar y una de transporte activo a corta distancia, de célula a célula, conocido como transporte polar. El flujo de auxinas desde la parte aérea hacia la raíz (movimiento acropétalo) es a través de los tejidos vasculares, una vez que se encuentran en la punta de la raíz, parte de las auxinas son redirigidas hacia arriba (movimiento basipétalo) por la epidermis, hacia la zona de elongación. Debido a su naturaleza de ácidos débiles, las auxinas sufren una disociación reversible, es decir, dependiendo del pH pueden encontrarse en su forma protonada (AIAH) o disociarse en su forma no protonada (AIA-) (**Fig. 6**) (Friml, 2003; Michniewicz *et al.*, 2007; Zažímalová *et al.*, 2007).

Las auxinas están parcialmente disociadas en la pared celular y en el espacio extracelular a un pH de 5.5, por lo tanto, las formas no disociadas (sin carga) pueden penetrar la membrana plasmática de forma pasiva, mientras que formas disociadas (aniones con carga), únicamente pueden ser transportados de forma activa al interior de las células vía un transportador. Se han descrito diversas proteínas transportadoras de influjo de auxinas, algunas de ellas pertenecen a la familia de proteínas AUXIN1 [AUX1]/LIKE-AUX1 [LAX]. Cuando las moléculas de auxinas se encuentran en forma de aniones en el citoplasma de las células (pH= 7.0), son transportadas hacia otras células por un transporte activo mediado por proteínas transportadoras de eflujo, que se localizan asimétricamente para dar direccionalidad al flujo, entre estas proteínas se encuentra la familia de proteínas transmembranales PIN-FORMED (PIN) (**Fig. 6**), así como los transportadores ABCB (ATP-BINDING-

CASSETTE B), que pertenecen a la familia de proteínas con “cassete ABC” (Friml, 2003; Pacifici *et al.*, 2015; Zažímalová *et al.*, 2007; Vanneste & Friml, 2009).

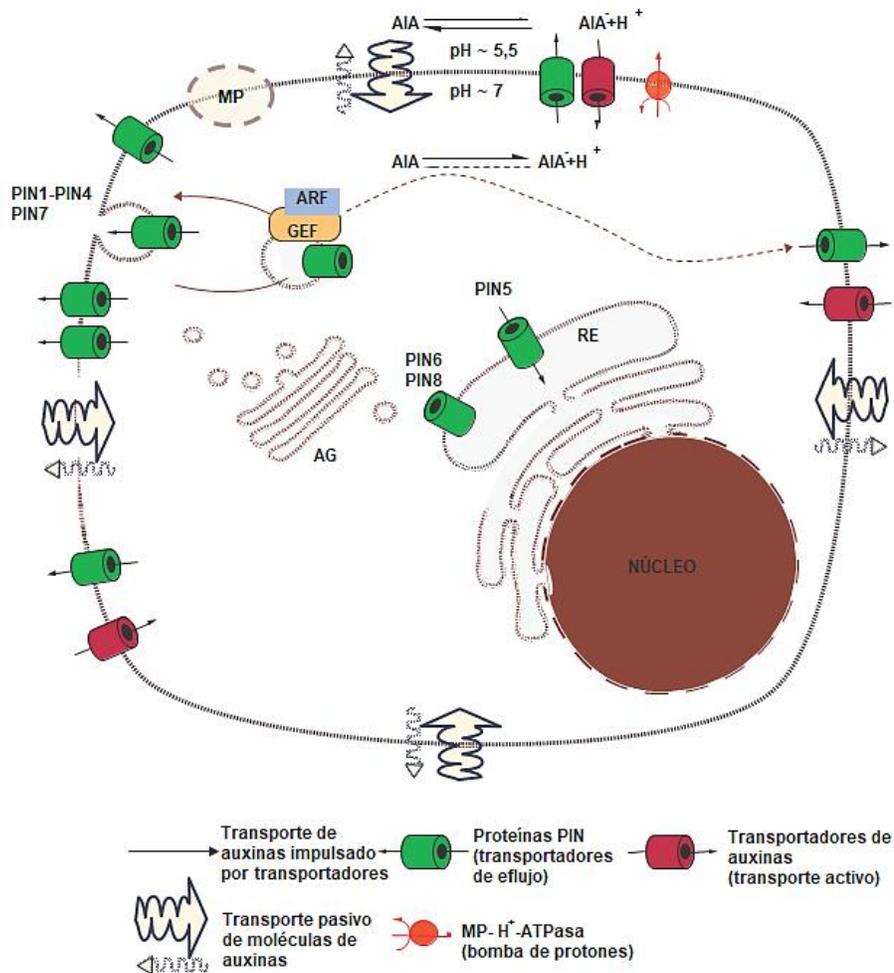


Figura 6. Representación esquemática de la localización subcelular de las proteínas PIN. Se muestra la localización de los transportadores de eflujo PIN, encargados de la distribución de auxinas intracelular (Modificado de Křeček *et al.*, 2009).

La familia de proteínas transmembranales PIN consta de ocho miembros: PIN1-PIN8, que se dividen en dos subfamilias. Los miembros de la primera subfamilia (PIN1-PIN4 y PIN6-PIN7), se localizan asimétricamente en la membrana plasmática (MP) para regular el flujo de auxinas, mientras que PIN6 se localiza en la membrana del retículo endoplasmático (RE), y los miembros de la segunda subfamilia (PIN5 y PIN8) se localizan en la membrana del RE, para mediar la compartimentalización y homeostasis de las auxinas intracelulares. La actividad de las proteínas PIN está

regulada a distintos niveles: transcripcional, degradación de proteínas, actividad de transporte, tráfico vesicular por la vía de endocitosis dependiente de clatrina y su reciclaje a la membrana, mediado por la exocitosis dependiente del complejo formado por el factor de intercambio de guanina y el factor de ribosilación del ADP (ARF-GEF, por sus silgas en inglés) (**Fig. 6**). La endocitosis dependiente de la clatrina de las proteínas PIN en la membrana plasmática, junto con su reciclaje a la membrana, son importantes para redirigir el flujo de auxinas y distribuir su patrón de acumulación. Particularmente, PIN1 tiene actividad en los tejidos vasculares, en el meristemo apical del follaje y en los órganos en desarrollo, mientras que PIN7 se expresa en la punta de la raíz, por otra parte, PIN2-PIN4 actúan en la punta de la raíz para mediar un gradiente de concentración de auxinas con máximos en la región meristemática, y regular la distribución y redistribución de auxinas (**Fig. 7**) (Křeček *et al.*, 2009; Michniewicz *et al.*, 2007; Paciorek, & Friml, 2006).

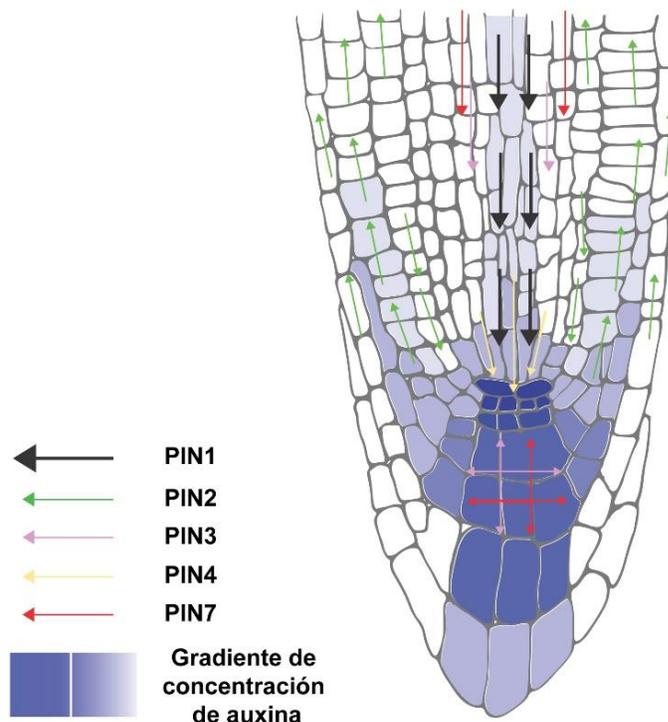


Figura 7. Distribución de auxinas a través de los transportadores PIN en la punta de la raíz. Se indica con flechas la dirección de flujo mediada por los transportadores PIN en la punta de la raíz de *A. thaliana*. La distribución y concentración de auxinas se muestra como un gradiente de color morado (Modificado de Křeček *et al.*, 2009).

2.6. Cascada de cinasas de proteínas activadas por mitógenos

En las vías de transducción de señales, las enzimas de tipo cinasa y fosfatasa regulan la fosforilación y desfosforilación de proteínas, respectivamente, lo que conlleva a la activación de diversas respuestas celulares (Ichimura *et al.*, 2002; Taj *et al.*, 2010). Las cascadas de cinasas de proteínas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés), son módulos de señalización evolutivamente conservados en todas las células eucariotas, los cuales se activan por distintos estímulos extracelulares, mediando respuestas a diversos tipos de estrés, la señalización hormonal, la activación de procesos celulares o la regulación de programas de desarrollo vegetal (Ichimura *et al.*, 2002; Fujita *et al.*, 2006; Colcombet & Hirt, 2008).

En el genoma de *A. thaliana*, están codificados genes para diferentes MAPK, particularmente, 20 genes codifican para MAPKs, 10 para MAPK cinasas (MAPKKs) y 80 para MAPKK cinasas (MAPKKKs). Una cascada de MAPK está constituida por tres tipos de serina/treonina (S/T) cinasas que se fosforilan secuencialmente de la siguiente forma: una MPKKK fosforila a dos residuos de S/T en un motivo conservado S/T-X₃₋₅-S/T (donde X representa a cualquiera de los 20 aminoácidos) localizado en el sitio de activación de una MPKK para activarla; a su vez una MPKK activa a una MPK fosforilándola en los residuos treonina (T) y tirosina (Y) del motivo T-X-Y, finalmente esta MPK se encarga de fosforilar distintos sustratos corriente abajo, tales como fosfolipasas, proteínas del citoesqueleto, proteínas asociadas a los microtúbulos e incluso factores de transcripción, para regular la expresión de genes específicos en respuesta a los estímulos ambientales (**Fig. 8**) (Ichimura *et al.*, 2002; Taj *et al.*, 2010).

MPK3, MPK4 y MPK6 son las MAP cinasas de *A. thaliana* que están mejor caracterizadas y se sabe que participan en respuesta al estrés y en la regulación del desarrollo vegetal. Particularmente, MPK6 está involucrada en estrés abiótico, interacciones mutualistas y la resistencia a bacterias y hongos, así como en la regulación de los programas de desarrollo embrionario y el desarrollo temprano de la raíz, procesos que involucran a múltiples hormonas vegetales, disponibilidad de

nutrientes y señales ambientales. Adicionalmente, se ha reportado que existe una redundancia funcional entre las MAPK, tal es el caso de MPK3 y MPK6, las cuales participan en la resistencia al estrés biótico y abiótico, además de estar involucradas en procesos del desarrollo vegetal (Bigeard & Hirt, 2018; López-Bucio *et al.*, 2014).

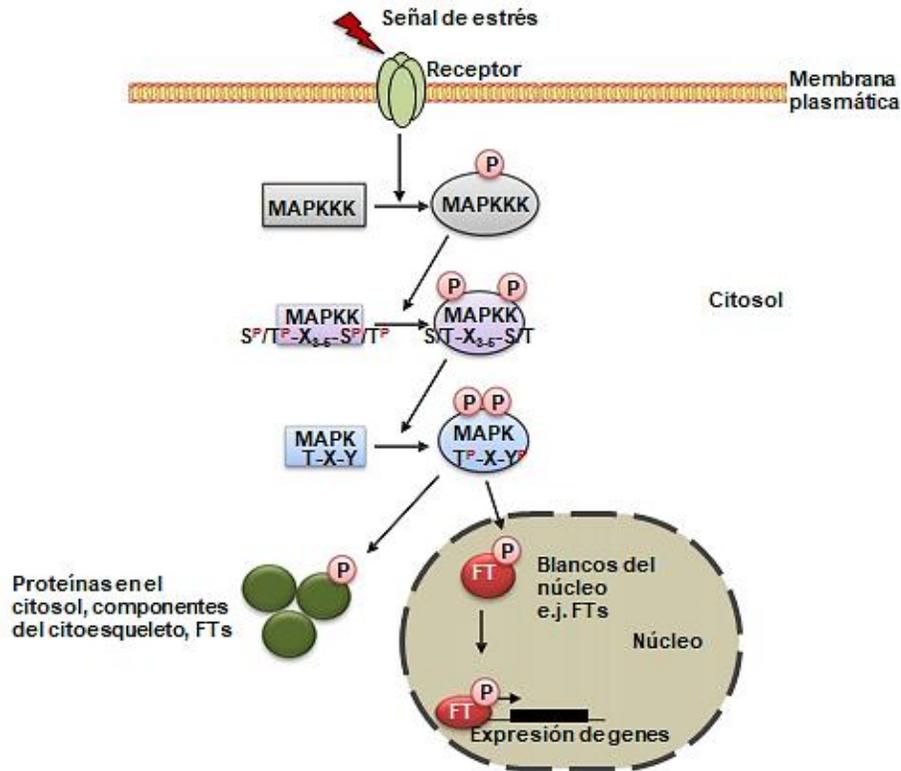


Figura 8. Cascada de señalización mediada por MAP cinasas. En las vías de señalización de este tipo, se activan secuencialmente: una MAPKKK que conduce a la fosforilación y activación de una MAPKK, la cual fosforila y activa a una MAPK. En este proceso, la transducción de la señal involucra modificaciones postraduccionales en diversas proteínas que culminan en una respuesta, por ejemplo, la activación de factores de transcripción (FT) que regula la expresión génica, para culminar en respuestas como la adaptación al estrés (Adaptado de Danquah *et al.*, 2014).

2.7. Cascadas de MAP cinasas y su relación con el transporte de auxinas

Las plantas están expuestas a distintos tipos de estrés, a lo cual responden activando vías de señalización que en ocasiones involucran a la cascada de MAP cinasas. En este sentido, se ha demostrado que MPK6 participa en respuesta a diversos tipos de estrés abiótico y biótico, además de modular procesos durante el

desarrollo temprano de la raíz, que también están regulados por la vía de señalización de auxinas (Colcombet & Hirt, 2008; López-Bucio *et al.*, 2014).

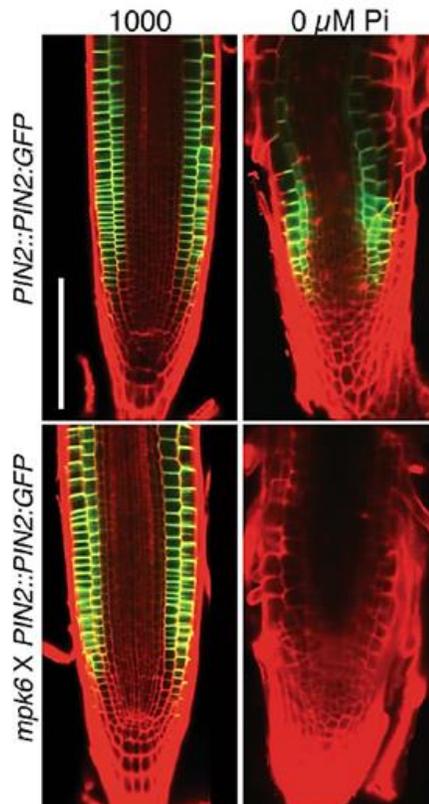


Figura 9. Expresión de *PIN2::PIN2::GFP* en respuesta a la deficiencia de fósforo (Pi) en la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre Col-0 y mutantes *mpk6* de *A. thaliana* L. Semillas del ecotipo silvestre Col-0 y de la línea mutante *mpk6* fueron germinadas y posteriormente transferidas a medio con 1000 μM de fósforo (Pi) y 0 μM de Pi (Tomada de López-Bucio *et al.*, 2019).

