



**TESIS DOCTORAL**

**Identificación de nuevos genes implicados en la iniciación y desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.**

**Mercedes Pallero Baena**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA**

**2015**





**TESIS DOCTORAL**

**Identificación de nuevos genes implicados en la iniciación y desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.**

**Mercedes Pallero Baena**

**DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y ZOOLOGÍA**

**Conformidad de los Directores:**

**Fdo:** Dra. Ilda de Jesus Casimiro Felício

**Fdo:** Dr. Juan C. del Pozo Benito

**Fdo.** Dr. Pedro J. Casero Linares

**2015**



A mis padres,



"Magia es creer en ti mismo.  
Si puedes hacer eso,  
puedes hacer que cualquier cosa suceda"

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)



## AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos son casi lo último que se escribe y, después de todo el trabajo realizado, cabría esperar que fueran lo más fácil de redactar. Pero sois tantas las personas implicadas en todos estos años de esfuerzo y tengo tanto que agradecer, que un par de páginas no es espacio suficiente.

Gracias Pedro por haberme transmitido, con tus clases, la pasión por la Biología Celular, pasión que me motivó a comenzar esta etapa de mi vida; por haberme enseñado tu delicado cuidado de las formas a la hora de exponer unos resultados o preparar una presentación; y por la serenidad que te caracteriza que me ayudó a mantener la calma en los momentos de agobios. Gracias Ilda por haberme enseñado tu rigurosidad y precisión de trabajo en el laboratorio y tus conocimientos de microscopía ya que, según el criterio de muchos expertos en la materia, eres una de las mejores internacionalmente y, por ello, me siento orgullosa de haber sido tu pupila. Y gracias a ambos por haberme dado la oportunidad de realizar mi “estancia” en Madrid, lugar donde he crecido tanto a nivel profesional como personal.

Gracias Carlos por todos tus esfuerzos durante estos tres años ya que, en teoría, eres codirector de mi tesis pero, en la práctica, has dirigido todo el trabajo que he realizado; gracias por cederme tu laboratorio, donde he podido disponer de la instrumentación y los materiales necesarios para adquirir los conocimientos de Biología Molecular y Genética que hoy poseo; y gracias por tu incansable entusiasmo en mantener un ambiente cálido en el laboratorio.

Gracias a todos los compañeros del Área de Biología Celular de la Universidad de Extremadura por vuestra ayuda y por todos los momentos vividos durante los años que pasamos juntos; especialmente, gracias Vanessa, Luis, Patri, Mario, Dani, Ana, Héctor y Aida, por vuestra compañía en el “zulo”, los descansos del café y alguna salida que otra, porque aunque la relación haya sido escasa durante estos últimos años, cosa que la distancia propicia, nunca olvidaré mis raíces.

Gracias compañeros del 180 por el día a día. Gracias Conchi por compartir conmigo *sro11* y por explicarme todo aquello que has podido. Gracias Elena por tu creatividad, tu infinita energía para organizar eventos y por las historias de tus niños

que tanto nos han hecho reír. Gracias Sara por tu sencillez y dulzura que son capaces de hacer recapacitar a cualquiera. Gracias Bárbara por tu alegría y desinteresada amabilidad. Gracias Silva por tu ayuda en mis momentos de crisis con los sistemas informáticos. Gracias Juan por nuestras veladas “románticas”. Gracias Nacho por tu sentido del humor. Gracias Bal por tus “cucú” y por escucharme a partir de las siete de la tarde. Y gracias Zami (aunque no sé si llegarás a leer esto) por tu “asúcar” y por tu paciencia y destreza en las explicaciones, cada vez que calcule concentraciones o establezca las condiciones de una PCR, me acordaré de ti. Gracias Abeto, Alfon, Ana, Dorota, Lauri, Leti, Angelita, Ruth e Iván por los momentos de risas, tanto en las comidas como en alguna que otra quedada. Y gracias al resto de compañeros del CBGP, por los saludos o sonrisas en los pasillos que han hecho más ameno el trabajo de cada día. Habéis sido unos compañeros estupendos y, volviendo la vista atrás, cambiaría un poco mi obcecación por el trabajo y aprovecharía de más momentos con vosotros.

Gracias Tami y Rubén por vuestra amistad a pesar de la distancia, no todo el mundo comprende que es preferible cuidar las amistades a gastarlas.

Gracias Esmeralda, José Ángel y Manolo por estar ahí incondicionalmente durante más de diez años, y por confiar y creer en mí.

Gracias Edu por trabajar para que yo haya tenido mi beca (sabes que es broma). Gracias Beatriz por, al menos, aprenderte el nombre de “*Arapitosi italiana*”, con eso ya me doy por satisfecha. Gracias abueli por tus achuchones en mis visitas fugaces, que tanto me han llenado de energía para seguir.

Gracias Luca por cruzarte en mi camino, por sacarme una sonrisa cuando solo tenía ganas de llorar, por mostrarme el lado positivo de las situaciones, por tu inagotable paciencia y capacidad de escucha, y por compartir tu corazón conmigo. En definitiva, por ser el motivo por el que no puedo arrepentirme de haber venido a Madrid.

Y por último, GRACIAS mamá y papá. Gracias con mayúsculas porque os tengo que agradecer TODO. Todos vuestros esfuerzos para que haya podido estudiar lo que más me gusta; todo vuestro apoyo en cada una de mis decisiones, aunque ello conllevara a estar separados de vuestra hija pequeña; y toda vuestra ilusión para que consiguiera mi felicidad. Sin vosotros nada hubiera sido posible.

## RECONOCIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. P. N. Benfey por proporcionarnos las líneas *upb1-1*, *35S::UPB1-3xYFP* y *pUPB1::GFP*; al Dr. J. A. Jarillo por proporcionarnos las líneas *cry1-104 (hy4-104)*, *cry2-1*, *cry1/cry2*, *phot1-5/phot2*, *phyA-211* y *phyB9*; a la colección pública de NASC por proporcionarnos las líneas mutantes de T-DNA; a la Dra. C. Manzano, a la Dra. B. Orman-Ligeza, al Dr. M. A. Moreno-Risueño, al Dr. S. Pollmann y a D. Víctor Carrasco por su ayuda en la realización de determinados ensayos de esta tesis; al Gobierno de España por financiar el Proyecto BIO2011-28184-C02-01; y al Ministerio de Educación de España por financiar la Ayuda del Programa de Formación de Profesorado Universitario (FPU, Referencia AP2009-2351).



## ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	9
SITUACIÓN DEL TEMA .....	13
Las plantas y su sistema radicular .....	13
<i>Arabidopsis</i> como planta modelo y su utilidad en los estudios de desarrollo .....	14
La biología de <i>Arabidopsis</i> .....	14
Análisis genético.....	15
Organización tisular en la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	16
Crecimiento de la raíz principal: proliferación y elongación .....	17
Iniciación de raíces laterales en <i>Arabidopsis</i> .....	20
Distribución acrópeta.....	20
Raíces laterales y el xilema.....	21
Iniciación de una raíz lateral.....	24
Emergencia de las raíces laterales .....	27
La auxina y el desarrollo de las raíces laterales .....	31
La auxina.....	32
El transporte polar de auxina.....	33
La señalización de auxina .....	36
La auxina en las distintas etapas de desarrollo de los primordios .....	39
Regulación hormonal de la arquitectura de la raíz.....	41
Iniciación, desarrollo y elongación de la raíz principal .....	41
Crecimiento de las raíces laterales .....	42
El ciclo celular en eucariotas.....	44
<i>SKP2B</i> como marcador de la formación de las raíces laterales .....	48
El sistema radicular y la luz.....	52
OBJETIVOS.....	57

MATERIAL Y MÉTODOS .....	61
BLOQUE I: ESTRATEGIA DE SEPARACIÓN CELULAR Y GENÓMICA .....	61
Meta-análisis de otros <i>micro-arrays</i> publicados .....	61
Análisis fenotípico de los mutantes de genes <i>cs-SKP2B</i> .....	61
Genotipado de plantas homocigotas .....	61
Esterilización de semillas, siembra y condiciones de cultivo .....	64
Medida de la longitud de la raíz principal.....	64
Recuento de las raíces laterales emergidas.....	65
Clarificación y montaje de las raíces .....	65
Recuento del número de primordios de raíz lateral en cada estadio de desarrollo .....	66
Sincronización de la iniciación de PRLs mediante graviestimulación.....	66
Análisis fenotípico de las plantas <i>upb1-1</i> y <i>35S::UPB1-3xYFP</i> .....	67
Tratamiento inhibitorio de la actividad peroxidasa.....	67
Localización de ROS en el desarrollo de los PRLs .....	67
Análisis fenotípico de las plantas <i>per2-1</i> , <i>per7-1</i> y <i>per57-1</i> .....	68
Análisis fenotípico de las plantas <i>ox-PER2</i> y <i>ox-PER7</i> .....	68
Tratamiento con auxina de las plantas <i>per7-1</i> , <i>per57-1</i> y <i>ox-PER7</i> .....	69
BLOQUE II: ESTRATEGIA GENÉTICA.....	69
Caracterización fenotípica de <i>srol1</i> .....	69
Medida de la longitud de la raíz principal.....	69
Recuento de los primordios de raíz lateral y las raíces laterales emergidas.....	69
Condiciones de cultivo en diferentes intensidades y calidades de luz .....	70
Método de cultivo <i>in vitro</i> en conos.....	70
Medida de la extensión del meristemo apical hasta la zona de transición .....	71
Recuento del número de células de la corteza en el meristemo apical.....	72
Análisis de la actividad mitótica en el meristemo apical .....	72
Secciones a microscopía confocal del meristemo apical.....	72

Medida de la longitud de 20 células de la corteza a partir de la zona de transición.....	73
Análisis fenotípico de mutantes de foto-receptores .....	73
Visualización de marcadores de identidad celular en la raíz principal.....	74
Caracterización molecular de <i>srol1</i> .....	75
Análisis de la señalización y respuesta a auxina en el meristemo apical.....	75
Visualización de marcadores del transporte de auxina en el meristemo apical	76
Tratamientos hormonales .....	76
Análisis transcriptómico en luz blanca/amarilla del control vs. <i>srol1</i> .....	77
Dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivos <i>in vitro</i> .....	77
Análisis de la producción de ROS en el meristemo apical y la zona de elongación.....	78
Tratamiento con ácido ascórbico .....	79
Tratamiento con manitol .....	79
Tratamiento con cloruro de sodio .....	80
Análisis del transporte floemático en la raíz principal .....	80
Visualización del citoesqueleto en células de la corteza de la zona madura ....	81
Tratamiento con cloruro de hierro.....	81
Tratamiento a diferente pH del medio de cultivo .....	81
Tratamiento de deficiencia de nitrógeno o fósforo.....	82
Análisis ionómico en luz/oscuridad del control vs. <i>srol1</i> .....	82
Análisis metabólico en luz blanca/amarilla del control vs. <i>srol1</i> .....	83
Tratamiento con piridoxina.....	83
Tratamiento con auxina metilada.....	83
Tratamiento con PCIB.....	84
Generación de injertos.....	84
Estudio morfológico del sistema radicular de los mutantes de genes identificados en el análisis transcriptómico de <i>srol1</i> .....	85
Mapeo posicional de <i>srol1</i> .....	86

Secuenciación del genoma completo de <i>srol1</i> .....	86
Secuenciación de los genes At2g40070 y At2g40095.....	87
Análisis fenotípico de los mutantes de los genes At2g40070 y At2g40095.....	87
Generación de líneas transgénicas .....	88
Análisis fenotípico de los mutantes de otros genes candidatos para la mutación .....	91
Medida de los niveles de ácido ascórbico en la parte aérea .....	92
Secuenciación del locus <i>VTC1</i> en el fondo <i>srol1</i> .....	92
Prueba de alelismo .....	93
Secuenciación de la región codificante de <i>LEW3</i> en el fondo <i>srol1</i> .....	93
Detección e identificación de glicoproteínas en gel .....	93
Crecimiento de plantas en presencia del hongo <i>Piriformospora indica</i> .....	94
Tinción de la membrana plasmática con el colorante FM® 4-64 .....	94
Digestión parcial de la pared celular en la raíz principal.....	94
Generación de líneas transgénicas <i>srol1</i> sobre-expresoras de <i>LEW3</i> .....	95
PROTOSCOLOS .....	97
RESULTADOS .....	109
BLOQUE I: IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LAS RAÍCES LATERALES. ESTRATEGIA DE SEPARACIÓN CELULAR Y GENÓMICA.....	109
Identificación y validación de nuevos genes expresados en el desarrollo de los primordios de raíces laterales. ....	109
Función de los genes <i>cs-SKP2B</i> en el desarrollo de los PRLs .....	111
La señalización redox controla el crecimiento de las raíces laterales .....	115
La actividad PEROXIDASA controla la emergencia de las raíces laterales ....	116
La función de <i>PER7</i> y <i>PER57</i> es independiente de la señalización mediada por auxina .....	121
BLOQUE II: ESTRATEGIA GENÉTICA .....	123
Identificación de mutantes con sistema radicular alterado.....	123

Caracterización fenotípica de <i>srol1</i> .....	124
Dinámica de crecimiento de la raíz principal .....	124
Desarrollo de raíces laterales .....	125
El crecimiento radicular de <i>srol1</i> está condicionado por la calidad de la luz ...	126
La longitud de onda de la luz afecta a la división y la elongación celular de la raíz.....	131
Papel de los foto-receptores en el fenotipo de <i>srol1</i> .....	137
La identidad celular en la raíz se mantiene en <i>srol1</i> .....	138
Caracterización molecular de <i>srol1</i> .....	139
Regulación hormonal .....	139
Señalización y respuesta a auxina en el meristemo apical de la raíz.....	139
Transporte polar de auxina en el meristemo apical de la raíz de <i>srol1</i> .....	142
Tratamientos hormonales.....	143
Análisis transcriptómico en luz blanca/amarilla del control vs. <i>srol1</i> .....	149
<i>srol1</i> muestra mayor resistencia al tratamiento con ácido jasmónico .....	150
<i>srol1</i> muestra mayores niveles de ROS en el meristemo radicular .....	151
El transporte floemático está alterado en <i>srol1</i> .....	157
<i>srol1</i> afecta a la dinámica del citoesqueleto.....	159
Efecto del hierro en el desarrollo del sistema radicular de <i>srol1</i> .....	161
Efecto de la variación del pH en el crecimiento de la raíz principal de <i>srol1</i>	162
El sistema radicular de <i>srol1</i> no tiene grandes deficiencias en la capacidad de adquirir nutrientes .....	163
Análisis metabolómico en luz blanca/amarilla del control vs. <i>srol1</i> .....	167
Identificación de un metabolito relacionado con formas metiladas de auxina .....	168
¿Existe una señal desde la parte aérea que confiere el fenotipo <i>srol1</i> ?.....	174
Estudio morfológico del sistema radicular de los mutantes de genes identificados en el análisis transcriptómico de <i>srol1</i> .....	176
Mapeo posicional de <i>srol1</i> .....	181

DISCUSIÓN.....	193
BLOQUE I: .....	193
Identificación de nuevos genes implicados en el desarrollo de las raíces laterales .....	193
BLOQUE II: .....	198
Identificación de <i>SROL1</i> y otros genes implicados en el desarrollo del sistema radicular.....	198
CONCLUSIONES .....	215
BIBLIOGRAFÍA.....	221

## **ABREVIATURAS Y SIGLAS**

**ABA** ácido abscísico

**ABD2** *ACTIN BINDING DOMAIN 2*

**ACC** ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico

**ACR4** *ARABIDOPSIS CRINKLY4*

**ADN** ácido desoxirribonucleico

**AFB1-3** *AUXIN RECEPTOR F-BOX PROTEIN1-3*

**AIA** ácido indol-3-acético

**ALF4** *ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION4*

**APX** *ASCORBATO PEROXIDASA*

**ARFs** factores de respuesta a auxina

**ARK1** *ARMADILLO-REPEAT KINESIN1*

**ARN** ácido ribonucleico

**ARNm** ARN mensajero

**AsA** ácido ascórbico

**ATP** adenosín trifosfato

**AUX1** *AUXIN TRANSPORTER PROTEIN 1*

**AXR3** *AUXIN RESISTANT 3*

**BiP** *BINDING IMMUNOGLOBULIN PROTEIN*

**BRs** brasinoesteroides

**CDKs** quinasas dependientes de ciclina

**CDS** secuencia codificante

**CF** carboxifluoresceína

**CFDA** 5-[6]-Diacetato Carboxifluoresceína

**CFP** célula fundadora del periciclo

**CKIs** inhibidores de CDK

**CKs** citoquininas

**Col-0** *Columbia-0*

**CQ** centro quiescente

**CRYs** criptocromos

**cs-SKP2B** *cell sorting-SKP2B*

**CTAB** Bromuro de Cetiltrimetilamonio

**CWR** enzimas remodeladoras de la pared celular

**CYC** ciclina

**CYP** *CITOCROMO P450*

**DAB** Diaminobencidina

**DAG** días después de la germinación

**DAPI** 4',6-diamino-2-fenilindol

**D-Man/ L-Gal** D-manosa/L-galactosa

**DMSO** dimetilsulfóxido

**EDTA** ácido etilen-diamin-tetraacético

**EMS** etilmetanosulfonato

**eRLs** emergencia de raíces laterales

**ERO1** *ENDOPLASMIC RETICULUM OXIDOREDUCTASE 1*

**GA** ácido giberélico

**GDP-Man** guanosín difosfato manosa

**GFP** proteína verde fluorescente

**GPX** *GLUTATIÓN PEROXIDASA*

**GTP** guanosín trifosfato

**GUS**  $\beta$ -glucoronidasa

**hdg** horas después de la graviestimulación

**HSF** *HEAT STRESS TRANSCRIPTION FACTOR*

**Hsps** proteínas de choque térmico

**IAA14** *INDOLE ACETIC ACID14*

**IAMT1** *AIA CARBOXIMETILTRANSFERASA 1*

**JA** ácido jasmónico

**KCN** cianuro de potasio

**Kin** quinetina

**KRP** *KIP-RELATED PROTEIN*

**LAX3** *LIKE AUX1-3*

**LB** Luria-Bertani

**LBD** *LATERAL ORGAN BOUNDARIES*

**LEW3** *LEAF WILTING 3*

**MAP4** *MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 4*

**MBD** *MICROTUBULE BINDING DOMAIN*

**MeAIA** metil ácido indol-3-acético

**MES** *METILESTERASA*

**MP** membrana plasmática

**MS** Murashige & Skoog

**Mtl** manitol

**NASC** *Nottingham Arabidopsis Stock Centre*

**NBT** nitroblue tetrazolium

**NPA** ácido N-1-naftilftalámico

**OST** *OLIGOSACCHARYLTRANSFERASE*

**PCIB** *p*-Clorofenoxiisobutírico

**PCR** reacción en cadena de la polimerasa

**PER** *PEROXIDASA*

**PGR5** *PROTON GRADIENT REGULATION 5*

**PHOTs** fototropinas

**PHYs** fitocromos

***PIN PIN-FORMED***

***PLT PLETHORA***

**PN** piridoxina

**PPT** propil pirazol triol

**PRLs** primordios de raíz lateral

**RAM** meristemo apical de la raíz

**RE** retículo endoplasmático

***RIC ROP-INTERACTIVE1 CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN***

**RLe** raíces laterales emergidas

**RLs** raíces laterales

***ROP RHO OF PLANTS***

**ROS** especies reactivas de oxígeno

**RT-PCR** reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

**SCF** Skp/cullin/F-box

***SCR SCARECROW***

**SDS** dodecil sulfato sódico

**siARNs** pequeños ARN interferentes

***SKP2 S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN2***

***SLR1 SOLITARYROOT1***

**SLs** estrigolactonas

**St** estadio

***SUC2 SUCROSE-H<sup>+</sup>SYMPORTER 2***

**Ta** temperatura ambiente

**T-DNA** ADN transferido

***TIR1 TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1***

**Tm** tunicamicina

**Tris** trihidrometil aminometano

**Ub** ubiquitina

**UDPN-GlcNAc** uridina difosfato N-acetilglucosamina

**UPR** *unfolded protein response*

**UV** ultravioleta

**VTC1** *VITAMIN C DEFECTIVE 1*

**WOX5** *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5*

**Wt** silvestre

**X-Gluc** 5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -glucurónico

**XPP** periciclo adyacente a los polos de protoxilema

**YFP** proteína amarillo fluorescente

**$\beta$ -GLU23 o PYK10**  $\beta$ -glucosidasa 23



# ***Introducción***



## INTRODUCCIÓN

El objetivo principal del presente trabajo ha sido la identificación de nuevos genes implicados en la formación del sistema radicular y, en especial, en el desarrollo de las raíces laterales (RLs) en *Arabidopsis thaliana*.

En las plantas vasculares superiores, el desarrollo del sistema radicular está determinado por el crecimiento en longitud de cada una de las raíces que lo conforman y por su capacidad de ramificación. El crecimiento en longitud de cada raíz es consecuencia del incremento en el número de células, debido a la proliferación celular en su meristemo apical, y de la capacidad de elongación de dichas células en el meristemo y en la zona de elongación. Las RLs son aquellas que se originan a partir de cualquier otra raíz, ya sea una raíz seminal o principal u otra raíz lateral y, en conjunto, constituyen la práctica totalidad del sistema radicular. En *Arabidopsis thaliana*, las RLs se distribuyen a lo largo de la raíz principal según una secuencia acrópeta y se inician a nivel del meristemo basal a partir de unas pocas células del periciclo próximas al protoxilema, denominadas células fundadoras (Dubrovsky *et al.*, 2001), que son capaces de responder a una estimulación mediada por auxinas (De Smet *et al.* 2007). Estas células sufren un programa definido de divisiones y expansiones celulares orientadas para formar un primordio de raíz lateral (PRL) (Malamy y Benfey, 1997).

El sistema radicular es fundamental para la adaptación y eficiencia reproductiva de las plantas, ya que es el órgano encargado de adquirir nutrientes y agua del medio. Entender cómo las plantas organizan el sistema radicular, permitirá obtener plantas que requieran una menor aportación de recursos.

En este trabajo, para identificar nuevos genes implicados en el desarrollo del sistema radicular en *Arabidopsis thaliana*, se ha utilizado una estrategia genómica y otra genética. Con la primera, mediante una estrategia de “separación celular”, usando la expresión del promotor *pSKP2B::GFP* como marcador en la raíz, y el posterior análisis transcripcional, se han identificado más de 600 genes que co-expresan con *SKP2B* (genes *cs-SKP2B*). El gen *SKP2B* codifica una enzima F-box implicada en la ubiquitinación y degradación de reguladores de la división celular y se expresa a lo largo de la raíz principal de *Arabidopsis thaliana* en todas las etapas del desarrollo de

las RLs, incluyendo las células fundadoras de los PRLs (Manzano *et al.*, 2012). La mayoría de los genes *cs-SKP2B* están presentes en las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema y muchos están involucrados en la formación y/o desarrollo de las RLs. También se ha puesto de manifiesto la importancia de los genes que codifican para enzimas con actividad peroxidasa y la señalización por ROS durante el desarrollo de las RLs, especialmente durante la emergencia de los PRLs.

Mediante una estrategia genética por mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS) de plantas transgénicas *pSKP2B::GUS*, se ha identificado un mutante recesivo con un sistema radicular muy reducido: *srol1* (del inglés *short root in light*). *SROL1* codifica una  $\alpha$ -1,2-manosiltransferasa implicada en los primeros pasos de la N-glicosilación de proteínas. Estos resultados han revelado la importancia de dicho proceso en el desarrollo de la raíz y su relación con la luz. Este estudio genético también ha contribuido al entendimiento del desarrollo del sistema radicular, a nivel del crecimiento de la raíz principal y/o desarrollo de las RLs.

## ***Situación del tema***



## SITUACIÓN DEL TEMA

### Las plantas y su sistema radicular

Las plantas, a diferencia de los animales, elaboran su arquitectura morfológica mediante programas organogénicos postembrionarios, tales como la formación de las hojas y las flores, y la ramificación de la raíz. La ramificación lateral en el tallo y el sistema radicular representa uno de los determinantes más importantes que define la arquitectura de la planta (Nibau *et al.*, 2008).

Las plantas superiores muestran una gran diversidad de arquitecturas de raíz tanto a nivel sistémico como anatómico (Lloret y Casero, 2002). Así, mientras que en dicotiledóneas, taxón al que pertenece *Arabidopsis thaliana*, todo el sistema radicular procede de la ramificación de la raíz principal o seminal, llamada así porque se origina durante la embriogénesis (Nibau *et al.*, 2008), en monocotiledóneas, como por ejemplo los cereales arroz (*Oryza sativa*) o maíz (*Zea mays*), el sistema radicular está constituido predominantemente por raíces adventicias (Hochholdinger *et al.*, 2004; Osmont *et al.*, 2007). Mediante estudios genéticos se han identificado muchos genes comunes al desarrollo de las raíces laterales (RLs) y adventicias (Hochholdinger y Zimmermann, 2008). Aunque se han hecho progresos en cereales, *Arabidopsis* permanece como el sistema experimental mejor caracterizado para estudiar el desarrollo de las RLs.

Esta plasticidad del sistema radicular es esencial para optimizar la adquisición de agua y micro/macronutrientes del suelo, en un medioambiente heterogéneo y cambiante, además de proporcionar anclaje a la planta y establecer interacciones con los microorganismos del suelo (Smith y De Smet, 2012). Por todas estas razones, ampliar los conocimientos e investigar los factores que determinan la arquitectura de la raíz representa un hecho agronómico importante (Hodge, 2004).

## ***Arabidopsis* como planta modelo y su utilidad en los estudios de desarrollo**

### **La biología de *Arabidopsis***

*Arabidopsis thaliana* (Figura 1) pertenece a la familia *Cruciferae* o *Brassicaceae* con una amplia distribución natural a través de Europa, Asia y Norte América (Meyerowitz y Somerville, 1994). Se han catalogado muchos ecotipos diferentes a partir de poblaciones naturales que están disponibles en diferentes bancos de germoplasma para su uso en investigación. *Columbia* y *Landsberg* son los ecotipos más utilizados como modelos para estudios genéticos y moleculares. Su ciclo de vida completo es de aproximadamente 6 semanas, incluyendo la germinación de la semilla, la formación de la roseta, el desarrollo del tallo principal, la floración y la maduración de las primeras semillas. Las plantas desarrollan una roseta que tiene entre 2 y 10 cm de diámetro, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Las hojas están cubiertas con pequeños pelos unicelulares llamados tricomas que son un modelo muy adecuado para estudiar morfogénesis y diferenciación celular (Meinke *et al.*, 1998). Las flores, de 2 mm de longitud, en condiciones experimentales, pueden ser fácilmente fertilizadas aplicando polen sobre la superficie del estigma. Los frutos son silicuas y contienen semillas que alcanzan unos 0,5 mm en la madurez.



Figura 1. *Arabidopsis thaliana* (Meinke *et al.*, 1998).

El crecimiento de las plantas se puede llevar a cabo en placas petri bajo luces fluorescentes en el laboratorio o en macetas en un invernadero. La floración empieza alrededor de las 3 semanas en tierra, y la inflorescencia resultante forma una progresión lineal de flores y silicuas durante varias semanas, antes de entrar en senescencia. Las plantas maduras alcanzan entre 15 y 20 cm de altura y a menudo producen varios cientos de silicuas con más de 5.000 semillas en total. Las raíces tienen una estructura simple, fácil para estudiar en cultivo *in vitro* y no establecen relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno. Entre los patógenos naturales se incluye una variedad de insectos, bacterias, hongos y virus (Meinke *et al.*, 1998).

### **Análisis genético**

El genoma de *Arabidopsis* está organizado en cinco pares de cromosomas y contiene 27.025 genes. Su secuenciación se completó en diciembre del año 2000 debido a la iniciativa de más de doscientos científicos pertenecientes a 35 instituciones diferentes para crear el proyecto de investigación The *Arabidopsis* Genome Initiative (AGI).

A lo largo de los últimos años, se han desarrollado los materiales y métodos genéticos necesarios para definir a esta planta como un organismo modelo (Koncz *et al.*, 1992; Martínez-Zapater y Salinas, 1998). Las semillas maduras son las dianas perfectas para la mutagénesis química. La mutagénesis por inserción de ADN transferido (T-DNA) mediante *Agrobacterium tumefaciens* ha llegado a ser el método de transformación de la planta completa por excelencia. Se han depositado en colecciones públicas miles de líneas transgénicas con inserciones de T-DNA por todo el genoma (Meinke *et al.*, 1998).

En los últimos 25 años se han identificado miles de mutantes de *Arabidopsis* afectados en casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, incluido el desarrollo radicular (Meyerowitz y Somerville, 1994). El análisis genético y molecular de mutantes de *Arabidopsis* ha proporcionado detalles moleculares de algunos genes involucrados en el contexto de genómica funcional (Finnegan *et al.*, 1998), así como la identificación de genes con aplicación agronómica (Meinke *et al.*, 1998).

## **Organización tisular en la raíz de *Arabidopsis thaliana***

La raíz principal de *A. thaliana* presenta una anatomía muy simple. En una sección transversal, es decir una sección histológica perpendicular al eje longitudinal de la raíz, podemos observar la epidermis monoestratificada que contiene entre 16 y 23 células y que reviste exteriormente a la raíz sin sucesión de continuidad. Está compuesta por dos tipos celulares, la identidad de los cuales depende de su posición relativa a las células corticales inmediatamente subyacentes (Overvoorde *et al.*, 2010). Las células epidérmicas que contactan con las paredes transversales de dos células corticales adyacentes se diferencian en células que producen pelos radiculares (tricoblastos; Cormack, 1949). Las células epidérmicas que contactan con la pared tangencial externa de solo una célula cortical generalmente no producen ningún pelo radicular (Dolan *et al.*, 1993; Overvoorde *et al.*, 2010) (Figura 2B). Inmediatamente, hacia el interior, se suceden dos estratos de células. El más externo es la corteza y el más interno, la endodermis. Ambos estratos suelen contener ocho células muy vacuolizadas que tienden a disponerse emparejadas radialmente. Las células de la corteza son significativamente mayores que las de la endodermis. Las células de la endodermis presentan en sus paredes las características bandas de Caspary. El cilindro vascular diarco ocupa el centro de la raíz y está delimitado por el periciclo que es un estrato que contiene entre 11 y 13 células de pequeño tamaño y más densamente citoplasmáticas que las de endodermis y corteza. (Figura 2A y C). El xilema atraviesa diametralmente el cilindro vascular. Así, ambos extremos, polos del xilema, contactan con las células del periciclo. El diámetro de las células del xilema es paulatinamente mayor desde los polos hacia el centro. El floema forma dos grupos separados de células, polos de floema, cuyas células más externas también establecen contacto con las células del periciclo. Los polos de floema presentan una disposición perpendicular respecto de los polos de xilema. Las células del parénquima vascular, que constituyen el resto del cilindro vascular, separan las células del xilema de las del floema. En ambos tejidos conductores, los elementos más externos, junto al periciclo, maduran antes, protoxilema y protofloema, respectivamente, que los más internos, metaxilema y metafloema.

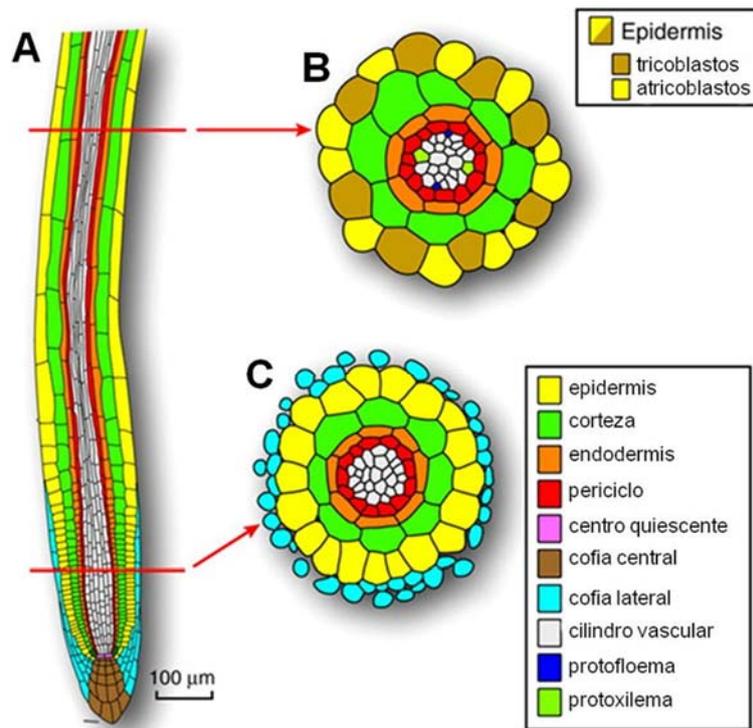


Figura 2. Organización celular de la raíz principal de *Arabidopsis thaliana*. En una sección longitudinal A) en una sección transversal a nivel de la zona madura B) y en una sección transversal a nivel del meristemo apical C). Adaptado de Overvoorde *et al.* 2010.

En una sección longitudinal, las células se suceden a lo largo de la raíz formando columnas continuas que discurren en paralelo en la mayor parte de su extensión y que confluyen hacia las células iniciales, en el extremo del meristemo apical (Dolan *et al.*, 1993; Overvoorde *et al.* 2010) (Figura 2A). Junto a las células iniciales, se pueden distinguir la protodermis, el meristemo fundamental y el procámbium que se diferenciarán en epidermis, corteza-endodermis y cilindro vascular, respectivamente. La cofia, de la que podemos distinguir una parte central y una parte lateral, cubre y protege al meristemo apical contra los daños mecánicos del suelo (Figura 2A).

### Crecimiento de la raíz principal: proliferación y elongación

En todas las plantas vasculares superiores el crecimiento de la raíz principal se debe tanto a la proliferación como a la elongación celular. Ambos procesos tienen lugar en zonas de crecimiento que pueden ser subdivididas en regiones

especializadas en el ápice de la raíz. Las células se suceden a lo largo de la raíz formando columnas paralelas, como se ha expuesto anteriormente. Las columnas de células se originan continuamente desde el centro quiescente (Figura 3). En cada columna, se pueden distinguir las siguientes regiones (Beemster *et al.*, 2003):

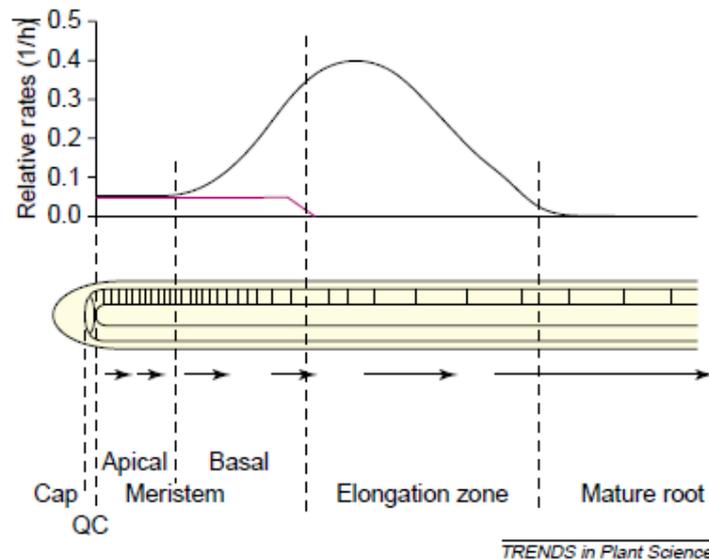


Figura 3. Procesos de crecimiento en el ápice de la raíz de *Arabidopsis* (Beemster *et al.*, 2003).

- Mitad apical del meristemo. Las células se dividen (línea rosa) y se elongan (línea negra) aproximadamente de igual manera (normalmente ~5% por hora). El crecimiento se debe al incremento del volumen citoplasmático. Ambos procesos son simultáneos y como consecuencia, el tamaño de la célula permanece más o menos constante. De hecho, en *Allium cepa*, Casero *et al.* (1989) demostraron que en la porción más distal del meristemo apical, la longitud celular permanece constante debido a que la elongación celular es contrarrestada exactamente por la división celular. Por otra parte, ambos procesos son independientes ya que obedecen a mecanismos de control diferentes, aunque están extraordinariamente relacionados entre sí (Barlow, 1984; Allan y Trewavas, 1986, Beemster *et al.*, 2003).

- Mitad basal del meristemo. Las células se dividen aproximadamente a la misma velocidad que en la mitad apical del meristemo, pero la velocidad de elongación incrementa rápidamente en función de la distancia al ápice de la raíz. Como consecuencia, el tamaño de la célula empieza a aumentar progresivamente (Casero *et al.*, 1989). Parece que las vacuolas dirigen el crecimiento en esta región pero no está claro si el volumen del citoplasma también se incrementa.

- Zona de elongación. Las células no se dividen pero se elongan (Traas *et al.*, 1998) (más del 40% por hora (Beemster y Baskin, 1998)) provocando que la longitud celular aumente más rápidamente que en la zona meristemática (Casero *et al.*, 1989).

- Zona madura de la raíz. En el límite proximal de la zona de elongación las células presentan su máxima longitud. Después, ni se dividen ni se elongan, salvo en procesos relacionados con el desarrollo de las raíces laterales.

El hecho de que las células se sucedan a lo largo de la raíz formando columnas paralelas, permite el estudio del crecimiento primario de la raíz principal referido a cada una de las columnas de células (Webster y MacLeod, 1980; Bertaud y Gandar, 1986; Rost *et al.*, 1988; Casero *et al.*, 1989).

En cada una de las columnas de células, el cese por completo de la capacidad proliferativa marca el límite proximal del meristemo apical. Dicho límite puede encontrarse a distinto nivel en cada columna de células, dando al límite del meristemo un aspecto dentado. En *Arabidopsis thaliana*, *Allium cepa*, *Vicia faba* y *Pisum sativum*, son las células del periciclo enfrentadas a los polos de xilema las que mantienen durante más tiempo su capacidad proliferativa marcando los límites proximales del meristemo más alejados de las células iniciales (Luxová, 1975; Rost *et al.*, 1988; Casero *et al.*, 1989; Beeckman *et al.*, 2001).

En las raíces, la elongación celular es un proceso simplástico, es decir, que todas las células situadas al mismo nivel transversal tienen la misma capacidad de elongación. Esto significa que las diferencias de longitud entre células situadas al mismo nivel transversal pueden ser debidas a diferencias en la actividad proliferativa a lo largo del meristemo como fue demostrado en *Allium cepa* por Casero *et al.*, (1989). En esta especie, las células del periciclo enfrentadas al xilema y al floema tienen una longitud semejante en el extremo distal del meristemo y sin embargo las células del periciclo enfrentadas al xilema son significativamente más cortas en el extremo proximal del meristemo. Estos resultados están estrictamente relacionados con una mayor capacidad proliferativa de las células del periciclo enfrentadas al xilema respecto de aquellas otras enfrentadas al floema.

La zona madura de la raíz se encuentra a la misma altura en todas las columnas de células. La diferenciación celular comienza a darse a distintos niveles de la raíz según la columna de células, así en el cilindro vascular se da más tempranamente que en las columnas de células de la corteza. La diferenciación celular

es el proceso, mediante el cual, las células sufren modificaciones citológicas dando lugar a una forma y una función determinadas, especializándose en un tipo celular.

### **Iniciación de raíces laterales en *Arabidopsis***

El desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis* proporciona un modelo sencillo para estudiar los factores abióticos y bióticos exógenos, y los factores genéticos endógenos que regulan la organogénesis postembrionaria en las plantas superiores (Reed *et al.*, 1998; Zhang y Forde, 2000; Casimiro *et al.*, 2001). Las raíces laterales se forman a lo largo de la raíz principal de acuerdo con un patrón regular (Charlton, 1983).

### **Distribución acrópeta**

Las raíces son capaces de mantener el crecimiento indefinidamente (Waisel *et al.*, 2002). Las células iniciales limitan con el centro quiescente (CQ) en el meristemo apical de la raíz (RAM, del inglés *Root Apical Meristem*; Dolan *et al.*, 1993; Overvoorde *et al.*, 2010). Cuando las células iniciales se dividen, generan dos células hijas: una en contacto con las restantes células madre del CQ, mientras que la otra sufre un número finito de divisiones celulares antes de salir del meristemo y elongarse (Scheres, 2007). Por lo tanto, desde el meristemo apical hasta la base, en cualquier momento se producen tejidos paulatinamente más viejos según una secuencia acrópeta.

Durante el crecimiento, y a medida que se producen nuevos tejidos, también se producen nuevas raíces laterales, por ello la iniciación de las raíces laterales en *Arabidopsis* ocurre según un patrón acrópeta (Figura 4). Las raíces laterales jóvenes generalmente se encuentran más cerca del ápice de la raíz, mientras que las raíces laterales más maduras se localizan en la zona proximal de la misma. Sin embargo, en algunas situaciones, nuevas RLs también pueden iniciarse en partes más maduras de la raíz, entre las RLs más tempranas. Además, la iniciación de las raíces laterales ocurre a un ritmo regular durante el crecimiento de la raíz (Lucas *et al.*, 2008), alternando izquierda-derecha (De Smet *et al.*, 2007).

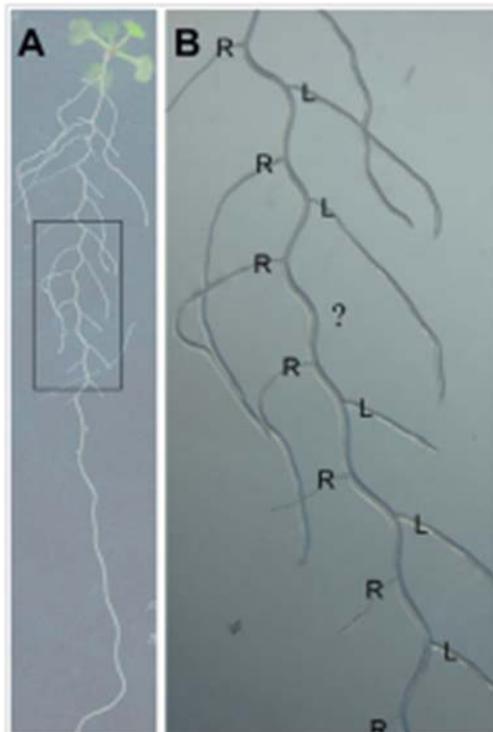


Figura 4. Distribución acrópeta de las raíces laterales en *Arabidopsis* a lo largo de la raíz principal. A) Las raíces laterales más jóvenes se disponen más cerca del ápice. B) Detalle del área marcada en A, mostrando las raíces laterales alternando izquierda (L) – derecha (R). ? Posición donde no se ha producido una raíz lateral (De Smet *et al.*, 2007).

### **Raíces laterales y el xilema**

Las raíces laterales en *Arabidopsis* se originan en células del periciclo adyacentes a los dos polos de protoxilema (XPP, del inglés *xylem pole pericycle*) (Blakely *et al.*, 1982; Casero *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 1995) (Figura 5A), llamadas células fundadoras del periciclo (Dolan *et al.*, 1993; Malamy y Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2001, 2003; Dubrovsky *et al.*, 2001; Lloret y Casero, 2002). Dubrovsky *et al.* (2001) definieron las células fundadoras del periciclo como “células que adquieren un destino de desarrollo diferente del de su madre y, como consecuencia, juegan un papel principal durante los primeros estadios de la iniciación de las raíces laterales.” Estas células sufren un programa definido de divisiones y expansiones celulares orientadas para formar un primordio de raíz lateral (PRL; Malamy y Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2001, 2003; Dubrovsky *et al.*, 2001; Lloret y Casero, 2002; Péret *et al.*, 2013) (Figura 5B).

El periciclo representa un tejido heterogéneo formado por células quiescentes junto a los polos del floema y células competentes para formar primordios de raíz lateral opuestas a los polos de protoxilema (Parizot *et al.*, 2008). La especificación del destino de las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema está controlada por la misma ruta genética que determina el patrón diarca de los tejidos vasculares a los que rodea (Mähönen *et al.*, 2006; Parizot *et al.*, 2008). Mutaciones, tales como *lonesome highway (lhw)*, que interrumpen el patrón diarca de los polos de xilema también bloquean la especificación de las células del periciclo de alrededor y su capacidad para formar PRLs (Parizot *et al.*, 2008).

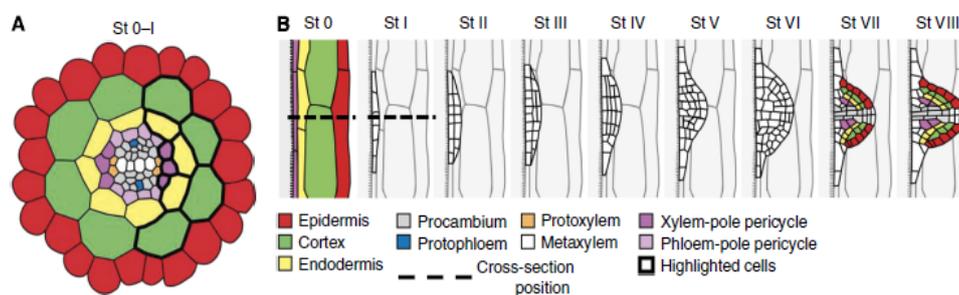


Figura 5. La formación de las raíces laterales (RLs) en *Arabidopsis thaliana*. (A) Sección transversal de una raíz de *Arabidopsis* (durante los estadios 0-I de la emergencia de un PRL) mostrando los diferentes tipos celulares, con la posición de la sección transversal en (B). Las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema están agrupadas en tres columnas de células y están en contacto con varias columnas de células de la endodermis, que están en contacto con columnas de células de la corteza (células subrayadas). (B) Estadios de la formación de las RLs. Entre los estadios 0 y I, las células XPP (a partir de las que se originan los PRLs) sufren varias divisiones transversales. Notar que en la dirección transversal las células varían en longitud y aparecen en la formación (Péret *et al.*, 2013).

La primera división del periciclo relacionada con la iniciación de una raíz lateral en *Arabidopsis* ocurre varios milímetros por encima del meristemo de la raíz principal, en la zona de diferenciación (Casimiro *et al.*, 2001) y solo a una distancia distal relativamente corta al primordio de RL más joven (Dubrovsky *et al.*, 2006). Sin embargo, la decisión de que células del XPP (células fundadoras) formarán un PRL en zonas distales se toma en una zona llamada meristemo basal (Beemster *et al.*, 2003), que está en la transición entre el meristemo y la zona de elongación de la raíz principal (De Smet *et al.*, 2007; Péret *et al.*, 2009) (Figura 6).

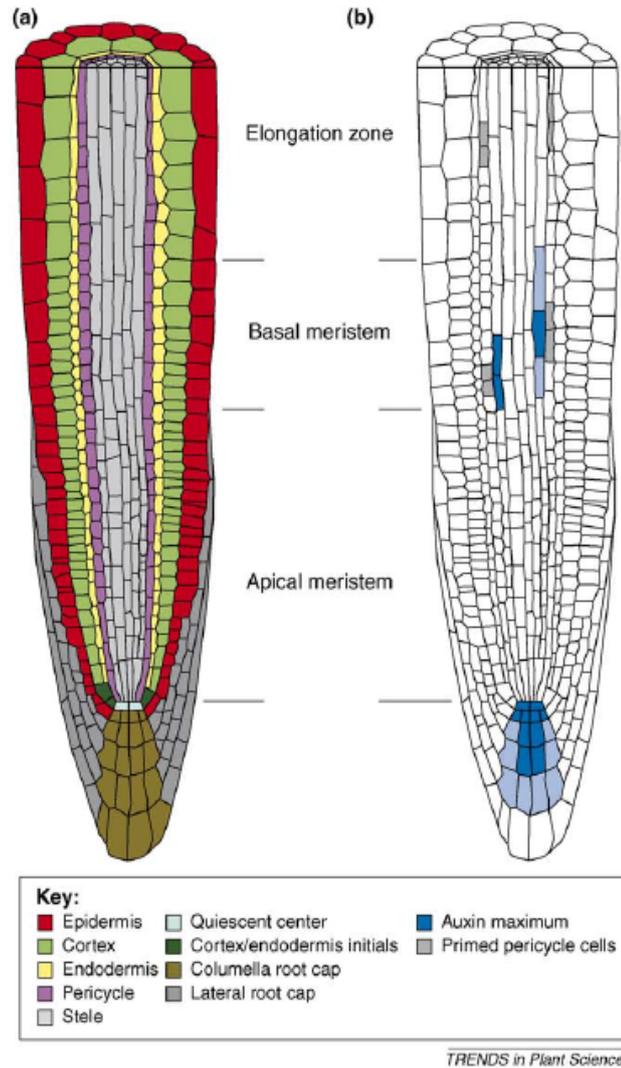


Figura 6. El inicio de las raíces laterales ocurre en el meristemo basal. Dibujo esquemático de los diferentes tejidos de la raíz (a) y la máxima señal de auxina presente (b) informado por la línea marcadora *DR5::GUS* (De Smet *et al.*, 2007). La acumulación de auxina espaciada regularmente en sitios del protoxilema marca a las células del periciclo adyacentes para convertirse en células fundadoras del periciclo (Péret *et al.*, 2009).

Esta posición corresponde con la región donde las células del periciclo progresan vía fase S a G2 del ciclo celular (Blakely *et al.*, 1979; Beeckman *et al.*, 2001). De Smet *et al.* (2007) demostraron que en el meristemo basal las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema se especifican en células proliferativas mediante señalización de auxina (Figura 6). Cada célula del periciclo enfrentada a los polos de protoxilema tiene la capacidad para dividirse en respuesta a elevados niveles de auxina (Boerjan *et al.*, 1995; Dubrovsky *et al.*, 2008). Sin embargo, solo un número limitado llegan a ser células fundadoras bajo condiciones normales (Dubrovsky *et al.*, 2001).