Un ejemplo de lo antes mencionado, es el trabajo de López-Bucio y colaboradores (2019), donde crecieron en medios carentes de fósforo (Pi) a plántulas de tipo silvestre Col-0 y la mutante *mpk6* portando al reportero *PIN2::PIN2::GFP*, encontrando que el reportero se localizó en las células del córtex y la epidermis de la punta de la raíz primaria de ambos tipos de plántulas creciendo en la condición control (1000 μM de Pi), sin embargo, la deficiencia de Pi (0 μM de Pi) resulta en un decremento de la expresión de *PIN2::PIN2::GFP* en Col-0, en tanto que en la mutante *mpk6* se pierde completamente la expresión del reportero (**Fig. 9**).

2.8. El arsénico (III) y sus efectos en el crecimiento de la raíz primaria

El As afecta negativamente a las plantas tanto a nivel bioquímico, como molecular e influye en la mayoría de las respuestas fisiológicas, incluyendo la inhibición de procesos del crecimiento (Abbas *et al.*, 2018). En este orden de ideas, Ashraf y colaboradores (2020) reportaron que el As (III) inhibe el crecimiento de la raíz primaria en plántulas de *A. thaliana*. En dicho trabajo, se crecieron plántulas en medios Hoagland modificados, que posteriormente se transfirieron a nuevos medios suplementado con concentraciones crecientes de arsenito de sodio (NaAsO_2) durante 3 días, entonces, un análisis del porcentaje de elongación de la raíz primaria mostró que el arsenito reduce la longitud de la raíz primaria, de manera inversa al incremento de su concentración (**Fig. 10**).

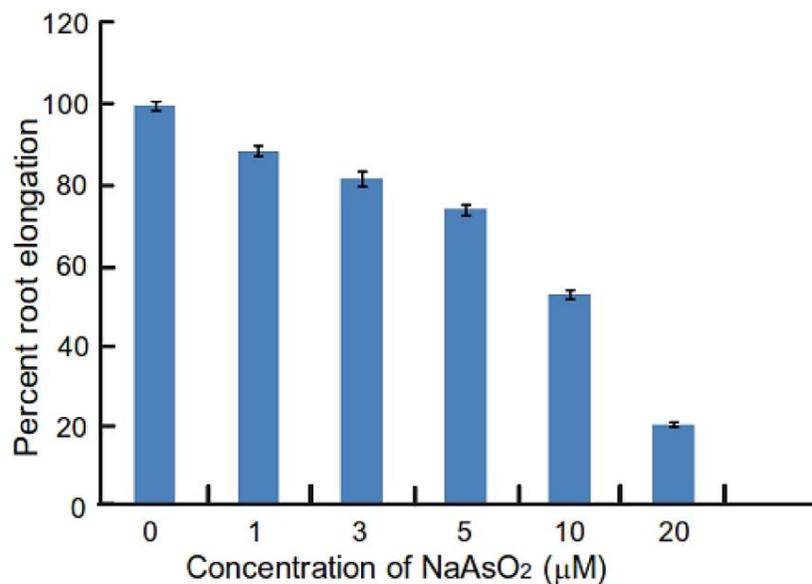


Figura 10. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO_2) sobre el crecimiento de la raíz primaria de plántulas de *A. thaliana* L. Semillas de plantas tipo silvestres fueron germinadas en medio Hoagland y 5 días después se transfirieron a medio suplementado con NaAsO_2 a distintas concentraciones durante 3 días. Se muestra el análisis del porcentaje de elongación de la raíz primaria; aproximadamente 50% de la inhibición del crecimiento de la raíz fue observada a 10 μM de arsenito (Tomada de Ashraf *et al.*, 2020).

Además, debido a que las auxinas regulan el crecimiento del sistema radical mediante su distribución asimétrica entre células, con ayuda de los transportadores de influjo y eflujo (Paciorek & Friml, 2006), el uso de mutantes afectadas en el

transportador de auxinas PIN2, reveló que dichas mutantes, en comparación con plántulas tipo silvestre (Col-0), son más sensible al efecto represor del crecimiento de la raíz primaria inducido por el NaAsO₂ (Fig. 11).

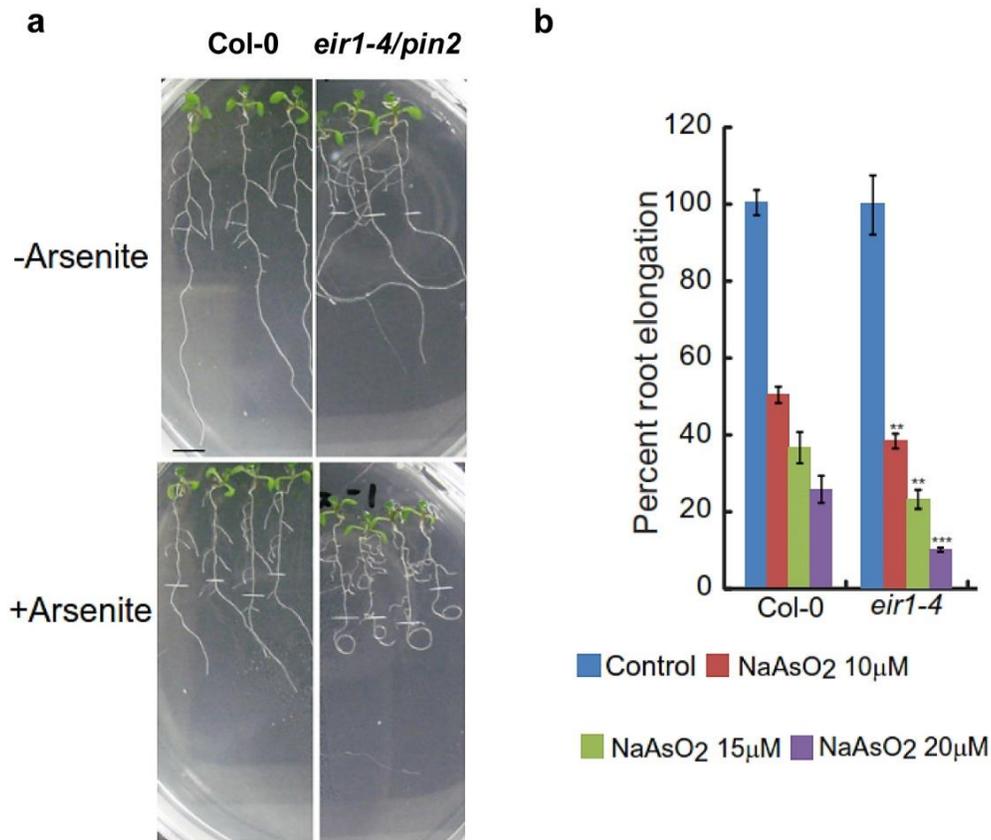


Figura 11. Crecimiento de plántulas tipo silvestre (Col-0) y mutantes *eir1-4/pin2* de *A. thaliana* en respuesta al arsenito de sodio (NaAsO₂). Semillas del ecotipo silvestre Col-0 y mutantes *eir1-4/pin2* fueron germinadas en medios Hoagland y 5 días después se transfirieron a nuevos medios suplementado con concentraciones crecientes de NaAsO₂ durante 3 días. (a) Imágenes representativas de la condición control (-Arsenito) y 10 μM de NaAsO₂ (+Arsenito). (b) Porcentaje de elongación de la raíz primaria de Col-0 y *eir1-4/pin2* en las distintas concentraciones de NaAsO₂ (Tomada de Ashraf *et al.*, 2020).

3. JUSTIFICACIÓN

El gen *MPK6* codifica para una cinasa de proteínas activadas por mitógenos, la cual participa en la regulación del desarrollo temprano de la raíz y está relacionada con la señalización hormonal de auxinas. Por otra parte, se ha mostrado que el arsenito [As (III)], la forma más tóxica del arsénico distribuida en el suelo, afecta el crecimiento y desarrollo vegetal. Así mismo, está reportado que el transportador de auxinas PIN2 está involucrado con el transporte del As (III) en la raíz. Por lo tanto, es válido suponer que una vía de señalización en la que participan MPK6 y las auxinas regula la respuesta de la raíz al As (III) en *A. thaliana*.

4. HIPÓTESIS

La cinasa MPK6 participa en la regulación de la respuesta de la raíz al arsénico (III) a través de un mecanismo dependiente de auxinas en *A. thaliana* L.

5. OBJETIVOS

5.1. General

Caracterizar el efecto del arsénico (III) [As (III)] sobre el desarrollo temprano de la raíz de *A. thaliana*, evaluando la participación de MPK6 y las auxinas en el proceso.

5.2. Particulares

- Analizar el efecto general del As (III) sobre el crecimiento y desarrollo post-embrionario en un sistema *in vitro*.
- Evaluar la expresión de genes relacionados con la proliferación (*CycB1*), elongación (*EXP7*), daño (*ERF115*) y señalización (*DR5*, *MPK6* y *MPK3*) celular durante la respuesta al As (III).

- Evaluar el papel de la señalización por MAP cinasas y auxinas durante la intoxicación con As (III) mediante el uso de mutantes, ácido indol-3-acético y un inhibidor del transporte de auxinas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico y compuestos con actividad farmacológica

En este trabajo se utilizaron semillas tipo silvestre de *A. thaliana* del ecotipo Columbia (Col-0), así como las mutantes *mpk6-2* (Lopez-Bucio *et al.*, 2014), *mpk3-1* (Lopez-Bucio *et al.*, 2014) y *eir1/pin2* (Luschnig *et al.*, 1998), además de las líneas transgénicas *CycB1;1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *pAtEXP7::GUS* (Cho y Cosgrove, 2002), *pERF115::GUS-GFP* (Heyman *et al.*, 2016), *DR5::GUS* (Ulmasov *et al.*, 1997), *pMPK6::uidA* (López-Bucio *et al.*, 2018) y *pMPK3::uidA*. Los compuestos con actividad farmacológica que se utilizaron en este estudio son: el arsenito de sodio (NaAsO₂), el ácido indol-3-acético (AIA) y el ácido *N*-naftiltalámico (NPA, por sus siglas en inglés), los cuales fueron adquiridos en Sigma-Aldrich.

6.2. Condiciones de crecimiento

Las semillas fueron desinfectadas de la superficie con etanol industrial al 96% (v/v) por 4 minutos y una solución de hipoclorito de sodio comercial al 10% (v/v) por 4 minutos en agitación constante a 1400 rpm. Posteriormente, se lavaron 5 veces con agua desionizada estéril y se sometieron a vernalización a 4 °C durante 2 días. Las semillas vernalizadas fueron germinadas y crecidas en placas de Petri conteniendo medio MS 0.2X, el cual está constituido con sales basales de Murashige y Skoog (1962) al 20% de su formulación original, 0.6% (m/v) de sacarosa y 1% (m/v) de fitoagar, además de estar ajustados con KOH a pH 7. Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos en Phytotechnology Laboratories®. Las placas fueron colocadas verticalmente en una cámara de crecimiento para plantas (Percival CU41L4) con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a una temperatura de 22 °C.

6.3. Ensayos farmacológicos con AIA, NPA y NaAsO₂

Plántulas de 4 días después de la germinación fueron transferidas a medios MS 0.2X frescos, adicionados con 10 nM de AIA, 10 µM de NPA o concentraciones crecientes de NaAsO₂ (0 µM, 3 µM, 6 µM, 12 µM y 24 µM), 6 días después de la interacción en estos medios incubados en las condiciones de crecimiento descritas, fueron evaluadas en los distintos ensayos que se describen en las siguientes secciones. Se colocaron marcas en las placas para indicar el sitio donde finalizaba la punta de la raíz de cada plántula. Todos los compuestos fueron adicionados a los medios a una temperatura aproximada de 75 °C, para permitir la disolución de cada compuesto en el medio de cultivo y posteriormente verter el medio en placas de Petri para que solidificara. El tratamiento “Control” (C o Ctrl) no contenía compuestos adicionales a la formulación previamente descrita en el apartado “6.2”, mientras que el tratamiento “0 µM” incluía el solvente usado para preparar la solución que se agregó a los medios. El AIA y el NPA se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) y el NaAsO₂ en una mezcla 1:1 de DMSO y H₂O desionizada.

6.4. Análisis de parámetros del sistema radical

18 Individuos de 10 días de edad (4 días después de la germinación + 6 días después de la interacción) en cada condición experimental fueron analizados para registrar la longitud de la raíz primaria (LRP) y la longitud de la raíz lateral más larga (Longitud de RLML) con ayuda de una regla, en tanto que el número de raíces laterales (NRL) de cada plántula se cuantificó bajo un estereoscopio (Olympus SZ40), mientras que la densidad de raíces laterales (DRL) se calculó dividiendo el NRL entre la LRP. El peso fresco total (PFT) y el peso fresco del follaje (PFF) de 6 plántulas crecidas sobre la misma placa se obtuvieron con una balanza analítica (Ohaus PX124), mientras que el peso fresco de la raíz (PFR) se consiguió restando el PFF del PFT.

6.5. Reacción de β -glucuronidasa

Líneas transgénicas portando las construcciones con los promotores de diferentes genes regulando la expresión del gen *uidA* (*GUS*) fueron incubadas en un buffer de reacción [1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido; 50 mM de NaH_2PO_4 ; 50 mM de Na_2HPO_4 ; 10 mM de E.D.T.A.; 0.1% (v/v) de Triton [™] X-100; 2 mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$; 2 mM de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$; el pH se ajustó a 7 con KOH] durante toda noche (20 minutos para las líneas de *pAtEXP7::GUS* y *pERF115::GUS-GFP*) a 37°C, para evidenciar la actividad de la enzima β -glucuronidasa. El buffer de reacción se sustituyó por la solución 1 [0.2 M de HCl; 20% (v/v) de CH_3OH] durante 50 minutos a 62 °C, después esta se reemplazó con la solución 2 [7% (m/v) de NaOH; 60% (v/v) de $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$] durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las plántulas fueron tratadas sucesivamente durante 20 minutos con soluciones de etanol al 40, 20 y 10% (v/v), desechando el tratamiento anterior y sustituyéndolo por el siguiente. Finalmente, las plántulas se colocaron en una solución de glicerol al 50% (v/v) dentro de cámaras de vidrio elaboradas manualmente con cubreobjetos, portaobjetos, parafilm y barniz para uñas transparente. Estas preparaciones fueron analizadas en un microscopio de campo claro (AmScope T490B) acoplado a un sistema de captura de micrografías, para obtener imágenes de las raíces creciendo en los distintos tratamientos.

6.6. Análisis de expresión *GUS*

Las imágenes de los tejidos mostrando actividad *GUS* fueron analizadas con el software IMAGEJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) para obtener el área de expresión en μm^2 y la intensidad de expresión en unidades arbitrarias (UA). Las UA se calcularon invirtiendo los píxeles azules y separando los canales de color de la imagen. A partir del canal rojo (abarcando todos los tonos del color azul antes de la inversión), se registraron los píxeles de un área definida (píxeles/ μm^2), restando aquellos que corresponden al fondo de la imagen y normalizando a uno el valor de la condición control de las plántulas tipo silvestre.

6.7. Introgresión del trasgén *DR5::uidA* en la mutante *eir1/pin2*.

Flores de la mutante *eir1/pin2* (receptora) crecidas en maceta fueron fecundadas manualmente con el polen de flores de plantas *DR5::uidA* (polinizadora), obteniendo la silicua de la cruce, de la cual se colectaron las semillas de la primer generación filial (F₁). Las semillas F₁ fueron germinadas en medios de selección suplementados con 20 nM de AIA y se seleccionaron las plántulas con el fenotipo silvestre (raíz corta, correspondiente al fenotipo *DR5::uidA*/tipo silvestre). Las plántulas seleccionadas se crecieron en suelo para recolectar semillas de la segunda generación filial (F₂). Las semillas F₂ se germinaron en las mismas condiciones que las semillas F₁, pero en esta ocasión se seleccionaron por el fenotipo mutante (raíz larga correspondiente al fenotipo *eir1/pin2*). Las plantas seleccionadas, se sembraron nuevamente en suelo para obtener la siguiente generación filial (F₃). Finalmente, las semillas F₃ se utilizaron para analizar la actividad de β -glucuronidasa e identificar a las mutantes *eir1/pin2* que portaban a *DR5::uidA*.

6.8. Estadística

Con el conjunto de datos de cada parámetro analizado, se construyó una matriz para realizar un análisis de ANOVA factorial por la prueba *post hoc* de Tukey, asignando categorías a los valores de su media y desviación estándar mediante el programa Statistica 10 (TIBCO Data Science-Statistica). Las categorías fueron nombradas por letras minúsculas en orden alfabético, donde “a” corresponde a la categoría con el valor más alto y las subsecuentes letras corresponden a valores más bajos en orden descendente. Las letras se colocaron sobre la barra de desviación estándar que emerge de las medias en cada gráfica, para identificar con letras distintas, cuando dos valores difieren entre si con una significancia estadística de $P \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1. El As (III) inhibe el crecimiento de la raíz en *A. thaliana*

Para analizar el papel del arsénico (III) [As (III)] en la raíz de *A. thaliana*, se crecieron plántulas de 4 días después de la germinación sobre medios MS 0.2X control (C) y suplementados con concentraciones de 0, 3, 6, 12, 24 y 48 μM de NaAsO_2 . 6 días después de la interacción (6ddi), se analizó la longitud de la raíz primaria, encontrando que a partir de la concentración de 3 μM ocurrió un acortamiento que se incrementó gradualmente hasta alcanzar la concentración de 12 μM , siendo esta última concentración en donde se obtuvo la mayor inhibición del crecimiento, similar al observado en las concentraciones de 24 μM y 48 μM (**Fig. 12a**). Para el caso de las raíces laterales (RL), a partir de la concentración de 6 μM ocurrió un incremento gradual hasta 24 μM , en tanto que 48 μM mostró una densidad de RL similar al de la concentración previa (**Fig. 12b**), sin embargo, dicho incremento en el número de RL, estuvo acompañado con una disminución en su longitud (**Fig. 12c**). Finalmente, la biomasa de la raíz disminuyó de manera dependiente al incremento en la concentración de NaAsO_2 (**Fig. 12d**). En los paneles “e” y “f” de la **Figura 12**, se puede observar el fenotipo contrastante de la condición control y el tratamiento de mayor concentración (48 μM), el cual afectó tanto a la raíz, como al follaje de las plántulas. Debido a que las plántulas mostraron crecimientos similares en el tratamiento C (sin solvente) y el de 0 μM de NaAsO_2 (donde solo se aplicó el volumen máximo de solvente utilizado para contener al compuesto), además de que el tratamiento de 48 μM mostró el mismo efecto que el de 24 μM para todos los parámetros analizados, en los experimentos posteriores se decidió eliminar ambos tratamientos (C y 48 μM), estableciéndose que bajo estas condiciones de crecimiento, el solvente no tiene efectos significativos sobre el crecimiento de las plántulas y el efecto máximo del arsenito se consigue en 24 μM .

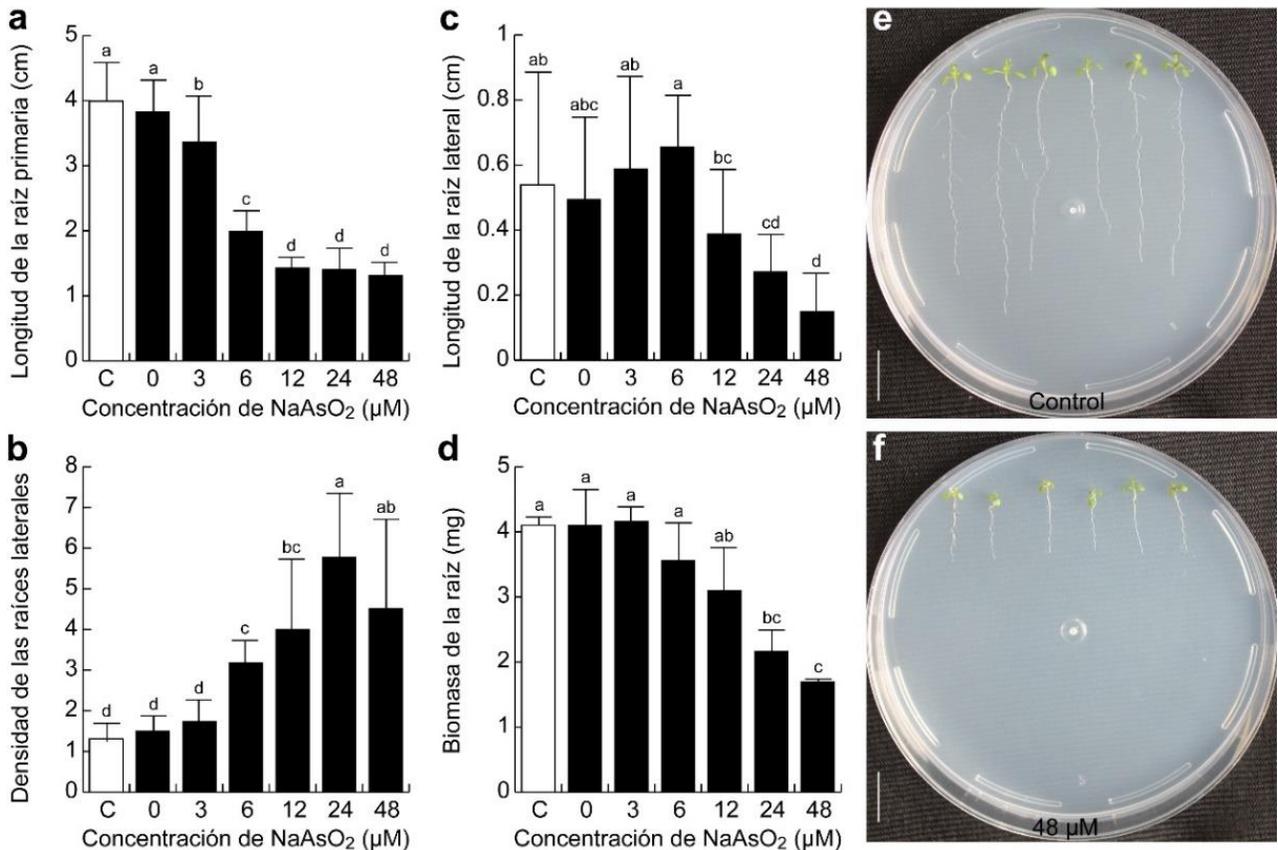


Figura 12. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO₂) sobre el crecimiento del sistema de la raíz en plántulas de *A. thaliana*. Semillas tipo silvestres fueron germinadas en medio MS 0.2X y 4 días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a nuevos medios MS 0.2X control (C) y suplementado con 0, 3, 6, 12, 24 y 48 μM de NaAsO₂ durante seis días adicionales. Los parámetros de (a) longitud de la raíz primaria, (b) densidad de raíz lateral, (c) longitud de la raíz lateral y (d) biomasa de la raíz fueron registrados. Las imágenes son representativas de la (e) condición control y el (f) tratamiento de 48 μM de NaAsO₂ del experimento (barra de escala = 1 cm). C = condición control sin solvente; 0 μM = tratamiento donde únicamente se aplicó el solvente. Los valores mostrados representan la media ± la desviación estándar (n = 18 plántulas para a-c; n = 3 placas con 6 plántulas para d). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

7.2. El As (III) bloquea la proliferación y elongación celular ocasionando daño en los tejidos

Una vez que se observó la represión del crecimiento de la raíz en respuesta al As (III), se decidió averiguar si esta disminución del crecimiento se asocia a un bloqueo de la proliferación y/o la expansión celular. Para esto, se analizó la expresión de la

línea *CycB1;1::uidA*, la cual porta el promotor del gen codificando a la proteína CICLINA-B-1 que funciona como efectora para la transición G2/M del ciclo celular y es reportera de la actividad mitótica en los tejidos (Planchais, 2002).

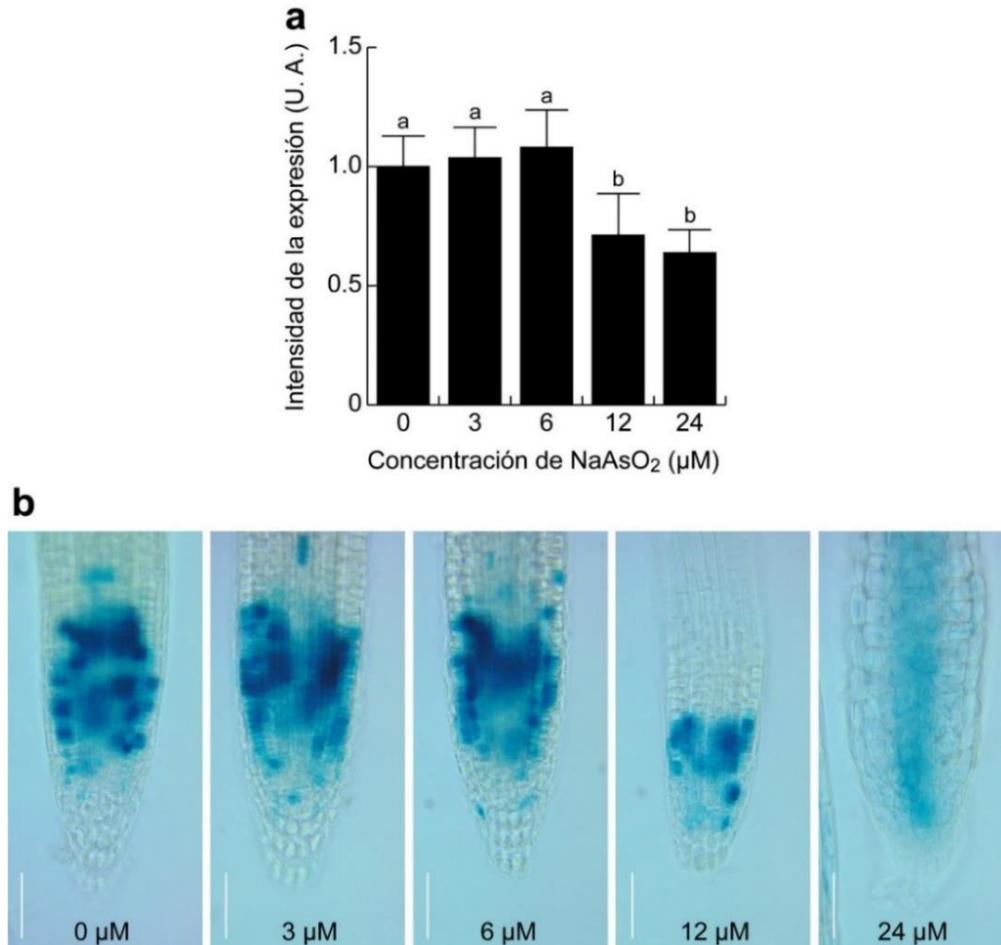


Figura 13. Expresión de *CycB1;1::uidA* en la raíz primaria de *A. thaliana* durante la respuesta al NaAsO_2 . Semillas de la línea transgénica *CycB1;1::uidA* fueron germinadas en medio MS 0.2X y 4 días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a medio MS 0.2X suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO_2 durante seis días adicionales. La cuantificación de la (a) intensidad de la expresión de *CycB1;1::uidA* se llevó a cabo a partir de las (b) imágenes de la expresión del reportero en la zona meristemática (barra de escala = 50 μm). Los valores mostrados representan la media \pm la desviación estándar ($n = 12$ plántulas). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Semillas de la línea *CycB1;1::uidA* fueron germinadas y crecidas en medios MS 0.2X, 4 días después de la germinación (ddg) se transfirieron a medios suplementados con 0, 3, 6, 12 y 24 μM NaAsO_2 . Subsecuentemente, las plántulas

fueron procesadas para analizar la actividad de β -glucuronidasa (GUS), mediante microscopía óptica de campo claro. El análisis de la expresión del reportero mostró una clara disminución de la actividad mitótica en el tratamiento de 12 μM (**Fig. 13a**). Así mismo, las imágenes permitieron visualizar que en el meristemo de la raíz primaria en plántulas crecidas sobre medios sin (0 μM) y con (3 y 6 μM) NaAsO_2 , hay un patrón de expresión que se concentra en puntos específicos señalando los núcleos de las células mitóticamente activas. En el tratamiento de 24 μM ocurrió un cambio drástico, ya que la expresión localizada en los núcleos de las células se perdió por completo (**Fig. 13b**).

Para evaluar el efecto sobre la elongación celular, se utilizaron plántulas de la línea reportera *pAtEXP7::GUS*, la cual se expresa en el tejido epidérmico de la raíz que da origen a los pelos radicales (tricoblastos) (Cosgrove *et al.*, 2002). Las plántulas portando la construcción *pAtEXP7::GUS* fueron crecidas en los tratamientos de NaAsO_2 y procesadas para visualizar la actividad de GUS en plántulas de 10 ddg. Con base en la expresión del gen reportero en el tejido diferenciado, se midió tanto la zona de elongación (ZE) como la longitud de las células en la zona de diferenciación (LCZD). El análisis mostró que la longitud de la ZE disminuye ligeramente en el tratamiento de 6 μM , mientras que en 12 y 24 μM hubo un crecimiento del 37% y 28%, respectivamente, con respecto al de la condición de 0 μM del compuesto (**Fig. 14a**). Para el caso de la LCZD, esta fue reduciéndose gradualmente de manera dependiente al incremento de la concentración del NaAsO_2 (**Fig. 14b**). Las imágenes del experimento muestran que si bien la expresión de *pAtEXP7::GUS* se extendió gradualmente hacia la punta de la raíz conforme aumentó la concentración de NaAsO_2 , este patrón de expresión no ocurrió en todas las células de la zona de diferenciación (**Fig. 14c**).