La especificación de las células fundadoras del periciclo está relacionada con una respuesta oscilante a auxina (visualizado por el marcador *DR5*) en las células del xilema adyacente (De Smet *et al.*, 2007; Moreno-Risueño, 2010) (Figura 6). Los autores demostraron que estas oscilaciones ocurren a intervalos regulares de ~15 horas y se asocian con la inducción de un nuevo primordio de raíz lateral en las células del periciclo adyacentes (De Smet *et al.*, 2007; Moreno-Risueño, 2010) (Figura 6).

La inducción de un nuevo PRL también puede estar influida por respuestas trópicas y estímulos mecánicos (De Smet *et al.*, 2007; Ditegou *et al.*, 2008; Laskowski *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2008). Por ejemplo, un estímulo gravitrópico puede inducir la formación de un PRL en la cara externa de una ondulación de la raíz (Lucas *et al.*, 2008). La acumulación de auxina en el periciclo de la cara externa de una ondulación de la raíz cuando se produce un estímulo gravitrópico, induce cambios en los tamaños celulares. Esto sugiere que debe existir un mecanismo de señalización mecánica independientemente a un marcaje de auxina en las células fundadoras del periciclo. Así, al menos dos mecanismos parecen estar operando en las raíces para el posicionamiento del PRL: una inducción mecánica y un mecanismo oscilatorio basado en auxina. Esto es perfecto para la sensibilidad de la raíz porque es capaz de espaciar los PRLs en respuesta a señales ambientales y endógenas (Péret *et al.*, 2009).

### **Iniciación de una raíz lateral**

El primer evento morfológico relacionado con la iniciación de las RLs en *Arabidopsis* ocurre en una columna del periciclo adyacente a un polo de protoxilema. Uno o dos días después de la germinación (DAG, del inglés *days after germination*), una división transversal asimétrica tiene lugar en dos células fundadoras (previa migración de sus núcleos a las paredes celulares colindantes), casi simultáneamente, llevando a la formación de dos células hijas cortas flanqueadas por dos células más largas (estadio I del PRL) (Casimiro *et al.*, 2001; 2003; Dubrovsky *et al.*, 2001) (Figura 7b). Inhibiendo con NPA (ácido N-1-naftilftalámico) el transporte de auxina a las células fundadoras, se interrumpe la división asimétrica inicial (Casimiro *et al.*, 2001), sin embargo, sus núcleos son capaces de migrar a las paredes celulares colindantes (De Smet *et al.*, 2007). Las divisiones celulares asimétricas normalmente son indicativas de que las células hijas adoptarán distintos destinos de desarrollo (Scheres

y Benfey, 1999). Consistente con esta conclusión, las células hijas más cortas (pero no las más largas) expresan genes marcadores asociados con divisiones asimétricas (como *ACR4* (*ARABIDOPSIS CRINKLY4*) (De Smet *et al.*, 2008) y *GNOM* (Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2004)).

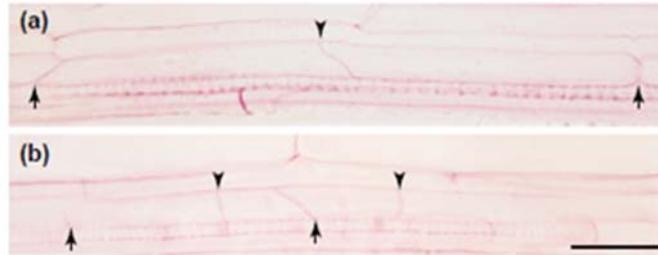


Figura 7. Sección longitudinal de un primordio de raíz lateral en estadio I en *Arabidopsis*. (a) Una célula fundadora del periciclo (CFP) ha sufrido una división transversal simétrica. (b) Un par de células cortas formadas por divisiones transversales asimétricas después de una división simétrica. Las flechas indican el final de las paredes celulares de CFP. Las cabezas de flechas indican las paredes celulares nuevamente formadas. Barra de escala = 25  $\mu\text{m}$  (Casimiro *et al.*, 2003).

Al igual que en *Arabidopsis*, en muchas otras especies, como *Allium cepa*, *Raphanus sativus* y *Helianthus annuus*, la iniciación de los primordios de raíz lateral solo ocurre en células del periciclo adyacente a los polos de protoxilema (Blakely *et al.*, 1982; Casero *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 1995). Sin embargo, en *Zea mays* y *Daucus carota*, en las que las RLs aparecen junto a los polos de protofloema, las divisiones transversales asimétricas se originan desde células del periciclo localizadas junto a los polos de protofloema (Casero *et al.*, 1995). Aunque se observan variaciones en la disposición radial de las células fundadoras del periciclo, la formación de células cortas a causa de divisiones transversales asimétricas representa un patrón universal de proliferación durante la iniciación de las RLs (Casimiro *et al.*, 2003).

Después del primer par de divisiones asimétricas en una columna del periciclo, las células localizadas a la misma altura en las columnas adyacentes también se activan (Figura 8). Las células hijas continúan dividiéndose simétrica y asimétricamente, desde el centro hacia arriba y hacia abajo, creando grupos con un máximo de diez células cortas que son similares en longitud (Casimiro *et al.*, 2001, 2003). Una serie idéntica de divisiones mitóticas ocurre también en ambas columnas de células del periciclo adyacentes, formándose un grupo de células cortas central localizadas al mismo nivel transversal (Figura 8b). A menudo se observa una plasticidad considerable en el preciso orden de estas divisiones. En *Arabidopsis*, son tres las columnas de células del periciclo enfrentadas al protoxilema las que se dividen

durante la formación de las raíces laterales, no obstante, solo las células cortas más centrales de cada columna contribuyen significativamente al establecimiento del PRL (Kurup *et al.*, 2005).

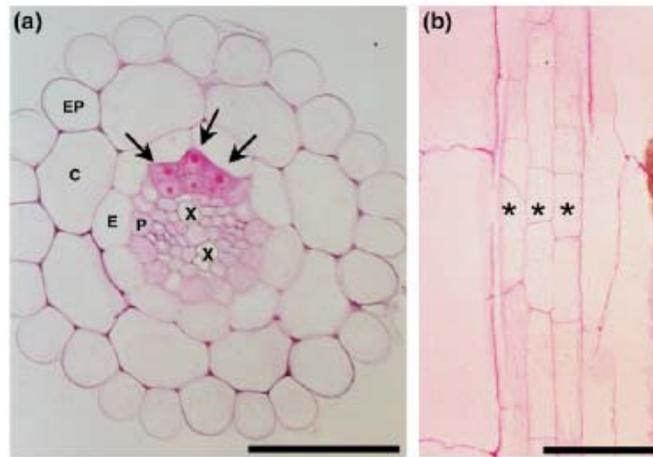


Figura 8. (a) Sección transversal de la raíz principal de *Arabidopsis* mostrando tres células del periciclo expandidas radialmente que han sufrido divisiones periclinales (flechas). Abreviaturas: C, córtex; E, endodermis; EP, epidermis; P, periciclo; X, xilema. (b) Sección longitudinal mostrando grupos de células cortas en tres columnas de células del periciclo adyacentes (asteriscos) localizadas al mismo nivel transversal. Barras de escala = 25  $\mu\text{m}$  (Casimiro *et al.*, 2003).

A partir de estas observaciones, se concluye que cada columna de células del periciclo contribuye con dos células fundadoras. Como el número mínimo de columnas del periciclo involucradas en la iniciación de las raíces laterales son tres, unas seis células fundadoras están involucradas en este proceso (Dubrovsky *et al.*, 2000). Según Dubrovsky *et al.*, (2001), la longitud media de las células fundadoras duplica la de la mayoría de las células del periciclo y se dividen simétricamente antes de las primeras divisiones transversales asimétricas (Figura 7a) concluyendo que solo se requieren tres células fundadoras del periciclo. Sin embargo, estas conclusiones contrastan con otras observaciones que estiman que son once las células fundadoras necesarias para la iniciación de una raíz lateral (Laskowski *et al.*, 1995).

Siguiendo un periodo de expansión radial, las células hijas cortas centrales se dividen periclinalmente, dando lugar a un primordio compuesto por dos capas de células, una interna y otra externa, definido como estadio II (Malamy y Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2001; 2003) (Figura 8a). La Figura 9 resume las siguientes divisiones en los primordios de RL (llamadas estadios III-VII) (Malamy y Benfey, 1997). Los PRLs entre los estadios III-VII tienen forma de bóveda o campana (Malamy y Benfey, 1997; Lucas *et al.*, 2013) y en el estadio VI tienen una organización similar al meristemo de

la raíz principal. La expansión celular entonces permite la emergencia de los PRLs desde la raíz madre en la zona madura (estadio VIII) (Casimiro *et al.*, 2001; Dubrovsky *et al.*, 2001) a los cinco o siete DAG (Bhalerao *et al.*, 2002). Mientras atraviesan la epidermis, el número de células cerca del ápice de las RLs se incrementa (activación del meristemo de las raíces laterales).

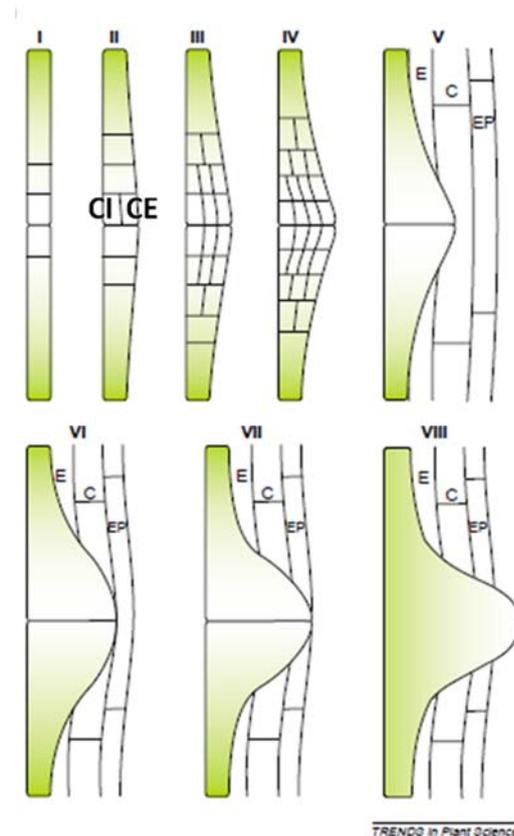


Figura 9. Estadios de desarrollo durante la formación de las raíces laterales (RLs) en *Arabidopsis*. La figura muestra una serie de secciones longitudinales a través de un primordio de RL a estadios de desarrollo específicos. El estadio I de los primordios de RL contiene un par de células cortas del periciclo flanqueadas por dos células largas. En el estadio II, las células sufren divisiones simétricas periclinales, formando una capa interna (CI) y otra externa (CE). En el estadio III de los primordios de RL, las células CE sufren divisiones periclinales para crear un primordio de tres capas. En el estadio IV, los primordios de RL forman cuatro capas debido a divisiones periclinales en la CI. En el estadio V, los primordios de RL atraviesan el córtex, finalmente emergiendo en el estadio VIII. Abreviaciones: C, córtex; E, endodermis; EP, epidermis. (Casimiro *et al.*, 2003).

### **Emergencia de las raíces laterales**

Para emerger, los primordios deben atravesar varios tejidos de la raíz principal. En *Arabidopsis*, esto comprende capas monoestratificadas de células endodérmicas, corticales y epidérmicas (Dolan *et al.*, 1993; Swarup *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2009)

(Figura 10). Sin embargo, en otras especies vegetales, tal como el arroz, los primordios de raíz lateral deben atravesar más de 15 capas de células (Lloret y Casero, 2002; Hochholdinger *et al.*, 2004; Osmont *et al.*, 2007; Péret *et al.*, 2009). Durante mucho tiempo se ha especulado que el desarrollo de las raíces laterales y los procesos de separación celular en los tejidos adyacentes de la raíz deberían estar finamente coordinados para minimizar los daños en los tejidos y reducir el riesgo de infección (Lloret y Casero, 2002; Péret *et al.*, 2009). Los tejidos de la raíz principal participan activamente en la emergencia de las raíces laterales (eRLs). Primero, en raíces de *Arabidopsis*, genes que codifican enzimas remodeladoras de la pared celular (CWR, del inglés *cell wall remodelling*) se expresan en las células junto a los primordios, para provocar la separación celular en los tejidos de alrededor y promover la emergencia de los PRLs (Neuteboom *et al.*, 1999; Roberts *et al.*, 2002; Laskowski *et al.*, 2006). Y segundo, en varias especies vegetales, las células que rodean a los primordios en formación están reclutadas para formar temporalmente una cofia que ayuda a la emergencia del órgano (Ivanchenko *et al.*, 2006).

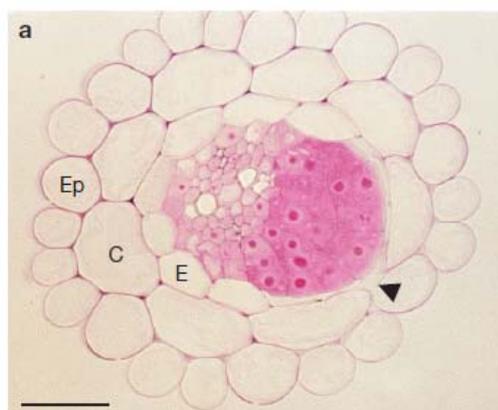


Figura 10. Sección transversal de una raíz de *Arabidopsis* conteniendo un primordio de raíz lateral emergiendo a través de la endodermis (E), corteza (C) y epidermis (Ep) que sufren separación celular (señalado con una cabeza de flecha). Barra de escala 20  $\mu\text{m}$  (Swarup *et al.*, 2008).

La emergencia de las raíces laterales es un proceso altamente regulado (Swarup *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2009; Overvoorde *et al.*, 2010). La auxina actúa como una señal inductora local que coordina la iniciación y el crecimiento de los primordios, la deformación del tejido y la separación celular (Benková *et al.*, 2003; Swarup *et al.*, 2008; Lucas *et al.*, 2013). La auxina se transporta desde el ápice de los PRLs hacia las células de los tejidos de alrededor, donde induce genes como *LAX3* (Péret *et al.*, 2013). *LAX3* (LIKE AUX1-3) es un transportador de influjo de auxina que se expresa en las dos columnas de células corticales que rodean a los PRLs (Figura

11) y que más tarde sufrirán separación celular para facilitar la emergencia del órgano (Swarup *et al.*, 2008). Este patrón de expresión restringido asegura que la separación celular esté sincronizada con el desarrollo y la emergencia de los PRLs, reduciendo la tensión creada por los tejidos de alrededor y permitiendo a las células meristemáticas del ápice de los PRLs dividirse periclinalmente. Además, asegura que no se afecte la integridad de la raíz principal (Péret *et al.*, 2009). *LAX3* está inducido desde el estadio I, antes de que suceda ningún cambio en la morfología de los PRLs ni en los tejidos de alrededor (Figura 11).

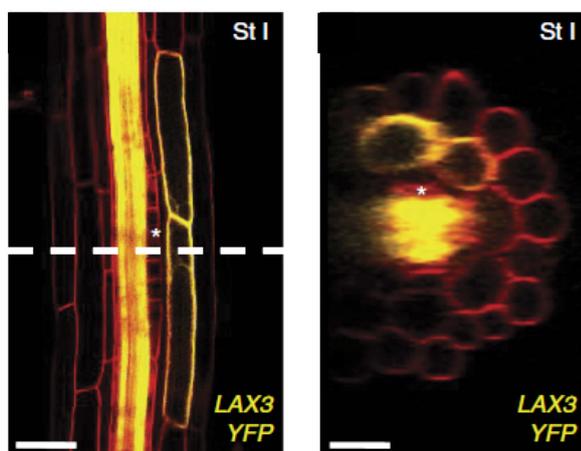


Figura 11. Patrón de localización de la proteína LAX3. Sección tangencial de raíz (izquierda) y sección transversal (derecha) a la altura mostrada por la línea de puntos, de la línea transgénica *pLAX3::LAX3::YFP* de *Arabidopsis*. El asterisco resalta la posición de una de las células XPP, desde las que se originan los PRLs (Péret *et al.*, 2013).

*LAX3* regula la expresión dependiente de auxina de un grupo de enzimas remodeladoras de pared celular (CWR) en las células que rodean a los PRLs (Swarup *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2009). Estas incluyen una pectasa liasa (PLA2), poligalacturonasa (PG), xiloglucan:xiloglucosil transferasa (XTR6), expansina (EXP17) y glicosil hidrolasa (GLH17) (Henrissat, 1991; Cosgrove, 2000; Marín-Rodríguez *et al.*, 2002; Vissenberg *et al.*, 2005). PG y PLA2 son particularmente importantes para la separación celular durante la emergencia de las raíces laterales porque se adhieren a la pectina desmetilada, un sustrato que está enriquecido en la lámina media de las células que rodean a los PRLs. La proteína IAA3/SHY2, expresada en la endodermis, regula la expresión de un grupo de enzimas CWR diferente pero que solapa con el grupo de enzimas regulado por *LAX3* (Figura 12a); esto probablemente refleja diferencias en la composición de la pared celular entre los tejidos de la raíz (Maule *et al.*, 2013; Roycewicz y Malamy, 2014). Como resultado de la activación enzimática, las paredes de las células que rodean a los PRLs se debilitan.

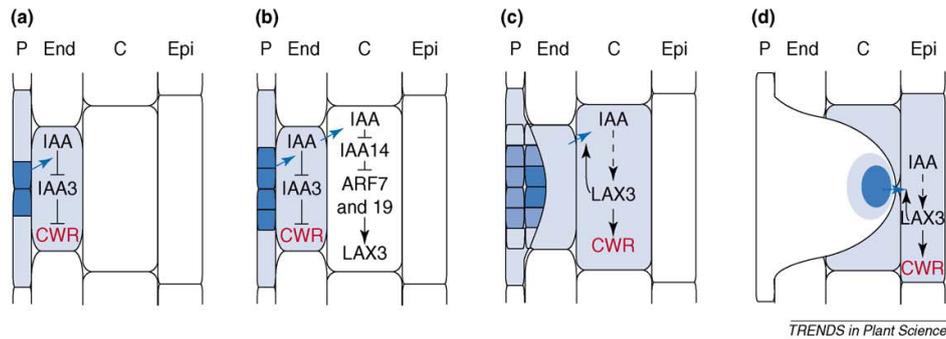


Figura 12. Emergencia de las raíces laterales. En las células endodérmicas, la degradación dependiente de auxina del represor IAA3/SHY2 regula la expresión de enzimas remodeladoras de la pared celular (CWR) para iniciar la separación celular (a). La auxina procedente de los primordios induce la expresión del transportador de influjo de auxina LAX3 en las células corticales adyacentes después de la degradación del represor IAA14/SLR (b). La acumulación de auxina dependiente de LAX3 causa la sobreexpresión de un grupo distinto de enzimas CWR que inician la separación de las células corticales (c). La auxina procedente de los primordios en el último estadio, en la proximidad de las células epidérmicas, induce la expresión de LAX3, y genes CWR (d), causando la separación celular y resultando en la emergencia de las raíces laterales. Por lo tanto, la emergencia de los PRLs a través de los tejidos de la raíz es un proceso altamente regulado por una compleja red de señalización de auxina célula a célula. Abreviaturas: P, periciclo; End, endodermis, C, corteza; Epi, epidermis (Péret *et al.*, 2009).

Otros componentes de la maquinaria de emergencia de los PRLs son los factores de transcripción ARF7 y IAA14 (Swarup *et al.*, 2008) que tienen papeles clave durante la formación de las RLs (Fukaki *et al.*, 2002; Okushima *et al.*, 2005, 2007) y regulan la inducción de LAX3 por auxina (Swarup *et al.*, 2008). Los nuevos PRLs son capaces de canalizar auxina a las células corticales de alrededor (Péret *et al.*, 2009; 2013). De esta manera, la auxina induce la expresión LAX3 por la degradación dependiente de TIR1/AFB de la proteína represora transcripcional IAA14, que deja de interactuar con el factor de transcripción ARF7 para permitir la expresión de los genes diana aguas abajo tales como LAX3 (Figura 12b). El patrón de expresión LAX3 requiere la inducción secuencial de transportadores de eflujo e influjo de auxina, como el transportador de eflujo PIN3 (Péret *et al.*, 2013).

Otro ejemplo de que la progresión del desarrollo y la emergencia de los PRLs están finamente coordinadas es que mutantes que interrumpen el proceso de emergencia de las raíces laterales también tienen afectada la progresión del desarrollo de los PRLs. Por ejemplo, raíces mutantes *lax3* presentan una proporción incrementada de primordios en estadio I (Swarup *et al.*, 2008).

El transporte de agua es importante durante la eRLs (Péret *et al.*, 2012). Los PRLs están aislados simplásticamente de la vasculatura de la raíz principal (Oparka *et al.*, 1995), siendo necesarios flujos de agua entre las células que se están

expandiendo y dividiendo. Las acuaporinas representan una gran clase de canales (Gomes *et al.*, 2009) de membrana plasmática (PIPs) y de tonoplasto (TIPs) (Danielson y Johanson, 2010). En *Arabidopsis*, la mayoría de los genes de acuaporinas están reprimidos en la raíz principal durante la formación de las raíces laterales y expresados en la base de estadios tempranos (I-II) de los PRLs, de una manera dependiente de auxina (Péret *et al.*, 2012) (Figura 13). Como resultado, la auxina reprime la conductividad hídrica en las células de la raíz principal y la promueve en los PRLs (Péret *et al.*, 2012). Los cambios en la distribución de acuaporinas relacionados con la auxina facilitan la eRLs (Péret *et al.*, 2012). Existe una compleja interacción espacial y temporal entre la auxina y la función de las acuaporinas para apoyar el crecimiento de los PRLs (Péret *et al.*, 2012).

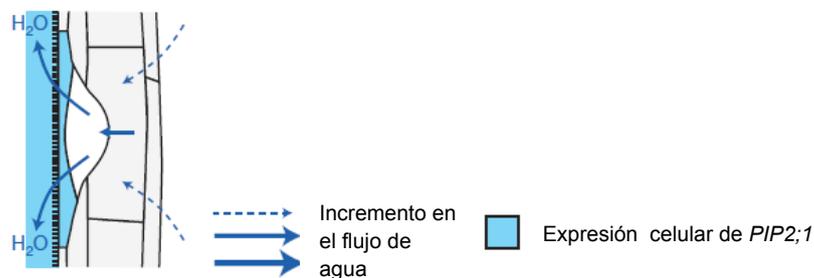


Figura 13. Diagrama que ilustra la regulación de la eRLs por *PIP2;1*. Una óptima eRLs requiere el transporte de agua en los tejidos basales y lo reprime en los tejidos de alrededor de los PRLs como resultado de una acumulación de auxina (Péret *et al.*, 2012).

## La auxina y el desarrollo de las raíces laterales

Varios estudios han demostrado que el desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis* está regulado por señales derivadas del tallo (Reed *et al.*, 1998; Zhang y Forde, 1998; Casimiro *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 2002). La auxina ácido indol-3-acético (AIA) representa un regulador clave del desarrollo de las raíces laterales (Blakely *et al.*, 1982; Celenza *et al.*, 1995; Laskowski *et al.*, 1995; Casimiro *et al.*, 2001, 2003). Un rastreo de mutantes de RLs de *Arabidopsis* pone de manifiesto el hecho de que muchas mutaciones también muestran defectos relacionados con la auxina (Tabla 1) (Casimiro *et al.*, 2003; Péret *et al.*, 2009).

Molecular/cellular processes	Mutants	Stage	Lateral root phenotype	Refs
Auxin homeostasis	<i>sur1</i>	I	Increased LR number	[90]
	<i>sur2</i>	I	Increased LR number	[91]
	<i>ilr2</i>	I	Reduced LR number	[92]
	<i>arf8</i>	I	Increased LR number	[52]
	<i>ilr1 iar3 il12</i>	I	Reduced LR number	[93]
	<i>ydk1</i>	I	Reduced LR number	[94]
	<i>dfl1</i>	I	Reduced LR number	[95]
Auxin signalling	<i>tir1 afb1</i>	I	Reduced LR number	[43]
	<i>axr1</i>	I	Reduced LR number	[96]
	<i>axr6/cul1</i>	I	Reduced LR number	[97]
	<i>iaa1/axr5</i>	I	Reduced LR number on auxin	[33]
	<i>iaa3/shy2-2</i>	I & E	Reduced LR number	[34]
	<i>iaa14/slr</i>	I & E	No LR	[31]
	<i>iaa18/crane</i>	I	Reduced LR number	[35]
	<i>iaa19/msg2</i>	I	Reduced LR number	[36]
	<i>iaa28</i>	I	Strongly reduced or no LR	[37]
	<i>arf 7 arf19, mir160-resistant</i>	I & E	No LR	[32]
<i>ARF10/16/17</i>	I	Reduced LR number	[50,51]	
Auxin transport	<i>aux1</i>	I	Reduced LR number	[98]
	<i>lax3</i>	E	Reduced LR number	[67]
	<i>pin1/3/4/7</i> and combinations	I & P	Reduced LR number	[30]
	<i>pgp4</i>	I	Increased LR number	[99]
Auxin transport protein addressing and regulation	<i>gnom</i>	I	Reduced LR number	[56]
	<i>axr4</i>	I	Reduced LR number	[100]
	<i>pinoid</i>	I	Reduced LR number	[101]
	<i>big/tir3/doc1</i>	I	Reduced LR number	[102]
Cell cycle	<i>35S:KRP2</i>	I	Reduced LR number	[103]
	<i>alf4</i>	I	No LR	[20]
Cell-to-cell communication	<i>acr4; crr1/2/3/4</i> and combinations	I	More LR primordia and disturbed spacing	[54]
Chromatin remodelling	<i>pickle</i>	I	Increased LR number on auxin	[104]
Cytokinin pathway	<i>brx-2</i>	I	Increased LR number on cytokinin	[88]
F-box proteins	<i>35S:SINAT5</i>	I	Reduced LR number	[105]
	<i>cegenduo</i>	I	Increased LR number	[106]
	<i>xbat32-1</i>	I	Reduced LR number	[107]
	<i>arabidillo1/2</i>	I	Reduced LR number	[108]

Tabla 1. Revisión de mutantes de raíces laterales involucrados en el conocimiento de los procesos moleculares o celulares durante la formación de las raíces laterales<sup>a</sup> Abreviaturas: E, emergencia; I, iniciación; P, patrón. <sup>a</sup>Esta lista está restringida a un pequeño número de mutantes para los que los procesos moleculares/celulares se han descrito entre un gran número de mutantes con defecto en las raíces laterales (Péret *et al.*, 2009).

## La auxina

La fitohormona AIA es un versátil morfógeno implicado en el desarrollo de las plantas (Vanneste y Friml, 2009). La auxina regula la embriogénesis, la organogénesis, la formación del tejido vascular y las respuestas trópicas en plantas (Vieten *et al.*, 2007; Petrásek y Friml, 2009).

En la semilla de *Arabidopsis*, se produce una acumulación de AIA en el ápice de la raíz entre uno y tres DAG (Bhalerao *et al.*, 2002). Sin embargo, antes de los 10 DAG, la mayoría del AIA presente en la raíz proviene predominantemente de los tejidos del tallo (Ljung *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 2002). En particular, entre los cinco y los siete DAG, la raíz principal experimenta un pulso corto de AIA que deriva de las primeras hojas y promueve la emergencia de los primordios de RL (Bhalerao *et al.*, 2002). Al eliminar los tejidos apicales del tallo, se suprime el pulso de AIA, bloqueando la emergencia de las RLs (Bhalerao *et al.*, 2002).

A lo largo del desarrollo, aumentan tanto el contenido como la capacidad biosintética de auxina en el sistema radicular (Ljung *et al.*, 2002). Así, el sistema radicular puede llegar a ser independiente de la auxina transportada desde el tallo. Sin embargo, la dependencia de una fuente de auxina apical del tallo inicialmente en el desarrollo de las RLs (Casimiro *et al.*, 2001; Bhalerao *et al.*, 2002; Marchant *et al.*, 2002) sirve para coordinar la emergencia de las RLs con el desarrollo de la hoja primaria, permitiendo que la plántula joven conecte y equilibre el metabolismo del carbono y del nitrógeno con sus respectivos órganos fuente, las hojas (carbono) y las raíces (nitrógeno).

### **El transporte polar de auxina**

El transporte polar de auxina representa un sistema de reparto especializado que la planta utiliza para movilizar AIA desde una fuente productora en el tallo hasta los tejidos basales tales como la raíz (Bennett *et al.*, 1998). En las raíces, el transporte polar de auxina mueve AIA hacia el ápice de la raíz (acrópeto) y desde este hacia la unión raíz-tallo (basípeto; Rashotte *et al.*, 2000). Diferentes estudios han demostrado que el transporte de auxina desempeña un papel importante en el desarrollo de las raíces laterales. El transporte basípeto y acrópeto se requieren durante las fases de iniciación y emergencia, respectivamente (Casimiro *et al.*, 2001). El transporte basípeto media otras respuestas de crecimiento de las raíces tales como el gravitropismo o el halotropismo (Müller *et al.*, 1998; Marchant *et al.*, 1999; Rashotte *et al.*, 2000; Yokawa *et al.*, 2014).

El NPA, un inhibidor del transporte polar de auxinas, impide el desarrollo de las raíces laterales por bloquear las primeras divisiones transversales de las células del periciclo enfrentadas al protoxilema (Casimiro *et al.*, 2001). El NPA parece ejercer estos efectos de desarrollo por causar una acumulación de AIA en el ápice de la raíz mientras reduce los niveles en los tejidos basales críticos para la iniciación de las raíces laterales (Casimiro *et al.*, 2001). Este patrón de distribución de AIA es consistente con el bloqueo por NPA del movimiento basípeto de AIA desde el ápice de la raíz (Casimiro *et al.*, 2001). Asimismo, la inhibición del transporte acrópeto por NPA, reduce la emergencia de las raíces laterales (Reed *et al.*, 1998) ya que bloquea el desarrollo de los primordios.

Las mutaciones que interrumpen el transporte polar de auxina también modifican la arquitectura de la raíz en *Arabidopsis* (Ruegger *et al.*, 1997; Casimiro *et al.*, 2001). Por ejemplo, la mutación *tir3* causa una reducción en el transporte polar de auxina, lo que conlleva a un menor número de raíces laterales (Ruegger *et al.*, 1997), el defecto del mutante *mdr1* (*multiple drug resistance1*) en el transporte acrópeto reduce la emergencia o elongación de las raíces laterales (Wu *et al.*, 2007), mientras que la arquitectura de la raíz del mutante *shootmeristemless* pierde el patrón acrópeto de desarrollo (Casimiro *et al.*, 2001) porque, al no formar primordios foliares, resulta en la pérdida del pulso de auxina que coordina la emergencia de las raíces laterales (Bhalerao *et al.*, 2002).

El transporte polar de auxina de célula a célula es un proceso coordinado de transportadores de eflujo e influjo, codificados por los genes *PIN-FORMED (PIN)* y *P-GLYCOPROTEIN (PGP)* (Petrásek *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007) y *AUXIN1/LIKE AUX1 (AUX/LAX)* (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2012) respectivamente.

Los transportadores de eflujo PIN tienen una localización polar en la membrana plasmática (MP) que regula la dirección del flujo de auxina (Wisniewska *et al.*, 2006). Por ejemplo, PIN1 principalmente se encuentra en la membrana plasmática apical de las células del cilindro vascular (Friml, 2003). PIN2 se localiza apicalmente en las células de la corteza y basalmente en las células de la cofia lateral y la epidermis (Luschnig *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Kleine-Vehn *et al.*, 2008). PIN3 se dispone en dos o tres capas de células de la columela sin una orientación aparente y en la cara apical de las células del cilindro vascular (Friml *et al.*, 2002). Y PIN4 se sitúa por toda la membrana plasmática de las células junto al centro quiescente y apicalmente en las células provasculares (Kleine-Vehn y Friml, 2008). Su modo de acción durante el desarrollo de la planta muestra una fuerte redundancia de su expresión y regulación cruzada dependiente de auxina (Vieten *et al.*, 2005). Existe un reciclaje continuo de los transportadores PIN entre la membrana plasmática y los endosomas (Geldner *et al.*, 2001, 2003) que permite su relocalización y direccionamiento del transporte de auxina. El gen *GNOM* codifica un *ARF-GEF (ADP RIBOSYLATION FACTOR-GUANIDINE EXCHANGE FACTOR)* que regula el tráfico de los transportadores de eflujo de auxina PIN (Steinmann *et al.*, 1999). Las células del periciclo de mutantes *gnom* son capaces de proliferar en respuesta a la adicción de auxina, pero no expresan marcadores tales como *ACR4* (De Smet *et al.*, 2008) o no forman un patrón normal de PRLs (Geldner *et*

*al.*, 2004). Los mutantes de varios genes *PIN* (tales como *PIN1*, 3, 4 y 7) presentan el mismo fenotipo de raíces laterales inducido por auxina observado en los mutantes *gnom* (Friml *et al.*, 2003).

En el modelo propuesto por Blilou y colaboradores, (2005), la redistribución de los transportadores de auxina de la familia *PIN* resulta en la acumulación de auxina en el nicho de células madre del meristemo; este máximo se mantiene a través de la elaboración postembrionaria de la raíz (Sabatini *et al.*, 1999; Aida *et al.*, 2002; Friml *et al.*, 2003; Blilou *et al.*, 2005). El máximo de auxina distal entonces determina el patrón de expresión de los factores de transcripción *PLT1* y *PLT2* (*PLETHORA*), que se requieren para la identidad del CQ y la especificación de células madre desde la embriogénesis en adelante (Aida *et al.*, 2004). *PLT* regula positivamente la expresión *PIN3*, *PIN4* y *PIN7* (Blilou *et al.*, 2005), que refuerza el flujo de auxina en el RAM, por lo tanto mantiene la posición postembrionaria del nicho de células madre distal.

En *Arabidopsis thaliana*, la familia *AUX/LAX* está representada por cuatro genes altamente conservados llamados *AUX1*, *LAX1*, *LAX2* y *LAX3*, que codifican proteínas transmembrana (multitransmembrana). El dominio N-terminal de *AUX1* proporciona información para la correcta localización de las proteínas *LAX* en el dominio de expresión de *AUX1* (Péret *et al.*, 2012).

La proteína *AUX1* (*AUXIN TRANSPORTER PROTEIN 1*) se localiza en la membrana plasmática basal de las células del protofloema, donde la permeasa de auxina facilita el transporte acrópeto de AIA a través del floema, y en la apical de las células de la cofia lateral y/o epidermis (Swarup *et al.*, 2001). Es remarcable el hecho de que los elementos del protofloema más apicales identificados coinciden con la posición de las células fundadoras en la transición G1-S (De Smet *et al.*, 2003), sugiriendo que *AUX1* facilita un importante flujo de auxina alcanzando el periciclo en esta posición, y junto con los transportadores de eflujo *PIN*, proporciona direccionalidad del flujo de auxina intercelular (Kleine-Vehn *et al.*, 2006).

*AUX1* y *LAX3* son transportadores de auxina de alta afinidad (Yang *et al.*, 2006; Carrier *et al.*, 2008; Swarup *et al.*, 2008). Mutaciones en *AUX1* o *LAX3* resultan en defectos en el desarrollo de las raíces laterales relacionados con auxina. Por ejemplo, los mutantes *aux1* presentan bajos niveles de AIA en el ápice debido a la interrupción del transporte mediado por *AUX1* entre la fuente de AIA y los tejidos apicales (Marchant *et al.*, 2002), son agravitrópicos y muestran una reducción del 50% en el

número de primordios de RL que inician (Hobbie y Estelle, 1995; Marchant *et al.*, 2002). Por el contrario, el mutante *lax3*, que presenta una inhibición en la emergencia de las raíces laterales, muestra significativamente un número incrementado de PRLs en la fase inicial de su desarrollo comparado con el control (Swarup *et al.*, 2008). El retraso en el desarrollo de las raíces laterales en el fondo mutante *lax3* probablemente se debe a que la auxina derivada de las hojas (que promueve la emergencia de las raíces laterales [Bhalerao *et al.*, 2002]) se acumula en niveles supraóptimos en el periciclo de la raíz, estimulando la iniciación ectópica de nuevos primordios. Conjuntamente, *AUX1* y *LAX3* actúan durante el desarrollo de las raíces laterales regulando las etapas de iniciación (Marchant *et al.*, 2002) y la emergencia (Swarup *et al.*, 2008), respectivamente.

Por lo tanto, se ha propuesto que la formación de las raíces laterales puede dividirse en dos fases: una fase de iniciación que depende de una fuente de auxina localizada en el ápice de la raíz, y una fase de emergencia que depende de una fuente derivada del tallo (Bhalerao *et al.*, 2002). *AUX1* regula el desarrollo de las raíces laterales por facilitar el flujo de AIA desde los primordios foliares en desarrollo, permitiendo la acumulación de AIA en el ápice de la raíz principal, y el flujo de AIA a los PRLs en desarrollo (Marchant *et al.*, 2002). Al promover la acumulación de AIA en el ápice de la raíz, influye en el ratio de iniciación de PRLs (fase 1) (Bhalerao *et al.*, 2002) y, a través del flujo de AIA desde las hojas recién formadas y/o de la toma en los PRLs (Marchant *et al.*, 2002), facilita más tarde la emergencia (fase 2) (Bhalerao *et al.*, 2002).

### **La señalización de auxina**

En presencia de auxina, las proteínas F-box TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1) o AFB1-3 (AUXIN RECEPTOR F-BOX PROTEIN1-3) se unen a proteínas Aux/IAA (Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski y Leyser, 2005) que, después del marcaje dependiente de ubiquitina, se degradan por el proteasoma (Zenser *et al.*, 2001; Gray *et al.*, 2003). Las proteínas TIR1/AFB parecen funcionar durante el desarrollo de las raíces laterales. Cuando la raíz principal de los mutantes simples *tir1* y *afb* se compara con la de las plantas silvestres, estos muestran pequeñas o ninguna diferencia en relación al número de PRLs, no obstante, el triple mutante *tir1 afb2 afb3* muestra una reducción del 90% (Dharmasiri *et al.*, 2005; Pérez-Torres *et al.*, 2008).

Una de las proteínas más importantes en la señalización de auxina regulando la iniciación de las raíces laterales es IAA14 (INDOLE ACETIC ACID14)/SLR1 (SOLITARYROOT1) (Fukaki *et al.*, 2002). IAA14/SLR1 pertenece a la familia de proteínas Aux/IAA (Fukaki *et al.*, 2002). Sustituciones de determinados aminoácidos en la secuencia codificante de IAA14 estabilizan la proteína represora. El mutante de ganancia de función resultante *slr-1* no forma PRLs debido a que las células fundadoras del periciclo no sufren divisiones formativas (Fukaki *et al.*, 2002). La mutación *slr-1* afecta a la expresión de varios genes reguladores del ciclo celular, entre otros (Vanneste *et al.*, 2005). La sobreexpresión del regulador de ciclo celular *CycD3;1* (que promueve la transición de la fase G1-S) en el fondo *slr-1* indujo unas pocas divisiones transversales (Vanneste *et al.*, 2005) pero no consiguió activar la expresión de marcadores tales como *ACR4* (*ARABIDOPSIS CRINKLY4*) (De Smet *et al.*, 2008) o permitir la formación de PRLs (Vanneste *et al.*, 2005). Por lo que la activación de la proliferación celular no es suficiente para restaurar el desarrollo de las raíces laterales en *slr1*. Sin embargo, el mutante de pérdida de función *iaa14-1* no tiene fenotipo obvio (Okushima *et al.*, 2005), sugiriendo que otros miembros, de los 29 que forman la familia génica Aux/IAA, pueden también estar involucrados. Aunque los mutantes de ganancia de función *iaa/axr5* (*auxin resistant 5*) (Yang *et al.*, 2004), *iaa3/shy2* (*short hypocotyl 2*) (Tian y Reed, 1999), *iaa18/crane* (Uehara *et al.*, 2008), *iaa19/msg2* (*massugu2*) (Tatematsu *et al.*, 2004) y *iaa28-1* (Rogg *et al.*, 2001) tienen alterado el desarrollo de las raíces laterales (Tabla 1), ninguno bloquea la iniciación de las mismas completamente, sugiriendo la redundancia en la familia génica Aux/IAA. Esto puede deberse a los diferentes patrones de expresión o distinta funcionalidad entre estas proteínas (Weijers *et al.*, 2005).

Las proteínas represoras Aux/IAA dimerizan con factores de transcripción llamados factores de respuesta a auxina (ARFs) que controlan la transcripción en respuesta a auxina (Guilfoyle y Hagen, 2007). IAA14/SLR interacciona y reprime la función de ARF7 y ARF19 (Fukaki *et al.*, 2005). La degradación de IAA14/SLR por auxina y TIR1/AFB1-3 causa la activación de los factores de transcripción ARF7 y ARF19 (De Smet *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2009) (Figura 14). Consistente con este modelo, el doble mutante *arf7 arf19* muestra muchos defectos fenotípicos encontrados en el mutante *slr1*, incluyendo la interrupción de la iniciación de las raíces laterales (Fukaki *et al.*, 2002; Wilmoth *et al.*, 2005). Sin embargo, a diferencia de *slr1*, el mutante *arf7 arf19* aún forma unas pocas raíces laterales (Fukaki *et al.*, 2007), sugiriendo que otros ARF(s) deben regular también la iniciación del órgano. La familia

génica *ARF* está compuesta por 23 miembros (Guilfoyle y Hagen, 2007); cinco ARFs funcionan como activadores transcripcionales (*ARF4*, 5, 6, 7 y 19) y los restantes ARFs parece que se comportan como represores transcripcionales (Tiwari *et al.*, 2003, 2004). Varios miembros de la clase más tardía de ARFs también parecen regular el desarrollo de las raíces laterales (Tian *et al.*, 2004; Mallory *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005)

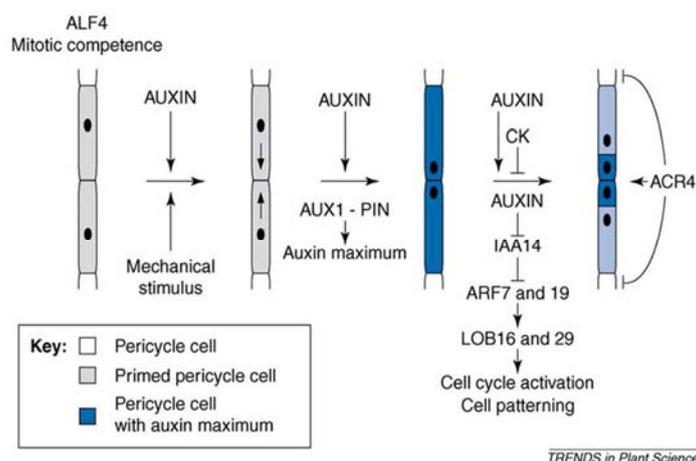


Figura 14. Eventos tempranos durante la iniciación de las raíces laterales de *Arabidopsis*. La acumulación local de auxina en células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema activa la cascada de señalización de auxina. La auxina causa la degradación de IAA14, por lo que se activa la expresión de *ARF7* y *19* y los genes de respuesta a auxina. El receptor *like*-quinasa ACR4 promueve las divisiones formativas en el primordio y reprime las divisiones celulares en las células del periciclo de alrededor (De Smet *et al.*, 2008). Abreviaturas: LOB, LATERAL ORGAN BOUNDARIES (Péret *et al.*, 2009).

Se han identificado dos genes regulados por *ARF7* y *ARF19* capaces de rescatar el defecto de raíces laterales de *arf7 arf19* cuando se sobreexpresan en el fondo del doble mutante (Okushima *et al.*, 2007). *LBD16/ASL18* (*LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN16/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE18*) y *LBD29/ASL16* pertenecen a una gran familia de factores de transcripción específicos de plantas. Los promotores de *LBD16/ASL18* y *LBD29/ASL16* representan dianas directas de *ARF7* y *ARF19* (Okushima *et al.*, 2007). Así, estas proteínas LBD parecen funcionar inmediatamente por debajo de *ARF7* y *ARF19* y mediar el patrón de raíces laterales regulado por auxina (Figura 14). Identificar qué genes están regulados por *LBD16* y *LBD19* es probablemente la prueba necesaria para entender cómo las células fundadoras del periciclo se dividen nuevamente, de forma ordenada, para dar lugar a un PRL (Péret *et al.*, 2009).

Mediante el perfil transcriptómico de las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema sufriendo iniciación de raíces laterales se han identificado sobre una docena de genes reguladores que controlan la división celular asimétrica y la especificación del destino celular (De Smet *et al.*, 2008). Uno de estos candidatos, *ACR4*, se expresa en las células hijas pequeñas después de la primera división asimétrica en el periciclo enfrentado a los polos de protoxilema. *ACR4* codifica un receptor *like*-quinasa asociado a la membrana, aumentando la posibilidad de que regule el patrón de PRLs por reconocer una nueva clase de moléculas de señalización, tales como un péptido. Mutantes defectuosos en *ACR4* y un miembro relacionado con la familia génica *CRR4 (CRINKLY4 RELATED4)* forman PRLs que no expresan o muestran expresión aberrante de los marcadores de unión y de respuesta a auxina *LBD5:GUS* y *DR5:GUS*, respectivamente (De Smet *et al.*, 2008). *ACR4* además parece influir en la especificación del destino celular durante la iniciación de las raíces laterales. *ACR4* y genes relacionados se requieren también para reprimir las divisiones en células del periciclo cercanas (De Smet *et al.*, 2008) (Figura 14). Mutantes en miembros de la familia génica *ACR4* causan PRLs iniciados unos cerca de otros o en polos opuestos normalmente excluidos (De Smet *et al.*, 2008). Por lo tanto, *ACR4* forma parte de un nuevo mecanismo que reprime las divisiones proliferativas en células del periciclo adyacentes a las células fundadoras (De Smet *et al.*, 2008). Dado que *ACR4* se expresa exclusivamente en los PRLs, la proteína *ACR4* probablemente regula señales autónomas no celulares que reprimen la división en células del periciclo cercanas.

### **La auxina en las distintas etapas de desarrollo de los primordios**

Evidencias genéticas y fisiológicas sugieren que la auxina se requiere en varios estadios específicos del desarrollo para facilitar la formación de las RLs. Se han descrito, en *Arabidopsis*, varios mutantes relacionados con auxina que detienen la formación de las raíces laterales en varias etapas del desarrollo (Celenza *et al.*, 1995). La mutación *alf4* bloquea la iniciación de las raíces laterales, mientras que la mutación *alf3* interrumpe el desarrollo del órgano poco después de la emergencia. El desarrollo post-emergencia interrumpido en el mutante *alf3* puede rescatarse mediante la aplicación exógena de auxina o precursores de indol (Celenza *et al.*, 1995). Los diferentes fenotipos de los mutantes *alf3* y *alf4* sugieren que el AIA se requiere en varias etapas del desarrollo de las raíces laterales. Laskowski *et al.* (1995) propusieron

que el AIA inicialmente se requiere para marcar a las células fundadoras del periciclo pero que los PRLs forman meristemas autónomos de esta hormona. Por ejemplo, primordios de RL jóvenes son incapaces de continuar dividiéndose cuando la raíz principal se escinde del tallo, a menos que se suplemente con AIA exógeno (Dubrovsky *et al.*, 2001). Sin embargo, entre los estadios III y V, los primordios de RL llegan a ser independientes de auxina aplicada exógenamente, indicando que contienen tipos celulares que pueden actuar como fuente de auxina endógena (Laskowski *et al.*, 1995; Himanen *et al.*, 2002; Marchant *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2003). Antes de llegar a ser autónomos de esta hormona (Ljung *et al.*, 2005), los primordios de raíz lateral obtienen AIA vía transporte polar de auxina (Reed *et al.*, 1998). Además, la capacidad de sintetizar su propia auxina parece coincidir con la activación del meristemo, aunque se precisan más estudios para poder demostrar esta idea.

Para propiciar el desarrollo y el patrón de tejidos en los PRLs, es importante el establecimiento de un gradiente de auxina, de manera parecida a un gradiente de morfógeno durante el desarrollo animal (Bhalerao y Bennett, 2003), con su máximo inicialmente en las células centrales y más tarde en el ápice de los PRLs multicelulares (Benková *et al.*, 2003; Péret *et al.*, 2009) (Figura 15). Este gradiente depende del transporte de auxina mediado por *GNOM* y los transportadores de eflujo de auxina PIN. Una interferencia química (inhibidores) o genética (mutantes) con el transporte de auxina origina alteraciones tanto en el establecimiento del gradiente de auxina como en el desarrollo de los PRLs (Benková *et al.*, 2003; Geldner *et al.*, 2004).

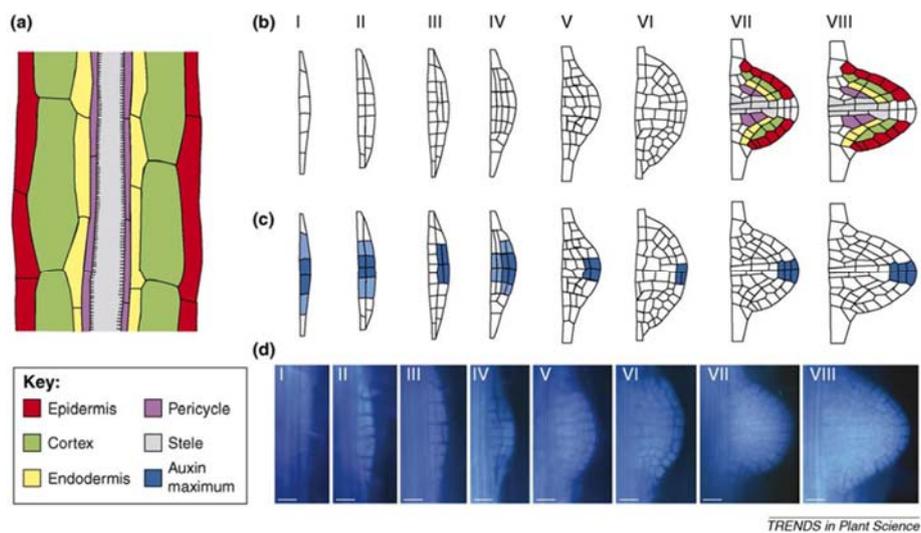


Figura 15. Cambios morfológicos durante el desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis*. Las raíces laterales se originan en el interior de la raíz principal a partir de las células del periciclo (a). Se muestran los ocho estadios del

desarrollo del primordio (números romanos [Malamy y Benfey, 1997]) (b) como también el establecimiento de la máxima señal de auxina mostrada con el marcador *DR5::GUS* (gradiente azul (c) [Benková *et al.*, 2003]). Los gráficos se dibujaron a partir de raíces teñidas con anilina *blue* para cada estadio de desarrollo de raíces laterales (d). Las barras de escala representan 20  $\mu\text{m}$  (Péret *et al.*, 2009).