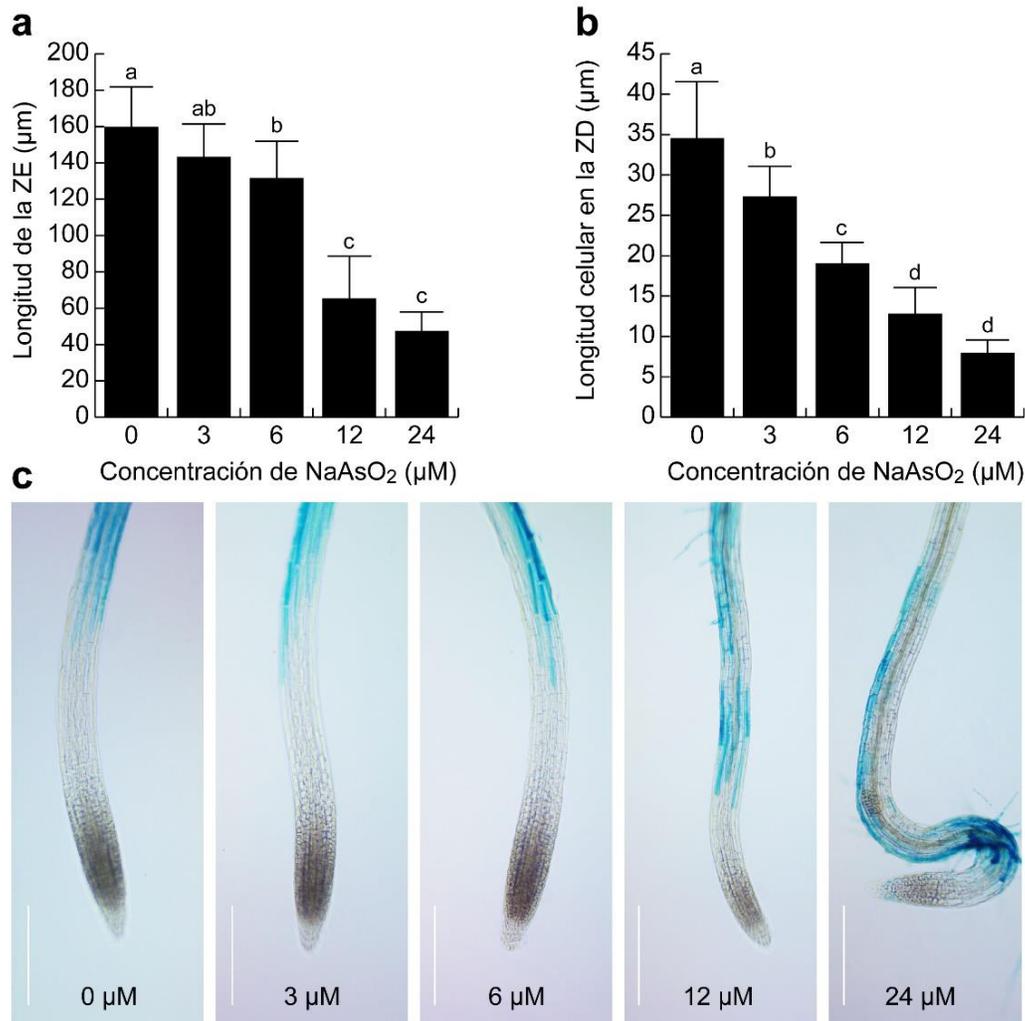


Figura 14. Efecto del NaAsO₂ sobre la expresión de *pAtEXP7::GUS* en la raíz primaria de *A. thaliana*. Semillas de la línea transgénica *pAtEXP7::GUS* fueron germinadas en medio MS 0.2X y 4 días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a medio MS 0.2X suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 µM de NaAsO₂ durante seis días adicionales. El registro de la (a) longitud de la ZE y la (b) longitud celular en la ZD se llevó a cabo a partir de las (c) imágenes de la expresión del reportero en la punta de la raíz primaria (barra de escala = 200 µm). ZE = zona de elongación; ZD = zona de diferenciación. Los valores mostrados representan la media ± la desviación estándar (n = 12 plántulas). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Debido a que los experimentos anteriores demostraron que el As (III) afecta el crecimiento radical, se decidió evaluar si el As (III) también dañaba los tejidos. Para esto se utilizó el promotor del gen *ERF115*, el cual codifica para un factor de transcripción que limita la tasa de división de las células del centro quiescente y es esencial para el restablecimiento y mantenimiento del nicho de células madre. Además, la muerte celular promueve su actividad en las células que se encuentran

en contacto directo con células dañadas (Heyman *et al.*, 2013; Heyman *et al.*, 2016). Por lo antes mencionado, la construcción *pERF115::GUS-GFP* es utilizada para identificar el daño en los tejidos. Un ensayo con plántulas portando este reportero de daño celular, similar a los realizados con las líneas *CycB1;1::uidA* y *pAtEXP7::GUS*, mostró que en la condición sin el compuesto (0 μM), las plántulas no mostraron expresión de *pERF115::GUS-GFP* en ningún tejido de la punta de la raíz primaria, este fenotipo se mantuvo en los tratamiento de 3 y 6 μM , sin embargo, en las concentraciones de 12 y 24 μM se observó expresión del reportero, siendo ligera y localizada en la vasculatura a nivel de la zona de elongación en el tratamiento de 12 μM y más acentuada en el cilindro vascular, abarcando las zonas de división, elongación y diferenciación en el tratamiento de 24 μM (**Fig. 15**).

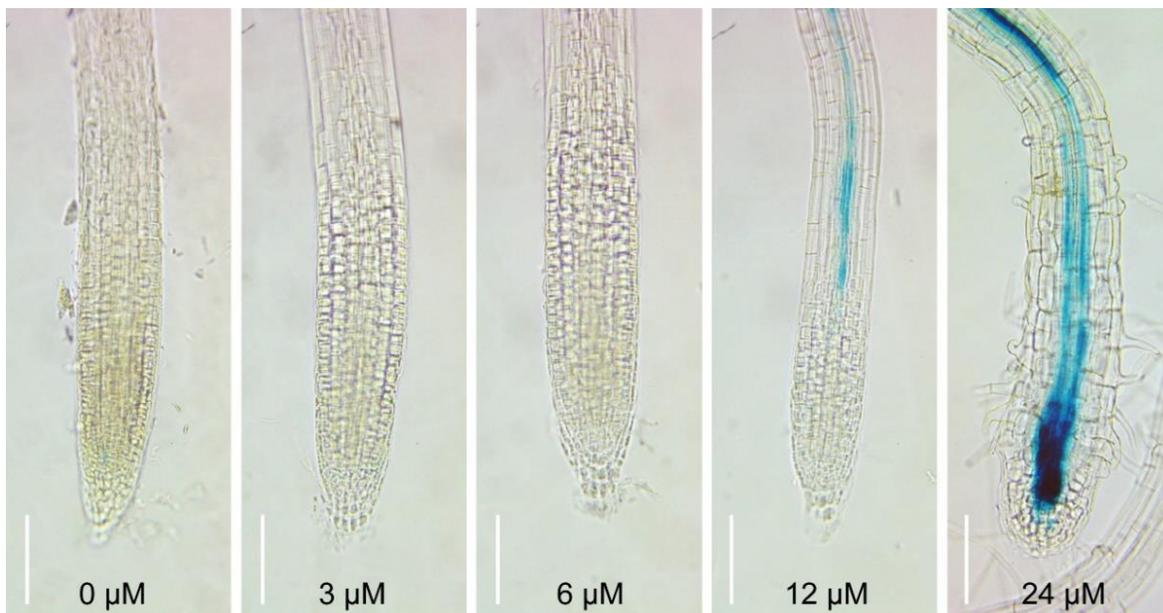


Figura 15. Expresión de *pERF115::GUS-GFP* en la raíz primaria de *A. thaliana* durante la respuesta al NaAsO_2 . Semillas de la línea transgénica *pERF115::GUS-GFP* fueron germinadas en medio MS 0.2X y 4 días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a medio MS 0.2X suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO_2 durante seis días adicionales (barra de escala = 100 μm). Las imágenes son representativas de 12 individuos analizados en cada condición de crecimiento. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

7.3. El As (III) altera el patrón de distribución de auxinas

Las auxinas son los principales reguladores del desarrollo de la raíz, por lo que cambios fisiológicos en el sistema radical frecuentemente involucran la participación de dicha fitohormona. Ulmasov y colaboradores (1997), diseñaron un promotor sintético formado por cinco repeticiones de un elemento de respuesta a auxinas que fusionaron al marco de lectura abierto del gen codificando para la enzima β -glucuronidasa (GUS), esta construcción denominada *DR5::GUS*, es una herramienta para monitorear los niveles y el patrón de localización de las auxinas. Plántulas de 4 días después de la germinación (ddg) de esta línea, fueron transferidas a medios suplementados con concentraciones de 0, 3, 6, 12 y 24 μM NaAsO_2 , 6 días después se analizó la actividad GUS en la punta de la raíz. En los tratamientos de 12 y 24 μM , el reportero presentó un incremento y una disminución de expresión, respectivamente (**Fig. 16a**), mientras que el área de expresión solo disminuyó en el tratamiento de 24 μM (**Fig. 16b**). En la condición sin NaAsO_2 (0 μM), *DR5::GUS* se expresó en la columela, lo cual ocurrió en todos los tratamientos, sin embargo, la intensidad y áreas de expresión modificadas en 12 y 24 μM estuvieron acompañadas por cambios en la morfología radical (**Fig. 16c**).

Dado que se mostró al As (III) como causante de la represión sobre el crecimiento de la raíz primaria modificando el patrón de distribución de auxinas, se decidió analizar si la aplicación de auxinas exógenas es capaz de revertir el fenotipo de acortamiento de la raíz. Para esto, semillas de tipo silvestre (ecotipo Col-0) fueron germinadas y plántulas de 4 ddg se transfirieron a medio MS 0.2X libre de compuestos adicionales (Ctrl), 10 μM de ácido indol acético (AIA), 24 μM de arsenito de sodio (As) o con una mezcla de ambos compuestos (AIA+As), durante seis días.

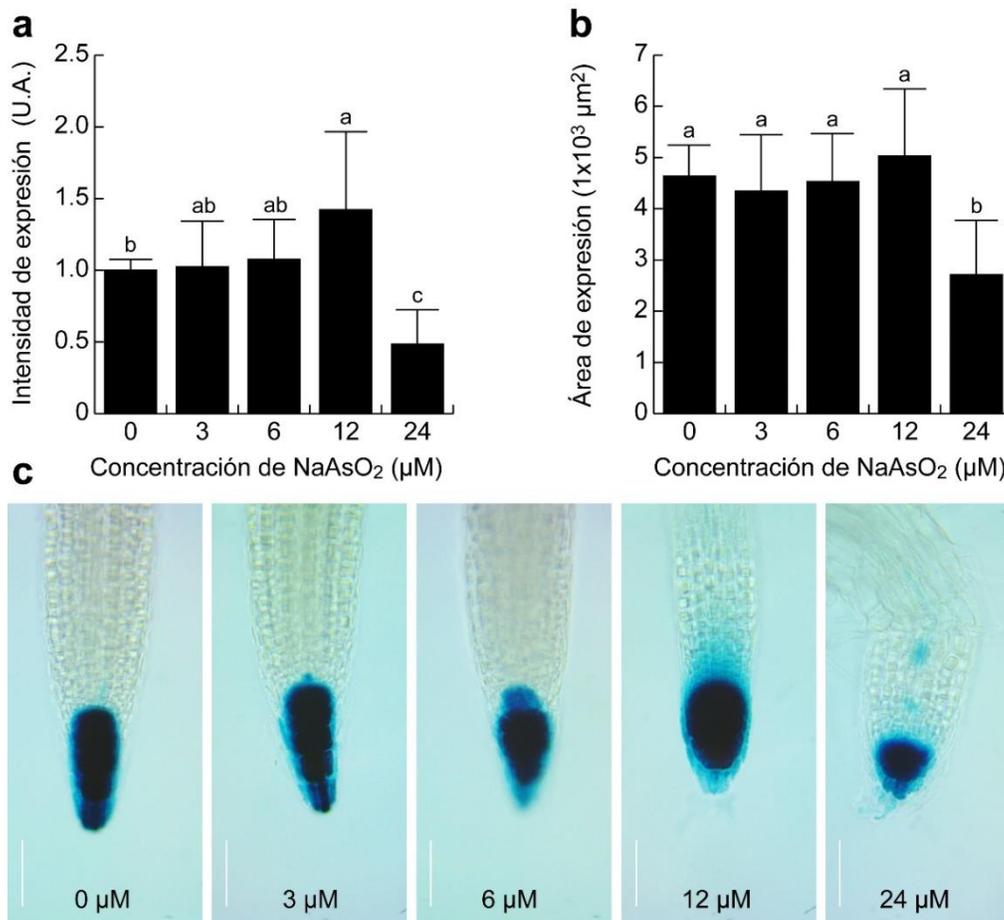


Figura 16. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO₂) sobre la expresión de DR5::GUS en la raíz primaria de *A. thaliana*. Semillas de la línea reportera DR5::GUS fueron germinadas en medio MS 0.2X y 4 días después de la germinación se transfirieron a medio MS 0.2X suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO₂ durante seis días. El registro de la (a) intensidad de la expresión y el (b) área de expresión se llevó a cabo a partir de las (c) imágenes de la expresión del reportero en la punta de la raíz primaria (barra de escala = 50 μm). Los valores mostrados representan la media ± la desviación estándar (n = 12 plántulas). Las letras diferentes indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Comparado con Ctrl, el AIA ocasionó un ligero acortamiento en la raíz primaria, mientras que el As indujo una fuerte represión del crecimiento, por su parte, el tratamiento con ambos compuestos combinados indujo un tamaño de raíz primara similar al de la condición en donde solo se administró As (**Fig. 17a**). Cabe mencionar que además de la similitud en cuanto al efecto en la raíz primaria del tratamiento de As y el de AIA+As, el fenotipo general de las plántulas creciendo en la mezcla de

los compuestos fue muy similar al de aquellas crecidas únicamente con As (**Fig. 17b**).

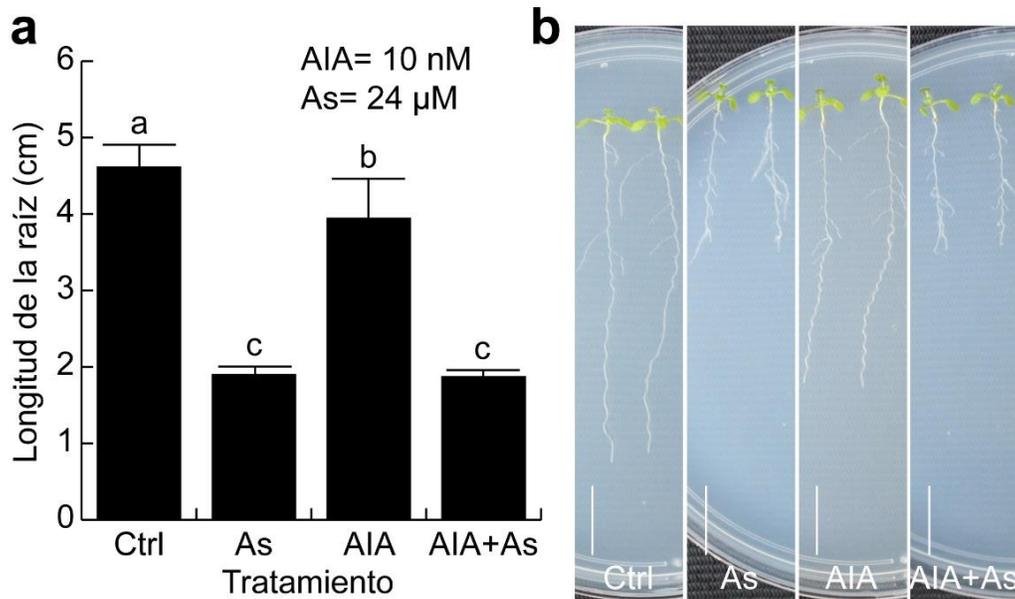


Figura 17. Respuesta de la raíz primaria de *A. thaliana* al ácido indol acético (AIA) y arsenito de sodio (As). Semillas tipo silvestre fueron germinadas en medio MS 0.2X, 4 días después de la germinación las plántulas se transfirieron a medio MS 0.2X fresco, sin (control/Ctrl) y suplementado con 10 nM de AIA, 24 μM de As y la mezcla de ambos compuestos, durante seis días adicionales. La gráfica muestra la (a) longitud de la raíz primaria y las (b) imágenes son representativas de cada uno de los tratamientos en el experimento (barra de escala = 1 cm). Los valores mostrados representan la media ± la desviación estándar (n = 18 plántulas). Las letras diferentes indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

7.4. El As (III) afecta al transporte de auxinas

La distribución de la señal auxínica puede ser afectada por un bloqueo en el transporte de auxinas. En los sistemas de crecimiento *in vitro* es frecuente el uso del ácido *N*-1-naftiltalámico (NPA, por sus siglas en inglés) para bloquear el transporte de auxinas. El NPA es un compuesto sintético que tiene como blanco los transportados de eflujo de auxinas, principalmente los ABC pero en menor grado también los PIN (Teale & Palme, 2018; Li *et al.*, 2019).

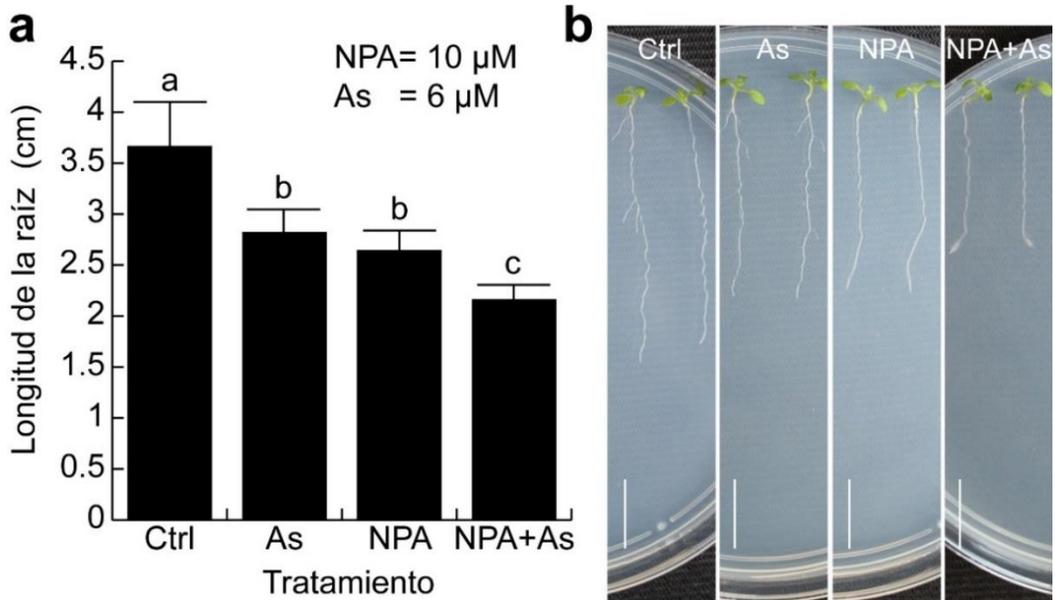


Figura 18. Efecto del arsenito de sodio (As) y al ácido *N*-1-naftilftalámico (NPA) en la raíz primaria de plántulas de *A. thaliana*. Semillas tipo silvestre fueron germinadas en medio MS 0.2X, 4 días después de la germinación las plántulas se transfirieron a medio MS 0.2X fresco, sin (control/Ctrl) y suplementado con 10 μ M de NPA, 6 μ M de As y la mezcla de ambos compuestos, durante seis días adicionales. La gráfica muestra la (a) longitud de la raíz primaria y las (b) imágenes son representativas de cada uno de los tratamientos en el experimento (barra de escala = 1 cm). Los valores mostrados representan la media \pm la desviación estándar ($n = 18$ plántulas). Las letras diferentes indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Entonces, se evaluó el efecto de 10 μ M de NPA solo o en combinación con 6 μ M de arsenito de sodio (As), sobre plántulas tipo silvestre Col-0 de 4 días después de la germinación (ddg). A los 6 días de interacción con los compuestos, tanto el NPA como el As redujeron hasta un 30% la longitud de la raíz primaria, mientras que el tratamiento combinado consiguió una reducción alrededor del 40%, con respecto a la condición control (**Fig. 18a**). En las imágenes del experimento se pudo apreciar que el tratamiento combinado de los compuestos reprime el crecimiento global de las plántulas (**Fig. 18b**).

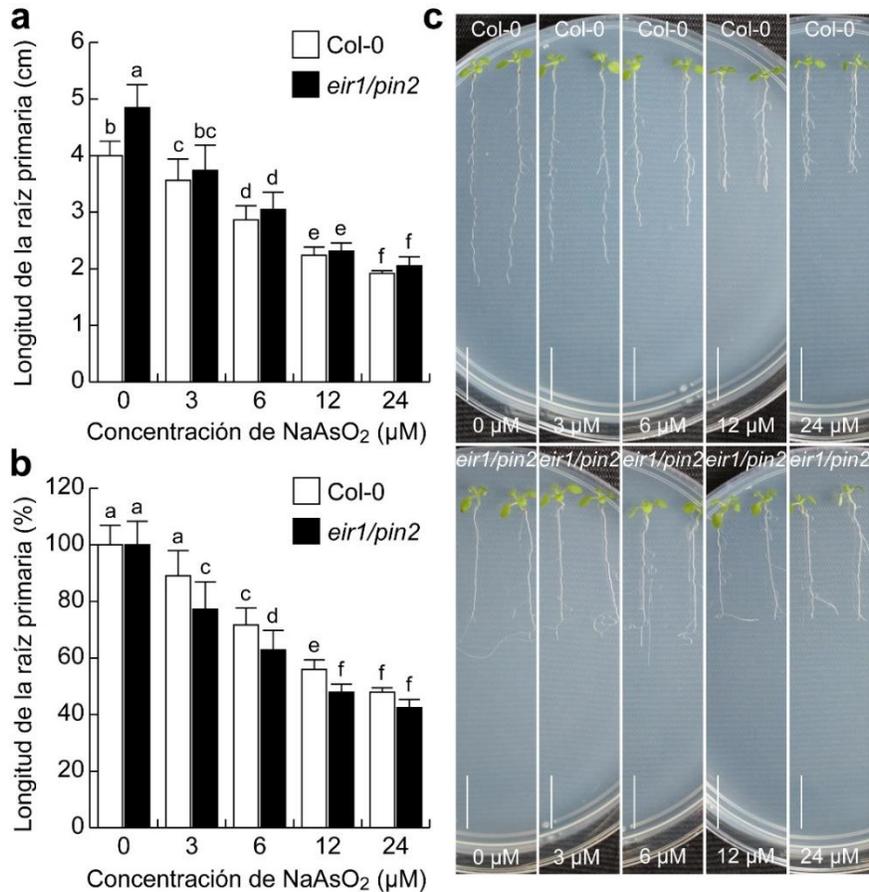


Figura 19. Respuesta de la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre Col-0 y de la línea mutante *eir1/pin2* de *A. thaliana* al arsenito de sodio (NaAsO₂). Semillas del ecotipo silvestre Col-0 y de la línea mutante *eir1/pin2* fueron germinadas en medio MS 0.2X, 4 días después de la germinación las plántulas se transfirieron a nuevo medio MS 0.2X suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO₂. Las gráficas muestran la (a) longitud de la raíz primaria y los (b) valores normalizados a 100% con respecto a los datos del tratamiento control (0 μM). (c) Imágenes representativas de los tratamientos del experimento (barra de escala = 1 cm). Los valores mostrados representan la media ± la desviación estándar (n = 18 plántulas). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Para corroborar el resultado anterior, se decidió analizar la participación en la respuesta al As (III) del transportador de auxinas PIN-FORMED 2 (PIN2), que regula el reflujo lateral de auxinas. Para esto, se utilizó la línea mutante *eir1/pin2*, que tiene un crecimiento de raíz primaria agravitrópico y un transporte de auxinas reducido (Blakeslee *et al.*, 2005). Plántulas de tipo silvestre Col-0 y mutantes *eir1/pin2* se crecieron sobre medios MS 0.2X durante 4 ddg, subsecuentemente se transfirieron a medios suplementados con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO₂, 6 días después se

analizó la longitud de la raíz primaria, mostrando que cada incremento de la concentración del arsenito, ocasionó una disminución gradual en la longitud de la raíz primaria, tanto en las plántulas de tipo silvestre como en la mutante (**Fig. 19a**). Posteriormente, los datos se normalizaron a 100% con respecto al control de ambos tipos de plántulas, lo que reveló que a partir de 3 μM , la mutante *eir1/pin2* mostró una mayor sensibilidad al efecto represor del crecimiento en la raíz primaria cuando se comparó con el tipo silvestre (**Fig. 19b**). Interesantemente, el NaAsO_2 no alteró el crecimiento agravitrópico en la raíz de *eir1/pin2* durante los tratamientos con 3 y 6 μM , sin embargo, su fuerte efecto represor sobre el crecimiento de la raíz primaria en los tratamientos de 12 y 24 μM , impidió observar cualquier tipo de crecimiento (**Fig. 19c**).

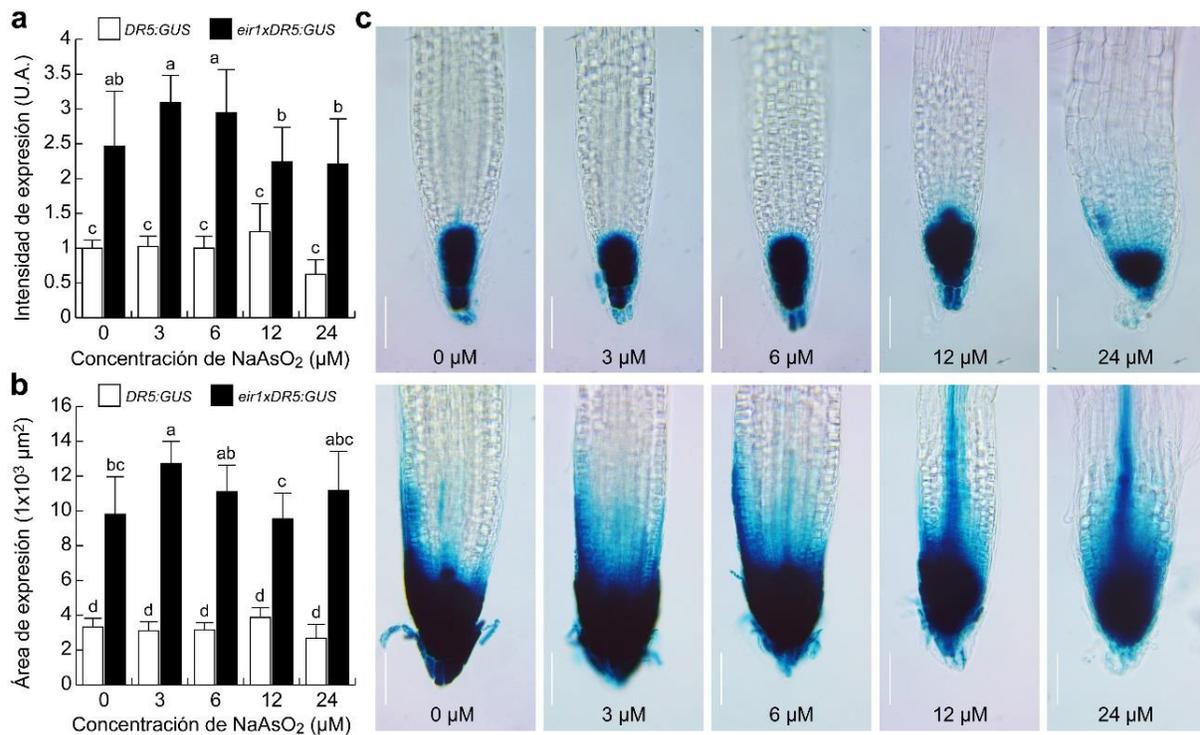


Figura 20. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO_2) sobre la expresión de *DR5::GUS* en la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre Col-0 y mutantes *eir1/pin2* de *A. thaliana*. Semillas tipo silvestre y de la mutante *eir1/pin2* (*pin2xDR5::GUS*) portando la construcción *DR5::GUS*, fueron germinadas en medio MS 0.2X y 4 ddg se transfirieron a medio MS 0.2X suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO_2 durante seis días. El registro de la intensidad de expresión (a) y el (b) área de expresión se realizó con base en las (c) imágenes de la expresión del reportero *DR5::GUS* en la punta de la raíz primaria (barra de escala = 50 μm). Los valores mostrados representan la media \pm la desviación estándar ($n = 12$ plántulas). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Posteriormente, se evaluó el patrón de localización de auxinas en ausencia del transportador PIN2, utilizando el gen reportero *DR5::GUS* en plántulas tipo silvestre (*DR5::GUS*) y en el fondo mutante (*eir1/pin2 DR5::GUS*), en el mismo sistema experimental. Para estos experimentos, inicialmente las plántulas *eir1/pin2 DR5::GUS* fueron obtenidas mediante la introgresión de *DR5::uidA* en el fondo mutante. En este análisis, el reportero en el fondo *eir1/pin2* mostró una intensidad y un área de expresión de al menos el doble en comparación a lo observado en la punta de la raíz de plántulas tipo silvestre, tanto en la condición control (0 μ M), como en cada uno de los tratamientos con NaAsO₂ (**Fig. 20a-b**). Sin embargo, *DR5::GUS* se expresó en la parte central de la zona meristemática durante los tratamientos de 12 y 24 μ M en el fondo mutante, lo cual no ocurrió en ninguna otra condición de crecimiento ni en las plántulas de tipo silvestre, ni en las mutantes *eir1/pin2* (**Fig. 20c**).

7.5. El As (III) induce la expresión de *MPK6* y *MPK3*

Debido a que *MPK6* participa en respuesta a estrés abiótico y los programas de desarrollo temprano de la raíz, se decidió evaluar si el As (III) modificaba la expresión de este gen en la raíz primaria utilizando plántulas de la línea reportera *pMPK6::uidA*. Para esto, las plántulas fueron germinadas y crecidas sobre medios MS 0.2X y 4 días después de la germinación se transfirieron a medios suplementados con las concentraciones de 0, 3, 6, 12 y 24 μ M de NaAsO₂. Después de 6 días, las plántulas se procesaron para visualizar la actividad de GUS con microscopia óptica de campo claro. El análisis indicó que la intensidad de expresión del reportero aumenta con forme incrementa la concentración de As (III) (**Fig. 21a**), mientras que el área de expresión fue de aproximadamente el doble durante en el tratamiento con 24 μ M (**Fig. 21b**). Desde la condición control (0 μ M) hasta 12 μ M, el reportero no se expresó en las células de la zona mitóticamente activa (ver **Fig.**

13b), en cambio, su expresión se localizó en toda la punta de la raíz durante el tratamiento de 24 μM (Fig. 21c).