## **Regulación hormonal de la arquitectura de la raíz**

### **Iniciación, desarrollo y elongación de la raíz principal**

Como se ha explicado anteriormente, las auxinas tienen un papel predominante y esencial en la regulación de la formación, desarrollo y respuesta del sistema radicular. Sin embargo, la señalización de auxinas interactúa con otras señalizaciones hormonales para adecuar el crecimiento de las raíces a las necesidades de las plantas. A continuación se mencionan algunas de las interacciones más significativas:

- En *Arabidopsis*, la señalización de auxina y la acción antagonista de las citoquininas (CKs) están involucradas en el desarrollo del nicho de células madre de la raíz (Muller y Sheen, 2008; Kartal *et al.*, 2009; Moubayidin *et al.*, 2009; Pernisova *et al.*, 2009; Ruzicka *et al.*, 2009). También es importante la regulación secundaria de la señalización de auxina por las giberelinas y los brasinoesteroides (Sabatini *et al.*, 1999; Frigerio *et al.*, 2006; Jung y McCouch, 2013) (Figura 16).

- Las estrigolactonas (SLs), una nueva clase de hormonas vegetales y moléculas de señalización de la rizosfera, están implicadas en el desarrollo de la raíz principal basado en la interacción con la señalización de auxina. En presencia de auxina, la aplicación exógena del análogo sintético de SLs, GR24, inhibe la elongación de la raíz principal de *Arabidopsis* a bajas concentraciones, o estimula el crecimiento de la raíz principal a altas concentraciones por una posible regulación de los transportadores de eflujo de auxina PIN1, PIN3 y PIN7 (Aida *et al.*, 2002; Kapulnik *et al.*, 2011; Ruyter-Spira *et al.*, 2011; Jung y McCouch, 2013) (Figura 16). GR24 también induce la curvatura de la raíz principal a altas concentraciones, en presencia de bajos niveles de auxina por inducir la elongación celular asimétrica (Koltai *et al.*, 2010).

- En *Arabidopsis*, el factor de transcripción SCARECROW (SCR) tiene una posible función en mediar la respuesta cruzada entre ácido giberélico (GA),

brasinoesteroides y la señalización de auxina involucrada en el mantenimiento de células madre (Muller y Sheen, 2008; Ruzicka *et al.*, 2009; Benkova y Hejatko, 2009; Jung y McCouch, 2013) (Figura 16).

- Los factores de transcripción DELLA, incluyendo GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1 (RGA) y RGA-LIKE 1, RGA-LIKE 2 y RGA-LIKE 3 (RGL1, RGL2 y RGL3), son reguladores negativos del crecimiento de la raíz mediado por GA, y parecen estar regulados negativamente por auxina. La ubiquitinación y destrucción de las proteínas DELLA en presencia de GA y auxina permite la división y elongación celular en la raíz (Dill y Sun, 2001; Ikeda *et al.*, 2001, 2002; Chandler *et al.*, 2002; Fleet y Sun, 2005; Perez-Perez, 2007; Jung y McCouch, 2013) (Figura 16).

- El ABA se requiere para el crecimiento normal de la raíz principal, por regular el transporte de auxina en la misma (Lin *et al.*, 2007; Jung y McCouch, 2013) (Figura 16).

- Y el etileno inhibe la elongación celular a través de la activación de *ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR1 (EDF1)* a *EDF4*, miembros de la familia de factores de transcripción *EREBP (ETHYLENE RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN)* (Alonso *et al.*, 2003; Jung y McCouch, 2013) (Figura 16). Varios genes *ACS (ACC SYNTHASE)* son diana de los factores de transcripción ARFs (Abel *et al.*, 1995; Tsuchisaka y Theologis, 2004). Y los genes *WEAK ETHYLENE INSENSITIVE2 (WEI2)* y *WEI7* representan una conexión entre la respuesta a etileno y la biosíntesis de auxina (Stepanova *et al.*, 2005).

### **Crecimiento de las raíces laterales**

La auxina es la principal señalización hormonal que regula el desarrollo de los PRLs mediante la formación de un gradiente de auxina (Péret *et al.*, 2009). Este gradiente está regulado aguas arriba por bajos niveles de las citoquininas antagonistas que reprimirían la formación de los PRLs mediante la interrupción de la localización de las proteínas PIN, que son particularmente responsables de crear el gradiente de auxina (Laplaze *et al.*, 2007). Las CKs específicamente afectan al ratio de diferenciación celular entre las zonas de división y elongación/diferenciación celular pero no afecta al ratio de división celular en el meristemo (Dello Iorio *et al.*, 2008). Las SLs también pueden regular la formación de los PRLs, posiblemente por alterar la sensibilidad a auxina por reprimir la expresión de los transportadores de flujo tales

como PIN1, así inhiben la formación de RLs a bajos niveles de auxina por reducir la acumulación de la hormona en las raíces, o inducir la formación de RLs a altas concentraciones de auxina por permitir niveles óptimos de la hormona (Ruyter-Spira *et al.*, 2011; Jung y McCouch, 2013) (Figura 17).

Las interacciones hormonales también desempeñan una función en el crecimiento de las RLs: auxinas, etileno y ácido abscísico (ABA) inhiben la elongación de las RLs, mientras que las CKs promueven la elongación (Rani Debi *et al.*, 2005; Iwama *et al.*, 2007; Jung y McCouch, 2013) (Figura 17).

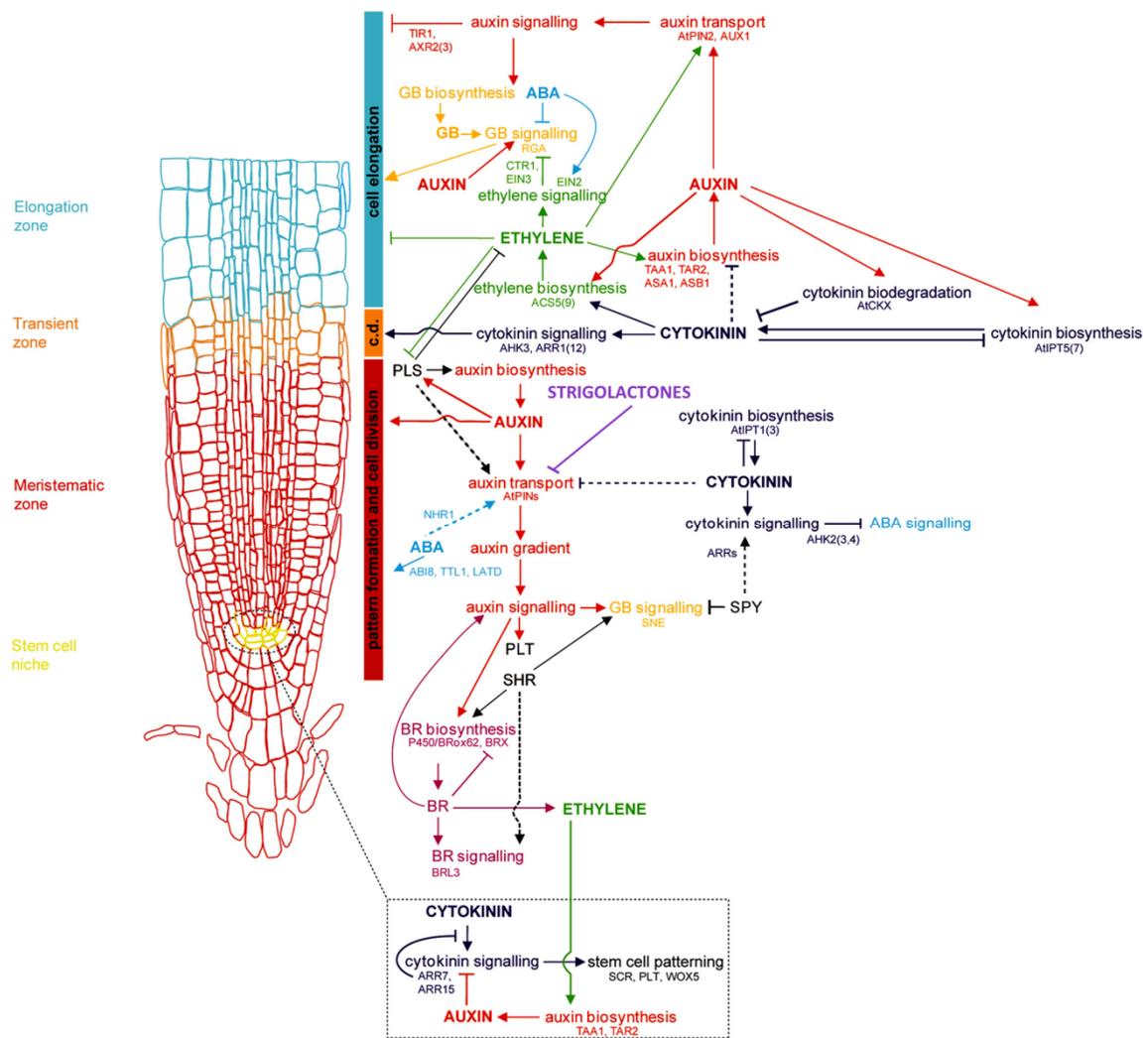


Figura 16. Modelo de la interacción hormonal y regulación genética del crecimiento y desarrollo de la raíz principal y el meristemo apical de la raíz en *Arabidopsis*. Importantes genes involucrados en la integración de las señales desde diferentes rutas hormonales se muestran en negro; las redes de hormonas tienen un código de color; las líneas discontinuas representan relaciones no resueltas o indirectas. Puede visualizarse la función fundamental de la señalización mediada por auxina en controlar los principales aspectos del crecimiento de la raíz, desde la división, diferenciación y elongación celular, así como la regulación antagonista de las auxinas por las citoquininas, y la regulación secundaria por otras hormonas, incluyendo ABA, etileno, GA, brasinoesteroides (BRs) y estrigolactonas. c.d.

es “diferenciación celular”, en referencia a la zona de transición donde se inicia la diferenciación celular (Jung y McCouch, 2013).

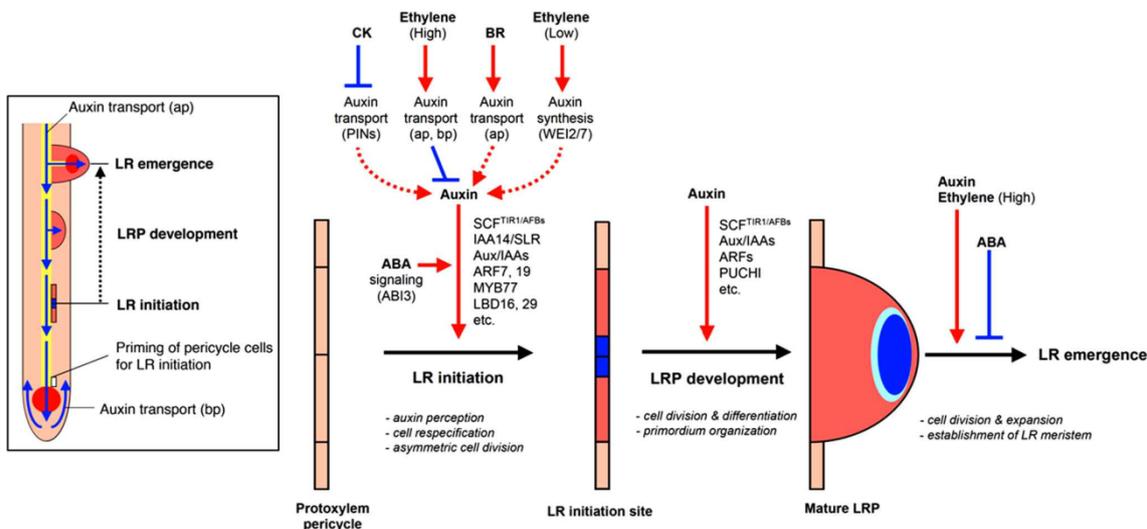


Figura 17. Control hormonal y genético de la formación de las raíces laterales en *Arabidopsis*. La formación de las RLs es un proceso de tres etapas consistente en la iniciación de las RLs, el desarrollo de los PRLs y la emergencia de las RLs. La iniciación de las RLs está regulada positivamente por la auxina pero regulada negativamente por las CKs y altas concentraciones de etileno [altas concentraciones de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) exógeno]. El transporte polar de auxina con un balance del influjo y eflujo en las direcciones acrópeta y basípeta es necesario para la iniciación de las RLs y generar un gradiente de auxina para organizar los primordios de RL (LRP; color azul en el sitio de iniciación de RLs y primordios). Las CKs inhiben el máximo de auxina por alterar la expresión de los transportadores PIN, así inhiben el gradiente de auxina para la iniciación de las RLs. Altas concentraciones de etileno o ACC exógeno, un precursor de etileno, inhiben la iniciación de las RLs por incrementar el transporte de auxina acrópeta (ap) y basípeta (bp). Los BRs promueven la iniciación de las RLs por incrementar el transporte acrópeta (ap) de auxina. Bajas concentraciones de etileno (bajas concentraciones de ACC exógeno) promueven la iniciación de las RLs por incrementar la síntesis de auxina dependiente de Trp mediada por WEI2 y WEI7. La señalización de ABA mediada por ABI3 es necesaria para propiciar la respuesta de auxina para la iniciación de las RLs. La auxina también promueve el desarrollo de los primordios de RL pero las CKs inhiben el desarrollo de los mismos y afectan el máximo de auxina por alterar la expresión de los transportadores PIN. El ABA inhibe la emergencia de las RLs mientras que la auxina y el etileno (via altas concentraciones de ACC exógeno) promueven la emergencia de las RLs (Jung y McCouch, 2013).

## El ciclo celular en eucariotas

El crecimiento es uno de los fenómenos más estudiados en los organismos pluricelulares. El proceso de división celular desempeña un papel esencial en los mecanismos por los cuales los organismos superiores alcanzan el desarrollo apropiado de sus órganos. El ciclo de división celular está controlado por una maquinaria molecular que asegura la fidelidad de la replicación del ADN y que

responde a señales tanto del medioambiente como programas de desarrollo intrínsecos. Un papel central en la regulación del ciclo celular lo desempeñan las quinasas dependientes de ciclina (CDKs). La actividad CDK está controlada por diferentes mecanismos, incluyendo la unión a ciclinas (Pines, 1994) y la fosforilación de un residuo de Thr-161 (o un equivalente) por la actividad de la quinasas de CDK (Dunphy, 1994).

Los complejos activos ciclina/CDK pueden inhibirse de diferentes maneras. La fosforilación de los residuos Thr-14 y Tyr-15 interfiere con la correcta unión del cofactor ATP y, además, inhibe la actividad CDK (Dunphy, 1994). Indirectamente, la actividad quinasas también se inhibe por la degradación controlada de las subunidades de ciclina (Peters, 1998). Otro mecanismo de regulación negativa de la actividad CDK está controlado por una familia de proteínas de bajo peso molecular, llamadas inhibidores de CDK (CKIs), que inhiben la actividad CDK mediante una estrecha asociación con los complejos ciclina/CDK (Sherr y Roberts, 1995; 1999). En mamíferos, se distinguen dos familias diferentes de CKI en base a su modo de acción y similitud de secuencia: las familias INK4 y Kip/Cip.

Las plantas poseen dos tipos de familias relacionadas con los CKIs: KRP/ICK y SIM/SMR. En *Arabidopsis*, se han designado como KRPs (del inglés *Kip-related proteins*) a las proteínas relacionadas con la clase de inhibidores de CDK Kip/Cip de mamíferos (De Veylder *et al.*, 2001; Vandepoele *et al.*, 2002). El genoma de *Arabidopsis* codifica siete genes *KRP*. A pesar de la limitada homología de secuencia con sus parientes de mamíferos, los KRPs son verdaderos homólogos funcionales de las proteínas Kip/Cip inhibiendo la actividad CDK tanto *in vitro* como *in vivo* (Wang *et al.*, 1997, 1998, 2000; Lui *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001). Así, KRP1 y KRP2 se corresponden con ICK1 y ICK2, respectivamente (De Veylder *et al.*, 2001).

De una manera similar a otros eucariotas, muchas de estas proteínas KRP de plantas están reguladas por una degradación dependiente de ubiquitina durante la transición G1/S. KRP1 de *Arabidopsis*, que se une al complejo CDKA;1/CYCD2;1 para inhibir su función, regula negativamente la transición G1/S (Ren *et al.*, 2008). La sobreexpresión ectópica de *KRP1* afecta seriamente al desarrollo de la planta y bloquea la primera división celular en las células fundadoras del periciclo en las raíces, mediada por auxina (Wang *et al.*, 2000; De Veylder *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2003; Bemis y Torii, 2007; Ren *et al.*, 2008).

Varios trabajos proporcionan información sobre el modo de acción y atenuación de la señal de auxina durante la iniciación de la raíz lateral. La Figura 18 ilustra la posible relación espacial entre la auxina, la expresión de *KRP2* y la posición longitudinal de las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema a lo largo de la raíz de la plántula de *Arabidopsis* (Himanen *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2003). El gen *KRP2* es un inhibidor específico de la quinasa dependiente de ciclina (CDKA;1), esencial para la transición G1/S y G2/M. Después de la germinación, las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema permanecen en fase G1 y la expresión de *KRP2* es alta (Figura 18a). Después, un grupo de células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema progresa a través de la transición G1-S (Figura 18b). Este importante evento del ciclo celular está caracterizado por una represión de la transcripción de *KRP2* por auxina (Stals e Inzé, 2001; Himanen *et al.*, 2002). En la Figura 18c, algunas de las células del periciclo en fase G2 entran en mitosis en el punto donde empieza la diferenciación del metaxilema (De Smet *et al.*, 2003). Siguiendo a este evento, la expresión de *KRP2* reaparece en aquellas células del periciclo que no están implicadas en la formación de los primordios de RL. Estos datos sugieren un papel para *KRP2* en controlar el patrón de ramificación de la raíz. Por unirse e inhibir permanentemente a los complejos CDKA;1 presentes, *KRP2* podría finalmente controlar la actividad de división del periciclo competente meristemáticamente.

Consecuentemente, la proliferación celular durante el desarrollo de las RLs no solapa con la proliferación celular en el meristemo apical de la raíz principal. Por lo tanto, las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema deben re-entrar en el ciclo celular después de dejar el meristemo de la raíz principal (el marcador específico de la fase G2/M, *pCYCB1;1::GUS*, marca las primeras divisiones en el periciclo durante la iniciación de las raíces laterales) (Dubrovsky *et al.*, 2000). Esto cuestiona la naturaleza quiescente de las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema y se discute por el concepto de un “meristemo monocapa extendido” (Casimiro *et al.*, 2003) porque, a diferencia de las células enfrentadas a los polos de floema o en otros tejidos de la raíz, las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema mantienen su capacidad para dividir después de salir del meristemo apical de la raíz.

La proteína nuclear ALF4 (ABERRANT LATERAL ROOT FORMATION4) se requiere para mantener las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema

en un estado competente de mitosis porque la mutación *alf4* bloquea la inducción del marcador mitótico *cyclin B1 (CycB1);1::GUS*. El periciclo de *Arabidopsis* expresa constitutivamente transcritos de genes del ciclo celular (Mironov *et al.*, 1997), lo cual ilustra la naturaleza especial de su regulación del ciclo celular.

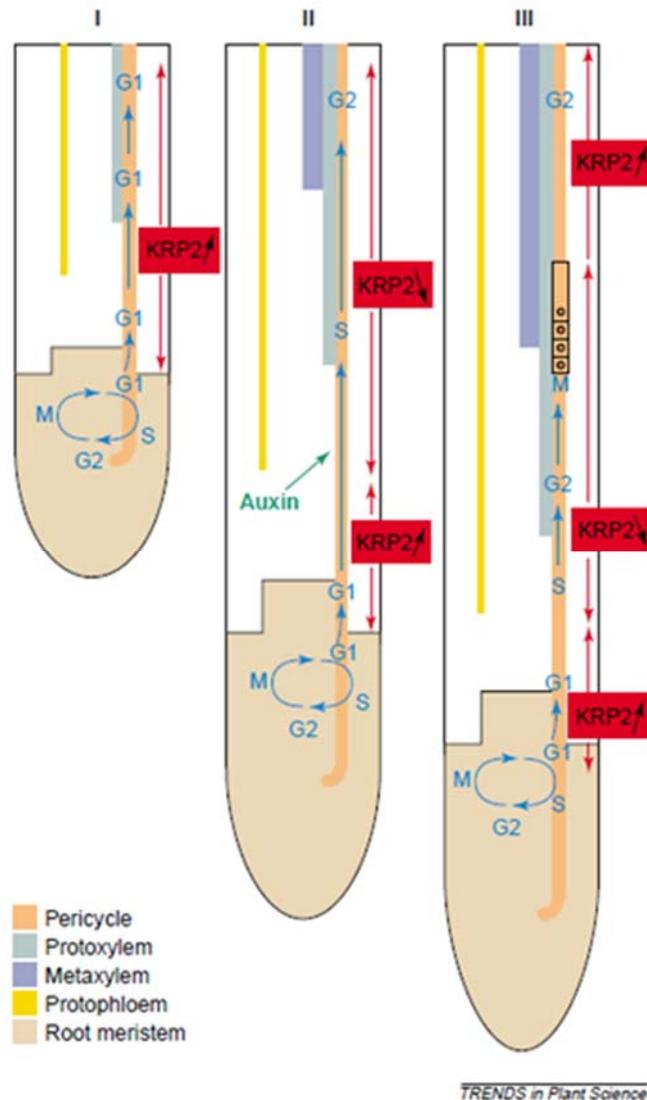


Figura 18. Relación espacial entre la posición longitudinal de las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema a lo largo de la raíz de la plántula, sus fases del ciclo celular y la auxina. Tres fases de desarrollo (I, II y III) de la raíz de la plántula de *Arabidopsis* se muestran aquí. Durante la fase I, las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema permanecen en fase G1 del ciclo celular y la expresión de *KRP2* es alta. Durante la fase II células del periciclo seleccionadas progresan a través de la transición G1-S, resultando en una zona distal de la raíz que contiene células del periciclo en fase G2 que está caracterizada por la represión transcripcional del gen *KRP2* inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina. Dado que la represión de *KRP2* está mediada por auxina (Stals e Inzé, 2001), un flujo importante de auxina alcanza el periciclo. Durante la fase III, células del periciclo seleccionadas en fase G2 entran en mitosis y la expresión *KRP2* reaparece en las células del periciclo que no están involucradas en la formación de la raíz lateral (Casimiro *et al.*, 2003).

## **SKP2B como marcador de la formación de las raíces laterales**

Las modificaciones postraduccionales regulan la actividad, la localización subcelular o la estabilidad de diferentes proteínas. Entre estas modificaciones, la fosforilación de la proteína es una de las más estudiadas. Sin embargo, la modificación covalente de las proteínas con ubiquitina (Ub) es un poderoso mecanismo que regula la estabilidad, la función o la localización de múltiples proteínas (Mukhopadhyay y Riezman 2007) (Figura 19).

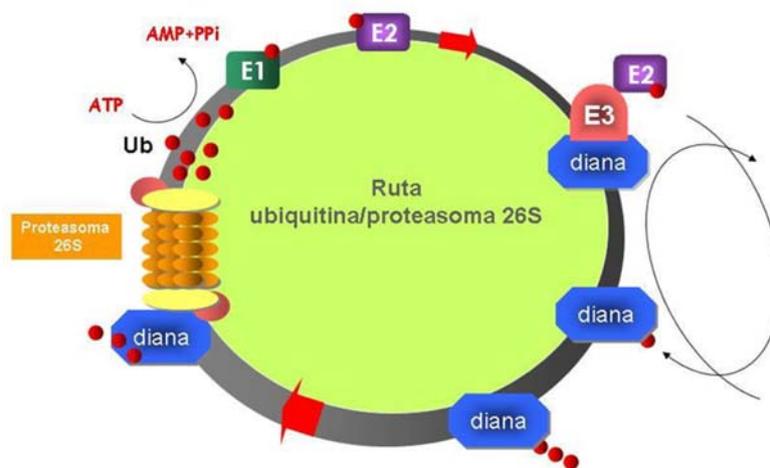


Figura 19. Ruta ubiquitina/proteasoma 26S

La Ub es un pequeño péptido que se une covalentemente a proteínas en una reacción postraducciona. La ubiquitinación es un sistema regulador altamente preciso e irreversible que está presente en todos los organismos eucariotas y regula la estabilidad, la actividad, la localización y el transporte de proteínas. La unión de Ub a las proteínas diana requiere la sucesiva función de tres enzimas: la E1 o enzima de activación de Ub, la E2 o enzima de conjugación y la E3 o enzima ligasa. La activación de la Ub se lleva a cabo por la E1 en una reacción dependiente de ATP. Después, la Ub se transfiere a la E2, que en colaboración con la E3, une covalentemente la Ub a las proteínas diana (Glickman y Ciechanover, 2002; Santner y Estelle, 2010; Strieter y Korasick, 2012; Olsen y Lima, 2013) (Figura 19). En la mayoría de los casos, la modificación con ubiquitina implica el marcaje para degradación a través del proteasoma 26S (UPS) (Figura 19). Lo que diferencia entre la modificación funcional o la degradación es la longitud de la cadena de ubiquitina y la posición en la que ésta se une (Li y Ye, 2008).

Entre los diferentes tipos de E3 descritas, el complejo SCF (Skp/cullin/F-box) es uno de los más estudiados (Skaar y Pagano, 2009; Teixeira y Reed, 2013). El complejo SCF está compuesto por 4 subunidades proteicas, CULLIN1, RING-box (RBX), ASK1 y una F-box (Cardozo y Pagano, 2004; Suryadinata *et al.*, 2013; del Pozo y Manzano, 2014) (Figura 20). Las tres primeras forman el cuerpo de la estructura en la que se ensamblan diferentes proteínas F-box para generar diversos tipos de complejos SCF que pueden reclutar diferentes dianas.

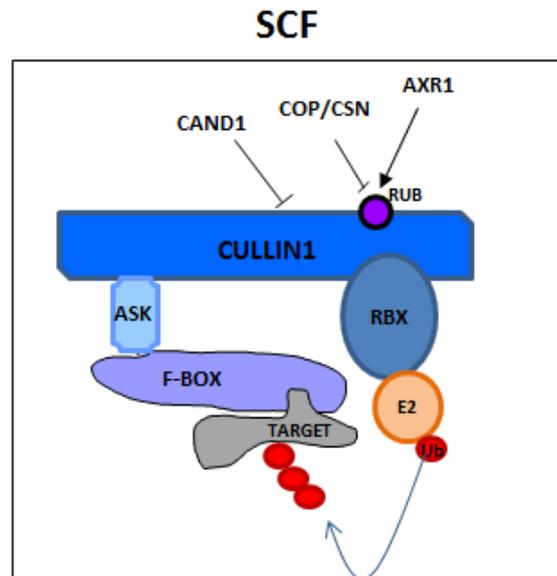


Figura 20. Representación esquemática del complejo SCF (del Pozo y Manzano, 2014).

En plantas, la ruta de la ubiquitina regula la mayoría de los procesos biológicos, tales como la señalización hormonal, respuestas a la luz, regulación del reloj circadiano o respuestas a patógeno (Smalle y Vierstra, 2004; Lechner *et al.*, 2006; Dreher y Callis, 2007; Moon *et al.*, 2004). Además de esto, la ruta de la ubiquitina también regula la división celular por degradar proteínas reguladoras clave, asegurando la correcta transición entre las fases del ciclo celular (Hershko, 2005; Nakayama y Nakayama, 2006). SKP2A y SKP2B (del inglés *S-Phase Kinase-Associated Protein2*) son proteínas F-box que comparten homología con Skp2 de humanos (*Homo sapiens*) (del Pozo *et al.*, 2002), un regulador clave de la división celular (Nakayama y Nakayama, 2006; Frescas y Pagano, 2008; Bassermann *et al.*, 2014). SKP2A forma parte del complejo SCF<sup>SKP2A</sup> y se une a auxina para controlar la estabilidad de factores de transcripción del ciclo celular, actuando como un regulador positivo de la división celular (Jurado *et al.*, 2010; Peer, 2013). SKP2B también regula la estabilidad de las proteínas del ciclo celular. El complejo SCF<sup>SKP2B</sup> y una enzima

RING-E3 llamada RKP (homólogo al complejo *Kpc1* de humanos que ubiquitina a Kip1) degradan al inhibidor de CDK KRP1 (Ren *et al.*, 2008). Mutantes *skp2b* muestran una tasa de división más alta en el meristemo de la raíz así como una prematura división de las células fundadoras de raíces laterales, sugiriendo que SKP2B degrada un activador del ciclo celular en estas células. *SKP2B* regula la formación de las RLs por reprimir la división de las células fundadoras del periciclo, así funciona como un regulador negativo. Este gen se expresa durante todo el desarrollo de las RLs (células fundadoras, PRLs y RLs emergidas) y en el meristemo de la raíz (Manzano *et al.*, 2012) (Figura 21). Manzano *et al.*, (2012) identificaron un nuevo motivo en el promotor de *SKP2B* que se requiere para la expresión específica en raíz y la inducción dependiente de auxina en las células del periciclo. Junto al control transcripcional mediado por auxina, la expresión de *SKP2B* está regulada por la deposición de la histona H3.1/H3.3 de una manera dependiente de CAF (del inglés, *chromatin assembly factor*). El promotor de *SKP2B* y el extremo 5' de la región transcrita están enriquecidos con H3.3 que se asocia con estados activos de la cromatina. Además, el promotor de *SKP2B* también está regulado por la acetilación de H3 de una manera dependiente de auxina y IAA14, reforzando la idea de que la regulación epigenética representa un mecanismo importante durante la formación de las raíces laterales (Fukaki *et al.*, 2006).

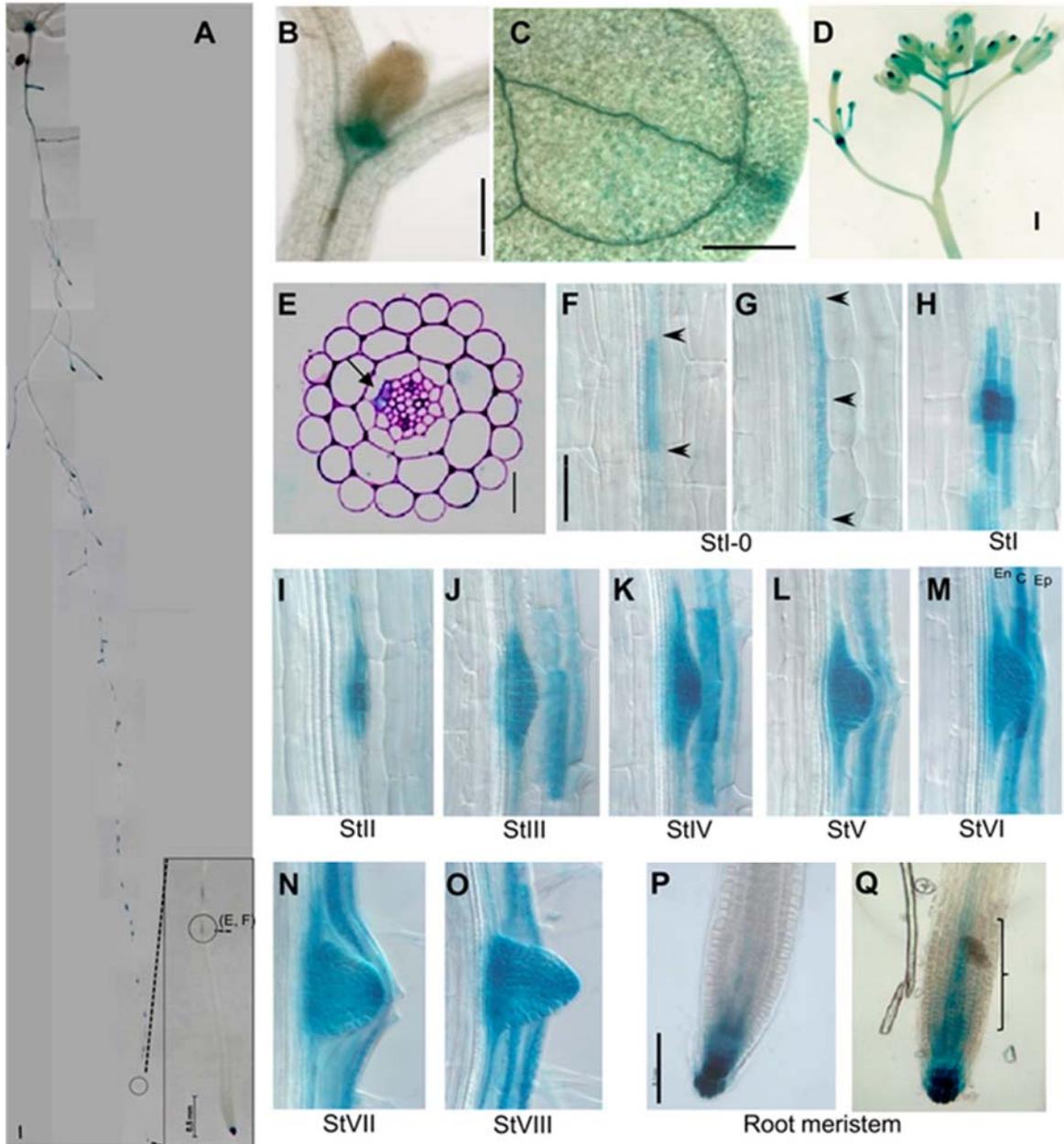


Figura 21. Expresión de *SKP2B*. A) Plántulas *pSKP2B::GUS* se crecieron durante 12 días y se tiñeron para la actividad GUS. La caja de la derecha es una ampliación mostrando los puntos teñidos para GUS más cerca del meristemo apical de la raíz. Los círculos indican las secciones analizadas en E y F. B) Expresión de *SKP2B* en el meristemo apical del tallo. C) Cotiledones y tejido vascular. D) Botones florales. E) Sección transversal mostrando los puntos teñidos para GUS más cerca del meristemo apical de la raíz como se muestra en A y F. La flecha indica las células del periciclo teñidas para la actividad GUS. F-O) Imágenes representativas de la formación de las RLs en diferentes estadios de desarrollo (St) desde el estadio 0 al estadio VIII, tomadas en una única raíz. P y Q) Imágenes representativas de dos meristemos de raíz diferentes mostrando distinta tinción para GUS en el meristemo basal (horquilla). Barras = 0,5 mm (A-D), 20 mm (E) y 0,2 mm (F-Q). C, Córte; En, Endodermis; Ep = Epidermis (Manzano *et al.*, 2012).

## El sistema radicular y la luz

Durante la evolución de las plantas terrestres, las raíces se han desarrollado en oscuridad con un crecimiento positivo al vector de la gravedad y, consecuentemente, están adaptadas a crecer en estas condiciones. La luz puede provocar cambios dramáticos en el crecimiento de la raíz y se produce como una respuesta de estrés (Yokawa *et al.*, 2011; Burbach *et al.*, 2012). A pesar de todo, las raíces están expuestas a la luz filtrada a través del suelo (Galen *et al.*, 2007) o canalizada a través del cilindro vascular (Mandoli *et al.*, 1984). Para percibir y responder a los cambios en la dirección, la intensidad, la calidad y la duración de la luz (Quail, 2002; Chen *et al.*, 2004; Jiao *et al.*, 2007) las raíces expresan varios tipos de foto-receptores asociados a la membrana plasmática que se activan al absorber una longitud de onda específica de la luz y convierten la percepción de la luz en respuestas específicas (Chen *et al.*, 2004; Briggs y Lin, 2012). De los 14 foto-receptores que se conocen en la parte aérea (Chen *et al.*, 2004; Briggs y Lin, 2012), la mayoría se expresan y están activos en la raíz (Somers y Quail, 1995; Tóth *et al.*, 2001; Sakamoto y Briggs, 2002; Canamero *et al.*, 2006; Galen *et al.*, 2007; Laxmi *et al.*, 2008; Tong *et al.*, 2008; Leasure *et al.*, 2009; Costigan *et al.*, 2011; Dyachok *et al.*, 2011; Rizzini *et al.*, 2011; Warnasooriya y Montgomery, 2011; Wan *et al.*, 2012) que pueden percibir la luz directamente (Somers y Quail, 1995; Kiss *et al.*, 2003; Salisbury *et al.*, 2007). El significado biológico de la percepción de la luz por la raíz aún no está completamente claro.

En *Arabidopsis*, los principales foto-receptores son los criptocromos (CRY1, 2 y 3) (Banerjee y Batschauer, 2005), las fototropinas (PHOT1 y 2) (Christie, 2007) y los fitocromos (PHYA, B, C, D y E) (Sharrock y Quail, 1989; Briggs *et al.*, 2001; Lin y Shalitin, 2003; Chen *et al.* 2004; Huq *et al.*, 2004). Los CRYs y las PHOTs perciben las longitudes de onda UV-A/azul (320-500nm) (Lin y Shalitin, 2003) y los PHYs son responsables de percibir las longitudes de onda del rojo/rojo lejano (600-750 nm). Los criptocromos son flavoproteínas con una similitud de secuencia con las fotoliasas pero tienen una extensión adicional C-terminal específica de plantas y los fitocromos son cromoproteínas foto-reversibles. Los CRYs y PHOT1, son importantes para la elongación de la raíz en respuesta a la luz azul (Canamero *et al.*, 2006; Galen *et al.*, 2007). La función de CRY3 en *Arabidopsis* aún no se conoce (Kleine *et al.*, 2003). Los PHYs A, B y D, controlan la elongación de la raíz mediada por luz roja (Correll y Kiss, 2005) y tanto PHYA como PHYB están involucrados en regular el gravitropismo

inducido por la luz, el fototropismo positivo inducido por la luz roja, el desarrollo de cloroplastos, la producción de metabolitos secundarios y el desarrollo de pelos radiculares (Feldman y Briggs, 1987; Johnson *et al.*, 1994; De Simone *et al.*, 2000; Kiss *et al.*, 2003; Hemm *et al.*, 2004). Las funciones de los otros fitocromos, PHYC y E, en procesos regulados por la luz en la raíz, aún no se han descrito. Además, los CRYs y los PHYs participan en el verdeamiento de la raíz bajo luz azul (Usami *et al.*, 2004).

A pesar de que los foto-receptores se expresan claramente en las raíces, la relevancia y significado biológico de estos genes en el sistema radicular no está claro.



## ***Objetivos***



## OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo ha sido **la identificación de nuevos genes implicados en la formación y desarrollo de las raíces laterales** en *Arabidopsis thaliana*.

Mediante una estrategia de “separación celular” y genómica, se han identificado más de 600 genes *cs-SKP2B* (*cell sorting-SKP2B*) que están directamente relacionados con la especificación, formación y/o desarrollo de las raíces laterales. Por otro lado, gracias a una estrategia genética, se ha identificado un mutante recesivo con un sistema radicular muy reducido, *srol1* (*short root in light*). Así, los objetivos principales de este trabajo son:

- 1) Análisis morfológico del sistema radicular de los mutantes de genes *cs-SKP2B*.
- 2) Caracterización fenotípica y molecular de *srol1*.
- 3) Estudio morfológico del sistema radicular de los mutantes de genes identificados en el análisis transcriptómico de *srol1*.



## ***Material y métodos***



## MATERIAL Y MÉTODOS

### **BLOQUE I: ESTRATEGIA DE SEPARACIÓN CELULAR Y GENÓMICA**

#### **Meta-análisis de otros *micro-arrays* publicados**

Los datos que se utilizaron para las comparaciones se obtuvieron de GEO (Edgar *et al.*, 2002) como archivos CEL. Los números GEO de acceso fueron: GSE3350, GSE6349, GSM226525, GSM226529, GDS3216, GSE21876, GSE21611 y GPL198. El análisis se basó en los valores de expresión RMA (del inglés *Robust Multi-array Analysis*) que se obtuvieron con los datos *affy* de BioConductor ([www.bioconductor.org](http://www.bioconductor.org)). Se normalizaron mediante el método RMA (Bolstad *et al.*, 2003) y se calcularon los *p-value*. Cada valor de expresión de las réplicas independientes de cada condición, se comparó con la media del control para conseguir el *log ratio* y calcular el *fold change* de expresión para cada gen. Se seleccionaron los genes que cambiaron su expresión más de 2 veces con respecto al experimento control, excepto para *ox-UPB1* que se seleccionó con un *fold change* de 1.75, y con un  $FDR < 0,02$ . El solapamiento entre los diferentes grupos de datos se llevó a cabo usando un programa *venny* (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

#### **Análisis fenotípico de los mutantes de genes *cs-SKP2B***

##### **Genotipado de plantas homocigotas**

En la colección pública de NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Centre*), se consiguieron 39 líneas de inserción de T-DNA en genes *cs-SKP2B*, que se llevaron a homocigosis mediante genotipado por PCR o selección con antibiótico (Tabla 2).

Gen cs-SKP2B	Línea T-DNA	Selección	Oligonucleótidos
At1g03210	SALK_044565	genotipado	LP AAATTGGACATAACATCCTAACCC RP TGTTGGAACAACAGGGAATC
At1g03210	SALK_147811C	genotipado	LP AATCCGCAATCTACGACATTG RP TTCTTTTGAATGTTTGCAG
At1g10200	GK-009C02.01	sulfadiazina 50 µg/ml	
At1g13420	GK-231G06.01	sulfadiazina 50 µg/ml	
At1g48630	SAIL_413_C07	PPT 20 µg/ml	
At1g51600	GK-448C11.01	sulfadiazina 50 µg/ml	
At1g57560	SALK_035416C	genotipado	LP CAGAAAAGTAGGAATAATGTGATTGG RP AACATCGACGATGGTTCTGTC
At1g60010	SALK_042028C	genotipado	LP AAACCATCCATAAATGCATG RP ATCCGTTAGTGAGATCATGCG
At1g62800	SALK_086748	genotipado	LP CCGAAGATCCTGTTCTCAGTG RP TAAAAATACGGGGATGGTTCC
At1g75750	SALK_001187C	genotipado	LP GATGTGTGGACCAAATTTTGG RP GTCTAGACCGAAAATGGGGTC
At2g14960	SAIL_82_D10	PPT 20 µg/ml	
At2g16850	SALK_099098	genotipado	LP AAGCAACACACAAGATGCAAG RP AAAATCCATGTCAAACCCTACG
At2g29660	SALK_001345C	genotipado	LP GAATTTTCGGCTCCAAAGTTTC RP ATTTGATTTACCGTTTTGCC
At2g34070	SALK_026608C	genotipado	LP ATTCATCATCACGAGGACGAC RP TCCACTAGGTATGGTGTTCGG
At2g39630	SAIL_694_F05	PPT 20 µg/ml	
At2g39980	GK-255G07.09	sulfadiazina 50 µg/ml	
At3g03170	GT_5_63368	genotipado	LP TTGAAAAACATCGTCCCAAAC RP TGTTCAACGTAGTTTCGACACG
At3g03170	GT_5_6892	genotipado	LP TGTTCAACGTAGTTTCGACACG RP TTGAAAAACATCGTCCCAAAC
At3g06035	SALK_118837C	genotipado	LP TCCGAGAATATCCTGCATTTG RP TTCAGGATCTTTAGATCTGGTCTG
At3g09980	SALK_028810C	genotipado	LP AATTGACGGTTTAGACGGGAC RP CAAAAGCCCCAAAATTTTCTC
At3g10780	WiscDsLoxHs096_08D	genotipado	LP CGAAAATCAACATTAACACTGCTG RP CCACTTCTAAGCTGTCGTTGG
At3g13530	SALK_061724C	genotipado	LP CCTTCTCTGAAGTTGCAGTGG RP AGCAGGGTGTATACACCGTG
At3g16360	GK-933D02.02	sulfadiazina 50 µg/ml	
At3g16450	SALK_085183C	genotipado	LP TTCGCCATAATTGGAGAATTG RP TGTCGTAGGTCACTTGCCTG
At3g19200	SALK_064758C	genotipado	LP TCACCCATTATGAATCCATTGTC RP TCCCTTTGATGAGATGGTACG
At3g24240 x At5g56040	SALK_040393 x SALK_037932	genotipado	LP AAACAGCCCAAGAAAAGTATGC RP CACTGCAACAATAAAGCCC
At3g42670	SAIL_1229_H10	PPT 20 µg/ml	

At3g54770	SALK_019552C	genotipado	LP TGCATGTAAGAGACCTTTCCG RP AACAAACAAAATCATCAAGCCG
At3g61890	GK-174E09.01	sulfadiazina 50 µg/ml	
At4g09990	SALK_084669C	genotipado	LP TGATGAGTCGGTAGGTATCGC RP CCTCGAGGAACACTAGCAATG
At4g12420	SALK_070056C	genotipado	LP GTGGATTCATGGAAGTCGTTT RP TGGTTAAAATTGTGGAATTTTGG
At4g26540 x At5g56040	SALK_053167 x SALK_037932	genotipado	LP TTTACAATCCCAACGCACTTC RP CGTGCAATTCGTTAGCTCTTC
At4g26890	SALK_071559C	genotipado	LP ACGGTTTGGTGTATCTTCACG RP TCGTTAGCACATAACCTAACGC
At4g34980	SALK_080446C	genotipado	LP AACATTGTTTCTCTCATTTTGC RP GGTTATTGCTTCTTTCTCCGG
At4g36380	SAIL_1157_E04	PPT 20 µg/ml	
At5g16900	SALK_113523C	genotipado	LP TGGAGGATCGTCATCGTTATC RP AGTGTTTTCCCAACAGGTTTC
At5g43890	SAIL_1273_E09	PPT 20 µg/ml	
At5g44020	SALK_071539C	genotipado	LP TTCCTTACCACAAGAGCAACG RP GAAGTTTCTTTGGGAAGTGG
At5g56040	SALK_037932	genotipado	LP TTCCAGTTCCGATCACGTTAG RP TCGATAACAACCAAATCTCCG

Tabla 2. Las 39 líneas de inserción de T-DNA en genes *cs-SKP2B*, conseguidas en la colección pública de NASC, se llevaron a homocigosis mediante genotipado por PCR o selección con antibiótico.

Para el genotipado por PCR, se obtuvo ADN genómico de una hoja de plantas de *Arabidopsis* de aproximadamente 4 semanas, creciendo en una mezcla de sustrato universal y vermiculita (proporción 3:1). El material fresco se recogió en un tubo *ependorf* conteniendo bolas de vidrio de 1 mm de diámetro y, después de congelarlo en N<sub>2</sub> líquido, se procesó en un molino agitador (SILAMAT 5s, Schaan, Principality of Liechtenstein) con el fin de que las bolas molieran la muestra. La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo el protocolo descrito por Bernatzky y Tanksley (1986). La PCR se llevó a cabo con el *kit* de Biotools y oligonucleótidos de Sigma-Aldrich según el procedimiento recomendado por la casa comercial. La electroforesis del producto de PCR, cargado con *loading buffer DNA* 10x, se realizó en geles de agarosa (PRONADISA) al 1 % en TBE 1x (89 mM Tris-HCl, 89 mM ácido bórico, 2mM EDTA), teñido con SYBR® Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) y usando un marcador de peso molecular (GeneRuler 1 Kb DNA Ladder, de Fermentas). El patrón de bandas se visualizó con el sistema de documentación de geles *Gel-Doc* (BIORAD).

Para la selección por antibiótico, las semillas estériles se sembraron en placas Petri redondas de 90 mm de diámetro, en posición horizontal, con medio MS ½

(Murashige & Skoog) suplementado con MES 0,05 %, sacarosa 1 %, Plant-agar al 0,7 % y los antibióticos (DUCHEFA) en la concentración final indicada.

### **Esterilización de semillas, siembra y condiciones de cultivo**

Las semillas silvestres (ecotipo *Columbia* o *Landsbreg erecta*, según correspondiera) y mutantes se esterilizaron en una solución de hipoclorito sódico al 50% durante 8 minutos y, posteriormente, se realizaron 3 lavados sucesivos con agua destilada estéril. Las semillas se estratificaron durante 48 horas a 4 °C en oscuridad y se sembraron en placas Petri cuadradas de 12 cm, sobre un medio de cultivo MS preparado con la mitad de concentración de sales (MS ½), suplementado con MES 0,05 %, sacarosa 1 % y Plant-agar 1 %, a pH 5.8 y esterilizado en el autoclave a 120°C durante 30 minutos. Las semillas se colocaron superficialmente en el medio de cultivo, disponiéndose separadas entre sí unos 10 mm y alineadas en la parte superior de cada placa. Todo este procedimiento se llevó a cabo en el interior de una cámara de flujo laminar. Las placas se sellaron con cinta quirúrgica (MILLIPORE) y se colocaron en posición vertical, en una cámara de germinación, para favorecer el crecimiento rectilíneo de las raíces principales. Las plantas crecieron en el interior de la cámara de germinación durante 10 días con 65 % de humedad relativa, iluminación con luz fluorescente blanca fría (75  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{seg}$ ) y fotoperiodo de día largo (ciclos de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad), y temperatura de 21/18 °C.