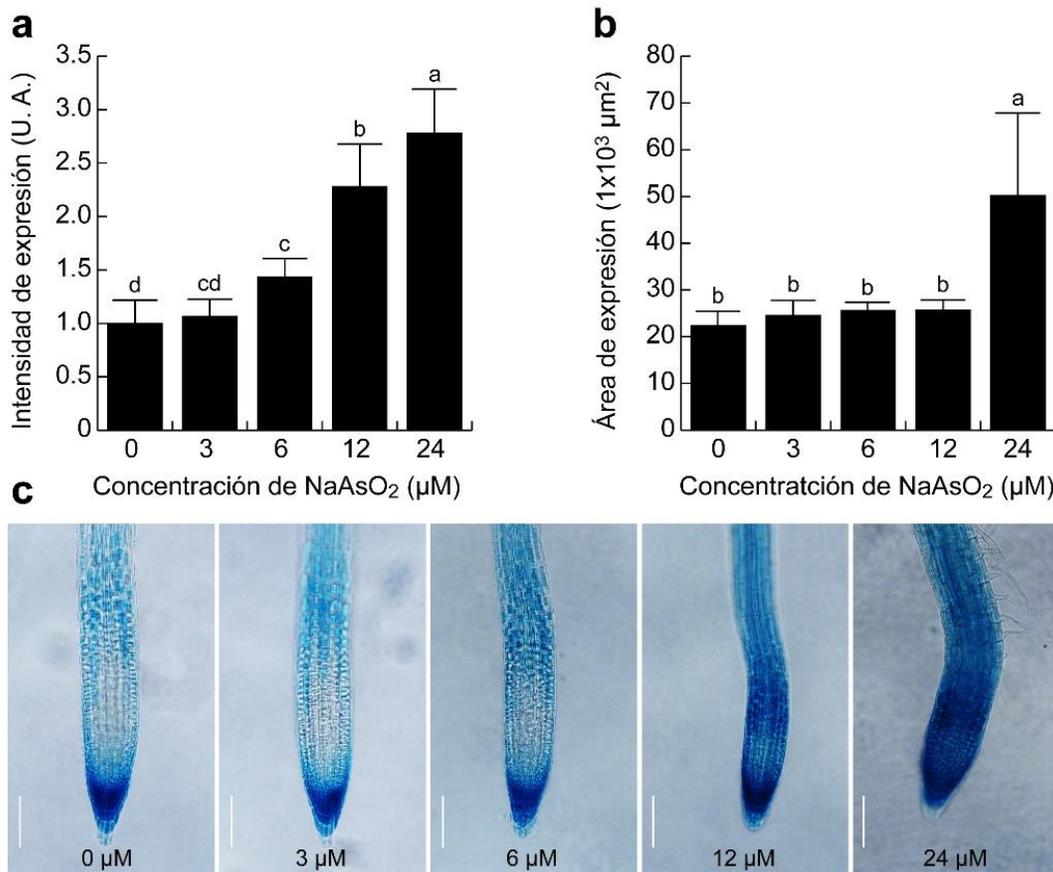


Figura 21. Expresión de *pMPK6::uidA* durante la respuesta al arsenito de sodio (NaAsO_2) en la raíz primaria de *A. thaliana*. Semillas de la línea transgénica *pMPK6::uidA* fueron germinadas en medio MS 0.2X, 4 días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a medio MS 0.2X fresco suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO_2 , durante seis días adicionales. La cuantificación de la (a) intensidad de expresión y del (b) área de expresión se llevó a cabo a partir de las (c) imágenes de las puntas de raíces primarias creciendo en los distintos tratamientos (barra de escala = 100 μm). Los valores mostrados representan la media \pm la desviación estándar ($n = 12$ plántulas). Las letras diferentes indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Debido a que diferentes estudios han demostrado que MPK6 y MPK3 tienen funciones redundantes en diversos procesos biológicos (Asai *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007), se decidió analizar los efectos del arsenito sobre plántulas que portan la construcción reportera *pMPK3::uidA*. Este análisis mostró que en el tratamiento sin el compuesto (0 μM) y en las concentraciones de 3 y 6 μM , las plántulas no muestran

expresión del reportero, mientras que las concentraciones de 12 μM y 24 μM , se observó expresión localizada principalmente en la zona de diferenciación (**Fig. 22**; ver **Fig. 14c**).

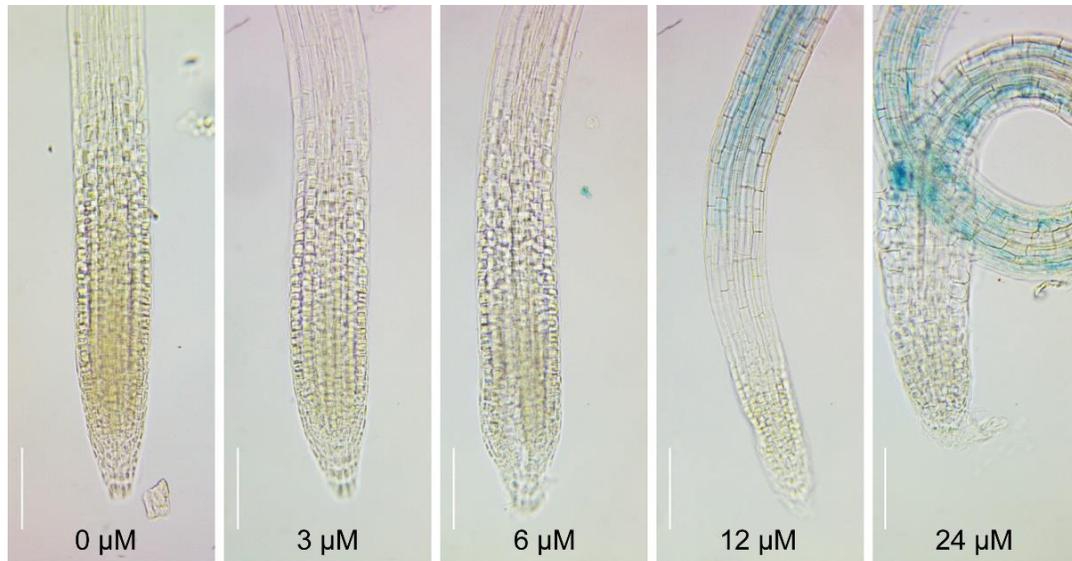


Figura 22. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO_2) sobre la expresión de $p\text{MPK3}::\text{uidA}$ en la raíz primaria de *A. thaliana*. Semillas de la línea transgénica $p\text{MPK3}::\text{uidA}$ fueron germinadas en medio MS 0.2X, 4 días después de la germinación, las plántulas se transfirieron a medio MS 0.2X suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO_2 durante seis días adicionales (barra de escala = 100 μm). Las imágenes son representativas de 12 individuos analizados en cada condición de crecimiento. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

Con la intención de establecer cómo participa MPK6 en la respuesta al As (III), se analizó el crecimiento de la raíz primaria de la línea mutante $mpk6-2$ en presencia del arsenito. Semillas de tipo silvestre Col-0 y de la mutante $mpk6-2$ fueron crecidas y transferidas en las mismas condiciones experimentales ya descritas, encontrándose que la raíz primaria de la mutante es más larga que la raíz primaria del tipo silvestre en todos los tratamientos (**Fig. 23a**). Razón por la cual, los datos se normalizaron a un 100% con respecto a la condición control de cada fondo genético, lo que hizo posible comparar el efecto del NaAsO_2 de manera proporcional al tamaño original de la raíz de ambos tipos de plantas en la condición control. De cualquier manera, dicho análisis mostró valores similares para Col-0 y $mpk6-2$ en todas las condiciones (**Fig. 23b**). En el panel “c” de la **Figura 23**, se puede observar que, si bien las mutantes son más grande que las plántulas de tipo silvestre, el

incremento en la concentración de As (III) ocasiona una represión general del crecimiento, incluyendo el follaje, en ambos tipos de plántulas.

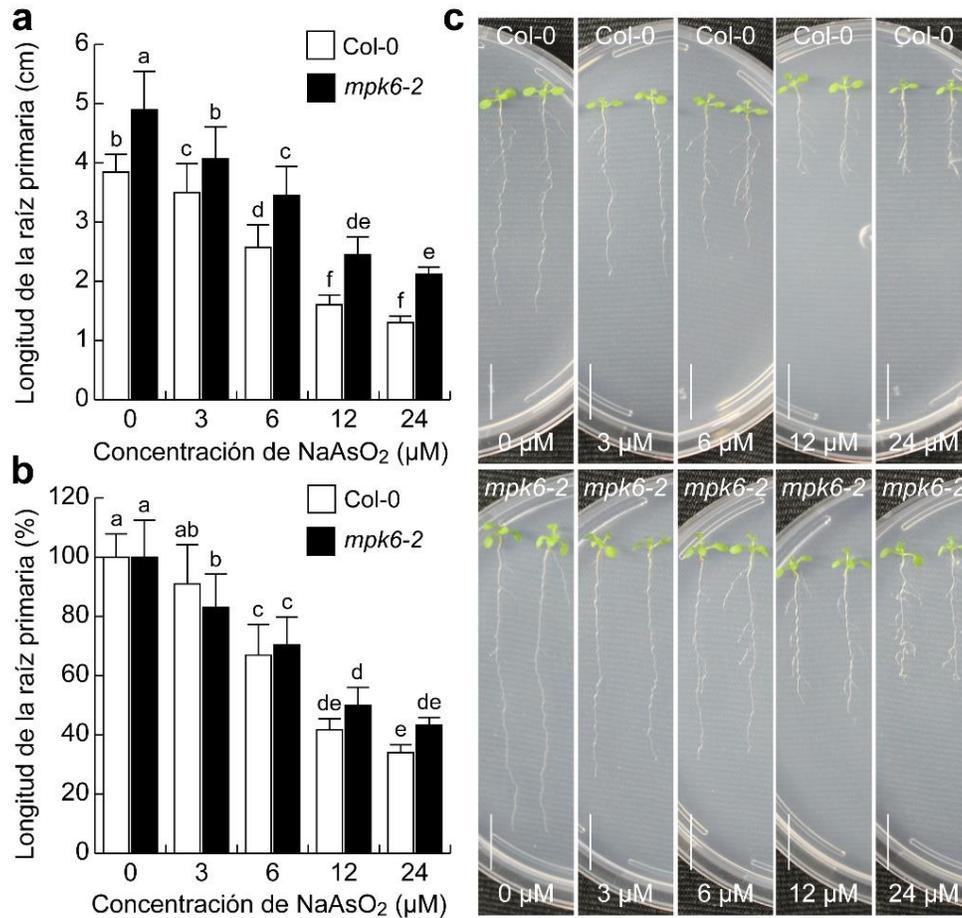


Figura 23. Respuesta de la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre y la mutante *mpk6-2* de *A. thaliana* al arsenito de sodio (NaAsO₂). Semillas del ecotipo Col-0 y de la línea mutante *mpk6-2* fueron germinadas en medio MS 0.2X, 4 días después de la germinación se transfirieron a medio MS 0.2X suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO₂. Se registró la (a) longitud de la raíz primaria y estos datos fueron normalizados a 100% con respecto al valor del tratamiento de 0 μM de cada tipo de plántula, representando (b) la longitud de la raíz primaria de manera porcentual (%). (c) Imágenes representativas de las plántulas creciendo en los tratamientos utilizados en el experimento (barra de escala = 1 cm). Los valores mostrados representan la media ± la desviación estándar (n = 18 plantas). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

De manera similar al caso de MPK6, la participación de MPK3 en la respuesta al As (III) se intentó esclarecer mediante el uso de plántulas de la línea mutante *mpk3-1*. Para esto, plántulas del ecotipo Col-0 y mutantes *mpk3-1* fueron crecidas en diferentes concentraciones de arsenito de sodio. Individuos de 10 ddg crecidos en

estas condiciones, revelaron que la longitud de la raíz primaria disminuyó conforme se incrementó la concentración de NaAsO_2 , tanto en las plántulas tipo silvestre como en las mutantes *mpk3-1*. Además, en medios suplementados con igual concentración del arsenito, no hubo diferencias de tamaño entre ambos tipos de plántulas (**Fig. 24a**). En las imágenes del panel “b” en la **Figura 24**, se puede observar que a diferencia de *mpk6-2*, la mutante *mpk3-1* presenta un fenotipo similar al tipo silvestre Col-0 en cada uno de los tratamientos utilizados.

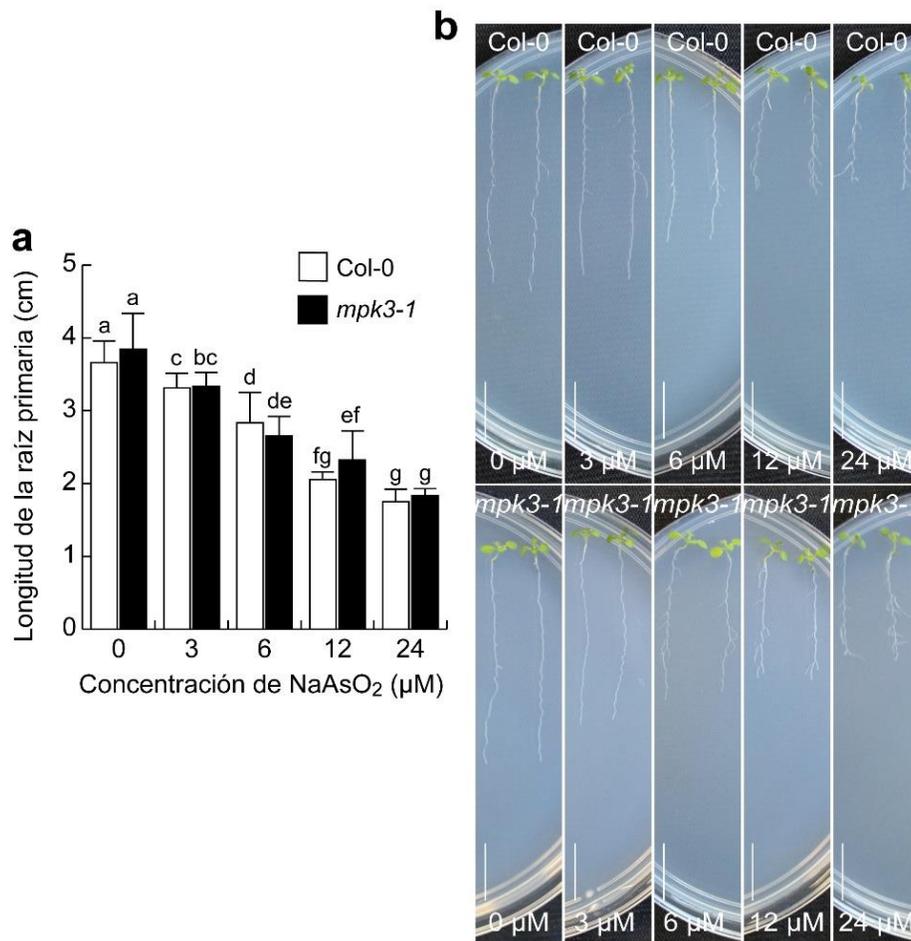


Figura 24. Efecto del arsenito de sodio (NaAsO_2) sobre la raíz primaria de plántulas de tipo silvestre y mutantes *mpk3-1* de *A. thaliana*. Semillas del ecotipo Col-0 y de la línea mutante *mpk3-1* fueron germinadas en medio MS 0.2X, 4 días después de la germinación se transfirieron a medio MS 0.2X suplementado con 0, 3, 6, 12 y 24 μM de NaAsO_2 . La (a) longitud de la raíz primaria fue registrada y como apoyo visual, se tomaron (b) imágenes representativas de los tratamientos utilizados en el experimento (barra de escala = 1 cm). Los valores mostrados representan la media \pm la desviación estándar ($n = 18$ plantas). Las letras distintas indican una diferencia estadística de un análisis Tukey con un valor de $P \leq 0.05$. El experimento se repitió dos veces con resultados similares.

8. DISCUSIÓN

En el suelo están presentes metales pesados y metaloides, cuyas concentraciones incrementan debido a las actividades antropogénicas. La raíz de las plantas es el principal sitio de contacto con los iones de metales pesados y metaloides en el suelo, los cuales reducen el crecimiento vegetal al modificar la arquitectura del sistema radical (Kahle, 1993; Gill, 2014). En este trabajo se realizaron diversos análisis enfocados a elucidar el mecanismo por el cual el arsénico, en su forma inorgánica trivalente de arsenito [As (III)], afecta el crecimiento de la raíz de *A. thaliana*. El efecto del compuesto fue evaluado en el sistema radical, mostrando que el As (III) reprime el crecimiento general afectando la elongación de la raíz primaria e induciendo la formación de raíces laterales de tamaño pequeño. Una raíz primaria reducida con numerosas raíces laterales cortas, resulta en una reducción de la biomasa, sugiriendo que el incremento en la formación de raíces laterales es un intento de la planta por maximizar la superficie de captación de agua y nutrientes, es decir, compensar la menor longitud de raíces laterales con un incremento de su número (**Fig. 12**).