### **Medida de la longitud de la raíz principal**

A los 10 días después de la germinación, se tomaron imágenes digitales con una cámara fotográfica Canon, de las plantas a través de las placas Petri mostrando de forma nítida las raíces principales y las raíces laterales, a lo largo de toda su longitud. Un trozo de papel milimetrado colocado junto a las placas sirvió como escala de referencia. A partir de estas imágenes se midió la longitud de la raíz principal de más de 15 plantas silvestres y mutantes utilizando el *software* del *National Institutes of Health ImageJ 1.46a* (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), previo calibrado correspondiente mediante la escala de referencia. Las medidas de longitud se realizaron desde la base del hipocotilo hasta el extremo apical de la raíz principal. Estos experimentos se repitieron dos veces, obteniendo valores similares en cada uno. Se calculó la media

aritmética y la desviación promedio de los datos obtenidos mediante una hoja de cálculo Excel. Como análisis estadístico se realizó una prueba *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Recuento de las raíces laterales emergidas**

En plantas silvestres y mutantes de 10 días, intactas y creciendo sobre el medio de cultivo, se realizó el recuento del número total de raíces laterales emergidas a lo largo de la raíz principal, mediante una lupa binocular Olympus. El recuento se realizó desde la base del hipocotilo hasta el extremo apical de la raíz principal. Estos experimentos se repitieron dos veces, obteniendo valores similares en cada uno. Se calculó la media aritmética y la desviación promedio de los datos obtenidos de más de 15 plantas diferentes de cada genotipo, mediante una hoja de cálculo Excel. Como análisis estadístico se realizó una prueba *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Clarificación y montaje de las raíces**

Se cosechó el 50 % de las plantas silvestres y mutantes de 8 días. Tras eliminar la parte aérea, se clarificaron las raíces. Para la clarificación, las raíces se sumergieron en metanol acidificado durante 25 minutos a 55 °C. Posteriormente, se mantuvieron en NaOH al 7% en etanol de 60 % durante 15 minutos. A continuación, se hidrataron paulatinamente mediante tratamientos sucesivos de 15 minutos con etanol de 40, 20 y 10 %. Finalmente, se colocaron en glicerol acuoso al 50 %, donde permanecieron durante 30 minutos como mínimo. Todo este procedimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente. Después, las raíces se montaron en glicerol al 50 %, sobre portaobjetos y se cubrieron cuidadosamente con cubreobjetos evitando la formación de burbujas y el aplastamiento de la muestra, para su observación a microscopía óptica con contraste interdiferencial de Nomarski.

### **Recuento del número de primordios de raíz lateral en cada estadio de desarrollo**

Las raíces principales de plantas silvestres y mutantes de 8 días montadas en glicerol al 50 %, se observaron a microscopía óptica con contraste interdifereencial de Nomarski, con un microscopio Zeiss Axiophot. Con un objetivo de 40x planneofluar de Zeiss, se realizó el recuento del número de primordios de raíz lateral en cada estadio de desarrollo a lo largo de la raíz principal, según Malamy y Benfey (1997). El recuento se realizó desde el extremo apical hacia la zona basal de la raíz principal. Para el estudio se utilizaron los datos de 10 raíces diferentes de cada genotipo, calculando la proporción media de PRLs en cada estadio con respecto al número total mediante una hoja de cálculo Excel. Para el análisis estadístico, los estadios de desarrollo se agruparon en: I-III (estadios donde tienen lugar las divisiones iniciales y orientadas para formar los primordios); IV-V (estadios donde los PRLs adquieren identidad meristemática); VI-VII (estadios donde empieza la elongación celular en los PRLs); y VIII (estadio final donde los PRLs emergen de la raíz). Estos grupos se analizaron mediante una ANOVA.

### **Sincronización de la iniciación de PRLs mediante graviestimulación**

En plantas silvestres y mutantes de 3 días, creciendo verticalmente sobre medio MS  $\frac{1}{2}$ , se indujo la formación de PRLs mediante un estímulo gravitrópico de 90° (Péret *et al.*, 2012) (Figura 22). A las 30, 35 y 42 horas del estímulo, las plantas se cosecharon, clarificaron y montaron como se describió previamente. A microscopía óptica con contraste interdifereencial de Nomarski, con un objetivo de 40x, se analizó el estadio de desarrollo del PRL formado, sincrónicamente en todas las raíces, en el lado externo de la curvatura formada. Para el estudio se utilizaron los datos de 30 raíces diferentes de cada genotipo, calculando el porcentaje de plantas que presentaban un estadio de desarrollo de PRL determinado. El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA.

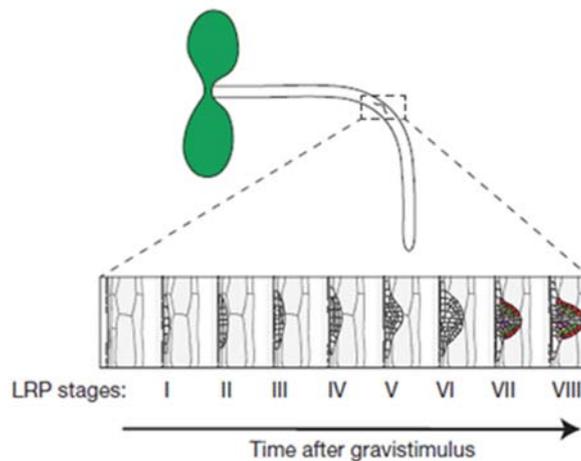


Figura 22. Sincronización de la iniciación de PRLs mediante un estímulo gravitrópico de 90 ° (Péret *et al.*, 2012).

### **Análisis fenotípico de las plantas *upb1-1* y *35S::UPB1-3xYFP***

Se analizó la longitud de la raíz principal de 60 plantas control, *upb1-1* y *35S::UPB1-3xYFP* (Tsukagoshi *et al.*, 2010), a partir de tres días después de la germinación y a intervalos de 24 horas, durante 10 días de crecimiento, el número total de raíces laterales emergidas y por milímetro de raíz principal a los 8 y 10 días, y la proporción de PRLs en cada estadio de desarrollo a lo largo de 12 raíces de 8 días, según lo descrito anteriormente.

### **Tratamiento inhibitorio de la actividad peroxidasa**

Para analizar el efecto de la inhibición de la actividad peroxidasa en la formación de las RLs, se crecieron plántulas *pSKP2B::GUS* en medio MS ½ durante 7 días (sección A) y se transfirieron a medio MS ½ con o sin KCN (100 µM) durante 4 días más (sección B). Posteriormente, se escindieron las raíces del tallo, se cortaron en dos secciones, A y B, y se tiñeron por separado para la actividad GUS. Se cuantificó el número de RLs y PRLs en ambas secciones.

### **Localización de ROS en el desarrollo de los PRLs**

Plántulas de *Arabidopsis* se crecieron durante 10 días en medio MS ½ con un fotoperiodo de 16 h. luz/8 h. oscuridad a 21/18 °C. La Diaminobencidina (DAB) se usó

para la detección de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tejidos de la raíz. Las moléculas de DAB oxidadas, presentan unos radicales libres que reaccionan entre sí para formar polímeros insolubles de color marrón. Se tiñeron las plántulas completas entre 4 y 6 horas con 1 mg/ml de DAB y 0,05 % Tween 20 en 20 mM de tampón fosfato a pH 7.4 y se cubrieron con papel de aluminio en agitación. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se visualizó con una coloración marrón-rojiza. Se aplicó un pre-tratamiento con 10 mM de KI durante 1 h. antes de la tinción con DAB y se usó como control. Para la visualización de superóxido, la raíces se tiñeron durante 1 h. en una solución 2 mM de nitroblue tetrazolium (NBT) en 20 mM de tampón fosfato a pH 6.1. Se aplicó un pre-tratamiento con 10 mM de propil galato durante 1 h. antes de la tinción con NBT y se usó como control. El color azul/violeta denota la presencia de superóxido. Las plántulas se lavaron según Malamy y Benfey (1997).

#### **Análisis fenotípico de las plantas *per2-1*, *per7-1* y *per57-1***

Se consiguieron líneas de inserción de T-DNA homocigotas en los genes *PER2*, *PER7* y *PER57* (At1g05250, At1g30870 y At5g17820, respectivamente), y se analizó la longitud de la raíz principal y el número total de raíces laterales emergidas y por milímetro de raíz principal de 60 plantas control, *per2-1*, *per7-1* y *per57-1* a los 8 y 10 días de crecimiento, y la proporción de PRLs en cada estadio de desarrollo a lo largo de 12 raíces de 8 días, según lo descrito en apartados anteriores.

#### **Análisis fenotípico de las plantas *ox-PER2* y *ox-PER7***

Las líneas sobre-expresoras de *PER2* y *PER7* inducibles por estradiol se consiguieron mediante el clonaje de las secuencias codificantes (CDS) en un vector *Gateway pER8* compatible (Zuo *et al.*, 2000), adaptado por Papdi *et al.*, (2008). Las líneas homocigotas T3 se seleccionaron con higromicina. Se cuantificó la longitud de la raíz principal, el número total y la densidad de raíces laterales emergidas en más de 60 plántulas control, *ox-PER2-2*, *ox-PER2-3*, *ox-PER7-4* y *ox-PER7-8* crecidas en medio MS ½ con o sin 10 µM de estradiol durante 10 días. Las diferentes líneas sobre-expresoras *PER2* o *PER7* se analizaron independientemente con sus respectivos controles.

### **Tratamiento con auxina de las plantas *per7-1*, *per57-1* y *ox-PER7***

Para analizar la formación de RLs en líneas mutantes *per* y sobre-expresoras, se crecieron plantas mutantes *per7-1* y *per57-1* en medio MS ½ durante 8 días (sección A) y se transfirieron a medio fresco MS ½ suplementado con o sin 10 nM o 50 nM de AIA durante 24 o 48 horas más. Las plantas *PER7* inducibles por estradiol se crecieron en medio MS ½ con 10 µM de estradiol durante 8 días y se transfirieron a medio MS ½ fresco con 10 µM de estradiol y 10 nM o 50 nM de AIA durante 24 o 48 horas más. Se cuantificaron las raíces laterales emergidas en la sección A solamente en el momento de la transferencia (0 horas) y a las 24 y 48 horas después de la transferencia.

## **BLOQUE II: ESTRATEGIA GENÉTICA**

### **Caracterización fenotípica de *srol1***

#### **Medida de la longitud de la raíz principal**

Se midió la longitud de la raíz principal de plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, a partir de un día después de la germinación y a intervalos de 24 horas, durante 10 días de crecimiento, según se ha descrito en apartados anteriores.

#### **Recuento de los primordios de raíz lateral y las raíces laterales emergidas**

Se realizó una tinción histoquímica para la actividad GUS, siguiendo el protocolo descrito por del Pozo *et al.*, (2006), en 40 plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* de 7 días. Las plantas teñidas e hidratadas se extendieron cuidadosamente sobre placas Petri cuadradas con MS ½ para facilitar el recuento de los PRLs y RLs emergidas por milímetro de raíz principal como se describió previamente.

### **Condiciones de cultivo en diferentes intensidades y calidades de luz**

Semillas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* estériles se sembraron en placas Petri cuadradas con MS ½, que se dispusieron en posición vertical bajo (75 µmol/m<sup>2</sup> x seg) o frontalmente (270 µmol/m<sup>2</sup> x seg) a tubos fluorescentes de luz blanca fría, bajo filtros coloreados (Rosco Ibérica E-colour+) que reducían la intensidad de la luz un 50, 20 y 5 % (filtros 209, 208 y 299 respectivamente), y bajo filtros coloreados azul, verde, amarillo y rojo (filtros 68, 89, 101 y 19, respectivamente) que reducían la intensidad de la luz un 85, 80, 25 y 65 % respectivamente, así como un papel opaco negro. Las plantas se crecieron durante 7, 8 o 10 días, según el experimento, se midió la longitud de la raíz principal y se realizó el recuento del número total de PRLs y RLs emergidas por milímetro de raíz en aquellas plantas que crecieron bajo los filtros coloreados azul, verde, amarillo, rojo y el papel negro, como se describió en apartados anteriores.

### **Método de cultivo *in vitro* en conos**

Semillas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* estériles se sembraron sobre un medio MS ½ suplementado con 0,5 % Plant-agar en un recipiente cónico de plástico transparente. Para mantener las condiciones de esterilidad, sobre este se colocó una tapa también de plástico transparente con forma cónica. Mediante este método de cultivo *in vitro*, el sistema radicular de las plántulas de *Arabidopsis* crece a través del medio y no superficialmente, y la parte aérea está expuesta a la luz, mientras la raíz puede mantenerse en oscuridad, reproduciendo más fielmente lo que sucede en la naturaleza. Para reproducir las condiciones de oscuridad, sobre el medio MS ½ se colocó un disco de aluminio opaco estéril con un pequeño orificio en el centro para colocar la semilla, y el recipiente cónico transparente se cubrió con una funda de plástico negro también de forma cónica (Figura 23).

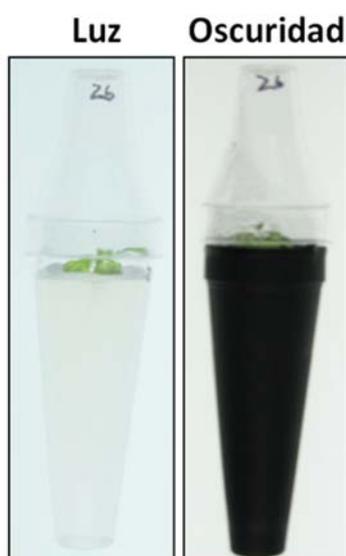


Figura 23. Imagen representativa del método de cultivo *in vitro* en conos.

### **Medida de la extensión del meristemo apical hasta la zona de transición**

Las raíces principales de plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* crecidas en condiciones de luz blanca y bajo un filtro de color amarillo durante 7 días, y montadas en glicerol al 50 %, se observaron a microscopía óptica con contraste interdiferencial de Nomarski. Con un microscopio Zeiss Axiophot equipado con una cámara digital DCF300FX de 1,4 Mpixels y el *software Leica Application Suite*, utilizando el objetivo de 20x, se obtuvieron imágenes de la extensión de las dos columnas de células de la corteza diametralmente opuestas en el meristemo apical, desde el centro quiescente hasta la zona de transición. La zona de transición se estableció al nivel de cada columna en el que las células de la corteza eran considerablemente más largas que las que las precedían distalmente (Dello Iorio *et al.*, 2007; Ubeda-Tomás *et al.*, 2009). Para calcular la extensión del meristemo apical, y utilizando el *software ImageJ*, se trazó una línea recta desde el centro quiescente, por el centro de la raíz principal, hasta las zonas de transición definidas para cada columna de células de la corteza, previo calibrado en micras mediante la escala de referencia proporcionada por el *software Leica*. Para el estudio se utilizaron 12 raíces diferentes de cada genotipo y condición de cultivo, calculando la media aritmética, la desviación promedio y la prueba *t-Student's*, con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009), mediante una hoja de cálculo Excel.

### **Recuento del número de células de la corteza en el meristemo apical**

Las raíces principales de plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* crecidas en condiciones de luz blanca y bajo un filtro de color amarillo durante 7 días, y montadas en glicerol al 50 %, se observaron a microscopía óptica con contraste interdiferencial de Nomarski. Con un objetivo de 40x, se realizó el recuento del número de células totales en las dos columnas de células de la corteza diametralmente opuestas en el meristemo apical, desde las células iniciales hasta la zona de transición. Para el estudio se utilizaron 12 raíces diferentes de cada genotipo y condición de cultivo, calculando la media aritmética, la desviación promedio y la prueba *t-Student's*, con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009), mediante una hoja de cálculo Excel.

### **Análisis de la actividad mitótica en el meristemo apical**

Se consiguieron plantas transgénicas con el promotor de la *CYCB1;1* fusionado al fragmento amino terminal de la *CYCB1* y al gen marcador *GUS* (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Esta línea *pCYCB1;1::CYCB1:GUS*, que permite detectar células en fase G2/M del ciclo celular, se cruzó (♂) con *srol1* (♀). Se crecieron plantas *pCYCB1;1::CYCB1:GUS* (control) y *srol1/pCYCB1;1::CYCB1:GUS* en condiciones de luz blanca y bajo un filtro de color amarillo durante 7 días. Se realizó una tinción histoquímica para la actividad *GUS* y las plantas se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía óptica con un microscopio Leica MD2000. Con un objetivo de 40x, se realizó el recuento del número total de puntos azules observados en el meristemo apical de la raíz principal de 12 plantas de cada genotipo y condición de cultivo y se calculó la media aritmética, la desviación promedio y la prueba *t-Student's*, con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009), mediante una hoja de cálculo Excel.

### **Secciones a microscopía confocal del meristemo apical**

Para analizar la longitud de las células de la corteza y epidermis en el meristemo apical, plantas vivas e intactas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, crecidas en condiciones de luz blanca durante 7 días, se tiñeron con una solución de 10 µl/ml de yoduro de propidio (SIGMA) en H<sub>2</sub>O, durante 20

segundos y se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía confocal con un microscopio confocal Leica SP8. Con un objetivo de 40x y el *software Leica Application Suite*, se obtuvieron secciones virtuales de 1,5 micras de grosor desde el centro de la raíz principal (a nivel del centro quiescente) hacia la epidermis de una mitad longitudinal del meristemo apical. Para el estudio se utilizaron 10 raíces diferentes de cada genotipo.

### **Medida de la longitud de 20 células de la corteza a partir de la zona de transición**

Las raíces principales de plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* crecidas en condiciones de luz blanca y bajo un filtro de color amarillo durante 7 días, y montadas en glicerol al 50 %, se observaron a microscopía óptica con contraste interdiferencial de Nomarski. Con un objetivo de 40x, se obtuvieron imágenes digitales de la zona de transición y de 20 células a partir de la misma en dos columnas de células de la corteza, diametralmente opuestas, de 12 raíces de cada genotipo y condición de cultivo. La longitud de cada célula se calculó midiendo la distancia entre el centro de las paredes transversales utilizando el *software ImageJ*, previo calibrado en micras mediante la escala de referencia proporcionada por el *software Leica*. Debido a que se manipularon raíces intactas, se tuvo sumo cuidado en excluir cualquier otra célula cortical de columnas adyacentes. Este es un punto importante en la metodología ya que la raíz principal de *Arabidopsis thaliana* posee un crecimiento helicoidal muy característico que se manifiesta en las columnas de células que la constituyen. Por ello se debe analizar cada columna de células de la corteza a lo largo de la zona de estudio variando el enfoque del objetivo. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló la media aritmética y la desviación promedio de la longitud de las células corticales localizadas en la misma posición con respecto a la zona de transición correspondiente. Como análisis estadístico se realizó la prueba *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Análisis fenotípico de mutantes de foto-receptores**

Se cruzaron los mutantes (♀) *cry1-104 (hy4-104)* (Lin *et al.*, 1996), *cry2-1* (Guo *et al.*, 1998), *cry1/cry2*, *phot1-5/phot2* (Jarillo *et al.*, 2001), *phyA-211* (Reed *et al.*, 1994) y *phyB9* (Reed *et al.*, 1993) con plantas *srol1/pSKP2B::GUS* (♂). La selección

de homocigotos se realizó mediante genotipado por PCR (Tabla 3). Se crecieron plantas *Col-0*, *cry1*, *cry2*, *cry1/cry2*, *phot1/phot2*, *phyA*, *phyB*, *srol1* (controles) y los dobles y triples mutantes generados en condiciones de luz blanca durante 10 días y se analizó la longitud de la raíz principal en 12 plantas de cada genotipo, como se describió previamente.

Mutante	Oligonucleótidos	
<i>cry1-104</i>	P1	GGGAGAGATGTCTTAGTATGCCTTATG
	P2	CCCCTCGAGCCCGGTTTGTGAAAGCCGTCT
<i>cry2-1</i>	P1	CATGGAACAACCTGGTTAGAGTGTGGA
	P2	ACGTGATCGCATCAACCTCAGTTGCAC
<i>phot1-5</i>	P1	TCCAATTGAACCTATGCGTGATCAGAAG
	P2	ACCGCTTCATCGATATTCACAGCTG
<i>phot2</i>	P1	ATGGAGAGGCCAAGAGCCCCTCCATCTCCTTTG
	P2	GCTAACTTCAACCTGCATCCTGCAGATGG
	P3	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
	P4	GCTTCTCCTTCTGGCGAGCTG
<i>phyA-211</i>	PA7	TTATCCACAGGGTTACAGGG
	PA12	GCATTCTCCTTGATCATCC
<i>phyB9</i>	P1	GTGGAAGAAGCTCGACCAGGCTTTG
	P2	GTGTCTGCGTTCTCAAACG

Tabla 3. Selección de homocigotos de los mutantes de foto-receptores mediante genotipado por PCR.

### **Visualización de marcadores de identidad celular en la raíz principal**

Se cruzaron plantas *srol1* (♀) con las líneas transgénicas (♂) J0121 (Laplaze *et al.*, 2005) y *pPLT2::PLT2:YFP* (Aida *et al.*, 2004). Plantas vivas e intactas control y *srol1*, crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días, se tiñeron con yoduro de propidio y se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía confocal. Con un objetivo de 40x, se obtuvieron imágenes digitales del meristemo apical o la zona madura (según correspondiera) de 10 raíces diferentes de cada genotipo.

## Caracterización molecular de *srol1*

### Análisis de la señalización y respuesta a auxina en el meristemo apical

Se cruzaron plantas *srol1* (♀) con líneas transgénicas (♂) de los marcadores de señalización HS::AXR3NT:GUS (Gray *et al.*, 2001) y DII-VENUS (Brunoud *et al.*, 2012), y respuesta a auxina *pDR5::GFP* (Blilou *et al.*, 2005).

Las plantas HS::AXR3NT:GUS (control) y *srol1*/HS::AXR3NT:GUS se crecieron en condiciones de luz blanca durante 7 días. Estas, en la placa de cultivo, se sometieron a un choque térmico de 37 °C durante 2 horas. Un tercio de las mismas se tiñó para la actividad GUS inmediatamente después del choque térmico. Otro tercio, se trató con 1 µM de AIA (disuelta en DMSO; DUCHEFA) en MS ½ líquido durante 30 minutos en agitación. Y el otro tercio, se mantuvo en MS ½ líquido con la cantidad de DMSO correspondiente (control) también durante 30 minutos en agitación. Transcurrido este tiempo, se realizó una tinción histoquímica para la actividad GUS en las plantas tratadas. En paralelo, se llevó a cabo dicha tinción en plantas sin haber recibido choque térmico alguno. Las plantas se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía óptica con un microscopio Leica MD2000 equipado con una cámara digital DCF300FX de 1,4 Mpixels y el *software Leica Application Suite*. Utilizando el objetivo de 20x se obtuvieron imágenes del meristemo apical y la zona de elongación de 12 raíces de cada genotipo y condición de tratamiento.

Las plantas DII-VENUS (control) y *srol1*/DII-VENUS se crecieron en condiciones de luz blanca durante 5 días. Un tercio de las mismas se trató con 1 µM de AIA en MS ½ líquido durante 30 minutos en agitación. Otro tercio, se mantuvo en MS ½ líquido con la cantidad de DMSO correspondiente (control) también durante 30 minutos en agitación. Y el otro tercio, no recibió tratamiento alguno. Las plantas se tiñeron con ioduro de propidio y se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía confocal. Con un objetivo de 40x, se obtuvieron imágenes digitales del meristemo apical de 10 raíces diferentes de cada genotipo y condición de tratamiento.

Y plantas vivas e intactas *pDR5::GFP* y *srol1/pDR5::GFP*, crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días, se tiñeron con ioduro de propidio y se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía confocal. Con un objetivo de 40x,

se obtuvieron imágenes digitales del meristemo apical de la raíz principal de 12 plantas diferentes de cada genotipo.

### **Visualización de marcadores del transporte de auxina en el meristemo apical**

Se cruzaron plantas *srol1* (♀) con líneas transgénicas (♂) de los marcadores de transportadores de auxina *AUX1::YFP* (Swarup *et al.*, 2004), *pPIN1::PIN1::GFP* (Benková *et al.*, 2003), *PIN2::GFP* (Xu y Scheres, 2005), *pPIN3::PIN3::GFP* (Zádníková *et al.*, 2010) y *pPIN4::PIN4::GFP* (Blilou *et al.*, 2005). Plantas vivas e intactas control y *srol1*, crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días, se tiñeron con yoduro de propidio y se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía confocal. Con un objetivo de 40x, se obtuvieron imágenes digitales del meristemo apical de la raíz principal de 10 plantas diferentes de cada genotipo.

### **Tratamientos hormonales**

Plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, germinadas en medio sin hormona, se trasplantaron a medios con diferentes concentraciones de hormona a los tres días después de la germinación. El medio sin hormona (control) se suplementó con la cantidad de disolvente correspondiente. Se marcó la posición del meristemo en ese momento y, cada 24 horas y durante los cuatro días siguientes al trasplante, se midió el incremento producido en la longitud de la raíz principal, con respecto al día anterior, en 20 plantas de cada genotipo y condición de cultivo. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz con respecto a las condiciones sin hormona, la desviación promedio y diferencias estadísticamente significativas entre el mutante y el control mediante la prueba *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en medio MS ½ suplementado con 0, 0´1, 1 y 5 µM de JA (DUCHEFA; disuelto en EtOH), en condiciones de luz blanca durante 8 días. El medio sin hormona se suplementó con la cantidad de EtOH correspondiente. Se midió la longitud de la raíz principal y se realizó el recuento del número total de PRLs y RLs emergidas por milímetro de raíz en 15 plantas de cada genotipo y concentración de hormona. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz principal con

respecto a las condiciones sin JA, la desviación promedio y la prueba *t-Student*'s con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Análisis transcriptómico en luz blanca/amarilla del control vs. *srol1***

Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en condiciones de luz blanca y bajo un filtro de color amarillo. Al octavo día después de la germinación y con un bisturí estéril, se separó cuidadosamente la parte aérea del sistema radicular. El material fresco de esta última fracción se recogió en tubos *ependorf* conteniendo bolas de vidrio y, después de congelarlo en N<sub>2</sub> líquido, se homogeneizó. El ARN se extrajo con TRIzol®. Tras 10 minutos a temperatura ambiente, se añadió cloroformo y se centrifugó durante 15 minutos a 4 °C. La fase soluble se traspasó a tubos nuevos, se precipitó el ARN con etanol al 70 % y se resuspendió en agua filtrada y autoclavada, libre de ADNasas/ARNasas. La determinación de las concentraciones de las soluciones de ARN, se realizó midiendo la absorción de las muestras a 260 nm en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA) y mediante *bioanalyzer* para comprobar su calidad e integridad. El ARN total extraído de tres réplicas independientes, se preparó para hibridaciones de *micro-array* individuales utilizando el *Nimblegen Array*. Para identificar genes expresados diferencialmente, se realizó un análisis estadístico de comparaciones múltiples y se calcularon los *valores q* según el método de Storey y Tibshirani (2003).

### **Dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivos *in vitro***

El dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivo *in vitro* (Modelo de utilidad Núm. 201300727) es un sistema de cultivo *in vitro*, en placas Petri cuadradas en posición vertical, que permite mantener la parte aérea de la planta expuesta a la luz y el sistema radicular, en oscuridad creciendo superficialmente sobre el medio. Consta de un cuerpo de metacrilato, prismático rectangular, abierto superiormente y con las paredes negras para impedir el paso de la luz a su interior, cuya embocadura es formal y dimensionalmente adecuada para recibir a la placa de cultivo; y un peine, materializado en un elemento laminar de metacrilato negro, de escaso grosor, de configuración esencialmente rectangular, que en sus extremos presenta dos

apéndices ortogonales para acoplarlo a la placa de cultivo y limitar, en lo posible, la luz que entra por la parte superior de la placa, dada la naturaleza transparente de la misma (Figura 24).

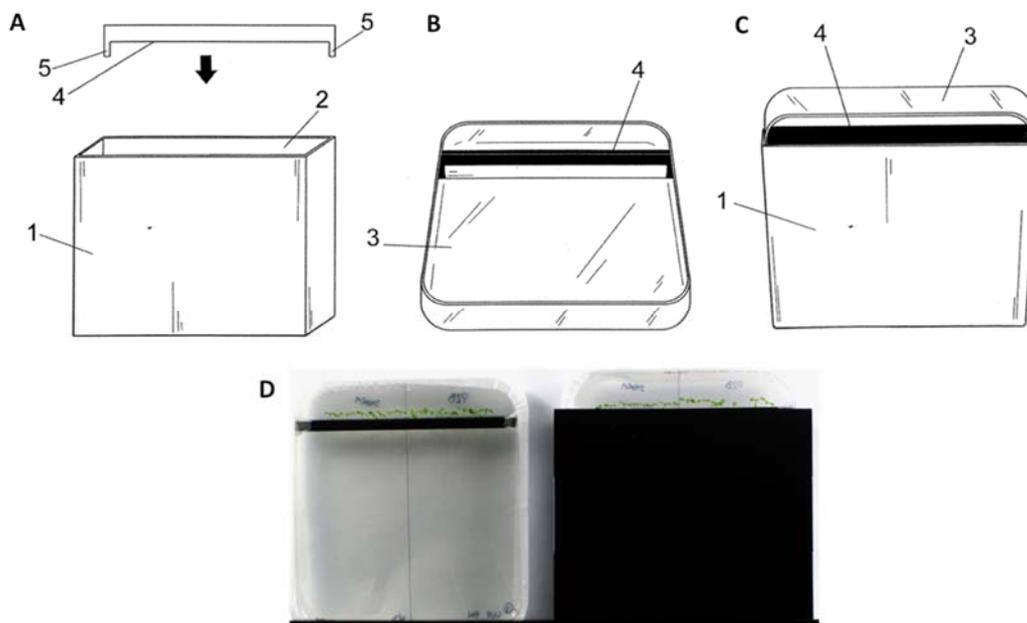


Figura 24. Dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivos *in vitro*. A) Representación esquemática en perspectiva del (1) cuerpo de metacrilato, prismático rectangular, abierto superiormente y con las paredes negras para impedir el paso de la luz a su interior, cuya embocadura (2) es formal y dimensionalmente adecuada para recibir a la placa de cultivo; y (4) del peine, materializado en un elemento laminar de metacrilato negro, de escaso grosor, de configuración esencialmente rectangular, que en sus extremos presenta dos apéndices ortogonales (5) para acoplarlo a la placa de cultivo y limitar, en lo posible, la luz que entra por la parte superior dada la naturaleza transparente de la misma, B) Representación esquemática en perspectiva de la placa de cultivo *in vitro* (3) con el peine acoplado (4). C) Representación esquemática en perspectiva del conjunto de las figuras A y B debidamente montado. D) Imagen representativa del dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivo *in vitro*. Modelo de utilidad Num.201300727.

### **Análisis de la producción de ROS en el meristemo apical y la zona de elongación**

Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en condiciones de luz blanca, bajo un filtro de color amarillo y en oscuridad utilizando el dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivos *in vitro*. Al quinto día después de la germinación y en la placa de cultivo, se añadió a cada meristemo apical una gota de 1  $\mu$ l de 0,24 mg/ml de 5[6]-CFDA (SIGMA) disuelto en H<sub>2</sub>O. En el caso de las plantas creciendo en luz amarilla u oscuridad, se tuvo especial cuidado en mantener dichas condiciones mientras se aplicaba el tratamiento. Las plantas continuaron creciendo en la cámara de germinación durante 2 horas. Al cabo de este tiempo, y mediante una

lupa binocular de fluorescencia Olympus equipada con una cámara DFC420C de 5 Mpxels y el *software Leica Application Suite*, se obtuvieron imágenes digitales a 8x del meristemo apical y la zona de elongación de la raíz principal de 12 plantas de cada genotipo y condición de cultivo. Con el *software LAS AF Lite* de Leica (<http://www.leica-microsystems.com>), se midió la intensidad de fluorescencia detectada en dichas imágenes y se calculó la media aritmética, la desviación promedio y la *t-Student's*, con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009), mediante una hoja de cálculo Excel.

### **Tratamiento con ácido ascórbico**

Plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, germinadas en medio sin antioxidante, se trasplantaron a 0 y 300  $\mu\text{M}$  de AsA (DUCHEFA; disuelto en  $\text{H}_2\text{O}$ ) a los tres días después de la germinación. Se marcó la posición del meristemo en ese momento y, cada 24 horas y durante los cuatro días siguientes al trasplante, se midió el incremento producido en la longitud de la raíz principal, con respecto al día anterior, en 20 plantas de cada genotipo y condición de cultivo. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz con respecto a las condiciones sin AsA.

Así mismo, se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en medio MS  $\frac{1}{2}$  suplementado con 0, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de AsA, en condiciones de luz blanca durante 7 días. Se midió la longitud de la raíz principal en 25 plantas de cada genotipo y tratamiento. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de crecimiento de la raíz principal con respecto a las condiciones sin antioxidante, la desviación promedio y la *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Tratamiento con manitol**

Plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, germinadas en medio MS  $\frac{1}{2}$ , se trasplantaron a MS  $\frac{1}{2}$  sin sacarosa suplementado con 0 o 50 g/l de Mtl (SIGMA) a los tres días después de la germinación. Se marcó la posición del meristemo en ese momento y, cada 24 horas y durante los cuatro días siguientes al trasplante, se midió el incremento producido en la longitud de la raíz principal, con

respecto al día anterior, en 20 plantas de cada genotipo y condición de cultivo. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz con respecto a las condiciones sin Mtl.

### **Tratamiento con cloruro de sodio**

Plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, germinadas en medio MS ½, se trasplantaron a 0 y 100 mM de NaCl (MERCK; disuelto en H<sub>2</sub>O) a los tres días después de la germinación. Se marcó la posición del meristemo en ese momento y, cada 24 horas y durante los cuatro días siguientes al trasplante, se midió el incremento producido en la longitud de la raíz principal, con respecto al día anterior, en 20 plantas de cada genotipo y condición de cultivo. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz con respecto a las condiciones sin NaCl.

### **Análisis del transporte floemático en la raíz principal**

Se cruzaron plantas *srol1* (♀) con la línea transgénica *pSUC2::GFP* (Imlau *et al.*, 1999) (♂). Plantas vivas e intactas *pSUC2::GFP* (control) y *srol1/pSUC2::GFP*, crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días, se tiñeron con yoduro de propidio y se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía confocal. Con un objetivo de 40x, se obtuvieron imágenes digitales a lo largo de la raíz principal hasta el meristemo apical en 10 plantas diferentes de cada genotipo.

Por otro lado, se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en condiciones de luz blanca. Al quinto día después de la germinación y en la placa de cultivo, se añadió una gota de 1 µl de CFDA en la cara abaxial de un cotiledón de las plántulas (Oparka *et al.*, 1994). Estas continuaron creciendo en la cámara de germinación y, mediante una lupa binocular de fluorescencia, se obtuvieron imágenes digitales a 8x y a intervalos de 15 minutos, hasta que la señal fluorescente se observó en el meristemo apical de la raíz principal de 12 plantas de cada genotipo. Con el *software ImageJ*, se midió la longitud de dichas raíces y, mediante una hoja de cálculo Excel, se calculó la media aritmética y la desviación promedio. Con estos datos se halló la velocidad de transporte floemático.

### **Visualización del citoesqueleto en células de la corteza de la zona madura**

Se cruzaron plantas *srol1* (♀) con las líneas transgénicas (♂) 35S::GFP-ABD2-GFP (Wang *et al.*, 2008) y GFP-MBD (Marc *et al.*, 1998).

Plantas vivas e intactas 35S::GFP-ABD2-GFP, GFP-MBD (controles), *srol1/35S::GFP-ABD2-GFP* y *srol1/GFP-MBD* crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días, se tiñeron con yoduro de propidio y se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía confocal. Con un objetivo de 40x, se obtuvieron imágenes digitales de las células de corteza a nivel de la zona madura de la raíz principal de 10 plantas diferentes de cada genotipo. Para visualizar los núcleos, las raíces se tiñeron con una solución de 10 µg/ml de DAPI (SIGMA) disuelto en H<sub>2</sub>O, durante 5 minutos.

### **Tratamiento con cloruro de hierro**

Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en medio MS ½ suplementado con 0, 4, 12, 20 y 40 mg/l de FeCl<sub>3</sub> (disuelto en H<sub>2</sub>O), en condiciones de luz blanca durante 8 días. Se midió la longitud de la raíz principal y se realizó el recuento del número total de PRLs y RLs emergidas por milímetro de raíz en 20 plantas de cada genotipo y tratamiento. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de crecimiento de la raíz principal con respecto a las condiciones control, la desviación promedio y la *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Tratamiento a diferente pH del medio de cultivo**

Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en medio MS ½ a pH 4.5, 5.8 y 7.0, en condiciones de luz blanca y bajo un filtro coloreado amarillo, durante 8 días. Se midió la longitud de la raíz principal de 12 plantas de cada genotipo, tratamiento y condición de cultivo. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de crecimiento de la raíz principal con respecto a las condiciones control, la desviación promedio y la *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Tratamiento de deficiencia de nitrógeno o fósforo**

Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en medio MS ½ con o sin nitrógeno o fósforo en condiciones de luz blanca durante 7 días. A partir de los tres días después de la germinación, a intervalos de 24 horas y durante los cuatro días siguientes, se midió la longitud de la raíz principal de 20 plantas de cada genotipo y tratamiento. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de inhibición experimentado cada día con respecto a las condiciones control, la desviación promedio y diferencias estadísticamente significativas entre el mutante y el control mediante la *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Análisis ionómico en luz/oscuridad del control vs. *srol1***

Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en condiciones de luz blanca y oscuridad, utilizando el dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivos *in vitro*. A los 12 días después de la germinación, se recolectaron las plantas completas de cada genotipo y condición de cultivo en tubos Falcon de 15 ml, teniendo especial cuidado en evitar cualquier presencia de agar. Las plantas se secaron a 65 °C durante 3 días, tras los cuales se obtuvieron 100 mg de peso seco de cada muestra (en cuatro réplicas independientes). Cada muestra independiente de material seco se digirió con 3 ml de HNO<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich Trace Metal Grade) a 100 °C al baño María durante 4 horas. Cada muestra se diluyó en 10 ml de agua 18 MW. Seguidamente, las muestras se analizaron mediante *Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry* (ICP-OES) en un Thermo Scientific iCAP 6500 utilizando las siguientes longitudes de onda para cada elemento: B, 208.9 nm; Ca, 184.0 nm; Ca, 317.9 nm; Cd, 228.8 nm; Cr, 206.1 nm; Cu, 324.7 nm; Fe, 240.4 nm; Fe, 259.9 nm; K, 766.4 nm; Mg, 279.0 nm; Mg, 285.2 nm; Mn, 293.9 nm; Mo, 203.8 nm; Na, 589.5 nm; Ni, 231.6 nm; P, 177.4 nm; P, 178.2 nm; S, 182.0 nm; Sr, 216.5 nm; Zn, 206.2 nm. Los datos del análisis, se normalizaron en mg/kg de peso seco y, mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje del contenido de trazas de los elementos analizados en las plantas *srol1* con respecto al control en ambas condiciones de cultivo; y en los dos genotipos con la raíz crecida en oscuridad con respecto a las condiciones de luz. Para el análisis estadístico se realizó la *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Análisis metabolómico en luz blanca/amarilla del control vs. *srol1***

Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en condiciones de luz blanca y bajo un filtro de color amarillo. Al octavo día después de la germinación y con un bisturí estéril, se separó cuidadosamente la parte aérea del sistema radicular, del que se eliminó cualquier resto de agar y se secó con papel de filtro. En tubos *ependorf*, se recogieron 50 mg de peso fresco de raíz de cada genotipo y condición de cultivo y se congeló en N<sub>2</sub> líquido. Los metabolitos se extrajeron con MeOH al 100 % + ácido fórmico al 0,1 %, reserpina y atropina. Tras incubar 1 hora a 70 °C, en continuo movimiento, se centrifugó durante 20 minutos a 13,2 r.p.m. y 4 °C. El sobrenadante se traspasó a viales de HPLC. La determinación de la concentración de metabolitos en las muestras se realizó mediante espectrometría de masas en el laboratorio del Dr. Stephan Pollmann (CBGP, UPM-INIA). Los datos obtenidos de diez réplicas independientes se analizaron con el *software* MetaboAnalyst 2.0 (<http://www.mybiosoftware.com/miscellaneous/10562>). Para el estudio de la naturaleza química del compuesto identificado se utilizó la aplicación *web* ChemSpider ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)).

### **Tratamiento con piridoxina**

Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* en medio MS ½ suplementado con 0 y 25 µg/ml de PN (disuelta en H<sub>2</sub>O y filtrada) en condiciones de luz blanca, bajo un filtro de color amarillo y en oscuridad, utilizando el dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivos *in vitro*. A los 8 días después de la germinación, se midió la longitud de la raíz principal de 20 plantas de cada genotipo, tratamiento y condición de cultivo. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz, con respecto al medio sin PN, en cada condición de crecimiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre el mutante y el control se analizaron mediante la *t-Student's* con una significación del 95% (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Tratamiento con auxina metilada**

Plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, germinadas en medio MS ½, se trasplantaron a 0, 0'1, 0'5 y 1 µM de MeAIA (SIGMA; disuelta en EtOH al

95% y filtrada) a los tres días después de la germinación. Se marcó la posición del meristemo en ese momento y, cada 24 horas y durante los cuatro días siguientes al trasplante, se midió el incremento producido en la longitud de la raíz principal, con respecto al día anterior, en 20 plantas de cada genotipo y condición de cultivo. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz con respecto a las condiciones sin MeAIA. El último día de tratamiento y mediante una lupa binocular de fluorescencia, se comprobó la presencia de cúmulos fluorescentes en el sistema radicular de las plantas *srol1*, en las diferentes concentraciones de MeAIA.

### **Tratamiento con PCIB**

Plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, germinadas en medio MS ½, se trasplantaron a 0, 10, 20 y 40 µM de PCIB (SIGMA; disuelto en DMSO y filtrado) a los tres días después de la germinación. Se marcó la posición del meristemo en ese momento y, cada 24 horas y durante los cuatro días siguientes al trasplante, se midió el incremento producido en la longitud de la raíz principal, con respecto al día anterior, en 20 plantas de cada genotipo y condición de cultivo. Mediante una hoja de cálculo Excel, se halló el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz con respecto a las condiciones sin PCIB. El último día de tratamiento, se comprobó la presencia de cúmulos fluorescentes en el sistema radicular de las plantas *srol1*, en las diferentes concentraciones de inhibidor.

### **Generación de injertos**

Se crecieron plantas transgénicas *pSUC2::GFP* y *srol1/pSUC2::GFP* (*scion* o donadoras de la parte aérea), *srol1* y silvestres *Col-0* (*stock* o donadoras del sistema radicular) en condiciones de luz blanca. A los cuatro días después de la germinación, se eligieron plántulas con el hipocotilo recto y largo, que se cortó rápida, limpia y oblicuamente con un bisturí estéril, con el agar como base, y usando una lupa binocular en el interior de una cámara de flujo laminar. El hipocotilo de la plántula *scion* se cortó en la base del mismo y el de la plántula *stock*, cerca del meristemo apical del tallo, por lo que tras el injerto, las plántulas presentaron un hipocotilo anormalmente más largo (Yin *et al.*, 2012). Seguidamente, la parte aérea de las plántulas

*pSUC2::GFP* o *srol1/pSUC2::GFP* se aproximó a la raíz de las plántulas silvestres o *srol1*, presionando cuidadosamente con unas pinzas estériles para asegurar que los sistemas vasculares de ambas partes quedasen perfectamente conectados. Los injertos continuaron creciendo en la cámara de germinación con una inclinación de la placa de cultivo de, aproximadamente, 45°. Transcurrida una semana, y mediante una lupa binocular de fluorescencia, se comprobó que la señal GFP hubiera alcanzado el meristemo apical de la raíz principal en los injertos.

### **Estudio morfológico del sistema radicular de los mutantes de genes identificados en el análisis transcriptómico de *srol1***

En diferentes colecciones públicas (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>), se consiguieron 24 líneas de inserción de T-DNA en genes identificados en el análisis transcriptómico de *srol1*, que se llevaron a homocigosis mediante genotipado por PCR o selección con antibiótico (Tabla 4).

Gen	Línea de T-DNA	Selección	Oligonucleótidos
At1g09080	GK-075D06	sulfadiazina 50 µg/ml	
At1g18830	SALK_049009	genotipado	LP TGGGGACTGCTGAAAATTATG RP TACAGAGAAAATCCGATCACGC
At1g60050	SALK_132616	genotipado	LP TCATGGAGCCAGACCTAAGTG RP CCGGATCATTCCCGTTTATAG
At1g68640	SALK_057190	genotipado	LP ACATCAACACGGCCAAGTAAC RP TCTCTCCTCACTCCCTCCTTC
At1g76780	SALK_082057	genotipado	LP CTTCCCCTTCTCCACATCTTC RP AGGCCAGGAGATTGAAGTACC
At2g16630	GK-660A11.01	sulfadiazina 50 µg/ml	
At2g24600	SAIL_1162_B01	PPT 20 µg/ml	
At2g24720	SAIL_667_F02	PPT 20 µg/ml	
At2g24850	SALK_108841	genotipado	LP TACCTGTTGGTGAACGAAAGG RP GCATGGCTAACTCTTACGCAC
At3g02730	GK-517E10.01	sulfadiazina 50 µg/ml	
At3g03660	SALK_004777	genotipado	LP TCAAAGCAATGGACCAAGAAC RP TTAGGCAATATTGGAAGCATG
At3g23250	SALK_151976	genotipado	LP GAAGATGGGGTTGAAGAGAGG RP CTAAGAGATCTTGTTCCCGC
At3g44860	SALK_119380	genotipado	LP CGAGTCACGGTCTTTGATTTC RP ATGCTCAACACCATGAAAACC
At3g44860	SALK_119380	genotipado	LP CGAGTCACGGTCTTTGATTTC RP ATGCTCAACACCATGAAAACC
At3g44870	GK-779G09	sulfadiazina 50 µg/ml	

At3g48740	SALK_073269	genotipado	LP CCGAAGAGTAATGTGACCACG RP TGAAGTGGGTGCTTTTGTTC
At3g55700	SALK_046282	genotipado	LP CTCAATCCATCTCCCTTCTCC RP TGGCTTGAAATTGATTGTAAGC
At4g21750	SALK_128172	genotipado	LP GATCCCTTATGGGTTTCAAGC RP CATCACCATTCTCTCCGCTAG
At4g36740	SALK_115125	genotipado	LP ATTTCTTCGAGCCTTGAGCTC RP CGACAAAACCCAAAATTCATG
At5g24240	SALK_048798	genotipado	LP AAAAGGCTCCACGAAGAAGCTC RP TCCATGACTGATTCTGTGATC
At5g39190	SALK_144510	genotipado	LP AACGAGGAGCTTTTCCAAGCTG RP TTTGCCATAATTGCTTTGGTC
At5g43840	SALK_045608	genotipado	LP AAAAGGTCAATCCAACGGTTC RP ACAACAGCTTCATTGTTGGG
At5g53190	GK-699D08	sulfadiazina 50 µg/ml	
At5g56860	SALK_001778	genotipado	LP TTTGATCTTGCACTTTTGGC RP GCCAAGATGTTTGTGGCTAAC

Tabla 4. Las 24 líneas de inserción de T-DNA en genes identificados en el análisis transcriptómico de *srol1*, se llevaron a homocigosis mediante genotipado por PCR o selección con antibiótico.

Se crecieron plantas silvestres *Col-0* y mutantes en condiciones de luz blanca durante 10 días. En 12 plantas de cada genotipo, se cuantificó la longitud de la raíz principal a los 3, 5, 7 y 10 días, las RLs emergidas a los 8 y 10 días y los diferentes estadios de desarrollo de los PRLs a los 8 días, que se analizaron independientemente mediante la *t-Student's* con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

Los mutantes de T-DNA (♀) se cruzaron con plantas *srol1/pSKP2B::GUS* (♂). La selección de homocigotos se realizó mediante genotipado por PCR o selección con antibiótico, según correspondiera. Se crecieron plantas *Col-0*, *srol1*, mutantes de T-DNA (controles) y los dobles mutantes generados en condiciones de luz blanca durante 8 días. En 12 plantas de cada genotipo, se cuantificó la longitud de la raíz principal a los 4, 6 y 8 días de crecimiento.

### **Mapeo posicional de *srol1***

#### **Secuenciación del genoma completo de *srol1***

Se extrajo el genómico de *srol1* con el E.Z.N.A.® *Plant DNA Kit* (OMEGA biotek), según el protocolo recomendado por la casa comercial, y se mandó a secuenciar

al *Beijing Genomics Institute* (BGI, China). El ADN se fragmentó en secciones de 100 pb y se generó una librería con adaptadores. Esta librería se secuenció masivamente y se apiló frente al genoma de referencia para identificar cambios en el mismo.

### **Secuenciación de los genes At2g40070 y At2g40095**

Sobre el genómico de plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, se amplificó, por PCR, la región que contenía la mutación puntual identificada por secuenciación masiva en los genes At2g40070 y At2g40095. La PCR se llevó a cabo con la DNA polimerasa Taq Gold® (ROCHE), según el protocolo recomendado por la casa comercial (Tabla 5).

Gen	Oligonucleótidos
At2g40070	P1 GTTATTGCTATGTGGGATGTTGCTC P2 ATCTAGCAGTTGAGGTAGTCGGC
At2g40095	P1 TAGATCCGCTGTTATACTCTGTG P2 ACGATGTGACCTATGGCTAAGAC

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la PCR para la amplificación de los genes At2g40070 y At2g40095.

El producto de PCR se purificó de gel de agarosa con el *kit GenElute™ Gel Extraction* (SIGMA), se cuantificó con un espectrofotómetro y se secuenció mediante el servicio de Secugen (<http://www.secugen.es/es/index.php>), según el procedimiento recomendado por la empresa. El resultado de la secuenciación se analizó utilizando las bases de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) y Phytozome (<http://www.phytozome.net/>), y los *software* Chromas ([http://technelysium.com.au/?page\\_id=13](http://technelysium.com.au/?page_id=13)), GeneRunner (<http://www.generunner.net/>) y BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>).

### **Análisis fenotípico de los mutantes de los genes At2g40070 y At2g40095**

Se consiguieron 6 líneas de inserción de T-DNA en los genes At2g40070 y At2g40095, que se llevaron a homocigosis mediante genotipado por PCR o selección con antibiótico (Tabla 6).

Gen	Línea de T-DNA	Localización	Selección	Oligonucleótidos
At2g40070	SALK_028501	exón	genotipado	LP ATCTTGACAGAGGTGTGGTGG RP CTTAAGTGCAGGCCGTTTAAG
	SALK_114501	exón	genotipado	LP ATATTTGGGTCCCACATTTTC RP GAATTTACGATTACATGATATGCG
	SALK_011272	intrón	genotipado	LP ATCTTGACAGAGGTGTGGTGG RP TTGGAACCCCTTTGTTTGTGAG
At2g40095	SALK_045616	300-UTR5'	genotipado	LP TCAGATGATGGAAGATCAGAGC RP TCGATAGTTTTGGTCCGTCAC
	SALK_122898	intrón	genotipado	LP TAAAAGCGAAGGAGTTGATGG RP TCACCAACTACGATTTCCGTC
	SAIL_870_A02	exón	PPT 20 µg/ml	

Tabla 6. Las 6 líneas de inserción de T-DNA en los genes At2g40070 y At2g40095, se llevaron a homocigosis mediante genotipado por PCR o selección con antibiótico.

Se crecieron plantas silvestres *Col-0* y mutantes en condiciones de luz blanca durante 10 días. Se cuantificó la longitud de la raíz principal en 15 plantas de cada genotipo.

### Generación de líneas transgénicas

Se diseñaron buenos oligonucleótidos utilizando el *software* Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) (Tabla 7).

Nombre	Posición	Oligonucleótido	Uso
2g40070Fw	Sentido	GGAGATAGAACCATGAATCGAAGTTTTAG GGCAA	RT-PCR
2g40070Rev	Antisentido	GAAAGCTGGGTCTCTCCCTTGTAAGCTTGC AGGGG	RT-PCR
2g40095Fw	Sentido	GGAGATAGAACCATGGGTTTTAGCAAAGA AGAGA	RT-PCR
2g40095Rev	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCTTTGAGTCTCTCTTG TTGTAAT	RT-PCR
50Gen2g40070Fw	Sentido	GGTTTGTCTGGGCTCGCAAGAAT	Amplificación genómico
50Gen2g40070Rev	Antisentido	CCACTGAGGCAGTTACTGCTGCT	Amplificación genómico
50Gen2g40095Fw	Sentido	CAAATCTGACCGTTGCTATCAC	Amplificación genómico
50Gen2g40095Rev	Antisentido	GTAACGTCCATAATGTCACTTCCC	Amplificación genómico
Gen2g40070Fw	Sentido	GGAGATAGAACCCAGTTATGTGATGGTGG TGACA	<i>Gateway</i> <sup>TM</sup> genómico
Gen2g40070Rev	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCTCTCCCTTGTAAGCT TGCAGG	<i>Gateway</i> <sup>TM</sup> genómico

Gen2g40095Fw	Sentido	GGAGATAGAACCCAGGTAAGAATAATCT GTCAC	Gateway™ genómico
Gen2g40095Rev	Antisentido	CCAGAAAGCTGGGTCTTTGAGTCTCTCTTG TTGTAATAAG	Gateway™ genómico
2g40095genattB1Fw	Sentido	GGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT ATGGGTTTTAGCAAAGAAGAG	attB genómico
2g40095genattB2Rev	Antisentido	GGGACCACCTTTGTACAAGAAAGCTGGGT GTTAAGATAAATAGATAATGA	attB genómico
2g40070sec1	Sentido	CTCCTCTCCAAACTTGTC	Secuenciación genómico
2g40070sec2	Sentido	CGAGTAAGTCGTGTTTCAATGG	Secuenciación genómico
2g40070sec3	Sentido	CCGTTGGGAGTAAATTGGAAGC	Secuenciación genómico
2g40070sec4	Sentido	GCAAGCGGTTTAAGTATTC	Secuenciación genómico
2g40070sec5	Sentido	GTTTTGAATCGCCACTACTAG	Secuenciación genómico
2g40070sec6	Sentido	GGTCTTCAAGGTCCACCAC	Secuenciación genómico
2g40070sec7	Sentido	GCGGAACTTGCTCCACCAG	Secuenciación genómico
2g40095sec1	Sentido	CGAGTCTCGGTTCAATTCCTCG	Secuenciación genómico
2g40095sec2	Sentido	GGAAGATCAGAGCATCTACC	Secuenciación genómico
2g40095sec3	Sentido	GCATCATCATCGCCGTCATCG	Secuenciación genómico
2g40095sec4	Sentido	CGAGAGGACCGTATCTGACA	Secuenciación genómico
2g40095sec5	Sentido	GACTCTACTTGGTGAGAAGG	Secuenciación genómico

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje de los genes At2g40070 y At2g40095.

Sobre el ARN purificado de plantas *Col-0*, se amplificó el ADN de la región codificante (CDS) de los genes At2g40070 y At2g40095 mediante el sistema de RT-PCR en un paso Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen), según el protocolo recomendado por la casa comercial. El producto de RT-PCR se purificó de gel de agarosa, se cuantificó con un espectrofotómetro y se utilizó como molde para la inserción de los sitios específicos de recombinación en el cromosoma de *E. coli* (attB, Weisberg y Landy, 1983), por PCR con la ADN polimerasa Taq Gold®. El producto de PCR se purificó de gel de agarosa, se cuantificó con un espectrofotómetro y se clonó en el vector *pDONR™221* (Invitrogen) mediante la reacción Gateway®BP con la mezcla de la enzima BP Clonasa™ II (Invitrogen), según el procedimiento recomendado por la casa comercial. Con el producto de la reacción BP, se transformó la cepa competente DH5α de *E. coli* que se creció en placas Petri redondas con medio

LB y el correspondiente antibiótico selectivo, a 37 °C durante 12 horas. Las células competentes se elaboraron según el protocolo de Sambrook *et al.*, (1989) y la transformación de células se realizó por el método de Birnboim y Doly (1979). Las colonias resistentes se crecieron en tubos de 10 ml con medio LB líquido y el correspondiente antibiótico selectivo, a 37 °C durante 12 horas en agitación. Se aisló el ADN plasmídico de las células mediante el *Plasmid Mini Kit I* (OMEGA BIO-TEK), según el protocolo recomendado por la casa comercial. El resultado de la extracción se comprobó por digestión mediante enzimas de restricción (ROCHE/FERMENTAS), según el procedimiento recomendado por la casa comercial, elegidas utilizando el *software* GeneRunner. El vector *pDONR<sup>TM</sup>221* con la región de interés clonada, se secuenció con los oligonucleótidos del servicio: F17 (sentido) y R19 (antisentido). Seguidamente, dicho fragmento se clonó en el vector de sobre-expresión *pGWB2* (Nakagawa *et al.*, 2007) mediante la reacción Gateway<sup>®</sup> LR con la mezcla de la enzima LR Clonasa<sup>™</sup> II (Invitrogen), según el protocolo recomendado por la casa comercial. Con el producto de la reacción LR, se transformó la cepa DH5 $\alpha$ , se aisló el ADN plasmídico, que se comprobó por digestión como se explicó previamente, y se transformó la cepa competente C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens*, que se creció en placas Petri redondas con medio LB y el correspondiente antibiótico selectivo, a 28°C durante 2-3 días. Las colonias resistentes se comprobaron por PCR con la ADN polimerasa de Biotools y los oligonucleótidos específicos, y se crecieron bien aireadas en matraces con medio LB líquido y el correspondiente antibiótico selectivo, a 28 °C durante 12 horas en agitación. La transformación de plantas silvestres *Col-0* y *srol1* se llevó a cabo mediante inmersión floral, según describieron del Pozo *et al.*, (2002). Se recolectaron las semillas de las plantas transformadas y se crecieron en placas Petri redondas de 150 mm de diámetro con MS ½ y el correspondiente antibiótico selectivo. Las plantas resistentes se crecieron en una mezcla de sustrato universal y vermiculita (proporción 3:1). Las semillas de la generación siguiente, de 30 líneas independientes, se crecieron en placas Petri redondas con MS ½ y el correspondiente antibiótico selectivo para comprobar la segregación. Las plantas homocigotas para el transgen se crecieron en placas Petri cuadradas con MS ½ para analizar su fenotipo.

Sobre los clones JAtYs T28M21.23 y 64I16 (<http://arabidopsislocalizome.org/>), se amplificó el genómico con 2 Kb de promotor de los genes At2g40070 y At2g40095, respectivamente, con la ADN polimerasa *High-Fidelity Phusion<sup>®</sup> Hot Start II* (FISHER), según el protocolo recomendado por la casa comercial. El producto PCR se utilizó como molde para la inserción de los sitios específicos del sistema Gateway<sup>®</sup> y attBs, y

se clonó en el vector *pDONR<sup>TM</sup>221* que se secuenció con el *primer* F17 y otros solapantes diseñados a cada 600 pb aproximadamente. Seguidamente, la región de interés se clonó en el vector de expresión *pGWB501* (Nakagawa *et al.*, 2007). Con esta construcción se transformaron plantas *srol1*.

### **Análisis fenotípico de los mutantes de otros genes candidatos para la mutación**

Se consiguieron 18 líneas de inserción de T-DNA en los genes identificados en el intervalo de mapeo de la mutación *srol1* (mediante el servicio de Metabolómica del CBGP, UPM-INIA), que se llevaron a homocigosis mediante genotipado por PCR o selección con antibiótico (Tabla 8).

Se crecieron plantas silvestres (ecotipo *Col-0* o *Wassilewskija* (*Ws-2*), según correspondiera), *srol1* y mutantes de T-DNA en condiciones de luz blanca durante 10 días. Se analizó el fenotipo a nivel del sistema radicular en 25 plantas de cada genotipo.

Gen	Línea de T-DNA	Selección	Oligonucleótidos
At2g39450	SALK_025271	genotipado	LP AATCTGCAATCCAAGTGTTC RP CTGCTCGAGTTTCACGGTAAC
At2g39770	SALK_082318	genotipado	LP GGAGAAGTTTGTGGAAAAGCC RP GCGAAATAATCGAACTCCCTC
	vitamin C		
	David Meinke		
At2g39790	SALK_069454	genotipado	LP TGACTATTTTGCAAACACACCC RP CTTGTGATTGACTCCGAGCTC
At2g39855	SALK_034384	genotipado	LP CTCTCGAAAACGCCATTTAG RP GCTAAGGGGGCAAGTTAATTG
At2g40190	SALK_106951	genotipado	LP TGCAGTAAGCAGGTTTTGAGG RP AACGGATTACACGGGTCTACC
At2g40410	SALK_011175	genotipado	LP CAAATAAATTCCATGCATGGG RP CTTCAGGCAAAGACACAGGAG
At2g40460	GK-051A04.01	sulfadiazina 50 µg/ml	
	GK-051A04.02	sulfadiazina 50 µg/ml	
	GK-051A04.03	sulfadiazina 50 µg/ml	
	GK-051A04.04	sulfadiazina 50 µg/ml	
	GK-051A04.05	sulfadiazina 50 µg/ml	
	GK-051A04.06	sulfadiazina 50 µg/ml	
	GK-051A04.07	sulfadiazina 50 µg/ml	

	GK-051A04.08	sulfadiazina 50 µg/ml	
At2g41560	SALK_029620	genotipado	LP AGGTTCAAGAGAGGGCAAGAGG RP CTCTTTCGCAACCTGCATATC
At2g41600	SALK_126477	genotipado	LP TTCAAAAAGCATACGATTTGGG RP ATTTTGCTTTGTGCTTGAACC

Tabla 8. Las 18 líneas de inserción de T-DNA en los genes identificados en el intervalo de mapeo de la mutación *srol1*, se llevaron a homocigosis mediante genotipado por PCR o selección con antibiótico.

### **Medida de los niveles de ácido ascórbico en la parte aérea**

Se recogieron hojas de, aproximadamente, 3-8 mm de longitud de plantas *pSKP2B::GUS* (control), *srol1/pSKP2B::GUS* y *vtc1-1*, que se extendieron en una lámina de papel de cromatografía Whatman 3030-6185 (DISMALAB). Cada hoja se aplastó sobre el papel de cromatografía con la parte curvada de una espátula de pesar de metal. Directamente sobre cada hoja aplastada, se pipetearon 10 µl de una solución acuosa de 1 mg/ml de NBT (SIGMA, St. Louis). En aproximadamente 5 minutos, se visualizó alrededor de cada hoja un precipitado púrpura-azulado, con una intensidad directamente proporcional a los niveles de AsA en la hoja (Conklin *et al.*, 1996).

### **Secuenciación del locus *VTC1* en el fondo *srol1***

Sobre el genómico de plantas *srol1/pSKP2B::GUS*, se amplificó, por PCR, el locus *VTC1*. El producto de PCR se secuenció mediante el servicio de Secugen, según el procedimiento recomendado por la empresa (Tabla 9).

Nombre	Oligonucleótido
At2g39770Fw	CCAATTTACAGCCATTTCCC
At2g39770Rev	GTGGATGCAACCGACACAA

Tabla 9. Oligonucleótidos utilizados en la PCR para la amplificación del locus *VTC1*.

### **Prueba de alelismo**

Se cruzaron plantas *vtc1-1* (♀) y *srol1/pSKP2B::GUS* (♂), creciendo en una mezcla de sustrato universal y vermiculita durante 4 semanas, aproximadamente. Se crecieron plantas *pSKP2B::GUS*, *srol1/pSKP2B::GUS*, *vtc1-1* (controles) y la progenie del cruce, en condiciones de luz blanca durante 10 días. El éxito del cruce se comprobó mediante una tinción histoquímica para la actividad GUS.

### **Secuenciación de la región codificante de LEW3 en el fondo srol1**

Sobre el ARN purificado de plantas *srol1*, se amplificó el ADN de la región codificante del gen *LEW3* mediante el sistema de RT-PCR en un paso (Tabla 10). El producto de RT-PCR se utilizó como molde para la inserción de los sitios attBs y se clonó en el vector *pDONR<sup>TM</sup>221*, que se secuenció con los oligonucleótidos del servicio.

Nombre	Posición	Oligonucleótido	Uso
LEW3Fw gw	Sentido	GGAGATAGAACCATGGCGATCTACTTCATT CT	RT-PCR
LEW3Rev gw	Antisentido	CCAGAAAAGCTGGGTCTTTAAGAGGACCTG TGAAAA	RT-PCR

Tabla 10. Oligonucleótidos utilizados para el clonaje del gen *LEW3*.

### **Detección e identificación de glicoproteínas en gel**

Se extrajeron las proteínas totales de material congelado de raíz de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca y oscuridad (utilizando el dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivos *in vitro*) y se separaron mediante SDS-PAGE (*SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*). La tinción del gel para la detección de glicoproteínas se realizó con *Pro-Q<sup>®</sup> Emerald 300 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit (P21857)* (Invitrogen), según el protocolo recomendado por la casa comercial. Las bandas se visualizaron usando un transiluminador UV (BioRad Fluor-S<sup>TM</sup>) a 300 nm con una cámara CCD incorporada. La identificación de la glicoproteína de la banda seleccionada se realizó mediante espectrometría de masas (MALDI-

TOF/TOF) en la unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM, Parque Científico de Madrid).

### **Crecimiento de plantas en presencia del hongo *Piriformospora indica***

El hongo *Piriformospora indica* se creció en un medio P.A. (fosfato de arginina). Se cortó un disco de hongo de, aproximadamente, 5 mm de diámetro que se colocó junto a las raíces de plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* crecidas en un medio MS ½ durante 5 días en condiciones de luz blanca. Como control, se crecieron plántulas en ausencia del hongo en las mismas condiciones. Al cabo de 15 días, se calculó el peso fresco medio de la parte aérea y las raíces de 15 plantas de cada genotipo y condición de cultivo, la desviación promedio y la prueba *t-Student's*, con una significación del 95 % (Ubeda-Tomás *et al.*, 2009).

### **Tinción de la membrana plasmática con el colorante FM® 4-64**

Plantas vivas e intactas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS*, crecidas, durante 7 días, en condiciones de luz blanca, bajo un filtro de color amarillo y en oscuridad utilizando el dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivo *in vitro*, se tiñeron con una solución de 4 µM del colorante FM® 4-64 (Invitrogen) en MS ½ líquido, durante 15, 30 y 60 minutos y se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía confocal. Con un objetivo de 40x, se obtuvieron imágenes digitales del meristemo apical y la zona de elongación de la raíz principal de 10 plantas de cada genotipo y condición de cultivo.

### **Digestión parcial de la pared celular en la raíz principal**

En la raíz principal de plantas vivas e intactas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1/pSKP2B::GUS* crecidas en condiciones de luz blanca durante 7 días, se digirió parcialmente la pared celular durante 10 y 20 minutos, según una adaptación del protocolo utilizado en el laboratorio del Dr. Tom Beeckman (descrito más adelante). Tras dicha digestión, las raíces se tiñeron con el colorante FM® 4-64 durante 15 minutos y se montaron en H<sub>2</sub>O para su observación a microscopía confocal. Con un

objetivo de 40x, se obtuvieron imágenes digitales de la epidermis a nivel de la zona madura de 10 raíces de cada genotipo.

### **Generación de líneas transgénicas *srol1* sobre-expresoras de *LEW3***

Sobre el ARN purificado de plantas *Col-0*, se amplificó el ADN de la región codificante del gen *LEW3* mediante el sistema de RT-PCR en un paso (Tabla 9). El producto de RT-PCR se utilizó como molde para la inserción de los sitios attBs y se clonó en el vector *pDONR<sup>TM</sup>221*, que se secuenció con los oligonucleótidos del servicio. Seguidamente, la región de interés se clonó en el vector de sobre-expresión *pGWB502 $\Omega$*  (Nakagawa *et al.*, 2007). Con esta construcción se transformaron plantas *srol1*.



## PROCOLOS

### Extracción de DNA genómico (Bernatzky y Tanksley, 1986)

Este protocolo es para una hoja

1. *Buffer* de extracción 316  $\mu$ l
2. *Buffer* de lisis 350  $\mu$ l
3. Sarcosyl (SIGMA) al 10 % 20  $\mu$ l
4. Calentar 30 min. a 60 °C. Mover de vez en cuando
5. Enfriar a temperatura ambiente (Ta)
6. 500  $\mu$ l de cloroformo (J.T.BAKER) y mover vigorosamente los tubos en la mano durante 15 seg.
7. Centrifugar a 8000 r.p.m. 10 min. a Ta
8. Transferir aproximadamente 600  $\mu$ l del sobrenadante, conteniendo el ADN, a un tubo nuevo
9. Añadir 0,7 volumen de isopropanol (BAKER) y mover
10. Centrifugar 15000 r.p.m. 15 min. a 4 °C
11. Eliminar el líquido y lavar el precipitado con EtOH (J.T.BAKER) al 70 %, libre de ARN y a -20 °C
12. Centrifugar 5 min. a 15000 r.p.m. y eliminar todo el EtOH
13. Secar el precipitado a Ta
14. Añadir 20  $\mu$ l de agua de ARNasa (SIGMA). Calentar 30 min. a 37 °C

#### *Buffer* de extracción

0,35 M sorbitol (SIGMA)

100 mM TRIS (DUCHEFA)

5 mM EDTA (ROCHE)

Ajustar el pH a 7,5 con HCl (J.T.BAKER) y autoclavar

#### *Buffer* de lisis

200 mM TRIS

50 mM EDTA

2 M NaCl (MERCK)

2 % CTAB (DUCHEFA)

### **Medio de cultivo para plantas**

Para 1000 ml de medio

- MS (Murashigue & Skoog) + vitaminas (DUCHEFA) 2,25 g
- Sacarosa (MERCK) 10 g
- Tampón MES (DUCHEFA) 0,25 g

Ajustar el pH a 5.8 con KOH (ROTH) 1 M

- Plant-agar (DUCHEFA) 10 g

Autoclavar durante 30 min. a 120 °C; 15 p.s.i.

### **Medio de cultivo para el tratamiento de deficiencia de nitrógeno y fósforo**

#### Medio control

Para 1000 ml de medio

- MS sin nitrógeno, fósforo y potasio (DUCHEFA) 0,305 g
- Tampón MES 0,25 g
- Sacarosa 10 g
- Vitaminas 500x 1 ml
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (DUCHEFA) 0,825 g
- $\text{KNO}_3$  (DUCHEFA) 0,95 g
- KCl (DUCHEFA) 0,625 mM

Ajustar el pH a 5.8 con KOH 1 M

- Plant-agar 10 g

Autoclavar durante 30 min. a 120 °C; 15 p.s.i.

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,625 mM

#### Medio sin fósforo

Para 1000 ml de medio

- MS sin nitrógeno, fósforo y potasio 0,305 g
- Tampón MES 0,25 g
- Sacarosa 10 g
- Vitaminas 500x 1 ml
- $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0,825 g

- $\text{KNO}_3$  0,95 g
- KCl 0,625 mM

Ajustar el pH a 5.8 con KOH 1 M

- Plant-agar 10 g

Autoclavar durante 30 min. a 120 °C; 15 p.s.i.

#### Medio sin nitrógeno

Para 1000 ml de medio

- MS sin nitrógeno, fósforo y potasio 0,305 g
- Tampón MES 0,25 g
- Sacarosa 10 g
- Vitaminas 500x 1 ml
- KCl 9,39 mM

Ajustar el pH a 5.8 con KOH 1 M

- Plant-agar 10 g

Autoclavar durante 30 min. a 120 °C; 15 p.s.i.

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,625 mM

#### **Medio de cultivo para bacterias**

Para 1000 ml de medio

- LB (Luria-Bertani) (DUCHEFA) 25 g

Ajustar el pH a 7.2 con KOH 1 M

- Agar bacteriológico (PRONADISA) 18 g

Autoclavar durante 30 min. a 120 °C; 15 p.s.i.

#### **Esterilización de semillas**

1. NaClO 50 % 8 min.
2. 3 lavados con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada estéril

### **Clarificación de plantas intactas**

1. Metanol acidificado 25 min. a 55 °C
2. NaOH (MERCK) al 7 % en EtOH de 60 % 15 min. a Ta
3. EtOH 40 % 15 min.
4. EtOH 20 % 15 min.
5. EtOH 10 % 15 min.
6. Glicerol (MERCK) acuoso al 50 % 30 min. mínimo
7. Montar en glicerol al 50 %

#### Metanol acidificado (50 ml)

- 2 ml HCl (concentrado 37 %)
- 10 ml metanol (BAKER)
- 38 ml H<sub>2</sub>O

### **Tinción histoquímica para la actividad GUS (del Pozo *et al.*, 2006)**

- Tampón GUS de 2 a 4 h. a 37 °C
- La reacción se detiene con EtOH al 95 % aproximadamente durante 2 horas
- Las muestras se hidratan con H<sub>2</sub>O al menos 1 hora antes de la observación

#### Tampón GUS

- 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (DUCHEFA) pH 7.0
- 40 nM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>
- 40 nM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>
- 0,004% de tritón X-100 (SIGMA)
- 5 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-glucurónico (X-Gluc) (DUCHEFA)

### **Digestión parcial de la pared celular (adaptación del protocolo del Dr. Beeckman)**

- Sumergir la plántula en la solución B durante 10-20 min. a Ta
- Montar en H<sub>2</sub>O

### Solución A

- 600 mM manitol
- 2 mM MgCl<sub>2</sub> (MERCK)
- 0,1 % BSA (SIGMA)
- 2 mM CaCl (DUCHEFA)
- 2 mM MES
- 10 mM KCl

pH 5.5 (con 1 M TRIS)

### Solución B

Solución A + 1,5 % celulasa (CALBIOCHEM) + 0,1 % pectoliasa (MP)

## **Purificación de ARN**

### Fase de separación

1. Incubar el lisado con TRIzol® Reagent (INVITROGEN) a Ta durante 10 min. para permitir la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas.
2. Añadir 0,1 ml de cloroformo por 1 ml de TRIzol® Reagent, cerrar los tubos bien y agitarlos vigorosamente en la mano durante 15 seg.

Nota: Remover con un vórtex la muestra puede incrementar la contaminación con DNA. Evitarlo si el ensayo es sensible a la presencia de ADN o realizar un paso de digestión con DNasa.

3. Incubar a Ta durante 2-3 min.
4. Centrifugar la muestra a 9000 x g durante 15 minutos a 4 °C.  
Después de la centrifugación, la mezcla se separa en un precipitado rojo de fenol-cloroformo, una fase intermedia y un sobrenadante coloreado conteniendo el ARN, el volumen del sobrenadante es de 600 µl aproximadamente.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
6. Añadir un volumen igual de EtOH al 70 % para obtener una concentración final de EtOH al 35 %.
7. Mezclar bien agitando con la mano o con un vórtex. Puede formarse algún precipitado disperso después de añadir el EtOH.

## Unión, lavado y elución

1. Transferir 700 µl de la muestra (incluyendo algún precipitado) a un Tubo de *Spin* (con el Tubo Colector)
2. Centrifugar a 12000 x g durante 15 seg. y Ta. Descartar el sobrenadante y volver a introducir el Tubo de *Spin* en el mismo Tubo Colector.  
*Nota:* Cuando se extraiga ARN de grandes cantidades de material, la muestra homogénea puede ser viscosa, requiriendo una centrifugación adicional (de 15 min.) para que la muestra pase completamente por la columna
3. Repetir los pasos 1-2 hasta que toda la muestra se haya procesado
4. Añadir 700 µl de *Wash Buffer I* al Tubo de *Spin*.
5. Centrifugar a 12000 x g durante 15 seg. a Ta. Descartar el sobrenadante y el Tubo Colector. Colocar el Tubo de *Spin* en un Tubo Colector nuevo.
6. Añadir 500 µl de *Wash Buffer II* con EtOH al Tubo de *Spin*.
7. Centrifugar a 12000 x g durante 15 seg. a Ta. Descartar el sobrenadante.
8. Repetir los pasos 6-7 una vez.
9. Centrifugar el Tubo de *Spin* a 12000 x g durante 1-2 min. para secar la membrana con el ARN unido. Descartar el Tubo Colector e introducir el Tubo de *Spin* en un Tubo de Recuperación.
10. Añadir 60 µl de agua libre de ARNasa en el centro del Tubo de *Spin*.
11. Incubar a Ta durante 1 min.
12. Centrifugar el Tubo de *Spin* durante 2 min. a  $\geq 12000$  x g a RT para eluir el ARN de la membrana en el Tubo de Recuperación.  
*Nota:* Si el ARN purificado es  $>100$  µg, realizar 3 eluciones consecutivas de 100 µl cada una. Coleccionar las eluciones en un único tubo.
13. Guardar el ARN purificado o proceder al ensayo.

## **Extracción de metabolitos**

1. Añadir 0,5 ml de MeOH al 100 % + ácido fórmico 0,1 % por 50 mg de tejido.
2. Añadir a cada muestra 30 µl de reserpina (600 ng/ml) y 10 µl de atropina (200 ng/ml).
3. Incubar durante 1 h. a 70 °C en constante movimiento en un *EppendorfThermoMixer*.
4. Centrifugar las muestras a 13,2 r.p.m. y 4 °C durante 20 min.
5. Transferir el sobrenadante a un tubo *ependorf* nuevo.

6. Centrifugar las muestras otra vez a 13,2 r.p.m. y 4 °C durante 20 min.
7. Transferir 250 µl del sobrenadante a un vial de HPLC.

#### Químicos requeridos

MeOH al 100 % + ácido fórmico al 0,1 % (LC-MS) SIGMA-ALDRICH (34671 FLUKA)

H<sub>2</sub>O + ácido fórmico al 0,1 % (LC-MS) SIGMA-ALDRICH (34673 FLUKA)

Acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1 % (LC-MS) SIGMA-ALDRICH (34668 FLUKA)

Reserpina (Estándar para LC-MS) SIGMA-ALDRICH (43530 FLUKA)

Atropina (Estándar analítico) SIGMA-ALDRICH (37019 FLUKA)

#### **Preparación de células de *E. coli* competentes (*Buffer Set*)**

Inocular 0,5 ml de un cultivo fresco de *E. coli*, creciendo durante toda la noche en medio LB, en 50 ml de SOB en un matraz de 500 ml. Agitar vigorosamente a una temperatura de 18-26 °C hasta que la OD<sub>600</sub> alcance 0,4-0,6.

1. Colocar el cultivo en hielo durante 10 min. y centrifugar las células a 3000 rpm en una centrifuga Beckman J-6B (o su equivalente) durante 6 min. a 0-4 °C
2. Eliminar el sobrenadante, resuspender las células cuidadosamente en 5 ml de 1x *Wash Buffer* helado y centrifugar como en el paso 1.
3. Eliminar completamente el sobrenadante y resuspender las células cuidadosamente en 5 ml de 1x *Competent Buffer* helado.
4. Alicuotar 200 µl de las células en tubos *eppendorf* estériles en hielo

En este paso, las células están preparadas para los experimentos de transformación o directamente se pueden guardar a -80 °C.

#### **Transformación de células de *E. coli* competentes (*Transformation Kit*)**

Colocar un tubo de células competentes frescas o congeladas en hielo.

1. Añadir 1-5 µl de DNA y mezclar cuidadosamente (intentar que el volumen de ADN sea inferior al 5 % del volumen de las células competentes).
2. Incubar en hielo durante 30 min., añadir 1 ml de medio LB líquido e incubar a 37 °C durante 50 min. en agitación.

3. Centrifugar a 6000 rpm durante 30 seg., eliminar un poco de medio, resuspender las células cuidadosamente y extender 100  $\mu$ l en una placa apropiada precalentada a 37 °C.

Incubar la placa a 37 °C o a la temperatura apropiada para que las colonias crezcan.

### **Preparación de células de *Agrobacterium tumefaciens* competentes**

1. Crecer 100  $\mu$ l de un cultivo fresco de *Agrobacterium* en 5 ml de medio LB con los antibióticos apropiados durante toda la noche a 28 °C.
2. Añadir 2 ml de este cultivo a 50 ml de medio LB y agitar a 28 °C hasta que la OD<sub>600</sub> sea de 0,5-1,0.
3. Enfriar el cultivo en hielo. Centrifugar las células en un tubo Falcon de 50 ml a 4000 rpm durante 5 min. a 4 °C.
4. Eliminar el sobrenadante. Resuspender las células en 1 ml de una solución 20 mM de CaCl<sub>2</sub> a 4 °C. Alicuotar 100  $\mu$ l en tubos *ependorf* pre-congelados. Congelar las células en nitrógeno líquido y guardar a -80 °C o continuar inmediatamente con el experimento de transformación.

### **Transformación de células de *Agrobacterium tumefaciens* competentes**

1. Añadir ~10  $\mu$ l de plásmido de ADN a las células.
2. Congelar las células en nitrógeno líquido.
3. Descongelar las células incubándolas a 37 °C durante 5 min. al baño María.
4. Añadir 1 ml de medio LB e incubar a 28 °C durante 2 h. en agitación.
5. Centrifugar durante 1 min. a 5000 rpm. Eliminar el sobrenadante y resuspender las células en el sobrenadante restante.
6. Plaquear las células en medio LB con los antibióticos apropiados. Incubar la placa a 28 °C durante 2-3 días.

### **PCR de comprobación de colonias**

1. En un *ependorf* con 20  $\mu$ l de agua de PCR, poner una muestra de colonia.
2. Pipetear para resuspender las células.

3. Hervir a 100 °C durante 10 min.
4. Centrifugar a poca velocidad para bajar el agua comprobando que no se forme *pellet*.
5. Poner en hielo inmediatamente.
6. Utilizar 2 µl para la PCR.

### **Transformación de plantas de *Arabidopsis* mediante inmersión floral**

1. Picar colonias de *Agrobacterium tumefaciens* y crecer en 200 ml de LB con los antibióticos apropiados a 28 °C durante 12 h. en agitación.
2. Centrifugar las bacterias durante 15 min. a 4000 rpm y 4 °C en un rotor JA10, y resuspender en una solución 5 % de sacarosa y 0,05 % de Silvet L-77 (LEHLE SEEDS).
3. Volcar las plantas de *Arabidopsis* floreciendo sobre la solución de *Agrobacterium* durante 5 min. Dejar secar sobre papel de filtro.
4. Tapar con un plástico transparente y dejar a Ta durante 12 horas. Destapar y regar.
5. Llevar a la cámara de cultivo hasta que la planta madure. Dejar sin regar para que se sequen las semillas.
6. Recolectar y seleccionar los transformantes.



## ***Resultados***



## RESULTADOS

### BLOQUE I: IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS GENES IMPLICADOS EN EL DESARROLLO DE LAS RAÍCES LATERALES. ESTRATEGIA DE SEPARACIÓN CELULAR Y GENÓMICA

#### Identificación y validación de nuevos genes expresados en el desarrollo de los primordios de raíces laterales.

Mediante una estrategia de separación celular específica (*cell sorting*), usando como herramienta la expresión de *SKP2B* (*pSKP2B::GFP*) (Figura 25), y el posterior análisis transcripcional por hibridación de una micro-matriz con sondas de ADN ordenadas (*micro-array*), se identificaron más de 600 genes que co-expresan con *SKP2B* en las células fundadoras del periciclo y durante los estadios iniciales de la formación de los primordios de RL, llamados genes “*cs-SKP2B*” (del inglés *cell sorting-SKP2B*) (Anexo Tabla I) (Tesis Doctoral Manzano, C., 2011; Manzano *et al.*, 2014).

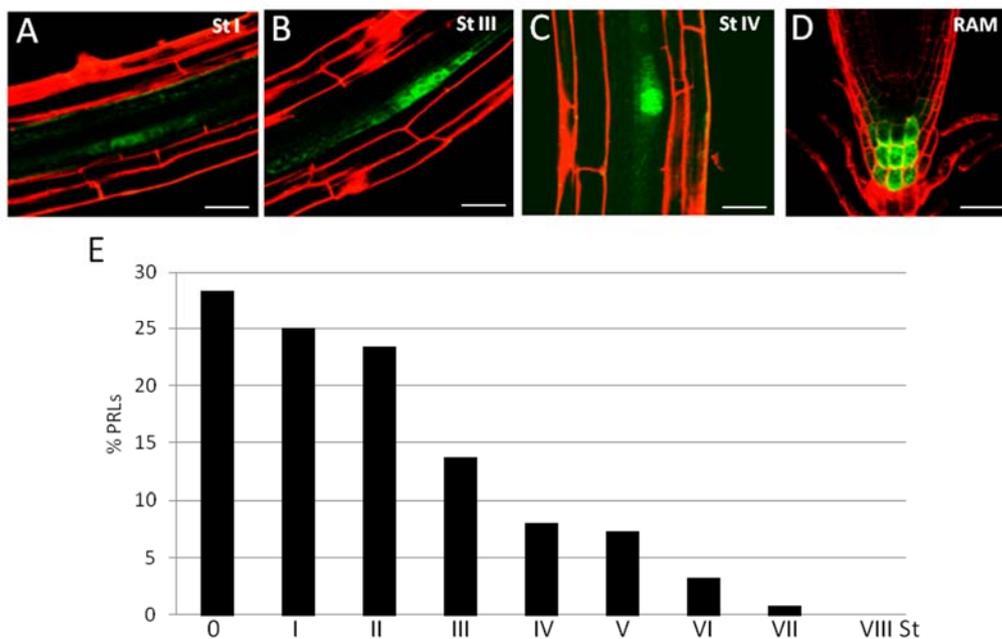


Figura 25. Expresión del marcador *pSKP2B::GFP*. A-D) Imágenes de microscopía confocal del marcador *pSKP2B::GFP* (verde) en las células fundadoras del periciclo y primordios de raíz lateral en diferentes estadios (St) de desarrollo (las

paredes celulares se muestran teñidas con ioduro de propidio, en rojo) (A-C) y en las células de la columela en el meristemo apical de la raíz (RAM) (D). Escala de las barras = 20  $\mu$ m. E) Porcentaje de estadios de primordios de raíz lateral (PRL), de acuerdo con Malamy y Benfey (1997) en plántulas de 5 días crecidas en condiciones similares que las plántulas usadas para el experimento de *cell sorting* (n>30). El estadio 0 corresponde a las células del periciclo que mostraron tinción GUS pero aún no se habían dividido (Manzano *et al.*, 2014).

Para validar que el grupo de genes *cs-SKP2B* estaba enriquecido con genes que se expresan en el periciclo, capa celular que origina las raíces laterales, y en los primordios, este grupo se comparó con los datos publicados previamente (usando *arrays* Affymetrix ATH1) relacionados con genes implicados en la especificación, la iniciación o la formación de RLs (Edgar *et al.*, 2002). En dos de estos grupos de datos se usaron células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema (J0121) (Brady *et al.*, 2007; De Smet *et al.*, 2008) o células iniciales de las raíces laterales (RM1000) (Brady *et al.*, 2007), mientras que en otros se usaron raíces enteras del sistema inducible de raíces laterales (LRIS) (Vanneste *et al.*, 2005). Además, también se comparó la lista de genes *cs-SKP2B* con los genes inducidos por Naxillin, un compuesto que, a diferencia del efecto de la auxina, promueve la formación de raíces laterales sin afectar al crecimiento de la raíz principal (De Rybel *et al.*, 2012). También se incluyeron dos grupos de genes que se expresaban en fase o en anti-fase con el marcador oscilante DR5:LUC (Moreno-Risueño *et al.*, 2010), ya que este grupo describió que los genes que oscilan en fase están implicados en el marcaje de las células fundadoras. Dependiendo del experimento, se encontró que el 76% o el 68% de los genes *cs-SKP2B* estaban representados en las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema, que son las células precursoras de RLs; y el 78% estaba presente en el grupo RM1000, que marca las células iniciales de raíces laterales (Tabla 11; Anexo Tabla IV). Por otro lado, usando el programa VisualRTC (Parizot *et al.*, 2010), se encontró que el grupo de genes *cs-SKP2B* contenía genes inducidos por auxinas, hormona promotora de la formación de las RLs (12,9%). Sorprendentemente, se encontró que un 18,9% de los genes *cs-SKP2B* son reprimidos por esta hormona, sugiriendo que el *cs-SKP2B* contiene un grupo de genes que posiblemente se asocie con la represión del desarrollo de los PRLs o con el mantenimiento de primordios en un estado quiescente (Anexo Figura 1). Además, un gran número de genes *cs-SKP2B* (118 genes) no estaban expresados en las células del periciclo marcadas en J0121 o RM1000 (Tabla 11). También se analizó la posibilidad de que estos genes estuvieran específicamente enriquecidos en otros tipos de tejidos (endodermis, corteza o epidermis) (Brady *et al.*, 2007). Mediante un análisis de solapamiento se encontró que 66 genes no estaban enriquecidos en estos tejidos radiales, indicando que estos

probablemente correspondan a genes que están “específicamente asociados a células expresando *SKP2B*” (SA-*SKP2B*) (Anexo Tabla V).

	Genotipo	Tipo celular	Tratamiento	Tiempo	Expresión	Total Nº genes	Genes comunes	Porcentaje (%)	Random (%)	p val
Grupo datos cs- <i>SKP2B</i>	SKP2Bp:GFP	células expresandoSKP	MS	5 d	presente	605				
Vanneste et al., 2005	wt	raíz completa	NPA/AIA	5 d/2 h	inducido	750	70	<b>10,00</b>	3,29	2,4399E-17
					reprimido	261	25	3,80	1,24	1,7605E-07
				5 d/6 h	inducido	1849	106	<b>16,00</b>	8,80	4,1405E-11
					reprimido	1463	124	<b>18,80</b>	6,90	1,4768E-25
	slr	raíz completa		5 d/2 h	inducido	508	61	9,20	2,40	1,5634E-20
					reprimido	227	22	3,30	1,08	7,4296E-07
				5 d/6 h	inducido	456	47	7,10	2,17	9,6032E-14
					reprimido	250	23	3,50	1,20	1,0319E-06
De Smet et al., 2008	J0121	cell sorting periciclo	NPA	5 d	presente	10099	501	<b>76,00</b>	48,29	5,993E-30
		cell sorting periciclo	NPA/AIA	5 d/2 h	inducido	1053	62	9,40	5,01	1,2187E-07
					reprimido	603	67	10,00	2,87	1,4887E-20
				5 d/6 h	inducido	1704	85	12,90	8,11	7,8625E-07
					reprimido	1666	125	<b>18,90</b>	7,93	2,7046E-21
		De Rybel et al. 2012	wt	raíz completa	NPA/Naxillir	3d/6h	inducido	401	79	<b>13,00</b>
NPA/Naxillir	3d/6h				reprimido	149	5	0,80	0,65	0,15457
Brady et al., 2007	RM1000	cell sorting PRL	MS	7 d	presente	12283	513	<b>77,80</b>	58,47	3,6506E-16
	J0121	cell sorting periciclo	MS	6 d	presente	12221	449	<b>68,00</b>	58,19	1,0603E-07
Moreno-Risueño et al., 2010	DR5::LUC	sobre RAM	MS	5 d	fase DR5	2084	41	6,20	9,92	0,00171517
		sobre RAM			antifase DR5	1409	38	6,40	6,18	0,05907853
Tsukagoshi et al., 2010	35::UPB1-GFP	región meristemo raíz	MS	6 d	inducido	2347	75	11,30	11,18	0,03263331
					reprimido	1805	176	<b>27,00</b>	8,59	3,2995E-43
		zona elongación raíz		6 d	inducido	790	13	2,00	3,76	1,1725E-20
					reprimido	906	79	<b>12,00</b>	4,31	1,8602E-32

Tabla 11. Comparación de los genes cs-*SKP2B* con otros datos de *micro-arrays* relacionados con la formación de raíces laterales, con la especificación de células fundadoras y con la expresión en el periciclo. El porcentaje en cada caso se calculó dividiendo el número de genes comunes con el grupo cs-*SKP2B* entre los datos del experimento en cuestión. Los valores *p-value* se calcularon usando la función Binomial.N. Los números en negrita resaltan las diferencias más significativas. MS, medio *Murashige and Skoog*; PRL, primordios de raíz lateral; RAM, meristemo apical de la raíz; *slr*, *solitary root*; NPA/AIA, tratamiento con NPA (ácido 1-N-Naftilftalámico) durante 5 días (d) y 2 o 6 horas (h) con AIA (ácido Indol-3-acético); NPA/Naxillir, tratamiento con NPA (ácido 1-N-Naftilftalámico) durante 3 días (d) y 6 horas (h) con Naxillir.

## Función de los genes cs-*SKP2B* en el desarrollo de los PRLs

El primer objetivo de este trabajo ha sido identificar nuevos genes implicados en el desarrollo de las raíces laterales, por ello se analizó la función que desempeñan los genes cs-*SKP2B*, que incluyen factores de transcripción, quinasas y genes

involucrados en la remodelación de la cromatina, señalización hormonal o respuesta a estrés en la formación de las RLs (Figura 26).

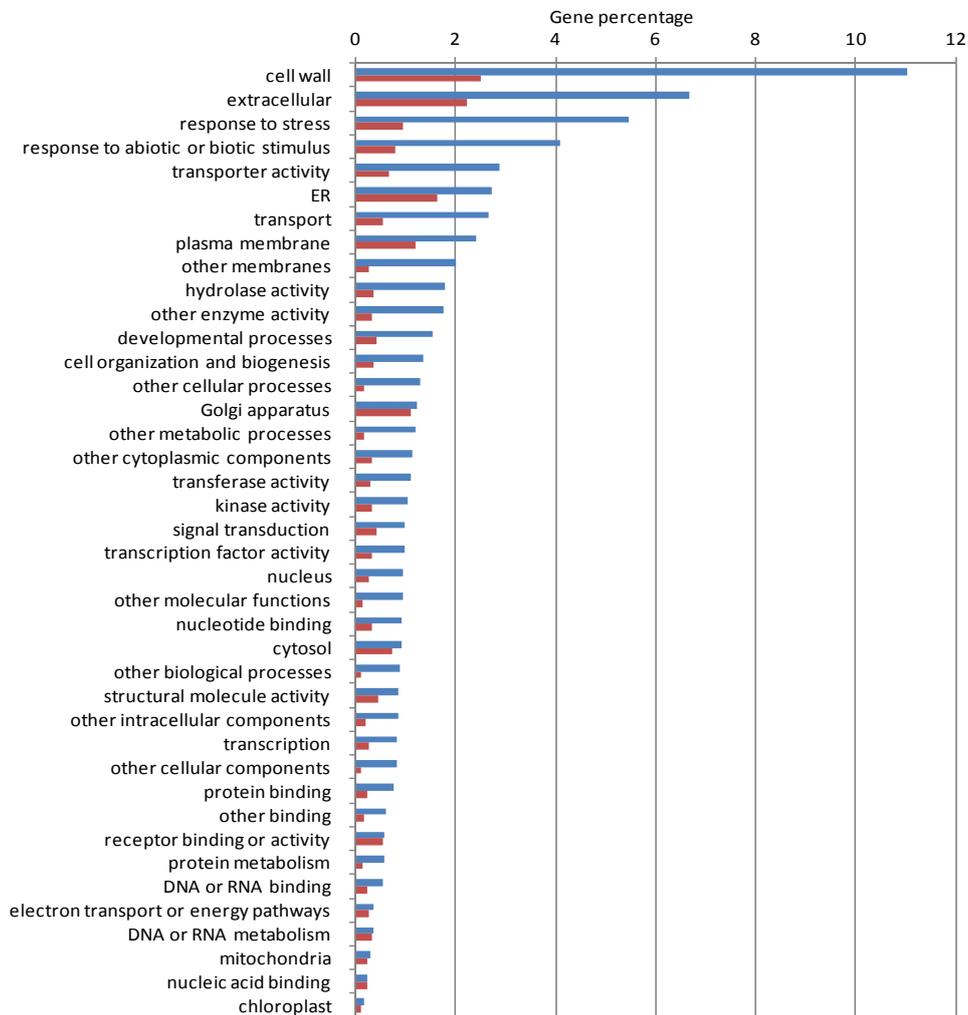


Figura 26. Porcentaje de genes clasificados por categorías funcionales. Azul: Porcentaje de genes encontrados en los cs-SKP2B. Rojo: Porcentaje de genes encontrados en el genoma de *Arabidopsis*. *Classification SuperViewer Tool w/ Bootstrap*. Toronto (Provar et al., 2003).

El análisis fenotípico de más de 35 líneas de inserción de T-DNA reveló que la mayoría de estos genes tienen funciones diferentes en el crecimiento de la raíz principal y/o el desarrollo de las RLs (Tabla 12).

AGI ID		Longitud de raíz (mm)	t-test1	RLs emergidas/mm	t-test2	Estudio estadíos PRLs	Presente en periciclo	Regulado por auxina
control 1		<b>34,41±3,37</b>		<b>0,087±0,029</b>		Sí		
	<i>FEZ</i>	<b>29,76±3,45</b>	0,003487	<b>0,102±0,032</b>	0,049281	Sí	NO	
At1g74500	<i>TMO7</i>	<b>26,34±2,13</b>	3,56E-07	0,073±0,024	0,2398724	Sí	Sí	inducido
control 2		<b>35,3±2,68</b>		<b>0,088±0,036</b>		Sí		
At3g61890	<i>ATHB12</i>	<b>28,4±1,85</b>	1,2738E-06	<b>0,011±0,006</b>	1,13E-05	Sí	Sí	reprimido
At3g42670	<i>CHR38</i>	<b>29,17±2,02</b>	5,1386E-05	<b>0,032±0,011</b>	0,0007398	Sí	Sí	inducido
At2g14960	<i>GH3.1</i>	<b>29,52±3,07</b>	9,4372E-05	<b>0,030±0,009</b>	0,0012735	Sí	Sí	inducido
At1g13420	<i>ST4B</i>	<b>31,16±2,15</b>	0,00228672	<b>0,041±0,017</b>	0,0055029	Sí	NO	
At3g03170	<i>Unknown</i>	<b>23,9±4,68</b>	8,9202E-08	<b>0,0376±0,01</b>	0,0079325		Sí	inducido
At4g36380	<i>ROT3</i>	<b>27,94±2,7</b>	2,4387E-06	<b>0,048±0,019</b>	0,0205045		Sí	
At1g62800	<i>ASP4</i>	<b>29,78±1,83</b>	3,5185E-05	<b>0,056±0,021</b>	0,0452885		Sí	reprimido
At2g16850	<i>PIP3B</i>	<b>29,87±3,19</b>	0,00042324	0,073±0,03	0,4019897		Sí	reprimido
At3g10780	<i>emp24</i>	<b>32,47±2,23</b>	0,02411448	0,077±0,019	0,473432		Sí	
At5g43890	<i>YUC5</i>	33,76±2,2	0,23258445	0,078±0,02	0,5444242		Sí	reprimido
control 3		<b>35,41±3,07</b>		<b>0,093±0,032</b>		Sí		
At1g10200	<i>GATA/WLIN1</i>	<b>27,86-3,35</b>	0,0034321	<b>0,022±0,008</b>	0,0012558	Sí	Sí	reprimido
At1g57560	<i>MYB50</i>	<b>37,89±3,27</b>	0,08045866	<b>0,046±0,023</b>	0,0049299		NO	inducido
At2g34070	<i>TBL37</i>	<b>40,93±3,22</b>	0,00125521	<b>0,129±0,034</b>	0,0489991		Sí	reprimido
At1g60010	<i>Unknown</i>	<b>42,59±2,89</b>	2,0611E-06	<b>0,13610,039</b>	0,0080971		Sí	inducido
At3g06035	<i>GPI-anchored</i>	<b>45,06±2,66</b>	2,9981E-07	<b>0,151±0,029</b>	0,0025145		Sí	reprimido
At5g44020	<i>HAD IIIB</i>	<b>39,65±5,61</b>	0,01316582	<b>0,124±0,031</b>	0,047023		Sí	reprimido
At5g56040	<i>LRR-Kinase</i>	<b>30,57±2,78</b>	0,00088064	<b>0,128±0,022</b>	0,0242053		Sí	inducido
At1g48630	<i>RACK1B</i>	<b>29,24±4,09</b>	0,00088943	<b>0,062±0,024</b>	0,017875		Sí	inducido
At3g19200	<i>Unknown</i>	<b>43,82±2,53</b>	7,5501E-07	0,102±0,045	0,6083854		Sí	inducido
At5g14750	<i>MYB66</i>	34,84±3,56	0,34056745	0,087±0,009	0,198798		NO	
At4g26890	<i>MAPKKK16</i>	38,59±4,91	0,05141523	0,121±0,06	0,1402085		Sí	
At5g16900	<i>LRR-kinase</i>	36,90±4,15	0,15403393	0,107±0,044	0,2633841		Sí	
At3g13530	<i>MAPKKK7</i>	34,78±4,31	0,87683704	0,096±0,032	0,6467743		Sí	
At4g12420	<i>SKU5</i>	37,71±2,75	0,9878534	0,117±0,038	0,2007416		Sí	
At4g09990	<i>Unknown</i>	36,38±2,84	0,45775026	0,074±0,032	0,2268636		NO	

Tabla 12. Función de los genes *cs-SKP2B* en el desarrollo de la raíz. Los mutantes de T-DNA se identificaron para genes seleccionados de los genes *cs-SKP2B*, y se crecieron en medio MS. Se cuantificaron el crecimiento de la raíz principal y las raíces laterales emergidas a los 10 días después de la germinación. Se analizaron en 3 grupos diferentes con sus respectivos controles. Los datos están presentados como media ± error estándar de la media (SEM). En negrita se indican diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's*,  $p < 0,05$  ( $n \geq 15$ ).