Ya que las raíces laterales emergen de la raíz primaria (RP), el crecimiento de esta última determina la configuración del sistema radical, motivo por el cual los análisis subsecuentes se realizaron sobre la RP. El análisis de la expresión *CyCB1::uidA* reveló que las plántulas creciendo en 3 y 6 μM de arsenito de sodio (NaAsO_2) no tuvieron alteraciones en la actividad mitótica del meristemo apical de la raíz (RAM, por sus siglas en inglés), sin embargo, el tratamiento de 12 μM de NaAsO_2 redujo considerablemente la mitosis en el RAM, por su parte, 24 μM NaAsO_2 desapareció la expresión localizada del reportero en los núcleos de las células del RAM, las cuales son de mayor tamaño ya que no experimentaron divisiones celulares (**Fig. 13**). En cuanto a la expresión de *pAtEXP7::GUS* que revela el tejido diferenciado de la zona de elongación (ZE), indicó que esta zona se ve significativamente afectada desde la concentración de 6 μM de NaAsO_2 , sin embargo, la longitud celular de la zona de diferenciación (ZD), señaló que a partir del primer tratamiento (3 μM de NaAsO_2), disminuye la expansión de las células, incrementándose gradualmente el

efecto con el aumento de la concentración del arsenito; de estas observaciones, se infiere que en la ZE ocurre un arresto de la expansión celular, dando como resultado células diferenciadas de menor tamaño en la ZD (**Fig. 14**). Para el caso de la línea *pERF115::GUS-GFP*, la expresión de este marcador de daño celular permitió evidenciar que el As (III) es capaz de bloquear los procesos celulares en las concentraciones de 12 y 24 μM de NaAsO_2 , activando los mecanismos de reparación que son necesarios en las células en expansión a la concentración de 12 μM , mientras que en la de 24 μM , tanto la zona de elongación como la zona meristemática activan fuertemente la maquinaria involucrada con la reparación celular (**Fig. 15**). En conjunto, los resultados de los tres experimentos anteriores muestran que si bien hay una expansión celular disminuida durante las concentraciones bajas (3 y 6 μM de NaAsO_2), las concentraciones altas (12 y 24 μM de NaAsO_2) involucran la disminución en el tamaño y el número de células, probablemente ocasionada por el bloqueo en procesos celulares que conllevan a activar los mecanismos de reparación celular en los que participa ERF115.

Las auxinas y sus precursores son las fitohormonas principales que se encargan de regular el crecimiento y desarrollo de la raíz, participando en los procesos de proliferación y elongación celular (Overvoorde *et al.*, 2010). Debido a que el arsenito altera ambos procesos, se decidió analizar su efecto sobre el patrón de distribución de auxinas con el uso del reportero de respuesta a auxinas *DR5::GUS*, el cual indicó que la actividad auxínica ocurre de manera más acentuada en la punta de la raíz con el tratamiento de 12 μM de NaAsO_2 , para disminuir considerablemente en la concentración de 24 μM (**Fig. 16**). Ya que dichos efectos en la actividad de la señalización por auxinas podrían asociarse a una alteración en la concentración de auxinas o a su movilización, se decidió hacer un tratamiento suplementando auxinas exógenas junto con 24 μM de NaAsO_2 , mostrándo que este exceso de auxinas no puede revertir el efecto del As (III), por lo que la biosíntesis de auxinas no parece estar alterada (**Fig. 17**); de tal manera, es posible que la movilización de las auxinas a través de los transportadores, sea el mecanismo afectado, induciendo una acumulación de auxinas en la punta de la raíz primaria a 12 μM de NaAsO_2 , mientras que en 24 μM de NaAsO_2 , causa la disminución en la actividad auxínica, como lo

reveló el marcador *DR5::GUS* (**Fig. 16**). La movilización de auxinas de una célula a otra se lleva a cabo a través de transportadores de eflujo de la superfamilia ABCB y de la familia de proteínas PIN-FORMED (PIN1-8) (Michniewicz *et al.*, 2007), por lo que inicialmente se decidió evaluar el efecto del inhibidor de eflujo auxinas (NPA), el cual afecta de manera principal el funcionamiento de los transportadores ABCB (Teale & Palme, 2018; Li *et al.*, 2019). El análisis mostró que el NPA por sí solo reprime el crecimiento de la RP de *Arabidopsis thaliana* L., de forma análoga a lo reportado por Li *et al.*, (2019), mientras que la combinación del NPA y el As resultó en un efecto mayor sobre el acortamiento de la RP (**Fig. 18**). Bloquear el funcionamiento de los transportadores ABCB con NPA genera que no se expulsan las auxinas hacia otras células de una manera eficiente, sin embargo, como el NPA actúa principalmente sobre los transportadores ABCB, los PIN aún podrían estar expulsando las auxinas hacia otras células en menor cantidad. Ashraf y colaboradores (2020) reportaron que el As (III) afecta el transporte de auxinas a nivel del transportador PIN2, por lo que el efecto sumado del NPA y el As (III) ocasionarían un bloqueo completo en el eflujo de auxinas, y por lo tanto, en el crecimiento de la raíz primaria.

Ya que la proteína de eflujo PIN2 se encarga de redistribuir las auxinas lateralmente hacia otros tejidos (Křeček *et al.*, 2009; Michniewicz *et al.*, 2007), se analizó la participación de PIN2 en respuesta al arsenito, comparando el crecimiento de la RP de plántulas tipo silvestre Col-0 y la mutante *eir1/pin2*, que mostró ser más sensibles al tratamiento con el As (III) al tener una reducción acentuada del crecimiento de la RP (**Fig. 19**), de estas observaciones se deduce que la proteína de eflujo PIN2 modula la respuesta de la raíz al arsenito, lo cual concuerda a lo reportado por Ashraf y colaboradores (2020), bajo sus condiciones experimentales. En concordancia con estos resultados, el análisis de la expresión de *DR5::GUS* en el fondo mutante *eir1/pin2*, mostró un excesivo incremento de la actividad auxínica en la columela y en los tejidos vasculares, en comparación con lo observado en el tipo silvestre Col-0 en los tratamientos de NaAsO₂ (**Fig. 20**). Así, probablemente las auxinas no se redistribuyen hacia los demás tejidos debido a la ausencia del transportador PIN2, acumulándose en la columela y la cofia lateral de la raíz durante

los tratamientos de 0, 3 y 6 μM , mientras que en los tratamientos más altos (12 y 24 μM) también se llega a acumular en los tejidos vasculares. Lo antes mencionado, explicaría por qué se observó un incremento de la intensidad de *DR5::GUS* en la plántulas tipo silvestre tratadas con 12 μM de NaAsO_2 , ya que dicha concentración puede ser la óptima para afectar el transporte de auxinas a nivel de PIN2 en las plántulas tipo silvestre (**Fig. 16**).

MPK6 es una cinasa de proteínas activada por mitógenos que participa en la resistencia a diversos tipos de estrés abiótico, así como también en los procesos de desarrollo temprano de la raíz (López-Bucio *et al.*, 2014). Se ha reportado que MPK6 regula la expresión de *PIN2* durante la deficiencia de fosfato, una condición de estrés abiótico que inhibe el crecimiento de la RP de *Arabidopsis thaliana* L. (López-Bucio *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019). Debido a que el As (III) inhibe el crecimiento y desarrollo de la RP de *Arabidopsis thaliana* L., además de alterar el transporte de auxinas mediado por el transportador PIN2, se decidió analizar la expresión de la línea reportera *pMPK6::uidA* en respuesta al arsenito de sodio (NaAsO_2). Este análisis indicó que la expresión de *MPK6* aumentó en relación directa con el incremento de la concentración de NaAsO_2 , resultando que en los tratamientos 12 y 24 μM la expresión se acentuara intensamente en las diversas zonas de la raíz (meristemática, de elongación y diferenciación) (**Fig. 21**). Esto claramente indica que el arsenito promueve la expresión de *MPK6* en las células de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* L. De este modo, se evaluó la participación de *MPK6* a través del uso de la mutante *mpk6-2*, la cual, sorprendentemente, en respuesta al arsenito mostró un crecimiento de la raíz primaria similar al de las plántulas de tipo silvestre Col-0 (**Fig. 22**), sugiriendo que aparentemente *MPK6* no participa en respuesta al arsenito o que su función puede ser compensada por alguna otra MAP cinasa. Al respecto, se ha reportado redundancia funcional entre proteínas de la familia de MAP cinasas, particularmente entre MPK6 y MPK3 que tienen funciones redundantes en diversos procesos biológicos (Asai *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2007). Para evaluar esta posibilidad, se analizó el comportamiento de la línea *pMPK3::uidA* en respuesta al NaAsO_2 . Interesantemente, la expresión de *MPK3* se visualizó a partir de 12 μM de NaAsO_2 , permaneciendo hasta 24 μM en la zona de

diferenciación celular (**Fig. 23**). Si bien el As (III) claramente induce la expresión de *MPK3*, la mutante *mpk3-1*, al igual que la mutante *mpk6-2*, tampoco mostró un comportamiento diferente al de las plántulas de tipo silvestre Col-0 en respuesta al NaAsO_2 (**Fig. 24**). De tal manera, es probable que en cada una de las mutantes *mpk3-1* y *mpk6-2*, la función de la cinasa afectada sea compensada por la otra, haciendo imposible observar un fenotipo diferencial al de tipo silvestre. La aparente participación de estas cinasas en las respuestas al arsenito, deducido de la inducción de su expresión, podría demostrarse con el uso de una doble mutante *mpk3 mpk6*, que desafortunadamente es letal, haciendo necesario el uso de otras estrategias experimentales que permitan analizar los efectos del arsenito sobre las funciones de ambas proteínas de manera individual. Estudios de actividad enzimática o la generación de dobles mutantes inducibles representan alternativas pendientes de explorar.

9. CONCLUSIÓN

El arsenito reprime el crecimiento y desarrollo de la raíz primaria de *A. thaliana* L., bloqueando los procesos de división y elongación celular, acompañado de un daño en los tejidos. Adicionalmente, el proceso altera la distribución y señalización de auxinas involucrando al transportador PIN2, así como un incremento en la expresión de *MPK6* y *MPK3*, los cuales parecen tener redundancia funcional que impide discernir la participación de estas proteínas de manera individual. Un esquema resumiendo los resultados obtenidos en este trabajo se muestra en la **Fig. 25**.

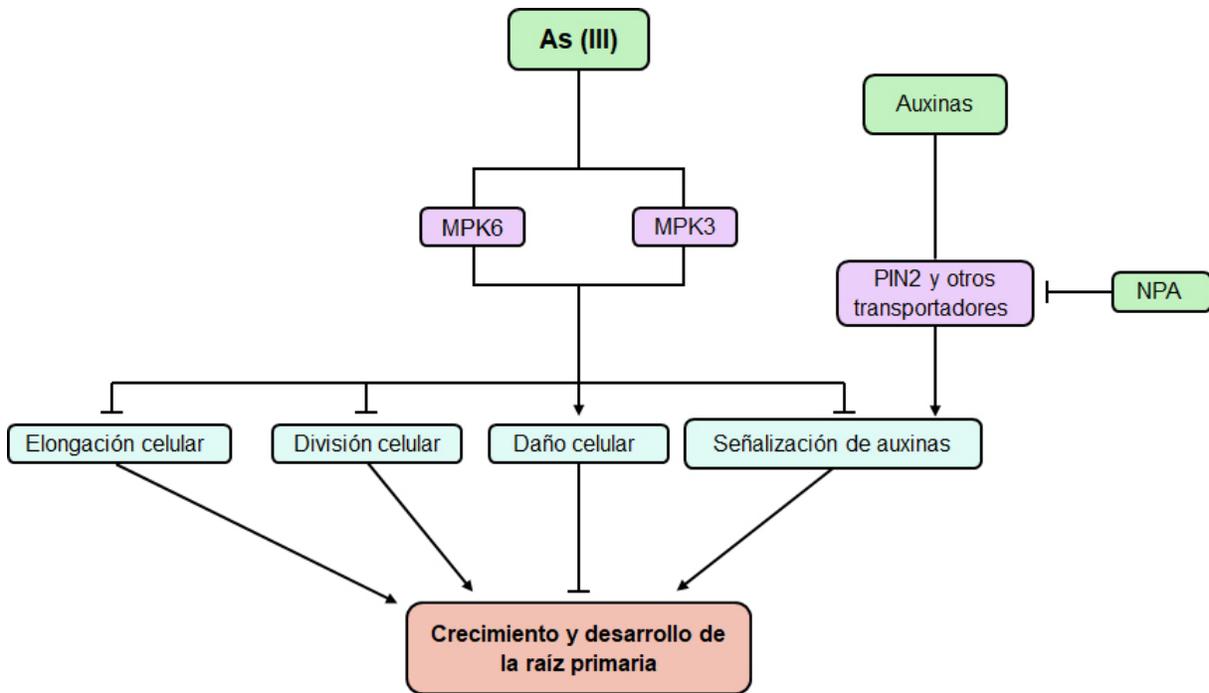


Figura 25. Participación de *MKP6* y *MPK3* en la respuesta de la raíz de *A. thaliana* L. al arsenito [As (II)]. El As (III) induce la expresión de *MPK3* y *MPK6*, bloqueando la división y elongación celular, induciendo el daño en los tejidos e inhibiendo la señalización de auxinas. Adicionalmente, las auxinas, que son redirigidas a la zona meristemática por el transportador PIN2, llevan a cabo su señalización para promover el crecimiento y desarrollo radical, pero dicho proceso es inhibido por el ácido *N*-1-naftiltalámico (NPA, por sus siglas en inglés), el cual afecta el transporte de auxinas bloqueando principalmente a los transportadores ABCB. Por lo anterior, fenómenos que en conjunto afecten la actividad de PIN2, como la intoxicación por As (III), junto con la inhibición de los transportadores ABCB vía el NPA, impiden el crecimiento de la raíz primaria.

10. PERSPECTIVAS

1. Evaluar la expresión de *DR5::uidA* en tratamientos combinados de As (III) y NPA.
2. Movilizar los reporteros *pMPK6::uidA* y *pMPK3::uidA* al fondo mutante *eir1/pin2* y monitorear la expresión de estos en respuesta al As (III).
3. Analizar la respuesta de la raíz a tratamientos con As (III) en las líneas *MPK6SR* y *MPK3SR*, que corresponden a combinaciones de la mutante *mpk6* con una mutación inducible en *MPK3* y la mutante *mpk3* con una mutación inducible en *MPK6*, respectivamente (Shao et al. 2020).
4. Generar las dobles mutantes *pin2 mpk6* y *pin2 mpk3* para evaluar su respuesta en tratamientos con As (III).

11. REFERENCIAS

Abbas G, Murtaza B, Bibi I, Shahid M, Niazi NK, Khan MI, Hussain M (2018). Arsenic uptake, toxicity, detoxification, and speciation in plants: physiological, biochemical, and molecular aspects. *International journal of environmental research and public health*, 15: 59. <https://doi.org/10.3390/ijerph15010059>

Amaral CD, Nóbrega JA, Nogueira AR (2013). Sample preparation for arsenic speciation in terrestrial plants—a review. *Talanta*, 115: 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.04.072>

Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415: 977-983. <https://doi.org/10.1038/415977a>

Asati A, Pichhode M, Nikhil K (2016). Effect of heavy metals on plants: an overview. *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management*, 5: 56-66.