Se realizó un análisis detallado de la distribución de PRLs en varios de estos mutantes incluyendo *st4b-1* (*ST4B*, codifica una sulfotransferasa); *athb-12-5* (*ATHB-12*, codifica un factor de transcripción); *gh3.1-2* (*GH3.1*, codifica una pseudo-AIA-amido sintasa); *clsy1-5* (*CHR38/CLSY1*, codifica una proteína remodeladora de cromatina) y *wlim1-1* (*WLIM1*, codifica un miembro de la familia de proteínas de unión

a actina) (Figura 27). Todos ellos mostraron una acumulación de PRLs entre los estadios IV-V y una reducción en la emergencia de las RLs; excepto *gh3.1-2*, en el que la reducción de las RLs emergidas no fue estadísticamente significativa. Estos datos sugieren que dichos genes pueden tener una función en el desarrollo de las RLs en un punto crucial de su desarrollo ya que entre los estadios IV-V se rompe la banda de Caspary necesaria para la emergencia de las RLs.

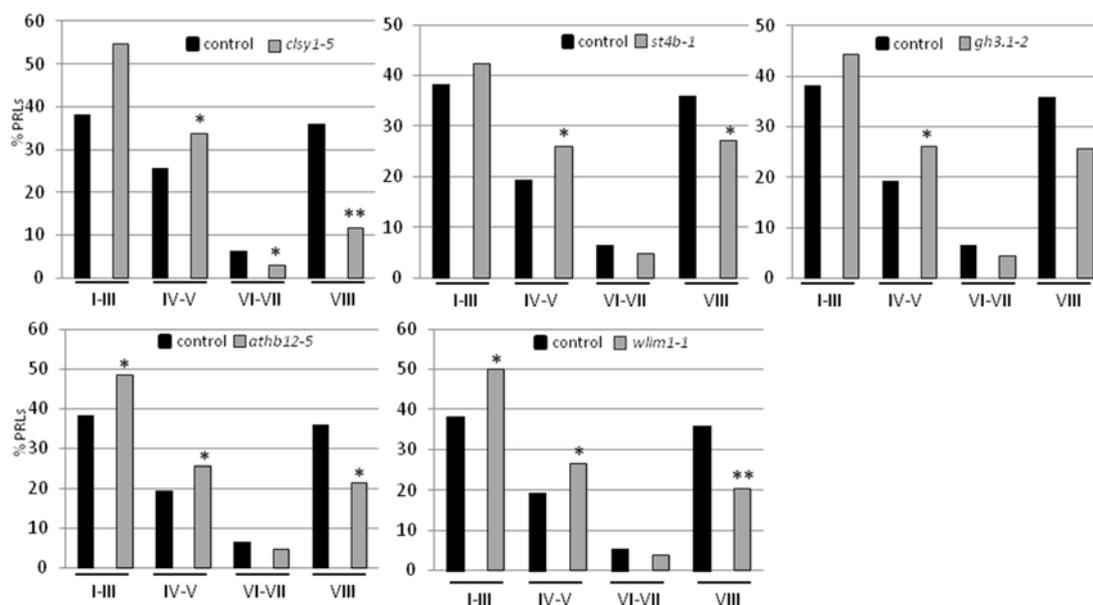


Figura 27. El desarrollo de los PRLs está afectado en los mutantes *cs-SKP2B*. Se cuantificaron los PRLs en los diferentes estadios de desarrollo en los mutantes de T-DNA seleccionados a partir de los genes *cs-SKP2B*. Las gráficas representan el porcentaje de estadios de PRLs en raíces de plántulas de 8 días crecidas en medio MS (n = 10). Las diferencias estadísticas entre los grupos de estadios de desarrollo de PRLs se analizaron mediante una ANOVA. Para estos análisis, los estadios de desarrollo de PRLs se agruparon de I a III, de IV a V, de VI a VII y VIII (ver Métodos) \*, ANOVA p < 0,05; \*\* p < 0,01.

Para estudiar las diferencias en las transiciones entre los estadios de desarrollo de los PRLs, se sincronizó la iniciación de PRLs mediante un protocolo basado en la graviestimulación de la raíz principal (Péret *et al.*, 2012), analizándose los estadios de PRLs a las 30, 35 y 42 horas después de la graviestimulación (hdg) (Figura 28). En las condiciones de estudio, a las 30 hdg, las raíces control presentaron fundamentalmente PRLs en los estadios III y IV. Los mutantes analizados mostraron un alto porcentaje de PRLs en estadio III y IV, y dos de ellos (*wlim1* y *clsy1-5*) mostraron también un alto porcentaje en el estadio V. Esto sugiere que la transición entre los primeros estadios de desarrollo de PRLs puede estar afectada. Más tarde, a las 35 hdg, la mayoría de los mutantes mostraron principalmente PRLs en el estadio V; y a las 42 hdg, todos los mutantes desarrollaron significativamente menos RLs emergidas (estadio VIII)

comparado con las plantas control (Figura 28). Todos estos resultados indican que mutaciones en estos genes afectan al desarrollo de los PRLs, confirmando la naturaleza y validez de los genes *cs-SKP2B* comentadas anteriormente.

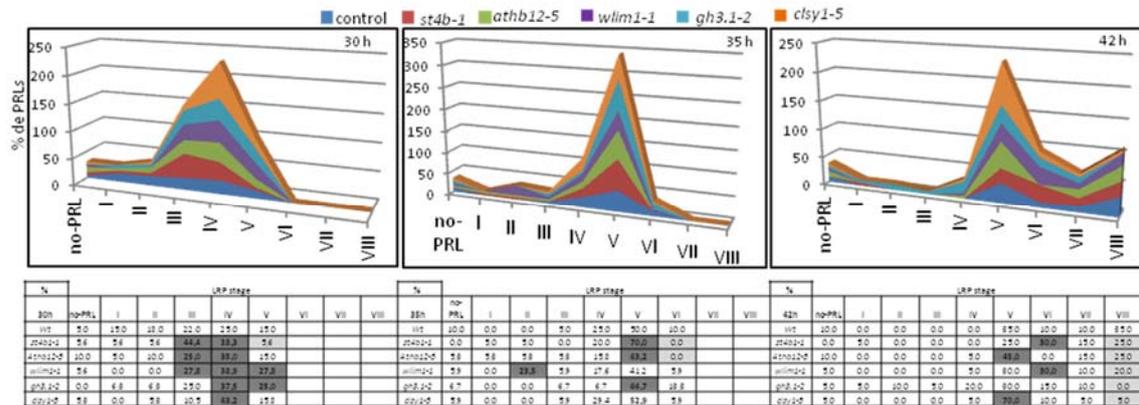


Figura 28. El desarrollo de los PRLs está afectado en los mutantes *cs-SKP2B*. Se indujo la formación de PRL mediante graviestimulación en raíces de plántulas control y mutantes de tres días y se observó el estadio de desarrollo del mismo a las 30, 35 o 42 horas después de la graviestimulación (n = 30). Las casillas en gris resaltan los casos en los que se encontraron diferencias estadísticamente significativas. ANOVA p < 0,01.

## La señalización redox controla el crecimiento de las raíces laterales

Un gran número de genes *cs-SKP2B* está relacionado con actividad redox (Anexo Tabla I). Entre ellos, *UPB1*, un factor de transcripción que regula la expresión de un grupo de genes *PEROXIDASAS* implicados en modular el balance de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) entre las zonas de división y elongación celular en la parte distal de la raíz (Tsukagoshi *et al.*, 2010). Además, un gran número de genes *cs-SKP2B* están reprimidos en la zona meristemática de plantas sobre-expresoras de *UPB1* (Anexo Tabla XIV) (Tsukagoshi *et al.*, 2010). Previamente se había mostrado que *UPB1* se expresaba en el meristemo principal de las raíces de *Arabidopsis*, pero se desconocía si se expresaba durante la formación de las raíces laterales (Tsukagoshi *et al.*, 2010). El análisis de plantas *pUPB1::GFP* mostró que el gen *UPB1* también se expresa en estadios tempranos de PRLs (estadios > III), aunque su expresión parece estar restringida a las células de la periferia del primordio (Figura 29A) y no se encontró ninguna expresión en los estadios I o II de PRLs formados mediante graviestimulación (no se muestran los resultados).

Por ello, se analizó la distribución de los estadios de desarrollo de PRLs en plantas control, *upb1-1* y plantas que sobreexpresan *UPB1* fusionado a 3 copias de la YFP (*Yellow Fluorescent Protein*; *UPB1-3xYFP*, Tsukagoshi *et al.*, 2010). Como previamente publicaron Tsukagoshi y colaboradores (2010), se encontró que las plantas con pérdida de función de *UPB1* presentaron unas raíces más largas que las plantas control (Figura 29B). La distribución o porcentaje de los estadios de desarrollo de PRLs fue similar en plantas control y *upb1-1* (Figura 29C), pero el mutante *upb1-1* desarrolló un mayor número de RLs emergidas que las plantas control (Figura 29C, E-F). En cambio, las raíces de plantas sobre-expresoras de *UPB1* acumularon significativamente un mayor número de PRLs en estadios IV-V, mientras que el número de RLs emergidas fue significativamente menor (Figura 29D-F). Estos resultados sugieren que la señalización mediada por *UPB1* es importante para controlar la emergencia de los PRLs.

### **La actividad PEROXIDASA controla la emergencia de las raíces laterales**

Entre los genes *cs-SKP2B* se encontró un gran número de genes *PEROXIDASA* (*PER*) (Anexo Tabla I). Varios de estos genes *PER* estaban significativamente reprimidos en plantas sobre-expresoras de *UPB1* (Anexo Tabla XIV). Por esta razón, este trabajo se centró en la función que desempeñan los genes *PER* durante el desarrollo de las raíces laterales. En primer lugar, se trataron plantas *pSKP2B::GUS* con cianuro de potasio (KCN), un potente inhibidor de la actividad peroxidasa (Figura 30A). El tratamiento con KCN redujo significativamente la emergencia de RLs (Figura 30B), mientras que el número de PRLs, contados tras la tinción histoquímica para la actividad GUS, fue similar (Figura 30C). Estos resultados apoyan la idea de que la actividad *PEROXIDASA* es importante para el desarrollo de las RLs, especialmente durante la emergencia de las mismas.

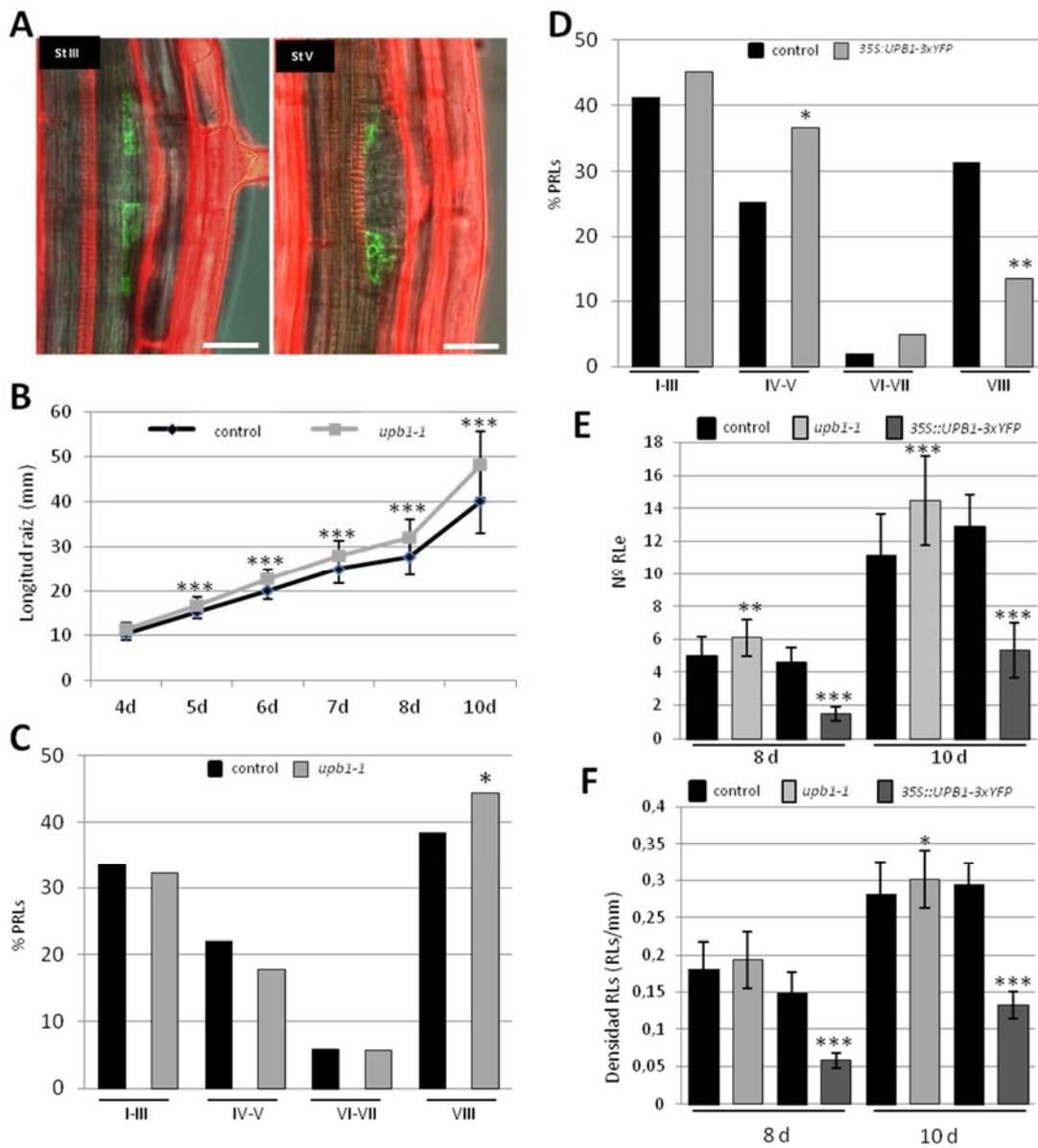


Figura 29. *UPB1* regula la emergencia de las RLs. A) *UPB1* se expresa en estadios tempranos del desarrollo de los PRLs. Imágenes de microscopía confocal de dos estadios diferentes de desarrollo de primordio de raíz lateral (PRL) en plantas *pUPB1::GFP* (verde) de 8 días. Barras = 25  $\mu$ m. B) Longitud de la raíz principal de plantas control y *upb1* en diferentes días después de la germinación. \*\*\*,  $p < 0,001$  por la prueba *t-Student's* ( $n = 60$ ). C) Porcentaje de estadios de desarrollo de PRLs en plantas control y *upb1*. Las diferencias estadísticas entre los grupos de estadios de desarrollo de PRLs se analizaron mediante una ANOVA. \*, ANOVA  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  ( $n = 12$ ). D) Porcentaje de estadios de desarrollo de PRLs en plantas control y sobre-expresoras de *UPB1* (35S::*UPB1-3xYFP*) ( $n = 12$ ). E) Número de raíces laterales emergidas (RLe) en plantas control, *upb1* y sobre-expresoras de *UPB1* de 8 y 10 días. F) Densidad de RLs (RLs/mm de raíz principal) en plantas control, *upb1* y 35S::*UPB1-3xYFP* de 8 y 10 días. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  por la prueba *t-Student's* ( $n = 60$ ).

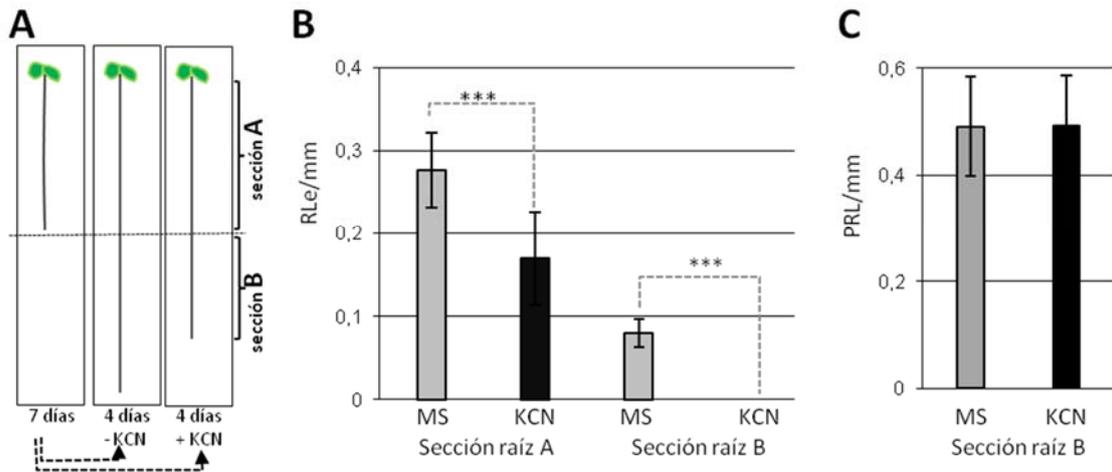


Figura 30. La inhibición de la actividad peroxidasa reduce la emergencia de las RLs pero no la especificación de los PRLs. A) Se crecieron plántulas *pSKP2B::GUS* en medio MS ½ durante 7 días (sección de raíz A) y se transfirieron a un medio MS ½ con o sin 100  $\mu$ M de KCN, un inhibidor de peroxidasa, durante 4 días más (sección de raíz B) y se tiñeron para la actividad GUS. B) Se cuantificaron las raíces laterales emergidas (RLe) a lo largo de las dos secciones de raíz diferentes. C) Se cuantificaron los primordios de raíz lateral (PRL) en la sección de raíz B para analizar el efecto del KCN en la especificación de los PRLs. \*\*\* $p < 0,001$  por la prueba *t-Student's* ( $n \geq 35$ ). Las barras de error representan DESVPROM.

La actividad peroxidasa promueve la oxidación de varios compuestos utilizando peróxidos, especialmente peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Para analizar la localización espacial de la actividad peroxidasa durante el desarrollo de las RLs, se tiñeron raíces con DAB (Diaminobenzidina) para visualizar  $H_2O_2$ . La tinción DAB se encontró desde los primeros estadios de desarrollo de los PRLs (estadio I) hasta la emergencia (Figura 31A), sugiriendo que el  $H_2O_2$  está involucrado a lo largo del desarrollo de las RLs. La acumulación de  $H_2O_2$  fue mayor durante los últimos estadios de desarrollo de las RLs y en las células de la epidermis que rodean al PRL que está emergiendo, que tienen que separarse para la emergencia del mismo. Como la señalización de ROS también implica superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) y se identificó la ATRBOHC NADPH oxidasa en el grupo de genes *cs-SKP2B*, se analizó la presencia de superóxido en los PRLs tiñendo con nitroblue tetrazolium (NBT). Al igual que el  $H_2O_2$ , el superóxido también se localizó en todos los estadios de desarrollo de los PRLs, con una acumulación mayor desde los estadios IV-V al estadio VII (Figura 31B).

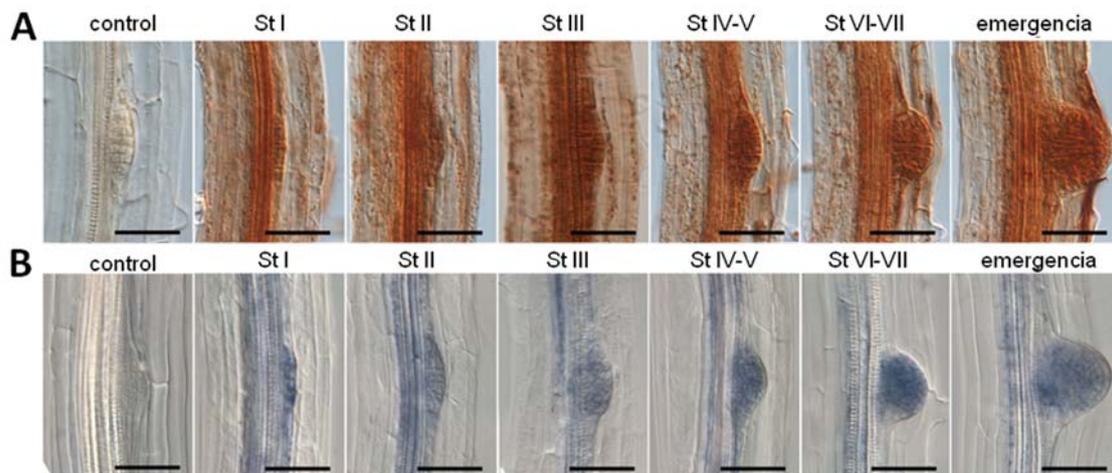


Figura 31. La señalización ROS-peroxidasa se necesita para el desarrollo de las raíces laterales. A) La tinción DAB indica la localización de  $H_2O_2$  en los PRLs de plántulas de *Arabidopsis*. Las imágenes muestran PRLs desde un estadio inicial de desarrollo hasta un primordio organizado creciendo a través de los tejidos corticales de la raíz principal (StI - emergencia) y un PRL joven (control) pre-tratado durante 1 h. con 10 mM KI antes de la tinción DAB (Barras de escala=1 mm). B) La tinción NBT indica la presencia de superóxido en PRLs de plántulas de *Arabidopsis*. Las imágenes muestran los estadios de desarrollo de la formación de PRLs teñidos con NBT (StI - emergencia) y una raíz control pre-tratada durante 1 h. con 10 mM propilgalato antes de la tinción NBT (control) (Barras de escala = 1 mm).

Habiendo establecido una función para ROS durante el desarrollo de las RLs, se analizaron líneas de inserción para los genes *PER2*, *PER7* y *PER57*, que se identificaron entre los genes *cs-SKP2B*. Los mutantes *per7-1* y *per57-1* presentaron raíces principales significativamente más cortas con respecto al control (Figura 32A y B), mientras que el mutante *per2-1* desarrolló una raíz principal ligeramente más larga que el control (Figura 32C). Además, el número total y la densidad de raíces laterales emergidas fue significativamente menor comparado con el control, tanto en el mutante *per7-1* como en el mutante *per57-1* (Figura 32A y B). Dado que estos mutantes presentaron defectos de RLs, se caracterizó en profundidad el desarrollo de PRLs. El mutante *per7-1* mostró diferencias estadísticamente significativas en las transiciones de estadios de desarrollo de PRLs, presentando menos PRLs en estadios tempranos (I-II) y también en estadio VIII comparado con el control (Figura 32D), pero acumuló un mayor número de primordios en estadios IV-V. El mutante *per57-1* también desarrolló menos PRLs en estadios tempranos, pero el número de PRLs completamente formados (estadio VIII) fue similar a las plantas control (Figura 32E).

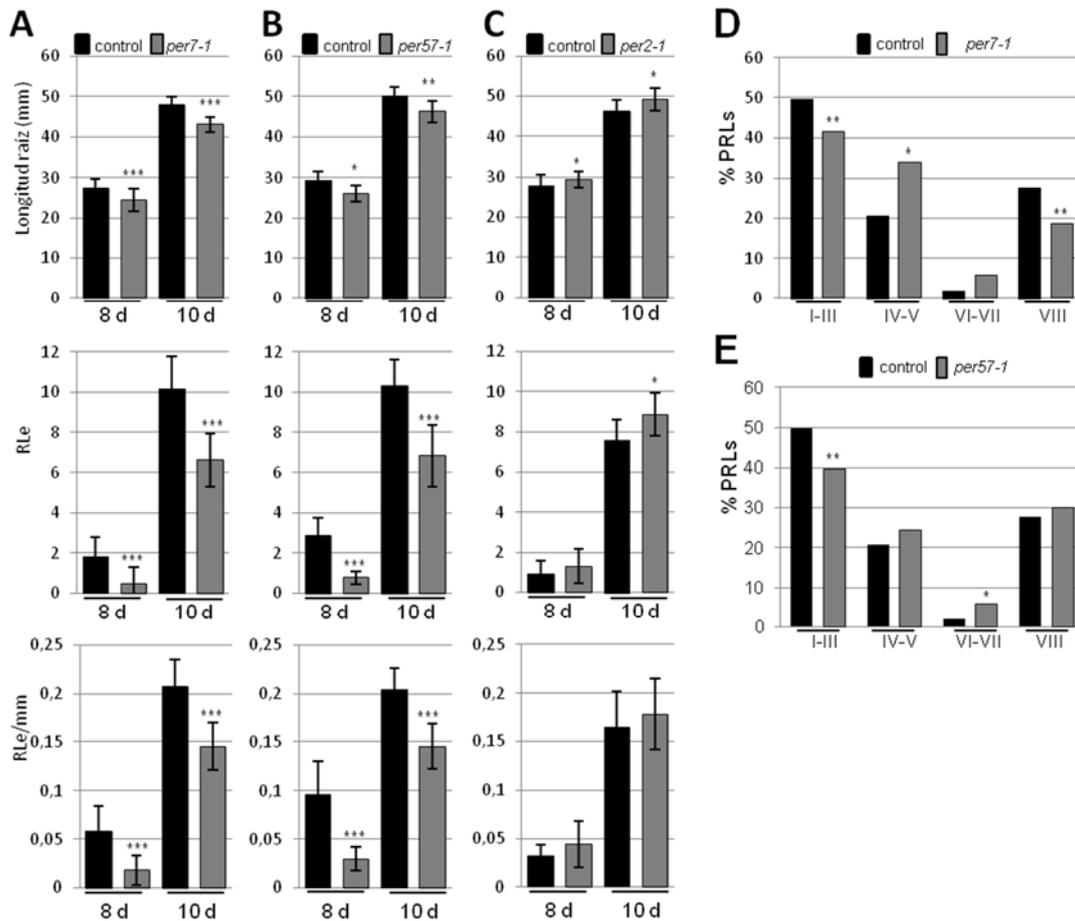


Figura 32. La pérdida de función de determinadas peroxidasas reduce la emergencia de RLs. Se cuantificó la longitud de la raíz principal (mm), el número total (RLe) y la densidad de raíces laterales emergidas (RLe/mm) en tres mutantes de genes de peroxidasas, *PER7* (A) *PER57* (B) y *PER2* (C). Se analizó cada mutante independientemente con su correspondiente control. Las medidas se realizaron a los 8 y 10 días después de la germinación. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$  por la prueba *t-Student's* ( $n \geq 60$ ). D) Porcentaje de estadios de desarrollo de PRLs en plantas control y *per7-1* de 8 días. E) Porcentaje de estadios de desarrollo de PRLs en plantas control y *per57-1* de 8 días. Las diferencias estadísticas entre los grupos de estadios de desarrollo de PRLs se analizaron mediante una ANOVA. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$  ( $n = 12$ ).

Por otro lado, también se quiso analizar el efecto de la ganancia de función de estas peroxidasas y, para ello, se generaron plantas transgénicas que sobre-expresaban *PER2* o *PER7* mediante un promotor inducible. La sobre-expresión de *PER2* no afectó a la longitud de la raíz principal pero redujo significativamente el número y la densidad de RLs emergidas (Figura 33A). Por otro lado, la sobre-expresión de *PER7* incrementó significativamente el número y la densidad de RLs emergidas (Figura 33B). Estos resultados sugieren que solo determinadas enzimas con actividad peroxidasa son capaces de promover la emergencia de los PRLs.

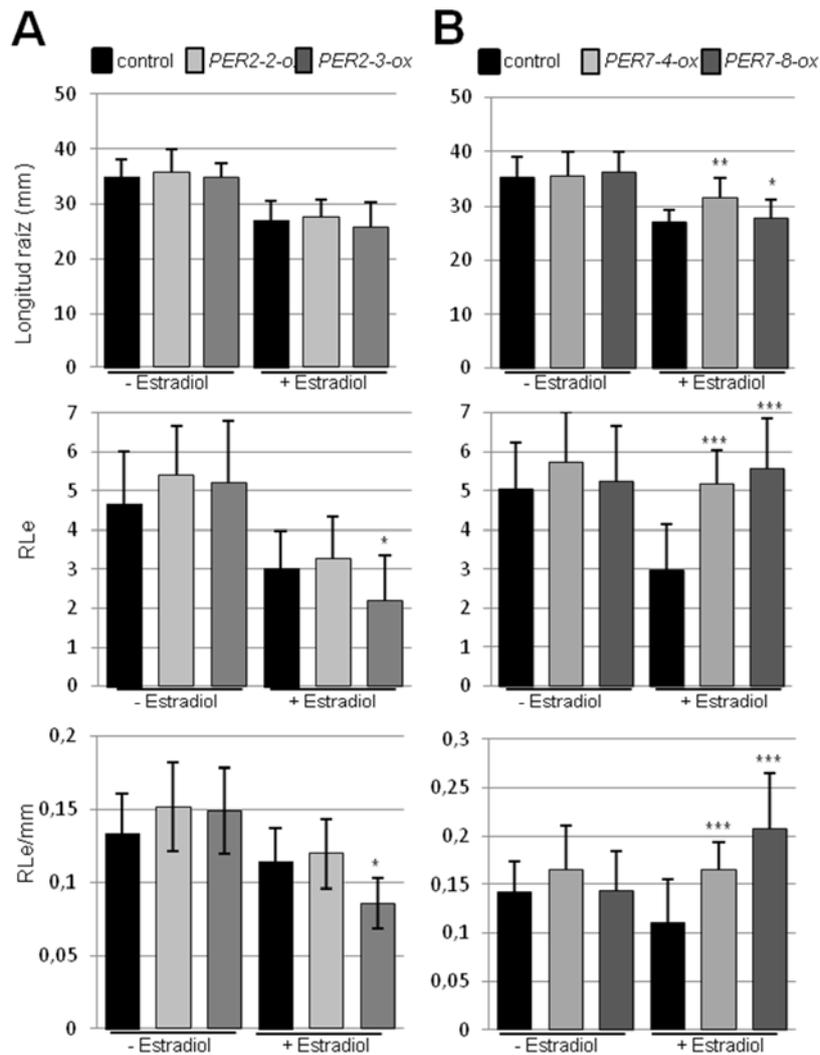


Figura 33. La ganancia de función peroxidasa incrementa la emergencia de RLs. Plantas transgénicas que sobre-expresan *PER2* (ox-*PER2*) (A) o *PER7* (ox-*PER7*) (B) bajo el control de un promotor inducible por estradiol se crecieron en un medio con o sin estradiol durante 10 días. Se cuantificó la longitud de la raíz principal (mm), el número total de raíces laterales emergidas (RLe) y la densidad de RLe (RLe/mm). Las diferentes líneas sobre-expresoras *PER2* o *PER7* se analizaron independientemente con sus respectivos controles. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  por la prueba *t-Student's* ( $n \geq 60$ ).

### La función de *PER7* y *PER57* es independiente de la señalización mediada por auxina

Varios estudios genéticos y fisiológicos han puesto de manifiesto la función de las fitohormonas en el desarrollo de las raíces laterales. Entre ellas, la auxina desempeña una función predominante durante la especificación, iniciación y desarrollo (Fukaki y Tasaka, 2009). Para determinar si *PER7* o *PER57* intervienen en el proceso

de formación de raíces laterales de una manera dependiente de auxina, se trataron raíces de plántulas *per7-1* y *per57-1* con la auxina natural ácido indol-3-acético (AIA) (Figura 34A-B). El tratamiento de auxina a diferentes concentraciones incrementó el número de RLs emergidas tanto en *per7-1* como en *per57-1* de la misma manera que en las raíces control después de 48 horas de tratamiento. El tratamiento con AIA también incrementó la producción de RLs de una manera similar en el control y en las plantas sobre-expresoras de *PER7* (Figura 34C). Estos datos sugieren que las funciones de *PER7* y *PER57* son independientes de la señalización de auxina.

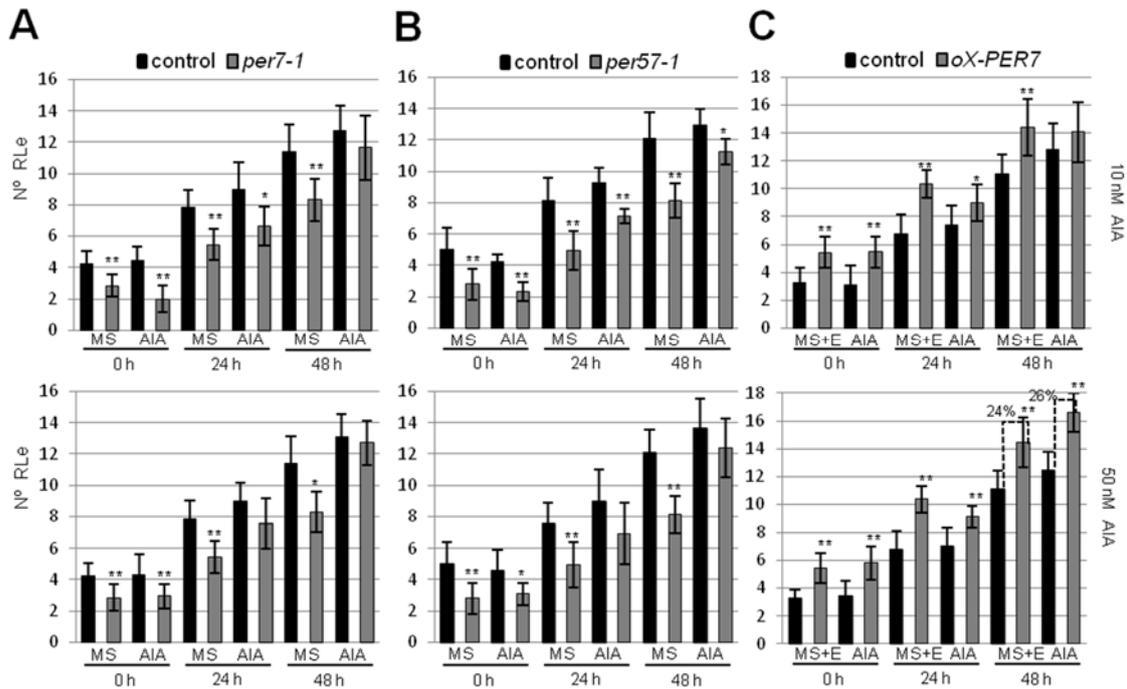


Figura 34. Efectos de la auxina en la formación de las RLs en plantas con actividad peroxidasa alterada. Se crecieron plántulas de *Arabidopsis* en medio MS 1/2 durante 8 días (sección de raíz A) y se transfirieron a un medio fresco con o sin AIA (10 o 50 nM como se indica en cada gráfica). Se cuantificó el número de RLe en la sección de raíz A (similar a la Figura 30A) a las 0, 24 o 48 horas después de transferir las plántulas. A) Número medio de raíces laterales emergidas (RLe) del control (*Col-0*) y *per7-1*. Las barras de error representan la DESVPROM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  por la prueba *t-Student's* ( $n \geq 12$ ). B) Número medio de raíces laterales emergidas (RLe) del control (*Col-0*) y *per57-1*. Las barras de error representan DESVPROM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  por la prueba *t-Student's* ( $n \geq 12$ ). C) Se crecieron plántulas de *Arabidopsis* en medio MS 1/2 conteniendo 10  $\mu\text{M}$  de estradiol (E) durante 8 días y se transfirieron a medio MS 1/2 fresco conteniendo 10  $\mu\text{M}$  de estradiol y con o sin AIA (10 o 50 nM como se indica en cada gráfica). Se cuantificó el número medio de raíces laterales emergidas (RLe) del control (*pER8:GUS*) o *pER8:PER7* (*ox-PER7*). Las barras de error representan DESVPROM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  por la prueba *t-Student's* ( $n \geq 12$ ). El porcentaje sobre las líneas discontinuas indica el incremento de RLs debido al efecto del tratamiento con auxina en cada genotipo.

## **BLOQUE II: ESTRATEGIA GENÉTICA**

### **Identificación de mutantes con sistema radicular alterado**

Para identificar nuevos genes implicados en el desarrollo radicular se decidió llevar a cabo una aproximación genética utilizando el marcador *pSKP2B::GUS*. Mediante mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS) de plantas transgénicas *pSKP2B::GUS*, se identificaron mutantes con un sistema radicular alterado (Tesis Doctoral Manzano, C., 2011). Entre otros, se identificó *srol1* (del inglés *short root in light*) que es un mutante recesivo con un sistema radicular muy reducido. Además, *srol1* presenta un aumento en la densidad tanto de raíces laterales como de pelos radiculares (más largos y más cercanos al ápice de la raíz), así como una acumulación de antocianinas en la parte aérea (Figura 35A) y autofluorescencia dispersa por el sistema radicular (Figura 35B).

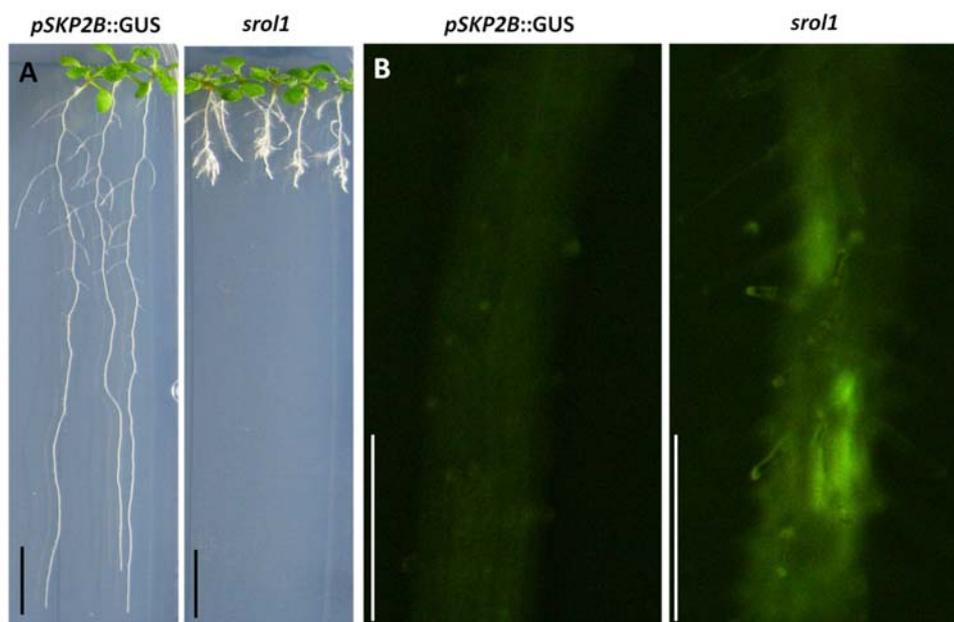


Figura 35. A) Imagen representativa de plántulas control y *srol1* de 8 días crecidas en MS  $\frac{1}{2}$  en condiciones de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad a 22 °C. Barras = 10 mm. B) Imágenes representativas de la autofluorescencia dispersa por el sistema radicular de *srol1* comparado con plantas control (*pSKP2B::GUS*). Barras = 0,05 mm.

## Caracterización fenotípica de *srol1*

### Dinámica de crecimiento de la raíz principal

Las semillas de plantas *pSKP2B::GUS* (control) y *srol1* germinaron 24 horas después de colocadas en la cámara de germinación. Las raíces crecieron superficialmente por el medio, por lo que presentaron un crecimiento oscilante (Figura 35A). La raíz principal de las plantas control mostró una dinámica de crecimiento que se ajustaba a una recta pero *srol1* experimentó una parada del crecimiento de la raíz principal al cuarto día (Tesis Doctoral Manzano, C., 2011) (Figura 36). Al segundo y tercer día de iniciado el experimento, las raíces de plantas control y *srol1* no mostraron diferencias estadísticamente significativas pero a partir del cuarto día de crecimiento, tales diferencias fueron incrementándose con el tiempo, alcanzando la máxima diferencia el décimo día. En todos los casos las diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) (Figura 36).

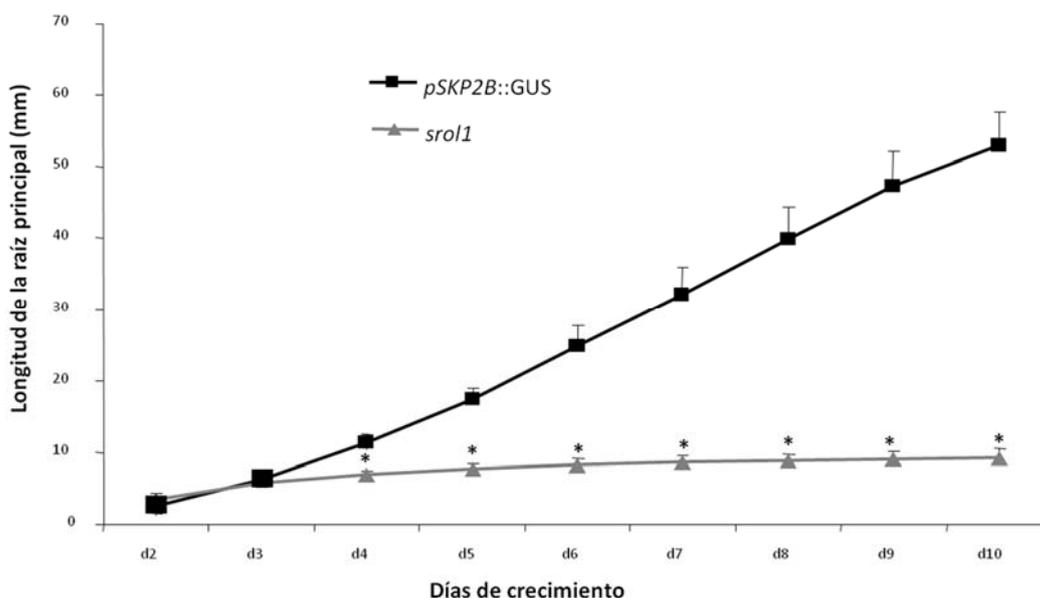


Figura 36. Crecimiento de la raíz principal de plantas control y *srol1*. En ordenadas se expresan, en milímetros, la longitud media de la raíz principal y, en abscisas, en intervalos de 24 horas, los días en los que se llevaron a cabo las medidas de la longitud de la raíz principal, a partir del momento en que se colocaron las semillas en la cámara de germinación. \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

## Desarrollo de raíces laterales

Mediante una tinción histoquímica para la actividad GUS ( $\beta$ -glucoronidasa) en plantas control y *srol1* con el marcador *pSKP2B::GUS*, se comprobó que el patrón de expresión de dicho marcador fue similar en el mutante y en el control, observándose en las células fundadoras del periciclo, en los diferentes estadios de desarrollo de raíces laterales y en el meristemo apical de la raíz (Figura 37A y B).

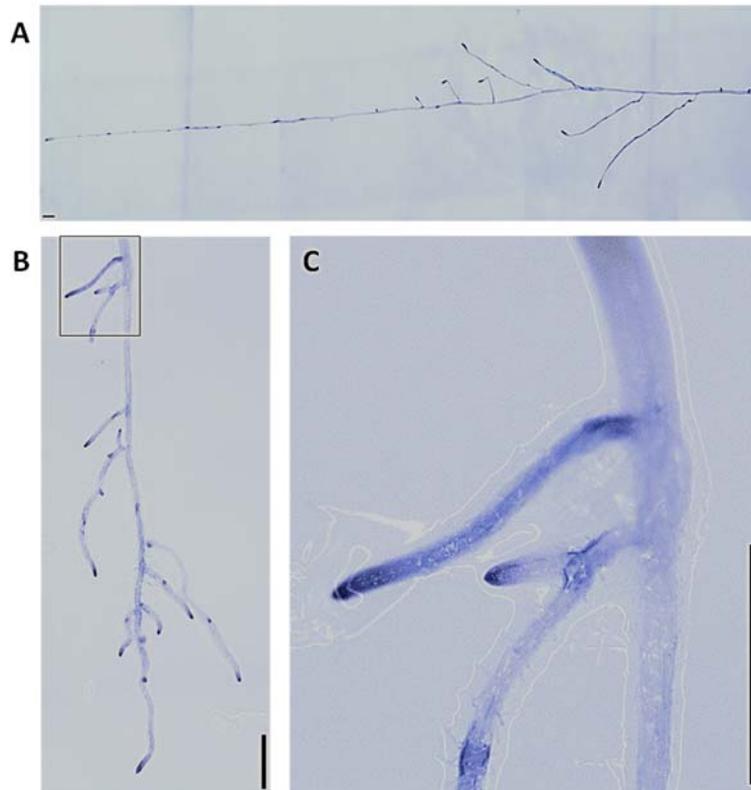


Figura 37. Tinción para la actividad GUS en plantas *pSKP2B::GUS* (A) *srol1/pSKP2B::GUS* (B) de 10 días. C) Ampliación del recuadro señalado en (B) donde se muestra la zona basal de una raíz lateral donde se está desarrollando una raíz lateral terciaria. Barras = 1 mm.

Al calcular el número total de primordios de raíz lateral y raíces laterales emergidas por milímetro de raíz principal, se observó que el mutante desarrolló un tercio más de raíces laterales por milímetro que las plantas control (Figura 38B). Pero la longitud de raíz principal en las plantas control fue de 24 mm y en *srol1* de 12 mm aproximadamente (Figura 38A), por lo que el número total de primordios de raíz lateral y raíces laterales emergidas fue significativamente menor en el mutante ( $9,51 \pm 1,60$ ) con respecto al control ( $13,22 \pm 2,48$ ).

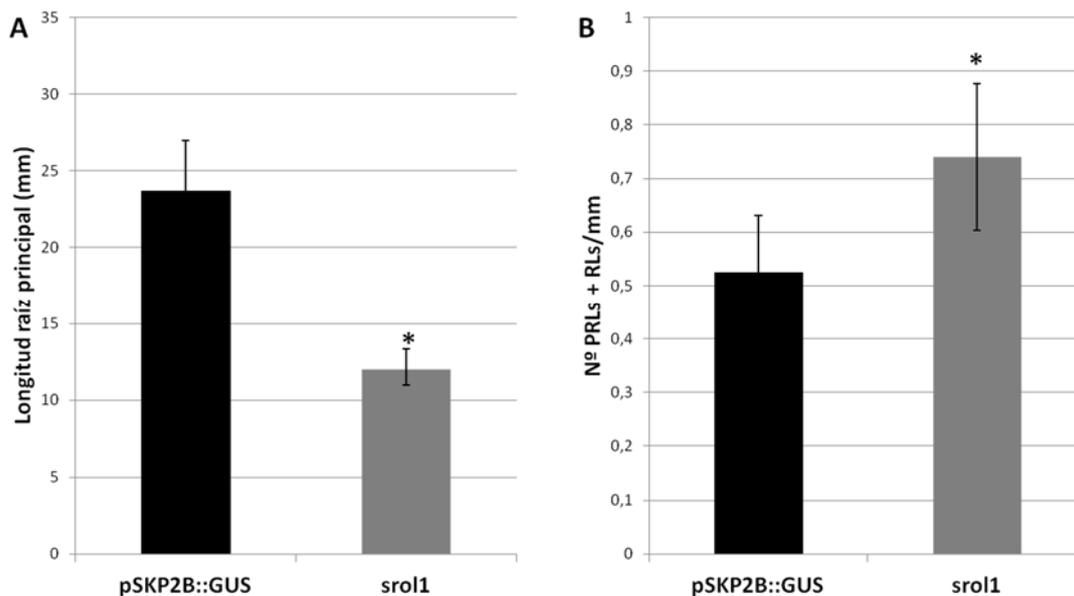


Figura 38. A) Longitud de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* de 7 días (n = 40). B) Número total de primordios de raíz lateral y raíces laterales emergidas por milímetro en plantas control y *srol1* de 7 días (n = 40). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

Además, en *srol1* se formaron raíces laterales terciarias directamente de la base de las raíces laterales originadas a partir de la raíz principal (Figura 37C). Y se observó una aceleración en el desarrollo de las raíces laterales aunque, con el tiempo, estas también detuvieron su crecimiento al igual que la raíz principal.

### **El crecimiento radicular de *srol1* está condicionado por la calidad de la luz**

Debido al método de siembra utilizado en el laboratorio para el cultivo *in vitro* de plántulas de *Arabidopsis*, mediante el cual las semillas se disponían en dos alturas en placas petri cuadradas orientadas verticalmente, se observó que la raíz principal de plantas *srol1* situadas en la hilera inferior crecía significativa y reproduciblemente más con respecto a las plantas alineadas inmediatamente por encima. Esto podría ser consecuencia de que la luz proyectada por tubos fluorescentes desde la parte superior incide con una intensidad menor en la parte inferior de la placa. Por ello, para comprobar si la intensidad de la luz provocaba algún efecto en el mutante, se crecieron plantas control y *srol1* en condiciones estándar de intensidad de luz ( $75 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{seg}$ ) y de alta intensidad ( $270 \mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{seg}$ ). En el último caso, la luz incidió frontalmente sobre la raíz. La alta intensidad de luz redujo el crecimiento de la

raíz principal tanto de las plantas control como *srol1*, llegando a ser dicha reducción de la mitad en el mutante (Figura 39).

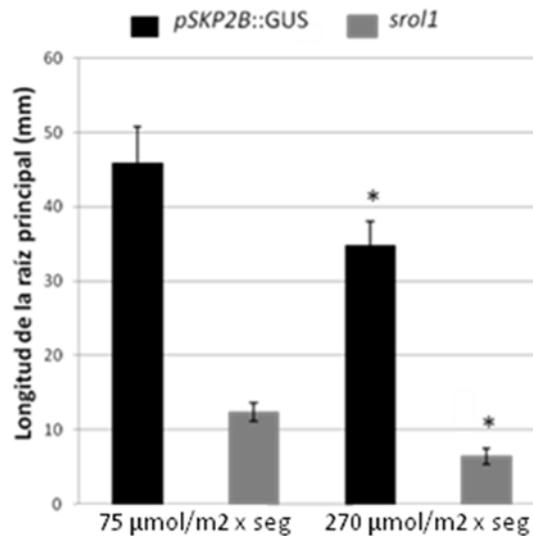


Figura 39. Longitud de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones estándar de intensidad de luz (75  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{seg}$ ) y alta intensidad (270  $\mu\text{mol}/\text{m}^2 \times \text{seg}$ ) durante 10 días (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t*-Student's ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

Esto apoya la idea de que un exceso de intensidad de luz puede producir o exacerbar el fenotipo *srol1*. Si esto fuera así, al reducir la intensidad que incide sobre la raíz, se esperaría que el crecimiento de la raíz principal de *srol1* se recuperara. Por ello, se crecieron plantas control y *srol1* en condiciones estándar de intensidad de luz (luz blanca) bajo filtros que reducían dicha intensidad lumínica a un 50%, 20% o tan solo un 5% de la intensidad control. En estas condiciones, las plantas control redujeron significativamente el crecimiento de la raíz principal con respecto a las condiciones estándar de intensidad de luz, pero las plantas *srol1* no recuperaron el fenotipo (Figura 40), indicando que el fenotipo mutante no se debe a la intensidad de la luz.

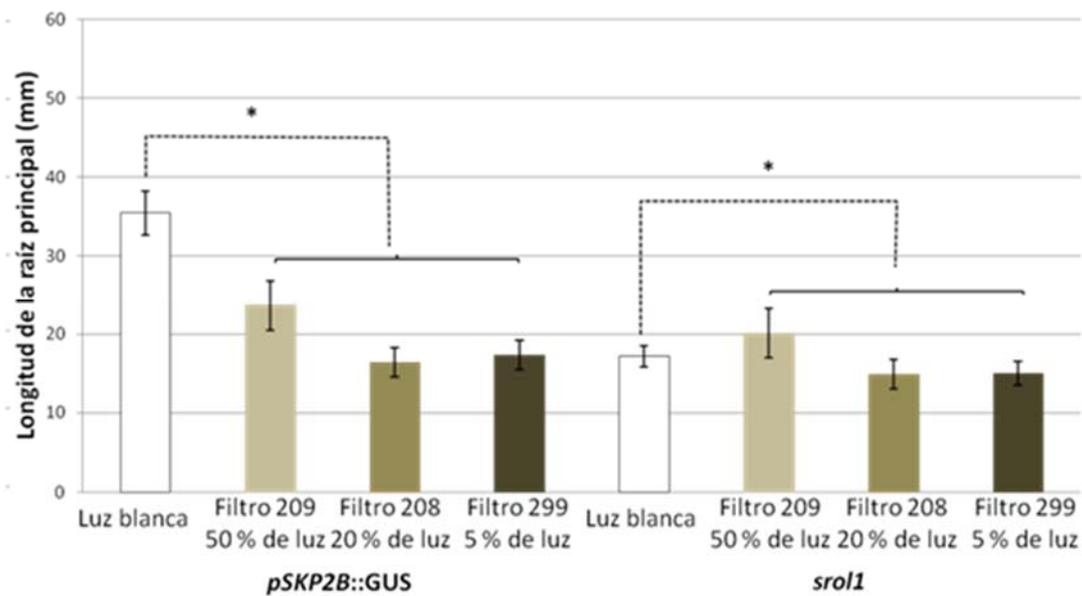


Figura 40. Longitud de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones estándar de intensidad de luz (luz blanca) y bajo filtros que reducen un 50%, 20% y 5% dicha intensidad durante 8 días (n = 15). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

La luz visible (la luz percibida por el ojo humano), es la combinación de luces con diferente longitud de onda (Figura 41A y B). Por ello, para comprobar si las diferentes longitudes de ondas de la luz provocaban algún efecto en el mutante, se crecieron plantas control y *srol1* en condiciones de luz blanca, bajo filtros azul, verde, amarillo, rojo y en completa oscuridad. En todas las condiciones, se redujo significativamente el crecimiento de la raíz principal de las plantas control, con excepción de la luz azul; y, sorprendentemente, *srol1* recuperó parcialmente el fenotipo en todas las situaciones, salvo cuando la planta se encontraba en oscuridad (Figura 41C). Estos resultados indican que el fenotipo mutante parece depender de la longitud de onda de la luz, siendo la luz amarilla la que más contribuye a la recuperación del crecimiento de la raíz principal en *srol1*.

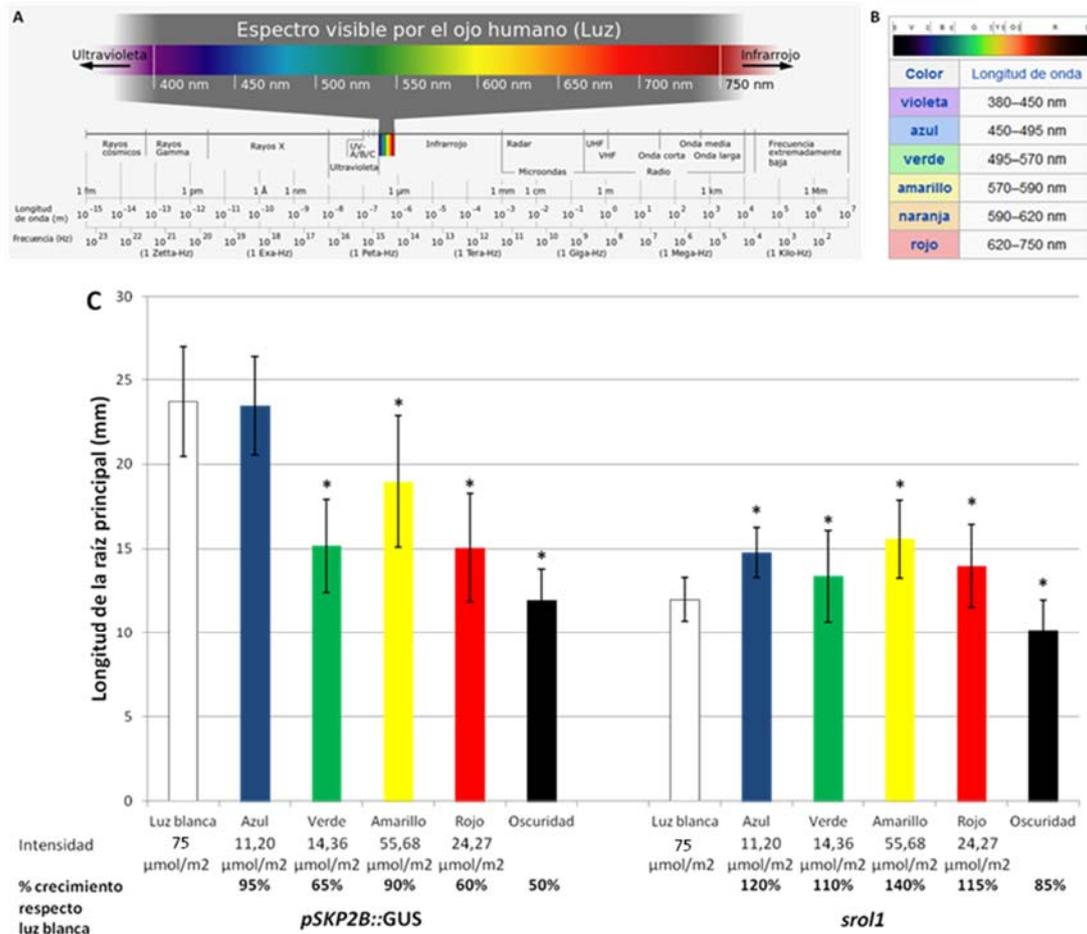


Figura 41. A) Esquema del espectro electromagnético resaltando el rango de longitudes de onda del espectro visible. B) Aproximación de los rangos de longitudes de onda que corresponden a los colores monocromáticos pertenecientes al espectro visible. C) Longitud de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca, bajo filtros azul, verde, amarillo, rojo y en completa oscuridad durante 7 días (n = 45). Bajo el eje de abscisas se expresa la intensidad de la luz y el porcentaje de crecimiento de la raíz principal con respecto a la luz blanca. \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

La longitud de onda de la luz también influyó en el número total de PRLs y RLs emergidas. Mediante una tinción histoquímica para la actividad GUS ( $\beta$ -glucoronidasa) en plantas control y *srol1* con el marcador *pSKP2B::GUS* crecidas en condiciones de luz blanca, bajo filtros azul, verde, amarillo, rojo y en completa oscuridad, se comprobó que las plantas control desarrollaron un número significativamente menor de PRLs y RLs emergidas en todas las condiciones, salvo en luz azul, con respecto a la luz blanca; y las plantas *srol1* desarrollaron un número significativamente menor de PRLs y RLs emergidas en todas las calidades de luz con respecto a la luz blanca, excepto en luz azul y amarilla. Además, y consecuentemente, en luz amarilla no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el control y el mutante (Figura 42).

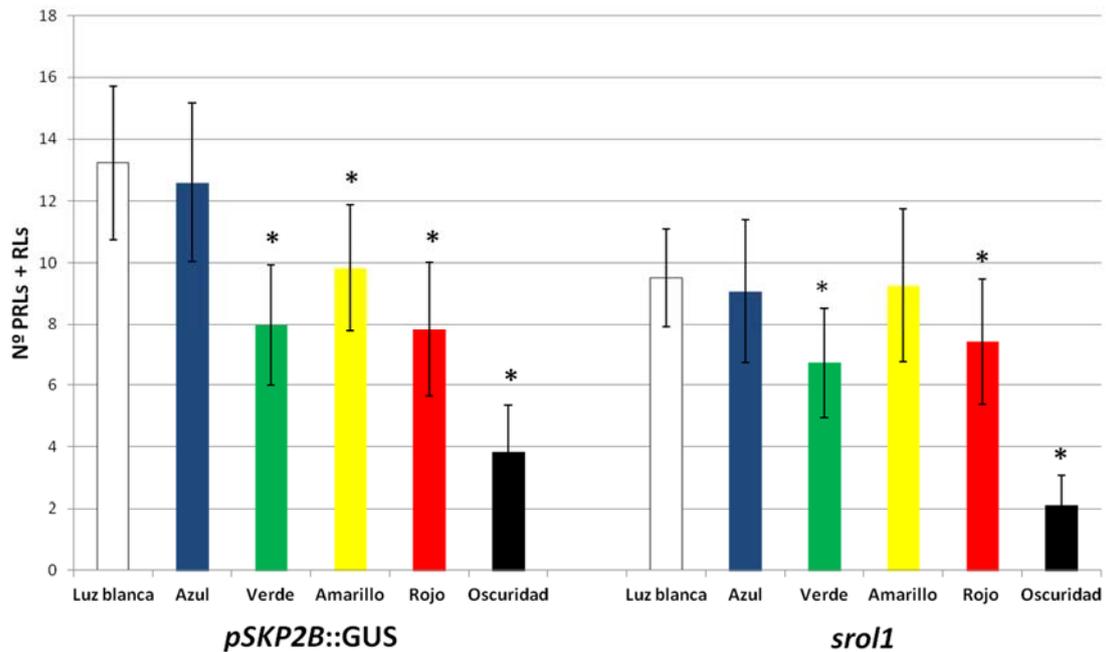


Figura 42. Número total de PRLs y RLs emergidas en plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca, bajo filtros azul, verde, amarillo, rojo y en completa oscuridad durante 7 días (n = 45). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ) con respecto a la luz blanca. Las barras de error indican DESVPROM.

La recuperación del fenotipo *srol1* citada anteriormente, no es completamente específica de la luz amarilla. Ya que el crecimiento en oscuridad se llevó a cabo con las plantas completas crecidas en oscuridad (etioladas) es posible que la falta de luz en la parte aérea afecte al desarrollo radicular. Para evitar esta limitación, se utilizó un método de cultivo *in vitro* en conos, mediante el cual el sistema radicular de las plántulas de *Arabidopsis* crece a través del medio y no superficialmente, y la parte aérea está expuesta a la luz, mientras la raíz puede mantenerse en oscuridad, reproduciendo más fielmente lo que sucede en la naturaleza (Material y Métodos Figura 23). Utilizando este sistema, se comprobó que tanto las plantas control como *srol1* presentaron un sistema radicular mucho más corto cuando estuvo expuesto a la luz que en oscuridad y que el mutante recuperó prácticamente el fenotipo silvestre cuando la raíz permaneció en completa oscuridad (Figura 43). Todos estos resultados parecen indicar que la luz es un factor negativo para el crecimiento del sistema radicular, repercutiendo en su desarrollo, y que el fenotipo de raíz corta de *srol1* se debe, al menos parcialmente, a la incidencia directa de la luz sobre la raíz y depende más de la calidad que de la intensidad de la misma.

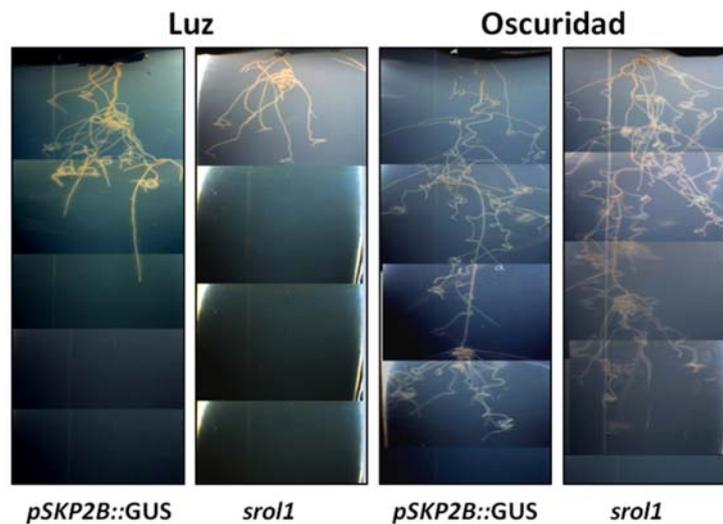


Figura 43. Montaje de imágenes sucesivas a lo largo del sistema radicular de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz y oscuridad mediante el sistema de cultivo *in vitro* en conos.

### **La longitud de onda de la luz afecta a la división y la elongación celular de la raíz**

Debido a que la luz amarilla fue la longitud de onda en la que *srol1* recuperó parcialmente el fenotipo más significativamente, se eligió como condición de estudio para analizar la capacidad de división celular en el meristemo apical de la raíz y la capacidad de elongación celular en la zona de elongación con respecto a la luz blanca tanto en plantas control como en *srol1*.

En la raíz principal de *Arabidopsis thaliana*, en sección longitudinal a nivel del CQ, y a cierta distancia del mismo, a una célula cortical relativamente isodiamétrica la sucede otra considerablemente más larga que ancha. Este nivel define la zona de transición entre la división y la diferenciación celular, definiendo la zona meristemática según Dello Ioio *et al.*, 2007 y Ubeda-Tomás *et al.*, 2009, que se establece a un nivel transversal diferente en cada columna de células de la corteza. Por ello, para calcular la extensión del meristemo apical (distancia desde el centro quiescente a la zona de transición), se ha considerado como zona de transición de la raíz, la media obtenida a partir de las zonas de transición de dos columnas de células de corteza diametralmente opuestas. A partir de la zona de transición, en cada columna, las células corticales muestran una longitud gradualmente mayor hacia la base de la raíz principal hasta alcanzar su longitud máxima, lo cual marca el límite entre la zona de elongación y la zona madura de la raíz.



Para contrastar estos resultados, se realizó el recuento del número de células de la corteza en dos columnas diametralmente opuestas en el meristemo apical de la raíz principal de plantas control y *srol1*, desde las células iniciales de la corteza-endodermis hasta las correspondientes zonas de transición. Nuevamente, la luz amarilla provocó un efecto negativo en el meristemo apical del control, reduciendo significativamente el número de células corticales con respecto a la luz blanca; sin embargo, en el mutante no hubo diferencias significativas en cuanto al número de células corticales entre las dos condiciones (Figura 45), por lo que la luz amarilla redujo el tamaño de las células meristemáticas específicamente en *srol1*. En luz blanca, el mutante presentó un número significativamente menor de células de la corteza en el meristemo apical con respecto a las plantas control, existiendo una correlación entre la extensión del meristemo apical y el número de células corticales (Figura 44B). Sin embargo, en cuanto al número de células corticales en el meristemo apical, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el control y *srol1* en luz amarilla.

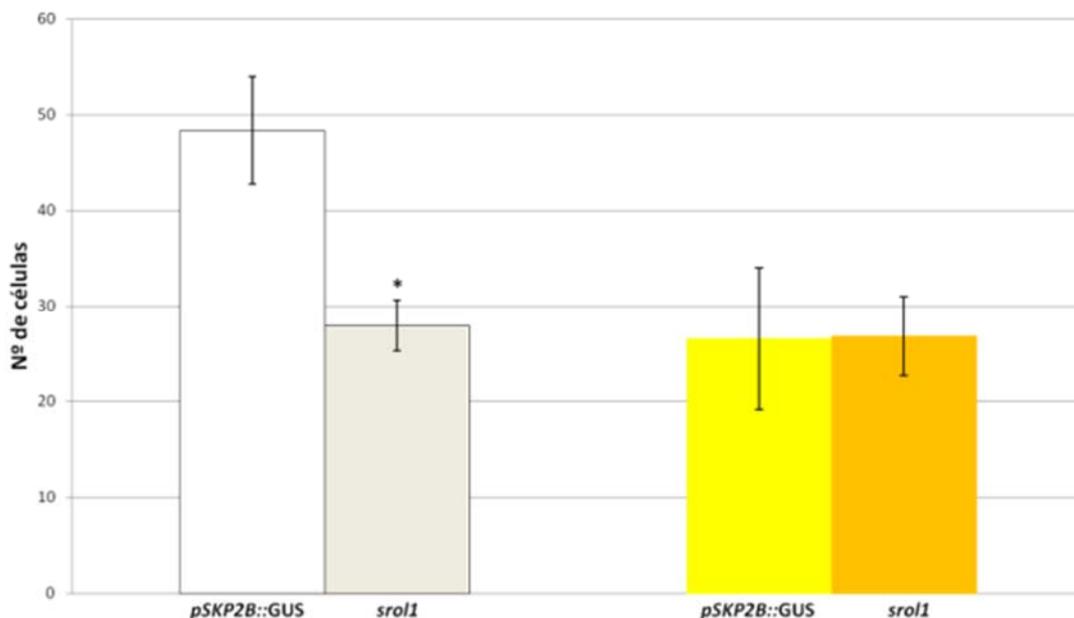


Figura 45. Número de células de la corteza en el meristemo apical de la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca y bajo un filtro amarillo, durante 7 días (n = 12). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

Para comprobar la actividad mitótica en el meristemo apical de la raíz principal, se analizó la acumulación de la proteína ciclina B1 (CYCB1) expresada bajo su propio promotor y fusionada al gen marcador GUS (*pCYCB1;1::CYCB1:GUS*), en el meristemo apical de la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones

de luz blanca y bajo un filtro amarillo. Mediante una tinción histoquímica para la actividad GUS ( $\beta$ -glucuronidasa), el marcador *pCYCB1;1::CYCB1:GUS* se expresa en aquellas células que se encuentran en la transición G2/M del ciclo celular en forma de puntos azules (Figura 46B). En esta ocasión, no hubo diferencias significativas en la actividad mitótica en el meristemo apical de plantas control en luz amarilla con respecto a la luz blanca; sin embargo, en *sro1* aumentó significativamente dicha actividad en luz amarilla con respecto a la luz blanca (Figura 46A). En luz blanca, *sro1* presentó un número significativamente menor de células en fase G2/M en el meristemo apical con respecto al control, existiendo una correlación con la extensión del meristemo apical y el número de células corticales (Figura 44B y 45). Y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el control y el mutante en luz amarilla, existiendo una correlación entre el número de células corticales y la actividad mitótica en el meristemo apical de la raíz principal (Figura 45). Estos resultados parecen indicar que el meristemo de la raíz de *sro1* tiene un potencial de división significativamente menor que el de las plantas control, ya que el número de células en mitosis está significativamente reducido.

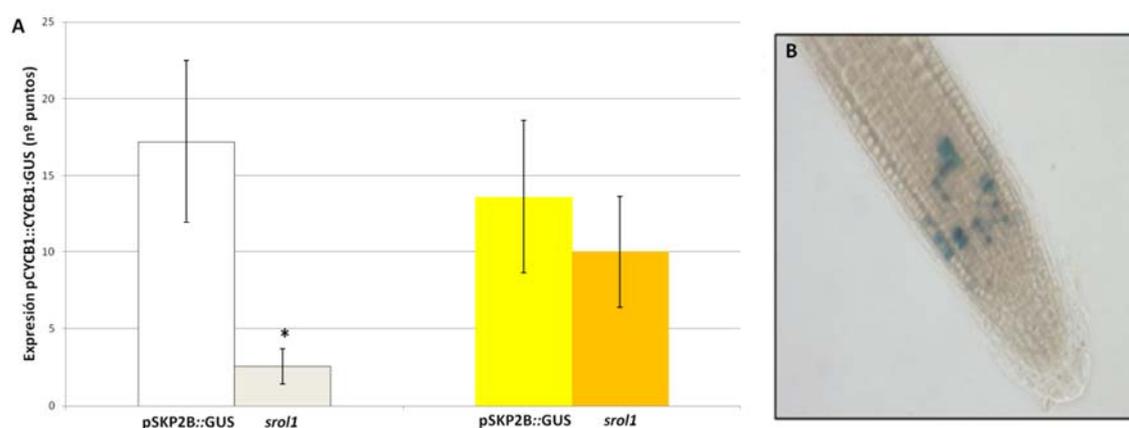


Figura 46. A) Expresión *pCYCB1::CYCB1:GUS* (nº de puntos azules) en el meristemo apical de la raíz principal de plantas control y *sro1* crecidas en condiciones de luz blanca y bajo un filtro amarillo, durante 7 días (n = 12). B) Visualización de la expresión del marcador *pCYCB1;1::CYCB1:GUS* en el meristemo apical de la raíz principal, tras la tinción histoquímica para la actividad GUS. \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

Mediante microscopía confocal, se analizó la longitud de las células de la corteza y epidermis en el meristemo apical de la raíz principal intacta de plantas control y *sro1* crecidas en condiciones de luz blanca. La microscopía confocal permitió observar la longitud celular en varias columnas de células de la corteza y epidermis de una mitad longitudinal del meristemo apical, mediante secciones virtuales de 1,5

micras de grosor desde el centro de la raíz (a nivel del centro quiescente) hacia la epidermis. El mutante mostró células de mayor tamaño, tanto en la epidermis como en la corteza, mucho más cerca del centro quiescente con respecto a las observadas en el control al mismo nivel transversal (Anexo Vídeos 1 y 2), indicando que en *sro1* el límite distal de la zona de elongación se encuentra mucho más cerca del ápice de la raíz que en el control y, por consiguiente, posee una zona meristemática mucho más corta. Estos resultados se correlacionan con los expuestos anteriormente con respecto a la extensión, el número de células de la corteza y a la actividad mitótica en el meristemo apical de la raíz principal de plantas control y *sro1* en luz blanca.

Para analizar la capacidad de elongación de las células, se midió la longitud de las primeras 20 células de la corteza a partir de la zona de transición en raíces de plantas control y *sro1* crecidas en condiciones de luz blanca y bajo un filtro amarillo. Esta zona, por lo tanto, corresponde con la zona de elongación y el comienzo de la zona madura (aproximadamente 2000 micras después de la zona de transición en el caso del control en luz blanca y tanto del control como del mutante en luz amarilla; y aproximadamente 1000 micras después de la zona de transición en el caso del mutante en luz blanca). Teniendo en cuenta la dinámica de crecimiento de la raíz principal (Figura 36), esta zona fue producida por el meristemo apical durante el séptimo día, es decir, durante las últimas 24 horas. Se ha elegido esta zona porque, en el momento en el que se produjo, las diferencias entre el control y el mutante, en cuanto a la longitud de la raíz principal, eran considerables.

Se han elegido las células de la corteza porque, en *Arabidopsis thaliana*, dichas células no sufren división celular ni antes ni durante la iniciación y desarrollo de los primordios de raíz lateral. Por consiguiente, variaciones en este aspecto no se corresponden con procesos relacionados con el desarrollo de las raíces laterales y la longitud celular en la zona madura se debe, únicamente, a la capacidad de elongación de las células (Figura 47).

Se obtuvieron imágenes digitales de las zonas de transición y las dos columnas de células corticales, diametralmente opuestas, de cada raíz principal, a microscopía óptica con contraste interdifereencial de Nomarski. Se calculó la media y la desviación promedio de la longitud de las células corticales localizadas en la misma posición con respecto a la zona de transición correspondiente. Estos resultados se muestran en la Figura 48.

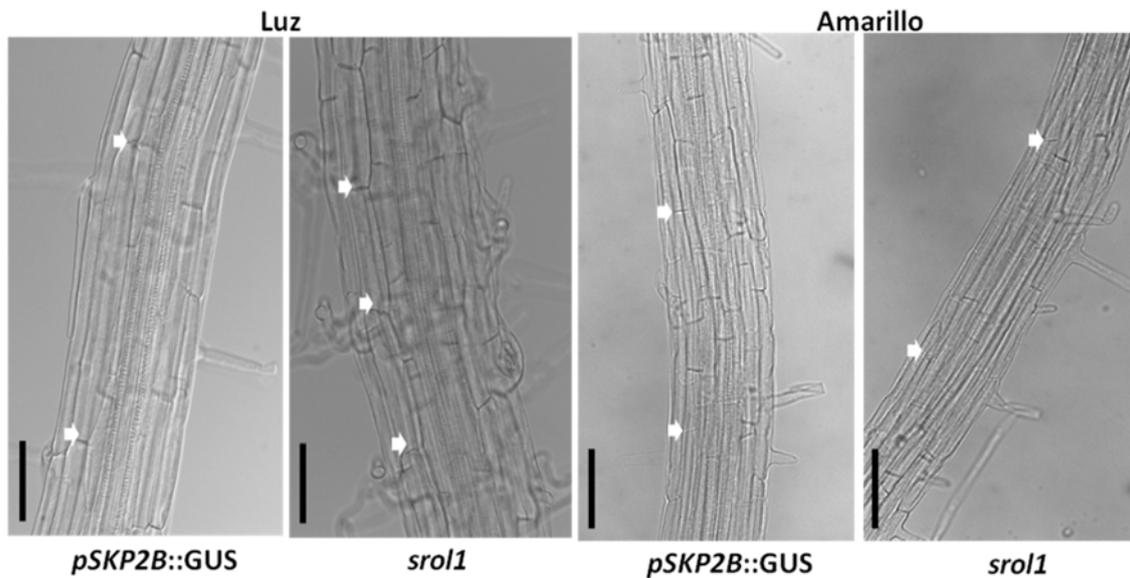


Figura 47. Visión longitudinal, a microscopía óptica con contraste interferencial de Nomarski de la zona madura de la raíz principal intacta y clarificada de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca y bajo un filtro amarillo, durante 7 días. Las flechas blancas delimitan la longitud de las células de la corteza. Barras = 50  $\mu$ m.

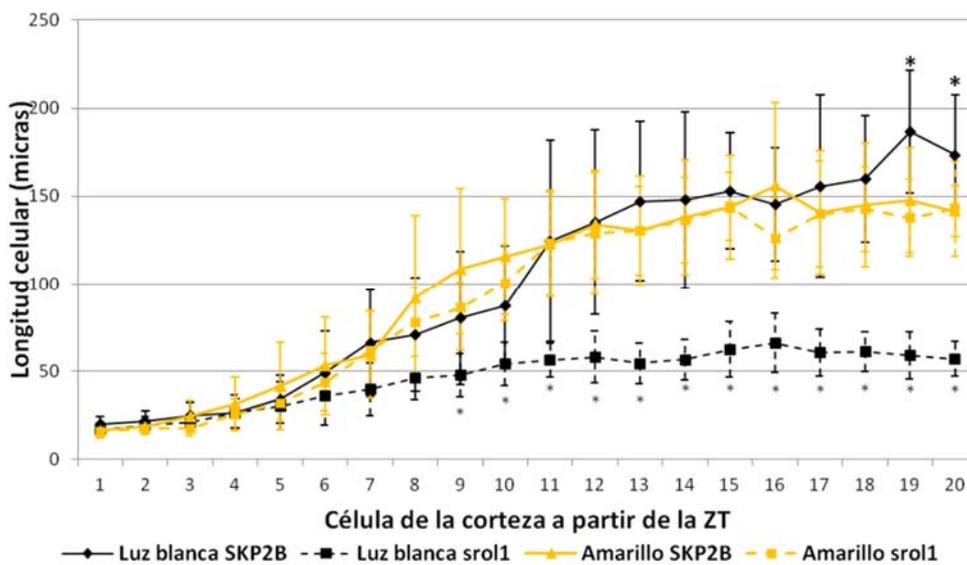


Figura 48. Longitud media (micras) de las primeras 20 células de la corteza a partir de la zona de transición en la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca y bajo un filtro amarillo, durante 7 días ( $n = 12$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

En la raíz principal de las plantas *srol1* crecidas en luz blanca, se observó una parada en el incremento de la longitud celular a partir de la novena célula cortical después de la zona de transición. Esta circunstancia hizo que las diferencias de longitud entre las células corticales del mutante y el control en luz blanca fueran

estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) a lo largo de la zona de estudio. La luz amarilla recuperó este efecto en el caso del mutante *srol1* (Figura 48).

### **Papel de los foto-receptores en el fenotipo de *srol1***

Las plantas dependen de la luz como fuente de energía y como señal de morfogénesis y desarrollo aunque alta intensidad de luz (como la radiación UV) puede inducir cambios graves en las células vegetales. La mayoría de lo que se conoce sobre la transducción de señal de la luz es en la parte aérea. Aunque existen numerosos trabajos del efecto de la luz en el desarrollo radicular, su papel en este órgano no está completamente claro.

Para comprobar si el fenotipo *srol1* estuviera mediado por la ruta de señalización de los foto-receptores, se cruzó el mutante *srol1* con los mutantes *cry1-104* (*hy4-104*) (Lin *et al.*, 1996), *cry2-1* (Guo *et al.*, 1998), *cry1/cry2*, *phot1-5/phot2* (Jarillo *et al.*, 2001), *phyA-211* (Reed *et al.*, 1994) y *phyB9* (Reed *et al.*, 1993). Se crecieron plantas *wild type*, *cry1*, *cry2*, *cry1/cry2*, *phot1/phot2*, *phyA*, *phyB*, *srol1* (controles) y los dobles y triples mutantes en condiciones de luz blanca y se analizó la longitud de la raíz principal. En ningún caso *srol1* recuperó el crecimiento radicular (Figura 49), indicando que el fenotipo de raíz corta no está mediado por estos receptores lumínicos.

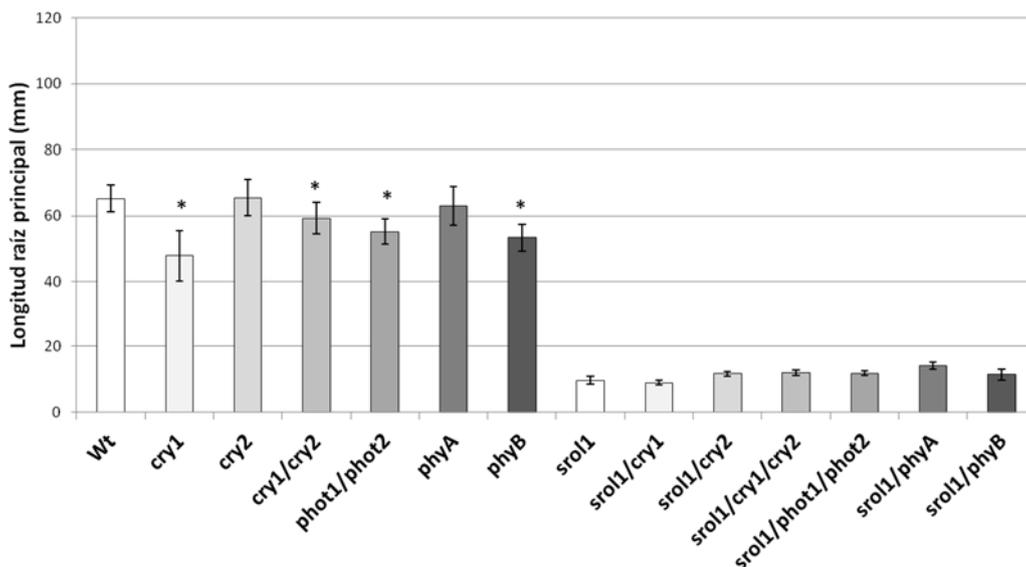


Figura 49. Longitud de la raíz principal (mm) de plantas *wild type*, *cry1*, *cry2*, *cry1/cry2*, *phot1/phot2*, *phyA*, *phyB*, *srol1* (controles) y los dobles y triples mutantes crecidos en condiciones de luz blanca durante 10 días (n = 12). \*, diferencias

estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

### **La identidad celular en la raíz se mantiene en *srol1***

Para comprobar si en el mutante *srol1* existía alguna alteración en cuanto a la identidad celular en algún tejido de los que componen la raíz principal, se realizaron una serie de cruces del mutante con diferentes marcadores celulares. En la Tesis Doctoral de Manzano C., 2011, se analizó la expresión de marcadores específicos del centro quiescente, como QC46, WOX5 (WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN 5) y SCR (SCARECROW) (Sabatini *et al.*, 2003; Haecker *et al.*, 2004; Heidstra *et al.*, 2004); de las células iniciales de la corteza/endodermis y de la endodermis propiamente dicha (SCR); y de las células de la corteza (Co2H2B; Ten Hove *et al.*, 2010), y en ningún caso se observaron diferencias con respecto al control. En el presente trabajo, además se analizó la expresión de un marcador específico del periciclo enfrentado a los polos de protoxilema (la línea J0121, Figura 50) (Laplaze *et al.*, 2005).

Mediante microscopía confocal, se estudió la expresión del marcador celular en la zona madura de la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca. Se observó que el mutante mantiene la identidad del periciclo enfrentado a los polos de protoxilema (Figura 50).

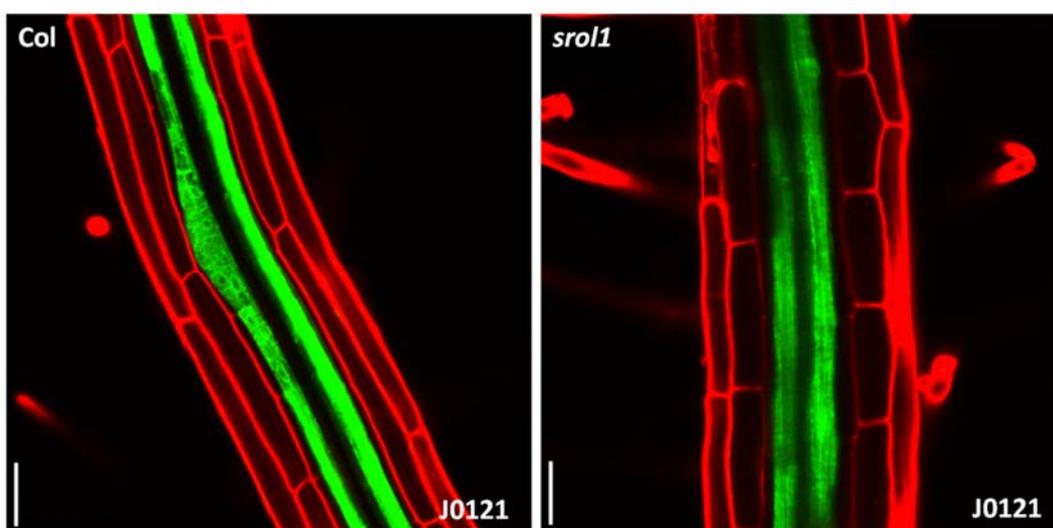


Figura 50. Imágenes a microscopía confocal de la expresión del marcador J0121 (verde) en la zona madura de la raíz principal, teñida con ioduro de propidio (rojo), de plantas control y *srol1* crecidas durante 5 días en condiciones de luz blanca ( $n = 10$ ). Barras = 25  $\mu\text{m}$ .

## Caracterización molecular de *srol1*

### Regulación hormonal

#### Señalización y respuesta a auxina en el meristemo apical de la raíz

La auxina es una hormona esencial en el control de casi todos los aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal (Vanneste y Friml, 2009), incluyendo la división y la elongación celular (Evans, 1989; Gray *et al.*, 1998, 1999). En *Arabidopsis*, el mantenimiento de la zona meristemática está controlado por las auxinas y los factores de transcripción PLT distribuidos en un gradiente en el meristemo radicular (Mähönen *et al.*, 2014). Se analizó la localización de la proteína PLT2 (PLETHORA 2) bajo la expresión de su propio promotor y fusionada a la YFP (*pPLT2::PLT2:YFP*) (Aida *et al.*, 2004). PLT2 es un factor de transcripción esencial para la especificación del centro quiescente y la actividad del nicho de células madre. En este sentido, tampoco se observaron diferencias significativas entre el control y *srol1*, indicando que dichos procesos se desarrollan con normalidad en el meristemo apical de la raíz principal del mutante; sin embargo, el dominio de PLT2 en *srol1* fue mayor que en las plantas control, indicando que, aunque las células no parecen ser meristemáticas por su tamaño celular, sí lo son por su identidad (Figura 51).

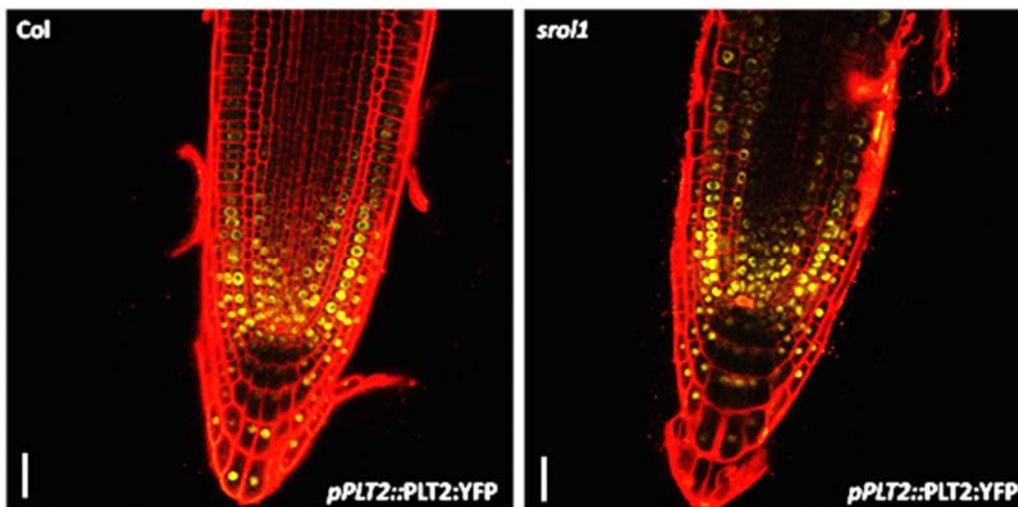


Figura 51. Imágenes representativas a microscopía confocal de la localización del factor de transcripción PLT2 (amarillo) en el meristemo apical de la raíz principal, teñida con ioduro de propidio (rojo), de plantas control y *srol1* crecidas durante 5 días en condiciones de luz blanca (n = 10). Barras = 25  $\mu$ m.

Ya que el fenotipo del mutante *srol1* se asemeja a plantas tratadas con auxinas exógenas, se decidió analizar si *srol1* tenía algún defecto en cuanto a la señalización y/o respuesta a auxina. Para ello, se llevó a cabo una serie de cruces del mutante con algunos marcadores moleculares específicos de dichos procesos. Entre ellos, se cruzó con el marcador de señalización que contiene la proteína AXR3 (AUXIN RESISTANT 3) bajo la expresión de un promotor inducible por choque térmico (HS, del inglés *Heat Shock*) y fusionada al gen marcador GUS (HS::AXR3NT:GUS, Figura 52) (Gray *et al.*, 2001).

En el meristemo apical y en la zona de elongación de la raíz principal de plantas control y *srol1*, crecidas en condiciones de luz blanca, se analizó la estabilidad de la proteína AXR3:GUS (Figura 52). Tras la activación del promotor HS mediante un choque térmico, se analizó la actividad GUS. Estudios de microscopía óptica no mostraron diferencias significativas entre el mutante y las plantas control, ya que la actividad GUS se redujo tras el tratamiento con AIA de forma similar en los dos genotipos; sin embargo, la acumulación de la proteína AXR3 fue mayor en *srol1* con respecto al control después de la inducción por choque térmico (Figura 52). Para comprobar que la actividad GUS observada no se debía a una inducción del promotor HS por el estrés lumínico en las raíces, se realizó una tinción histoquímica para la actividad GUS sin choque térmico previo, y no se observó ninguna coloración azul.

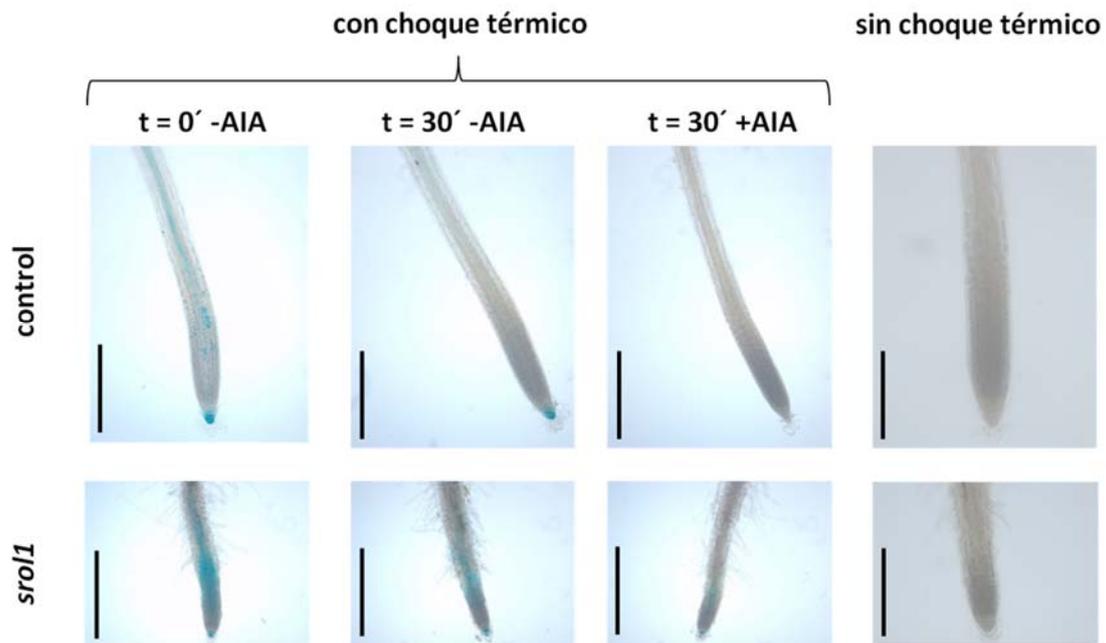


Figura 52. Imágenes a microscopía óptica del meristemo apical y de la zona de elongación de la raíz principal de plantas control y *srol1* con el marcador HS::AXR3NT:GUS, crecidas durante 7 días en condiciones de luz blanca.

Mediante una tinción histoquímica para la actividad GUS, se muestra la estabilidad de la proteína AXR3 tras la activación del promotor por choque térmico y un tratamiento con AIA. Como control se realizó una tinción histoquímica para la actividad GUS sin choque térmico previo (n = 12). Barras = 200  $\mu$ m.

Para contrastar estos resultados, se analizó la estabilidad del marcador DII-VENUS en presencia de AIA (Figura 53) (Brunoud *et al.*, 2012). DII-VENUS es la YFP fusionada al dominio DII de las proteínas Aux/IAA (degron), que interacciona con TIR1 para promover su degradación dependiente de auxina, y bajo la expresión de un promotor constitutivo. Mediante microscopía confocal, se comprobó la señal fluorescente en el meristemo apical de la raíz principal de plantas control y *sro1* crecidas en condiciones de luz blanca. Nuevamente, el mutante no presentó ningún defecto en cuanto a la señalización de auxina, ya que el marcador DII-VENUS se degradó totalmente tras el tratamiento con AIA durante 30 minutos; sin embargo, *sro1* mostró una alteración en la distribución de auxina en el meristemo apical con respecto al control, observándose una mayor concentración de señal fluorescente en el cilindro vascular y menos en la cofia lateral (Figura 53).

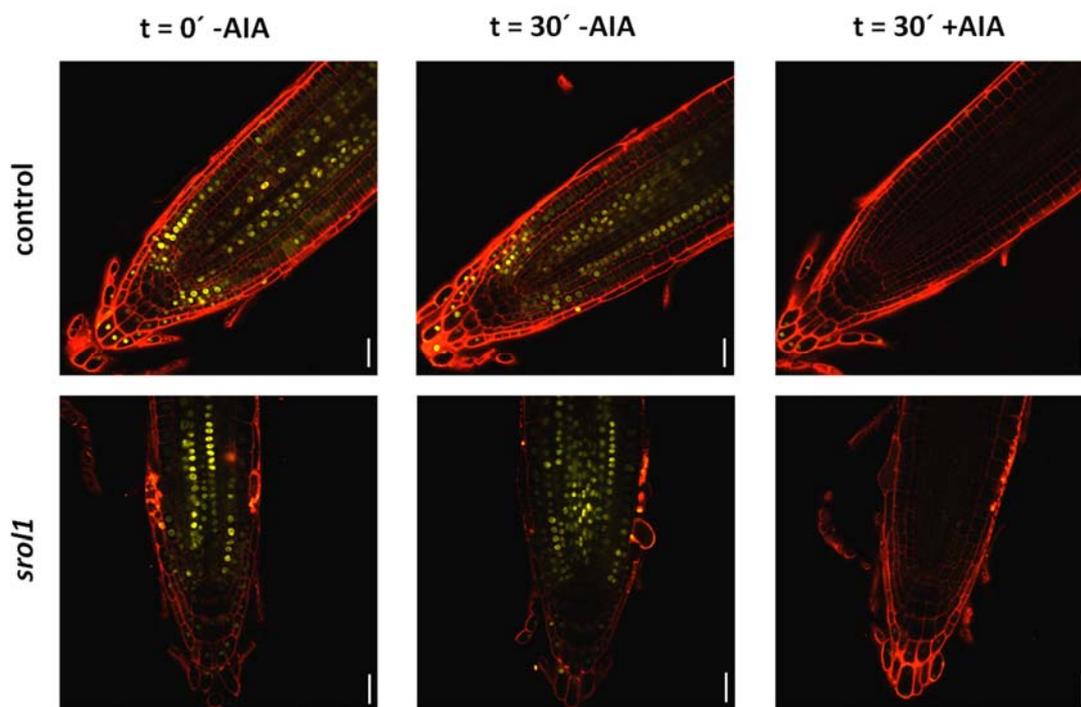


Figura 53. Imágenes a microscopía confocal, de la estabilidad del marcador DII-VENUS (amarillo), con y sin tratamiento de AIA durante 30 minutos, en el meristemo apical de la raíz principal, teñida con ioduro de propidio (rojo), de plantas control y *sro1* crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días (n = 10). Barras = 25  $\mu$ m.

Para comprobar si el mutante presentaba algún defecto en la transcripción de la señal a auxina, se analizó la expresión del promotor *DR5* fusionado a la GFP

(*pDR5::GFP*; Figura 54) (Blilou *et al.*, 2005). *DR5* es un marcador de respuesta a auxina que contiene un promotor sintético con repeticiones en tándem del motivo de respuesta a auxina AuxRE (del inglés, *Auxin Response Element*). Mediante microscopía confocal, se observó la señal fluorescente en el meristemo apical de la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca. El mutante no mostró diferencias en la expresión de *DR5* con respecto al control (Figura 54), indicando que *srol1* tampoco presenta alteraciones en cuanto a la respuesta a auxina.