Ashraf MA, Umetsu K, Ponomarenko O, Saito M, Aslam M, Antipova O, Rahman A (2020). PIN FORMED 2 Modulates the Transport of Arsenite in *Arabidopsis thaliana*. *Plant communications*, 1: 100009. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2019.100009>

Bigeard J, Hirt H (2018). Nuclear signaling of plant MAPKs. *Frontiers in plant science*, 9: 469. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00469>

Biswal B, Joshi PN, Raval MK, Biswal UC (2011). Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signalling and adaptation. *Current Science*, 101: 47-56. <http://www.jstor.org/stable/24077862>

Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS (2005). Auxin transport. *Current opinion in plant biology*, 8: 494-500. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.014>

Carbonell-Barrachina AA, Aarabi MA, DeLaune RD, Gambrell RP, Patrick WH (1998). The influence of arsenic chemical form and concentration on *Spartina patens* and *Spartina alterniflora* growth and tissue arsenic concentration. *Plant and Soil*, 198: 33-43. <https://doi.org/10.1023/A:1004285625998>

Casimiro I, Beeckman T, Graham N, Bhalerao RP, Zhang H, Casero PJ, Sandberg G, Bennett MJ (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in plant science*, 8: 165-171. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(03\)00051-7](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(03)00051-7)

Cheng S (2003). Heavy metals in plants and phytoremediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 10: 335-340. <https://doi.org/10.1065/espr2002.11.141.3>

Chibuike GU, Obiora SC (2014). Heavy metal polluted soils: effect on plants and bioremediation methods. *Applied and environmental soil science*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/752708>

Cho HT, Cosgrove DJ (2002). Regulation of Root Hair Initiation and Expansin Gene Expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 3237-3253. <https://doi.org/10.1105/tpc.006437>

Colcombet J, Hirt H (2008). *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, 413: 217-226. <https://doi.org/10.1042/BJ20080625>

Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P (1999). Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant Journal* 20: 503-508. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00620.x>

Cosgrove DJ, Li LC, Cho H, Hoffmann-Benning S, Moore RC, Blecker D (2002). The growing world of expansins. *Plant and Cell Physiology*, 43: 1436-1444. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcf180>

Danquah A, de Zelicourt A, Colcombe, J, Hirt H (2014). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology advances*, 32: 40-52. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.006>

Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, 119: 71-84. <https://doi.org/10.1242/dev.119.1.71>

Friml J (2003). Auxin transport—shaping the plant. *Current opinion in plant biology*, 6: 7-12. <https://doi.org/10.1016/S1369526602000031>

Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current opinion in plant biology*, 9: 436-442. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.05.014>

Furuta KM, Hellmann E, Helariutta Y (2014). Molecular control of cell specification and cell differentiation during procambial development. *Annual review of plant biology*, 65: 607-638. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040306>

Gill M (2014). Heavy metal stress in plants: a review. *Int J Adv Res*, 2: 1043-1055.

Gray WM (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS biology*, 2: e311. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020311>

Guevara-García AA, Lara FP, Juárez LK, Herrera-Estrella LR (2017). Heavy metal adaptation. *eLS*, 1-9. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0001318.pub3>

Gupta B, Tripathi AK, Joshi R, Pareek A, Singla-Pareek SL (2015). Designing climate-smart future crops employing signal transduction components. *Elucidation of abiotic stress signaling in plants*, 393-413. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2540-7_14

Heyman J, Cools T, Canher B, Shavialenka S, Traas J, Vercauteren I, Van den Daele H, Persiau G, De Jaeger G, Sugimoto K, De Veylder L (2016). The heterodimeric transcription factor complex ERF115–PAT1 grants regeneration competence. *Nature plants*, 2: 1-7. <https://doi.org/10.1038/nplants.2016.165>

Heyman J, Cools T, Vandebussche F, Heyndrickx KS, Van Leene J, Vercauteren I, Vanderauwera S, Vandepoele K, De Jaeger G, Van Der Straeten D, De Veylder L (2013). ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science*, 342: 860-863. <https://doi.org/10.1126/science.1240667>

Hou D, O'Connor D, Igalavithana AD, Alessi DS, Luo J, Tsang DCW, Sparks DL, Yamauchi Y, Rinklebe J, Ok YS (2020). Metal contamination and bioremediation of agricultural soils for food safety and sustainability. *Nature Reviews Earth & Environment*, 1: 366-381. <https://doi.org/10.1038/s43017-020-0061-y>

Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis BE, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC, MAPK Group (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in plant science*, 7: 301-308. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02302-6](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02302-6)

Ingram PA, Malamy JE (2010). Root system architecture. *Advances in botanical research*, 55: 75-117. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380868-4.00002-8>

Jiang K, Feldman LJ (2005). Regulation of root apical meristem development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 21: 485-509. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.21.122303.114753>

Kahle H (1993). Response of roots of trees to heavy metals. *Environmental and experimental botany*, 33: 99-119. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(93\)90059-O](https://doi.org/10.1016/0098-8472(93)90059-O)

Knight H, Knight MR (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in plant science*, 6: 262-267. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01946-X](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01946-X)

Křeček P, Skůpa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zažímalová E (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome biology*, 10: 1-11. <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-12-249>

Kumar S, Dubey RS, Tripathi RD, Chakrabarty D, Trivedi PK (2015). Omics and biotechnology of arsenic stress and detoxification in plants: current updates and prospective. *Environment international*, 74: 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.019>

Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Laplaze L (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in plant science*, 18: 450-458. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.006>

Li P, Ding L, Zhang L, He J, Huan Z (2019). Weisiensin B inhibits primary and lateral root development by interfering with polar auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139: 738-745. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.04.020>

López-Bucio J, Cruz-Ramírez, A, Herrera-Estrella L (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current opinion in plant biology*, 6: 280-287. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00035-9)

López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya-González J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, de Luna-Valdez LA, Ramos-Vega M, León P, Guevara-García AA (2014). *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of Experimental Botany*, 65: 169-183. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert368>

López-Bucio JS, Raya-González J, Ravelo-Ortega G, Ruiz-Herrera LF, Ramos-Vega M, León P, López-Bucio J, Guevara-García AA (2018). Mitogen activated protein kinase 6 and MAP kinase phosphatase 1 are involved in the response of *Arabidopsis* roots to L-glutamate. *Plant Molecular Biology*, 96: 339-351. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0699-8>

López-Bucio JS, Salmerón-Barrera GJ, Ravelo-Ortega G, Raya-González J, León P, de la Cruz Reyes H, Campos-García J, López-Bucio J, Guevara-García AA (2019). Mitogen-activated protein kinase 6 integrates phosphate and iron responses for indeterminate root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 250: 1177-1189. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03212-4>

Luschnig C, Gaxiola RA, Grisafi P, Fink GR (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & development* 12: 2175-2187. <https://doi.org/10.1101/gad.12.14.2175>

Mauch-Mani B, Slusarenko AJ (1993). *Arabidopsis* as a model host for studying plant-pathogen interactions. *Trends in microbiology*, 1: 265-270. [https://doi.org/10.1016/0966-842X\(93\)90049-W](https://doi.org/10.1016/0966-842X(93)90049-W)

Meharg AA, Hartley-Whitaker J (2002). Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. *New Phytologist*, 154: 29-43. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2002.00363.x>

Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, 282: 662-682. <https://doi.org/10.1126/science.282.5389.662>

Michniewicz M, Brewer PB, Friml J (2007). Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 5. <https://doi.org/10.1199/tab.0108>

Mickelbart MV, Hasegawa PM, Bailey-Serres J (2015). Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*, 16: 237-251. <https://doi.org/10.1038/nrg3901>

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for the rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2: a001537. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537>

Pacifici E, Polverari L, Sabatini S (2015). Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. *Journal of experimental botany*, 66: 1113-1121. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru534>

Paciorek T, Friml J (2006). Auxin signaling. *Journal of Cell Science*, 119: 1199-1202. <https://doi.org/10.1242/jcs.02910>

Peleg Z, Blumwald E (2011). Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 14: 290-295. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.001>

Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Bennett MJ (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in plant science*, 14: 399-408. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.05.002>

Petricka JJ, Winter CM, Benfey PN (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annual review of plant biology*, 63: 563-590. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042811-105501>

Planchais S, Perennes C, Glab N, Mironov V, Inzé D, Bergounioux C (2002). Characterization of *cis*-acting element involved in cell cycle phase-independent activation of *Arath*; *CycB1*; 1 transcription and identification of putative regulatory proteins. *Plant molecular biology*, 50: 109-125. <https://doi.org/10.1023/A:1016018711532>

Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J (2013). Auxin: simply complicated. *Journal of experimental botany*, 64: 2565-2577. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert139>

Schiefelbein JW, Benfey PN (1991). The development of plant roots: new approaches to underground problems. *The Plant Cell*, 3: 1147. <https://doi.org/10.1105/tpc.3.11.1147>

Shao Y, Yu X, Xu X, Li Y, Yuan W, Xu Y, Mao C, Zhang S, Xu J (2020). The YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 Cascade Functions Downstream of the RGF1-RGI Ligand–Receptor Pair in Regulating Mitotic Activity in Root Apical Meristem. *Molecular plant*, 13:1608-1623. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.09.004>

Smith S, De Smet I (2012). Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367: 1441-1452. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0234>

Song WY, Park J, Mendoza-Cózatl DG, Suter-Grotemeyer M, Shim D, Hörtensteiner S, Geisler M, Weder B, Rea PA, Rentsch D, Schroeder JI, Lee Y, Martinoia E (2010). Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 21187-21192. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013964107>

Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist*, 203: 32-43. <https://doi.org/10.1111/nph.12797>

Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A (2010). MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant signaling & behavior*, 5: 1370-1378. <https://doi.org/10.4161/psb.5.11.13020>

Teale W, Palme K (2018). Naphthylphthalamic acid and the mechanism of polar auxin transport. *Journal of experimental botany*, 69: 303-312. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx323>

Tripathi RD, Srivastava S, Mishra S, Singh N, Tuli R, Gupta DK, Maathuis FJ (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends in biotechnology*, 25: 158-165. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.003>

Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997). Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *The Plant Cell*, 9: 1963-1971. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.11.1963>

Vanneste S, Friml J (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136: 1005-1016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.001>

Vanstraelen M, Benková E (2012). Hormonal interactions in the regulation of plant development. *Annual review of cell and developmental biology*, 28: 463-487. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101011-155741>

Voß U, Bishopp A, Farcot E, Bennett MJ (2014). Modelling hormonal response and development. *Trends in plant science*, 19: 311-319. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.02.004>

Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19: 63-73. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048298>

Wang X, Wang Z, Zheng Z, Dong J, Song L, Sui L, Nussaume L, Desnos T, Liu D (2019). Genetic dissection of Fe-dependent signaling in root developmental responses to phosphate deficiency. *Plant physiology*, 179: 300-316. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00907>

Wani SH, Kumar V, Shriram V, Sah SK (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal*, 4: 162-176. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2016.01.010>

Woodward AW, Bartel B (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*, 95: 707-735. <https://doi.org/10.1093/aob/mci083>

Zažímalová E, Křeček P, Skůpa P, Hoyerova K, Petrášek J (2007). Polar transport of the plant hormone auxin—the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 1621-1637. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-6566-4>

Zhang H, Zhu J, Gong Z, Zhu JK (2022). Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, 23: 104-119. <https://doi.org/10.1038/s41576-021-00413-0>

Zhao Y (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual review of plant biology*, 61: 49. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112308>

Zhu JK (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167: 313-324.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

VOTOS DE APROBATORIOS

Secretaria Ejecutiva del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
P r e s e n t e .

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. **OCAMPO SANTANA ANDREINA** con número de matrícula **10002829** cuyo título es:

“Participación de *MPK6* durante la respuesta de la raíz al arsénico (III) en *Arabidopsis thaliana* L.”

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR**

Cuernavaca, Mor a 07 de septiembre del 2022

Atentamente
Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

Dra. Verónica Lira Ruan	(Presidente).
Dr. Nelson Avonce Vergara	(Secretario).
Dr. Salvador Barrera Ortiz	(Vocal).
Dr. Ángel Arturo Guevara García	(Suplente).
M. C. Angélica Ortega García	(Suplente).



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANGELICA ORTEGA GARCIA | Fecha:2022-09-08 13:56:33 | Firmante

VC/cpr+HhiUEIGIST42i/DDp6gKluMDpVHSZ3Yj3DwatlaAug5f8MYpi065r71A58EQPHQZAayrHQaOJXdyMr/bVvcAgX4zLpDUJLEa+odJ0zGvgoJ74IzWij0YsA+dJeSG0cEVfU6N7bO1yhbOisidEdgxhQd516dUxu9VSViCQVPz6/LZAYQ8oWKzoPwRLEuS3SR62mBRszulqQOmWyLey5P6xK9r7SZUJqR60mwBR5bK8IwVNEILKCaUYHQRVQamK6eHZA8Vj+plqNy/OguHPaxnCcO5bOQCv5bWYKPFgttHONKI0++wYpLPzU8V+bBCzbsT2VrkV1siQN5oQ==

VERONICA LIRA RUAN | Fecha:2022-09-08 14:39:03 | Firmante

X46UpYsxENFPB4iOsnNdGi7gHgtvuMQAMPy8LTXFxc89H0PweVMhPjVgmUuN/4A9zAHwnqguEapNNKUNerm/yMq7x0CDx/Ql1uvnVU/k5jAAyLDsMwkprFaoloJ62CapMw8gMwyM3GdtVIHQ16h8GRAWXVA6kos0gw3YLHDNCQqj3rI/lkOkhDC9anlvztesRF9yXEFzCdZ4/mhz1oh6HPkXIOTXjogxKiVmRy7vP9kg4sDx7VtY31g16QcMVG+q1aNA3/xEy3cv1Uj1in0k9Y4ggT1FAifAXaoqCfWLSfAlaTuiBDOARItwsqGWzxtTvD7v7rKe7QJfLry40g==

NELSON AVONCE VERGARA | Fecha:2022-09-09 11:04:17 | Firmante

XzoX0H4WMS37XqtquMIUgdbXOc/iG+A+6LO+KSPPHPR5B/h9f6UCQbKuyENiuwvXJfifufE7JWu2tNgbjJtdAG0m/t3RK+jtRQ/aMNbDzdZ1+1DnhjaFHeCAKnL9qDVuVuSQO6L4XOXxDJX5S76qRWtaLJUS22qY2GnQV9aaltxjsEOfdLoBHMafS4kbuPbPFsG+5wB5k34yW5licB39ZE/SIH7CJVqaU5hAQ4E90cjpXLYTu0FcBOjtpgkltu/HaFO7GK3el5zWeqgDwpTKx+5GgKp7QXEyfgfQlOQ4EK8OgOA4NmH37kKSYDxAiKbiOU1+zKBUObZ5rJTGFQ==

SALVADOR BARRERA ORTIZ | Fecha:2022-09-14 18:53:09 | Firmante

Z4xevk3s66WbZnT7f+q4TYND55qwLLDIRxV/Y3AhnyZiX4z26LnCk9wKDPGBkzIGPSLU8UxbB9ZxlsWrJNCPgYh8y3j7/HNJIR2MjWBpj+UgPZEXPFzN+mDh7M0+SkPznWostjpwol89syh2fZQiJrD6EZnxbkvHxssaE19tXcREBe/1GCT4Y2gNROEI7SEJzEU8ahJfDCYhxecGp8ArhbfzFZWSz6OzwKOSIKCo44sYqKvKmfAoalfv43u0t9OHa/tmMSitP+MAwkYkG38jU8lpxWUezAdlglxqBgl9yLFWxueBft4urge8TXYJN+1mLZ2NYKgtTAPJcmLECOQ==

ÁNGEL ARTURO GUEVARA GARCÍA | Fecha:2022-09-16 12:17:16 | Firmante

AZIDLTRk6luaHw9ahm6A+2oPcP2mdrvUWb73XDL/PdH4vylDR+EBVcq97kMDIA9FEMGID1HGEW0qYmZhuS64nIBjhWwLR/okRhp7hNovhUQLwL8UMOrvMjHMX0Vq8T0Av+zXkgEhxb9BECmnWEM+DogtlQ+V+MA1hABr90qICPNyLQYkL2j1C2uCGlVl3n1eaF1/ENX72Y+7otH178sly4UQ8H4tPRWZycc4zi+w2RsCO50tpEZCC1TGgNiMu5UYvOD99TMKAXnBUUliCX36uXKtBxcLAG8an4ANzi4wjGr58veCUOR52PH7+b9pqOibI3IFIThBBJno44UPA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[ipuezg59Z](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/1862QDJNVfYFS4LKSfocf4MMWfOui1wW>