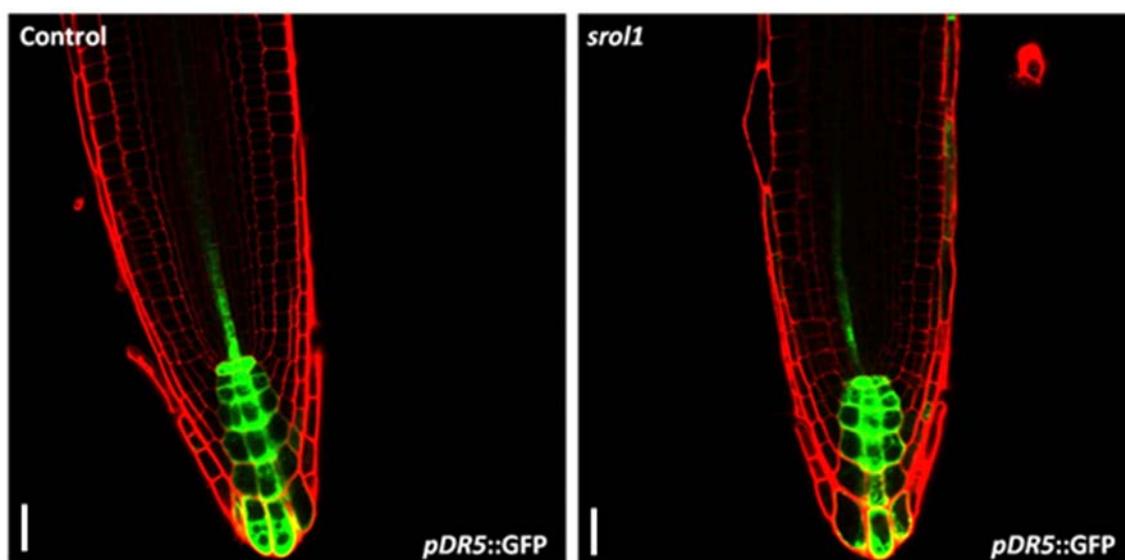


Figura 54. Imágenes a microscopía confocal, de la expresión *pDR5::GFP* (verde) en el meristemo apical de la raíz principal, teñida con ioduro de propidio (rojo), de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días (n = 12). Barras = 25  $\mu$ m.

### **Transporte polar de auxina en el meristemo apical de la raíz de *srol1***

Para comprobar si *srol1* presentaba algún defecto en el transporte polar de auxina en el meristemo apical, se realizaron una serie de cruces del mutante con algunos marcadores de transportadores de AIA. Estos fueron AUX1:YFP (Figura 55A) (Swarup *et al.*, 2004), *pPIN1::PIN1:GFP* (Figura 55B) (Benková *et al.*, 2003), PIN2:GFP (Figura 55C) (Xu y Scheres, 2005), *pPIN3::PIN3:GFP* (Figura 55D) (Zádníková *et al.*, 2010) y *pPIN4::PIN4:GFP* (Figura 55E) (Blilou *et al.*, 2005).

Mediante microscopía confocal, se analizó la expresión de los diferentes transportadores de auxina en el meristemo apical de la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca. El mutante solo presentó diferencias

con respecto al control en la localización de PIN4, ya que no se observó expresión alguna de este transportador en las células por debajo del centro quiescente (Figura 55E). En *srol1* tampoco se apreciaron diferencias comparado con el control en cuanto a los procesos de reciclaje de los transportadores PIN analizados (ampliación en la Figura 55B).

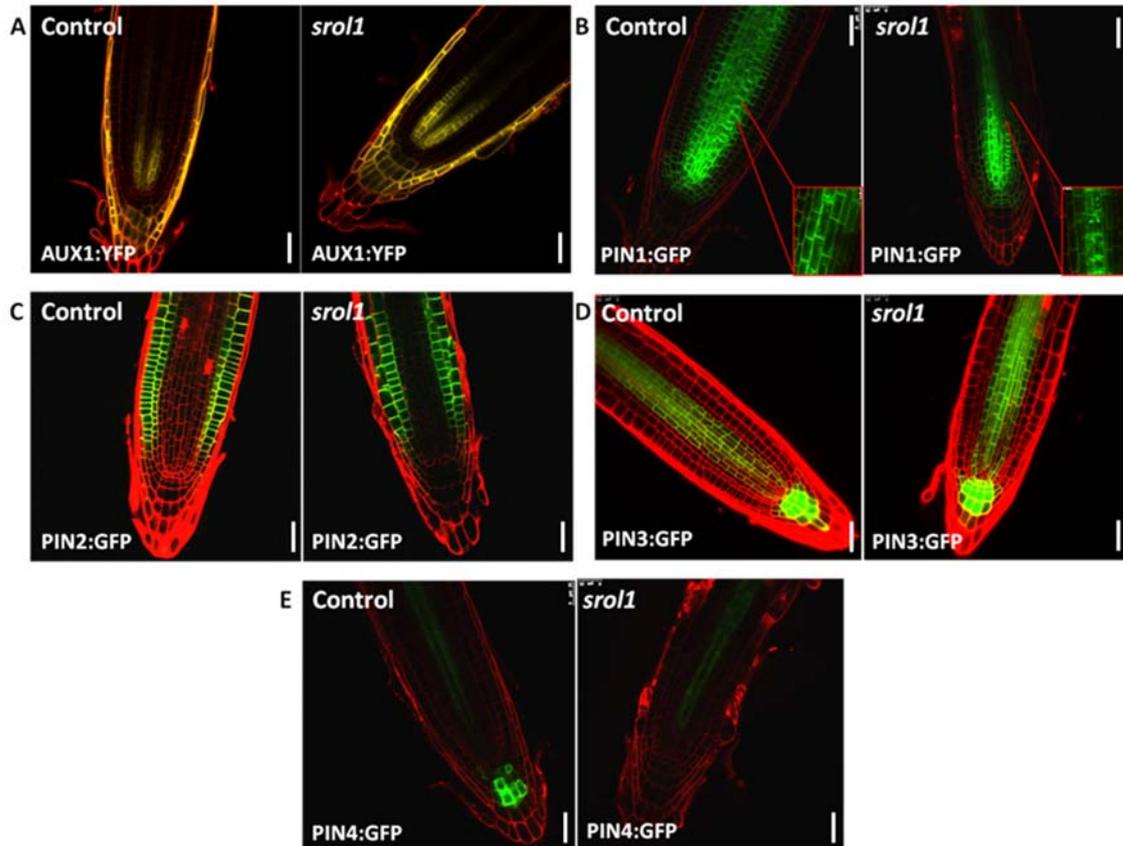


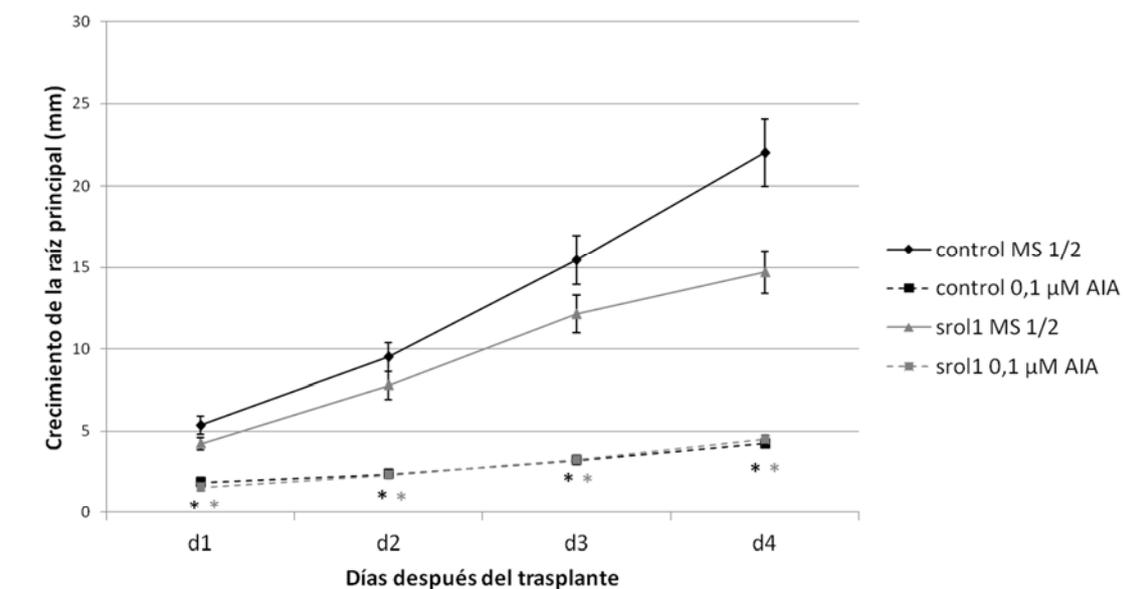
Figura 55. Imágenes a microscopía confocal de la expresión de los transportadores de auxina AUX1 (A) (amarillo), PIN1 (B), PIN2 (C), PIN3 (D) y PIN4 (E) (verde) en el meristemo apical de la raíz principal, teñida con yoduro de propidio (rojo), de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días (n = 10). Barras = 25  $\mu$ m.

### Tratamientos hormonales

Para analizar el efecto de diferentes hormonas en el crecimiento de la raíz principal de *srol1*, se germinaron plantas control y mutante en medio sin hormona, se trasplantaron, a los tres días después de la germinación, a medios frescos sin y con diferentes concentraciones de AIA, quinetina (Kin), ácido abscísico (ABA), el precursor de etileno ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), brasinoesteroides (BRs) o ácido jasmónico (JA), y se realizó un seguimiento de la dinámica de crecimiento de la

raíz durante los cuatro días siguientes al trasplante. Diariamente, se calculó el incremento producido en la longitud de la raíz principal, y se halló el porcentaje de inhibición con respecto a las condiciones sin hormona para dar una información temporal en lugar de al final del proceso.

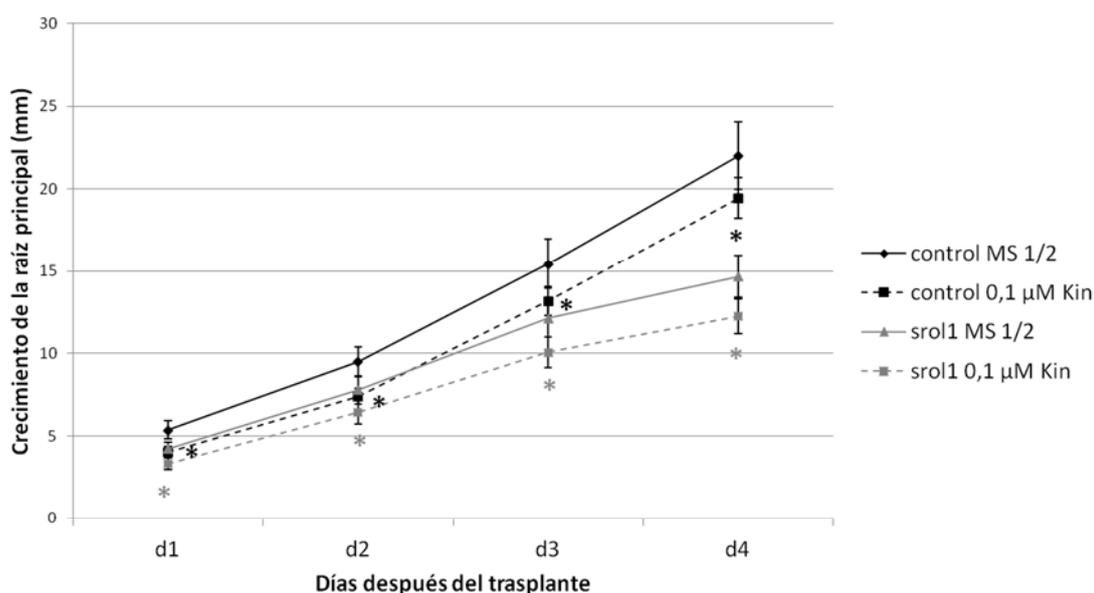
El tratamiento con 0,1  $\mu$ M de auxina, produjo una fuerte inhibición del crecimiento de la raíz principal tanto en el control como en *srol1*, con respecto a las condiciones sin hormona (Figura 56). En ambos genotipos, el efecto inhibitorio del crecimiento fue máximo dos días después del trasplante, aunque en el mutante fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) con respecto a las plantas control (Figura 56). Dicha inhibición se mantuvo relativamente constante hasta el final del tratamiento en el control; sin embargo, en *srol1*, disminuyó con el tiempo, incrementándose las diferencias existentes con respecto a las plantas control (Figura 56).



% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
control	65,15	88,03	85,50	84,27
<i>srol1</i>	63,21	78,79	78,39	50,33
p-value	0,25	<b>3,40E-08</b>	<b>6,50E-05</b>	<b>1,68E-20</b>

Figura 56. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS  $\frac{1}{2}$  y trasplantadas a medio fresco con o sin 0,1  $\mu$ M de AIA al tercer día después de la germinación ( $n = 20$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ) entre el mutante y el control.

El tratamiento con 0,1  $\mu\text{M}$  de Kin redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz principal tanto en el control como en *srol1* (Figura 57) con respecto a las condiciones sin hormona. El primer día después del trasplante, se produjo una inhibición máxima del crecimiento de la raíz en ambos genotipos (Figura 57). Dicho efecto inhibitorio fue reduciéndose con el tiempo en las plantas control, llegando a desaparecer a partir del tercer día después del trasplante; sin embargo, en *srol1*, se mantuvo relativamente constante hasta el final del tratamiento, apreciándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), con respecto al control, desde los tres días después del trasplante en adelante (Figura 57).

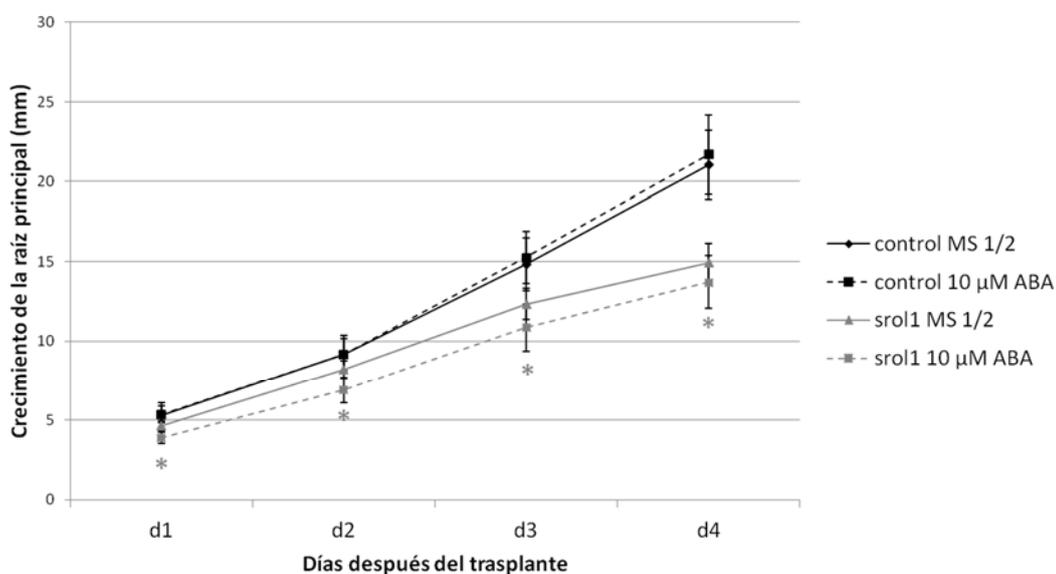


% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
control	24,69	18,90	2,83	4,35
<i>srol1</i>	21,45	12,11	16,77	14,22
p-value	0,28	0,21	<b>0,0003</b>	<b>0,004</b>

Figura 57. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS  $\frac{1}{2}$  y trasplantadas a medio fresco con o sin 0,1  $\mu\text{M}$  de Kin al tercer día después de la germinación ( $n = 20$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ) entre el mutante y el control.

El tratamiento con 10  $\mu\text{M}$  de ABA no afectó al crecimiento de la raíz principal del control, con respecto a las condiciones sin hormona; sin embargo, en *srol1*, redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz (Figura 58). Se inhibió el crecimiento al primer y segundo día después del trasplante, observándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a las plantas control (Figura

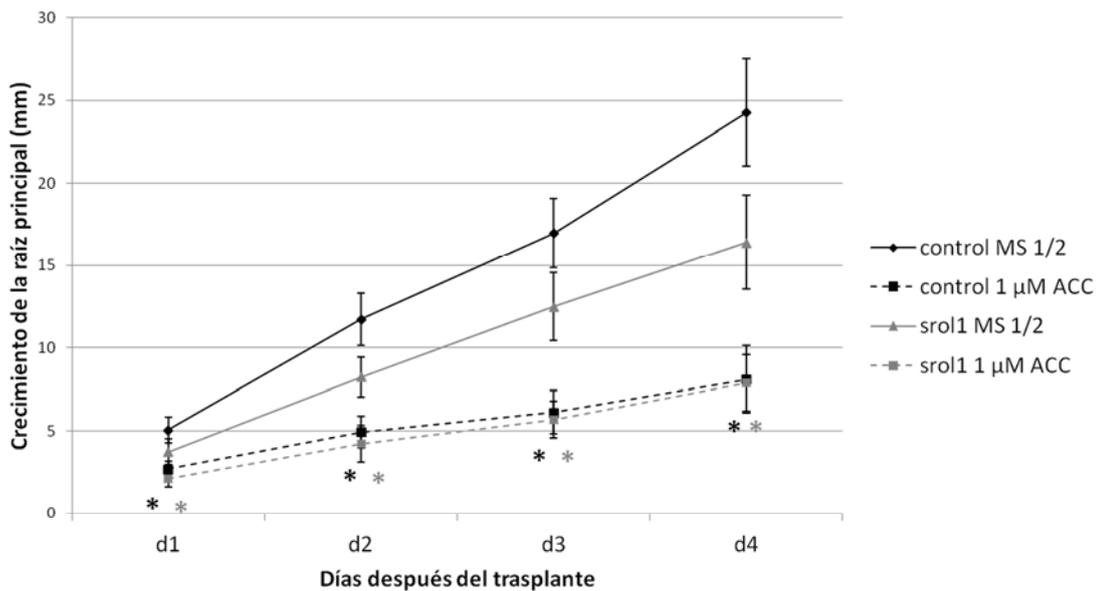
58). Este efecto inhibitorio fue reduciéndose con el tiempo, llegando a desaparecer a partir del tercer día de tratamiento (Figura 58).



% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
<b>control</b>	-1,24	1,95	-7,67	-3,39
<b>srol1</b>	16,17	15,71	4,29	-10,32
p-value	<b>6,19E-05</b>	<b>0,03</b>	0,07	0,25

Figura 58. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS ½ y trasplantadas a medio fresco con o sin 10 μM de ABA al tercer día después de la germinación (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05). Las barras de error indican DESVPROM. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05) entre el mutante y el control.

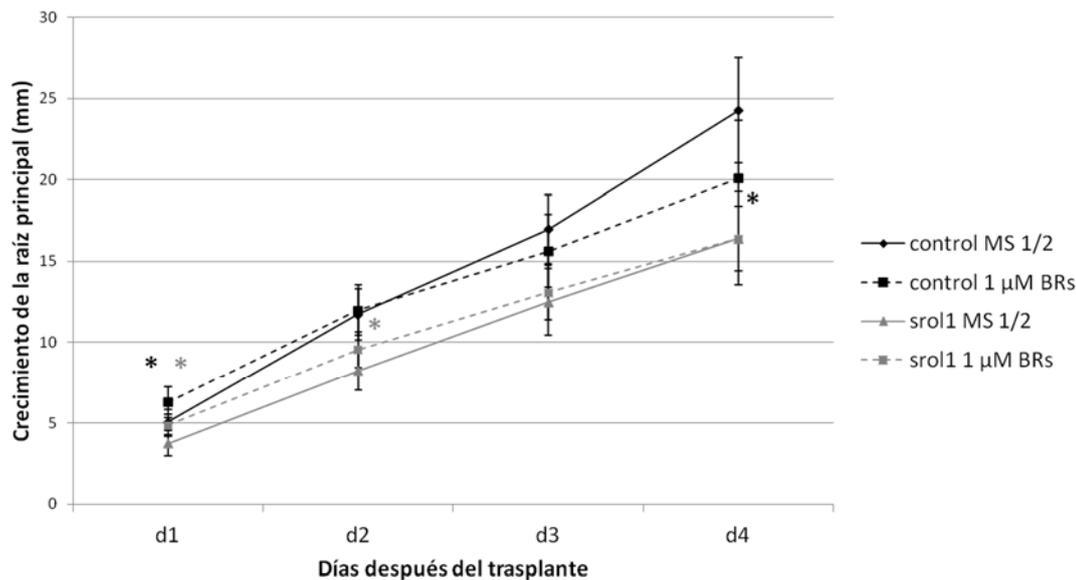
El tratamiento con 1 μM de ACC redujo significativamente (p < 0,05) el crecimiento de la raíz principal tanto en el control como en *srol1*, con respecto a las condiciones sin hormona (Figura 59). En ambos genotipos, el efecto inhibitorio del crecimiento fue máximo tres días después del trasplante, manteniéndose relativamente constante hasta el final del tratamiento en el control; sin embargo, en *srol1*, este efecto fue reduciéndose con el tiempo, llegando a ser significativamente menor (p < 0,05) con respecto al control, el cuarto día después del trasplante (Figura 59).



% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
control	46,63	66,64	77,22	72,92
srol1	43,04	53,37	65,87	43,67
p-value	0,46	0,08	0,06	<b>0,001</b>

Figura 59. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS  $\frac{1}{2}$  y trasplantadas a medio fresco con o sin 1  $\mu$ M de ACC al tercer día después de la germinación (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPRM. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ) entre el mutante y el control.

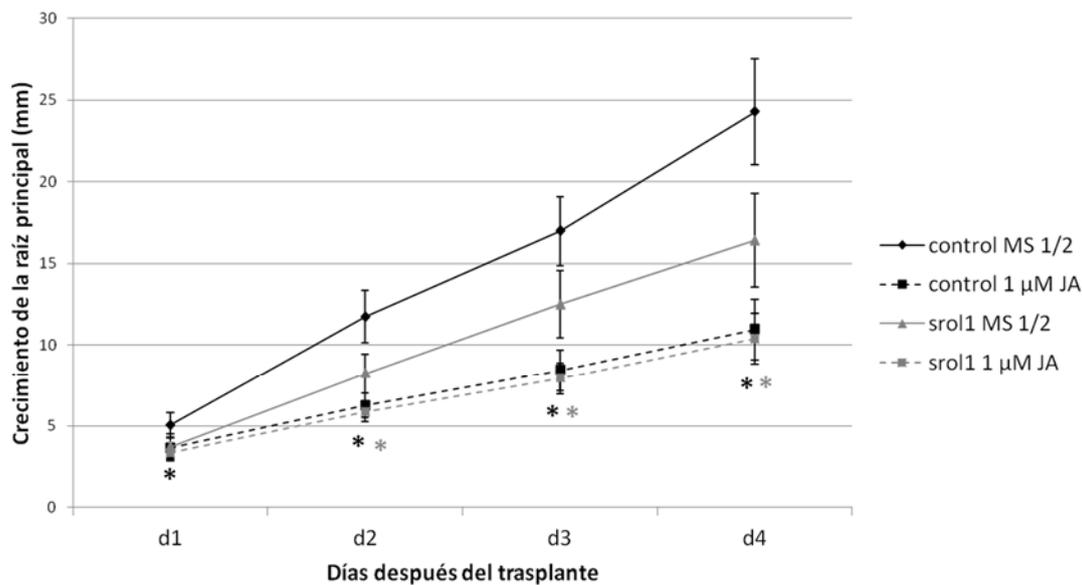
El tratamiento con 1  $\mu$ M de BRs redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz principal en el control, con respecto a las condiciones sin hormona; sin embargo, en *srol1*, no se produjo el mismo efecto (Figura 60). El primer día después del trasplante, se favoreció significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz en ambos genotipos y el efecto inhibitorio comenzó a observarse, en las plantas control, dos días después del trasplante, y un día más tarde en el mutante (Figura 60). En el control, este efecto fue incrementándose con el tiempo, siendo máximo el último día del tratamiento; sin embargo, en *srol1*, alcanzó el máximo valor tres días después del trasplante, manteniéndose relativamente constante hasta el final del tratamiento. De esta manera, la inhibición del crecimiento fue significativamente menor en el mutante con respecto al control, al cuarto día del trasplante (Figura 60).



% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
control	-24,64	14,03	30,43	38,43
srol1	-30,07	-4,39	18,23	15,24
p-value	0,43	<b>0,007</b>	0,26	<b>0,02</b>

Figura 60. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS ½ y trasplantadas a medio fresco con o sin 1 μM de BRs al tercer día después de la germinación (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05). Las barras de error indican DESVPROM. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05) entre el mutante y el control.

El tratamiento con 1 μM de JA redujo significativamente (p < 0,05) el crecimiento de la raíz principal tanto en el control como en *srol1*, con respecto a las condiciones sin hormona (Figura 61). En las plantas control, el efecto inhibitorio del crecimiento fue incrementándose con el tiempo, alcanzando el máximo valor el último día del tratamiento; sin embargo, en *srol1*, este efecto fue máximo tres días después del trasplante y se redujo el último día. Durante todo el tratamiento, la inhibición del crecimiento fue significativamente menor (p < 0,05) en el mutante con respecto a las plantas control (Figura 61).



% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
control	27,69	60,86	58,76	65,33
srol1	8,93	43,78	51,37	35,75
p-value	<b>0,001</b>	<b>0,0002</b>	0,20	<b>0,0001</b>

Figura 61. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS ½ y trasplantadas a medio fresco con o sin 1 μM de JA al tercer día después de la germinación (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05). Las barras de error indican DESVPROM. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05) entre el mutante y el control.

### **Análisis transcriptómico en luz blanca/amarilla del control vs. *srol1***

Para comprender el efecto de la mutación *srol1* en el crecimiento de la raíz principal, se llevó a cabo un análisis transcriptómico para comparar la expresión génica en la raíz del control y el mutante. Se seleccionaron los genes que estuvieran más de 2 veces sobre-expresados o reprimidos en el mutante con respecto al control en ambas condiciones de crecimiento (*p-value* < 0,05) (Anexo Tablas XV-XVIII) y en cada genotipo en luz blanca con respecto a la luz amarilla (Anexo Tablas XIX-XXII). Usando estos parámetros, se identificaron más de 600 genes que estaban enriquecidos y más de 800 genes que disminuían su expresión específicamente en la raíz de *srol1* con respecto al control en condiciones de luz blanca. Los cambios más significativos se encontraron en genes relacionados con respuesta a estrés, actividad hidrolasa, transporte floemático, dinámica del citoesqueleto, respuesta a jasmonato,

actividad cloroplástica, factores de transcripción y homeostasis de calcio, hierro o pH (Anexo Figuras 2 y 3).

### ***sro1* muestra mayor resistencia al tratamiento con ácido jasmónico**

Debido a la gran cantidad de genes relacionados con respuesta a jasmonato sobre-expresados específicamente en la raíz de *sro1* en condiciones de luz blanca con respecto al control (Anexo Figura 2), se llevó a cabo un análisis del desarrollo del sistema radicular del mutante en presencia de esta hormona en el medio. Para ello, se crecieron plantas control y *sro1* en condiciones de luz blanca, germinadas directamente en concentraciones crecientes de JA (0, 0,1, 1 y 5  $\mu$ M), y se cuantificó la longitud de la raíz principal y los PRLs y RLs emergidas por milímetro de raíz. Tanto en el control como en el mutante, el tratamiento tuvo un efecto significativamente negativo ( $p < 0,05$ ) con respecto a las condiciones sin JA, y dependiente de la concentración de hormona, en la longitud de la raíz principal (Figura 62A); sin embargo, la inhibición del crecimiento fue significativamente menor en *sro1* comparado con el control, sobre todo a concentraciones mayores (Figura 62B), indicando que el mutante fue mucho más resistente al tratamiento. Mediante una tinción histoquímica para la actividad GUS, se analizó la expresión del marcador *pSKP2B::GUS* y se comprobó que, tanto en las plantas control como mutantes, el número total de PRLs y RLs emergidas por milímetro de raíz principal aumentó significativamente y de una manera dependiente de la concentración de JA, con respecto a las condiciones sin hormona (Figura 62C); pero este aumento fue significativamente menor en *sro1* comparado con el control, especialmente a concentraciones mayores. En ambos casos, el incremento en la densidad fue debido a la disminución de la longitud de la raíz principal y a un mayor número de PRLs y RLs. Bajo el tratamiento con 5  $\mu$ M de JA, no se llegó a producir ninguna ramificación lateral.

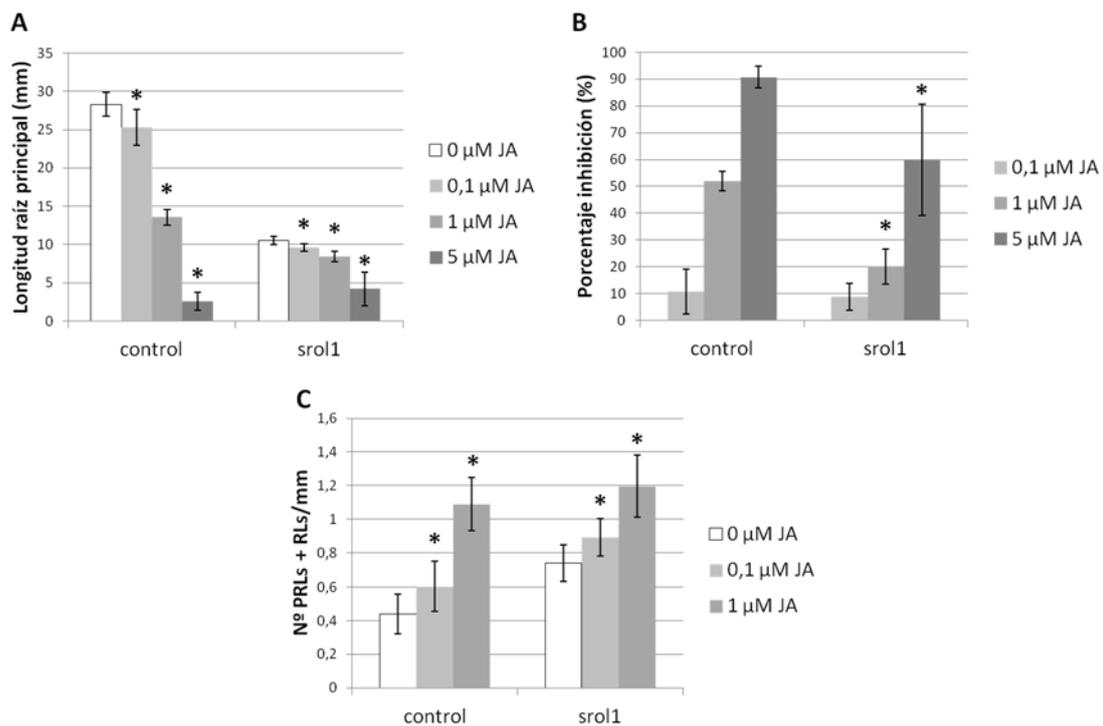


Figura 62. A) Longitud de la raíz principal (mm), B) porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz principal y C) número total de PRLs y RLs por milímetro de raíz en plantas control y *srol1* germinadas directamente en concentraciones crecientes de JA (0, 0,1, 1 y 5  $\mu\text{M}$ ) y crecidas en condiciones de luz blanca durante 8 días ( $n = 15$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

### ***srol1* muestra mayores niveles de ROS en el meristemo radicular**

Debido a la gran cantidad de genes relacionados con respuesta a ROS y estrés sobre-expresados específicamente en la raíz del mutante en condiciones de luz blanca con respecto al control (Anexo Figura 2), se llevó a cabo un análisis de la producción de ROS (del inglés, *Reactive Oxygen Species*) en el meristemo apical y en la zona de elongación de la raíz principal de *srol1*. Las ROS son moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno, como el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ) y el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Se forman como producto del metabolismo normal del oxígeno y desempeñan funciones importantes en la señalización y homeostasis celulares. Sin embargo, ante un estrés ambiental (por ejemplo, exposición a UV o calor), los niveles de ROS pueden incrementarse dramáticamente y esto puede resultar en daños significativos en las estructuras celulares, lo que se conoce como estrés oxidativo. Existen muchos métodos para medir la producción de radicales libres en las células, entre ellos la 5-[6]-Diacetato Carboxifluoresceína (5[6]-

CFDA) (Carmody y Cotter, 2000; Tammariello *et al.*, 2000; Ottonello *et al.*, 2001). La 5[6]-CFDA es una molécula no fluorescente y permeable a la célula. Esterasas intracelulares la hidrolizan a carboxifluoresceína (CF) en presencia de peróxido de hidrógeno que, por sus cargas negativas extra, es retenida en la célula. La acumulación de CF en las células se puede medir por un incremento en la fluorescencia (rango excitación/emisión 485/530 nm) proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno en las mismas (Bass *et al.*, 1983).

Para ello, se crecieron plantas control y *srol1* en condiciones de luz blanca, bajo un filtro amarillo y en oscuridad (utilizando el dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivos *in vitro* (Silva-Navas *et al.*, sin publicar) (Material y Métodos Figura 24). Al quinto día después de la germinación, se añadió al meristemo apical una gota de CFDA y se observaron los niveles de ROS al cabo de las 2 horas de la adición. En luz blanca, el mutante presentó unos niveles de ROS significativamente mayores con respecto al control; sin embargo, estas diferencias desaparecieron cuando *srol1* creció tanto en luz amarilla como en oscuridad (Figura 63A y B). Pero cabe destacar que, tanto el control como el mutante, mostraron una intensidad de fluorescencia significativamente mayor en las raíces crecidas en oscuridad con respecto a las que lo hicieron en luz amarilla. Y, en todos los casos, la producción de ROS fue más elevada en la zona de elongación que en el meristemo apical (Figura 63A y B). Se comprobó que sin añadir CFDA al meristemo no se visualizó ninguna señal fluorescente (Figura 63A).

El L-ácido ascórbico (AsA) o vitamina C se considera uno de los mayores antioxidantes presentes en las plantas, ya que contribuye al estado redox celular (Foyer *et al.*, 1983). El AsA elimina la toxicidad de las ROS generadas para proteger a la célula del daño oxidativo. De esta manera, el AsA es importante para determinar el nivel de tolerancia a muchos estreses ambientales, como la alta intensidad de luz. También es un cofactor involucrado en la síntesis de ácido abscísico (Qin y Zeevaart, 1999), ácido giberélico (Lange, 1994; Hedden y Kamiya, 1997; Arrigoni y De Tullio, 2002) y antocianinas (Britsch *et al.*, 1990; 1993; Holton *et al.*, 1993). Y además, participa en la regulación de la elongación celular y la progresión a través del ciclo celular (Smirnov, 1996; Horemans *et al.*, 2000).

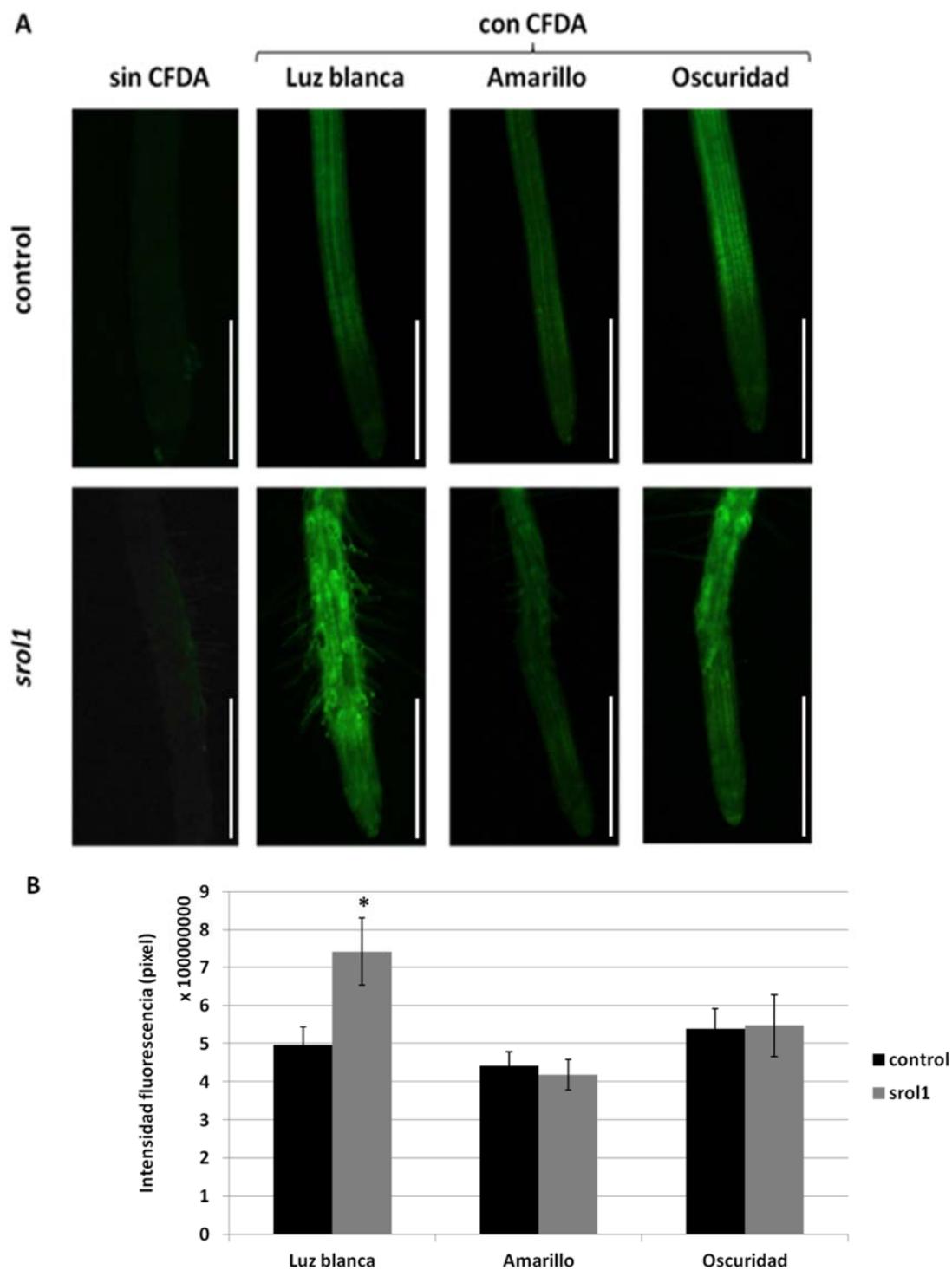
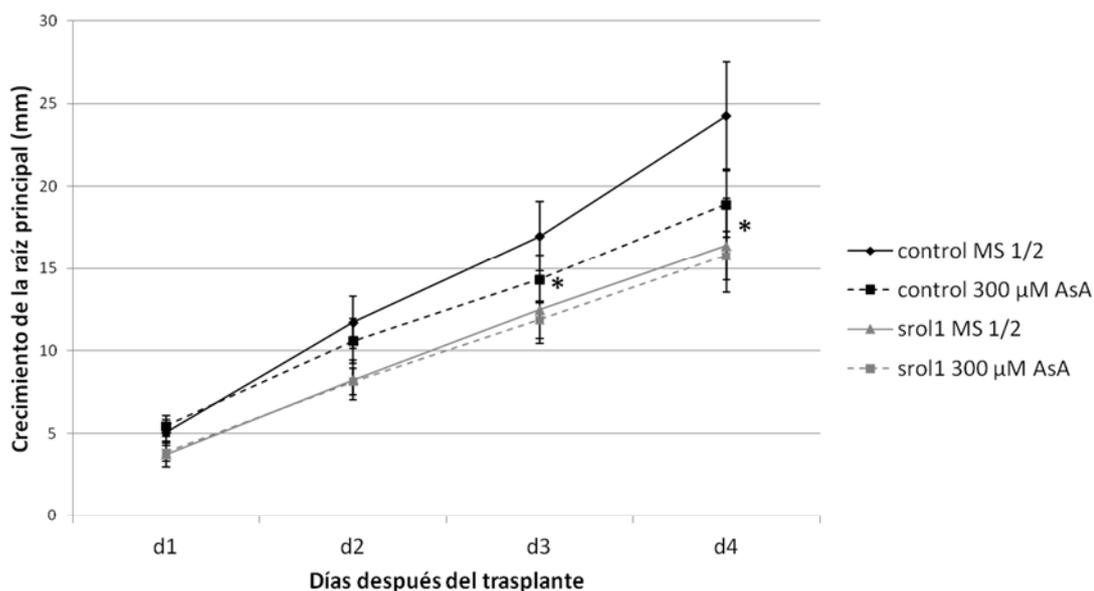


Figura 63. A) Imágenes a la lupa binocular de fluorescencia del meristemo apical y de la zona de elongación de la raíz principal, tras 2 horas de la adición o no de CFDA al meristemo, de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca, amarilla y oscuridad (utilizando el dispositivo para el crecimiento de raíces en cultivos *in vitro*) durante 5 días. Barras = 200  $\mu$ m. B) Intensidad (pixel) de la fluorescencia detectada (n = 12) \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas mediante la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

Debido al hecho de que, en luz blanca, *srol1* presentó una producción de ROS significativamente mayor con respecto al control (Figura 63), se analizó el efecto del ácido ascórbico en el crecimiento de la raíz principal del mutante. Para ello, se germinaron plantas control y *srol1* en medio sin antioxidante y se trasplantaron a un medio sin y con un suplemento de 300  $\mu\text{M}$  de AsA a los tres días después de la germinación. Se realizó un seguimiento de la dinámica de crecimiento de la raíz durante los cuatro días siguientes al trasplante. El tratamiento con AsA redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz principal en el control, con respecto a las condiciones sin antioxidante; sin embargo, en el mutante, no tuvo ningún efecto (Figura 64). En las plantas control, la inhibición del crecimiento de la raíz se produjo dos días después del trasplante, incrementándose, de una manera dependiente del tiempo, hasta alcanzar un valor máximo de inhibición el último día de tratamiento (Figura 64). Sin embargo, el ácido ascórbico no causó efecto significativo alguno en el crecimiento de la raíz de *srol1*, observándose diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), con respecto a las plantas control, a partir del segundo día después del trasplante (Figura 64).



% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
control	-7,94	23,04	28,38	37,49
<i>srol1</i>	-3,51	4,26	10,12	-1,10
p-value	0,45	<b>0,0008</b>	<b>0,01</b>	<b>1,55E-06</b>

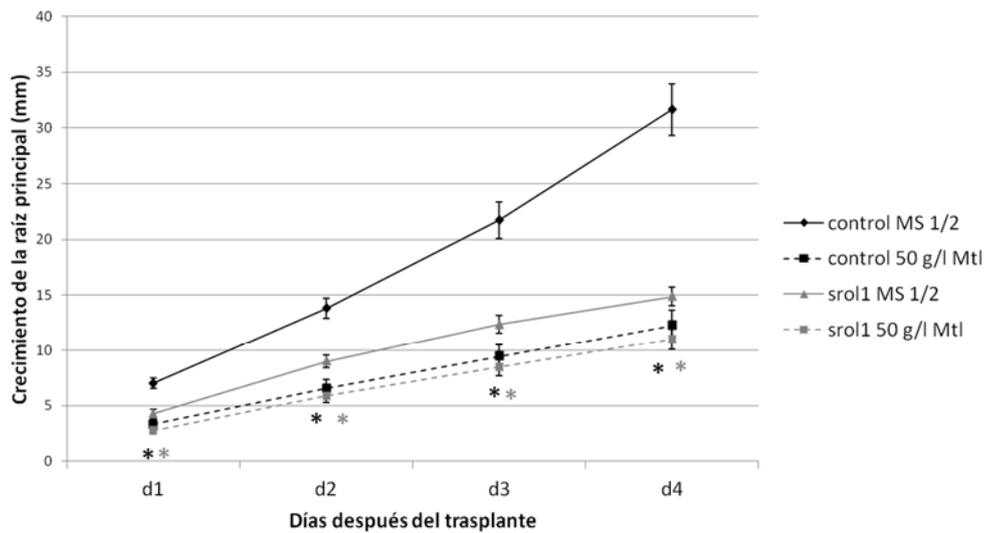
Figura 64. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS  $\frac{1}{2}$  y trasplantadas a medio fresco con o sin 300  $\mu\text{M}$  de AsA al tercer día después de la germinación ( $n = 20$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento

de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ) entre el mutante y el control.

Como se comentó anteriormente, muchos estreses abióticos inducen la producción de ROS. Para estudiar el efecto del estrés en el crecimiento de la raíz principal de *srol1*, se analizó el resultado del estrés osmótico y salino. En las plantas *in vitro*, se usan aproximaciones experimentales basadas en la adición de compuestos al medio de cultivo. La sequía, por ejemplo, se simula añadiendo al medio manitol, sorbitol o polietilenglicol (Verslues *et al.*, 2006). De igual manera, se añade NaCl al medio para exponer a las plantas a estrés salino, que es una combinación de estrés osmótico y toxicidad de Na<sup>+</sup> (Munns y Tester, 2008). Por ello, se germinaron plantas control y mutante en medio MS, se trasplantaron a un medio fresco sin y con 50 g/l de manitol (Mtl) o 100mM de NaCl a los tres días después de la germinación y se realizó un seguimiento de la dinámica de crecimiento de la raíz durante los cuatro días siguientes al trasplante.

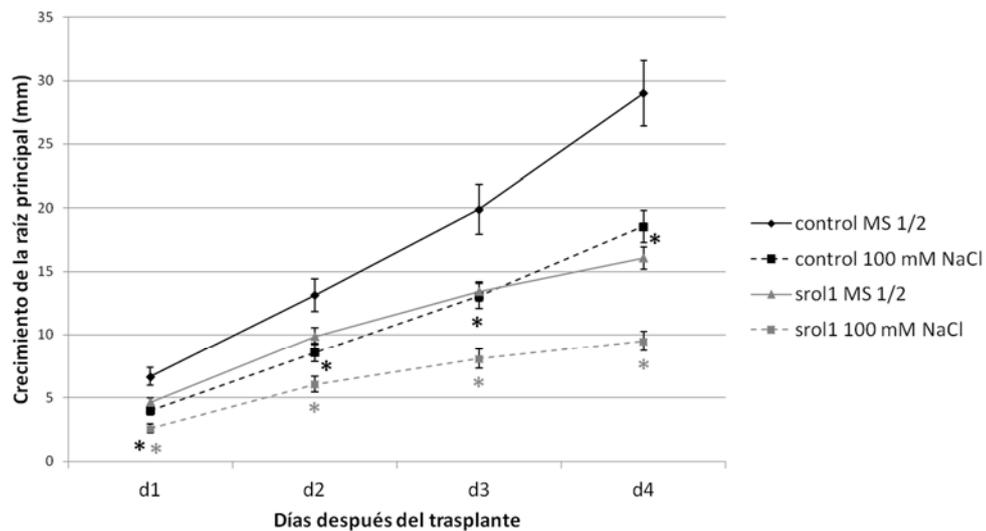
El estrés osmótico producido por el Mtl redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz principal tanto en el control como en *srol1*, con respecto a las condiciones estándar (Figura 65). El efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz fue significativamente menor en el mutante con respecto a las plantas control (Figura 65). A partir del segundo día de tratamiento, dicho efecto se incrementó con el tiempo en el control, siendo máximo cuatro días después del trasplante; sin embargo, en *srol1*, se redujo con el tiempo, llegando a desaparecer por completo el último día de tratamiento (Figura 65). Esto hizo que las diferencias observadas entre el crecimiento experimentado por la raíz de las plantas control y mutante se incrementaran con el tiempo.

Por otro lado, el estrés salino generado por el NaCl, también redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz principal tanto en el control como en *srol1*, con respecto a las condiciones estándar (Figura 66). En ambos genotipos, el efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz fue mínimo dos días después del trasplante y se fue incrementando a lo largo del tiempo (Figura 66). Este incremento fue significativamente mayor en *srol1* con respecto al control, siendo máximo, en ambos casos, el último día de tratamiento (Figura 66).



% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
control	52,33	52,90	63,43	71,59
srol1	35,18	34,61	22,16	-2,23
p-value	<b>6,36E-07</b>	<b>4,43E-05</b>	<b>6,27E-11</b>	<b>8,42E-20</b>

Figura 65. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS ½ y trasplantadas a medio fresco con o sin 50 g/l de Mtl al tercer día después de la germinación (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05). Las barras de error indican DESVPROP. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05) entre el mutante y el control.



% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
control	39,82	29,41	33,27	40,00
srol1	44,76	33,17	43,10	47,28
p-value	0,10	0,19	<b>0,01</b>	<b>0,05</b>

Figura 66. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS ½ y trasplantadas a medio fresco con o sin 100 mM de NaCl al tercer día después de la germinación (n = 20). \*, diferencias

estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ) entre el mutante y el control.

### **El transporte floemático está alterado en *srol1***

Debido a la gran cantidad de genes relacionados con el transporte floemático reprimidos específicamente en la raíz del mutante en condiciones de luz blanca con respecto al control (Anexo Figura 3), se llevó a cabo un análisis de la funcionalidad del floema en la raíz de *srol1*. Para ello, el mutante se cruzó con el marcador de transporte floemático *pSUC2::GFP* (Imlau *et al.*, 1999). El floema es el tejido conductor encargado del transporte de nutrientes orgánicos e inorgánicos (especialmente azúcares) producidos en la parte aérea fotosintética y autótrofa, hacia el resto de la planta y *SUC2* (*SUCROSE-H<sup>+</sup>SYMPORTER 2*) es el principal transportador de sacarosa por el floema. En las plantas transgénicas *pSUC2::GFP*, la GFP, bajo la expresión del promotor de *SUC2*, se transporta pasivamente a través de los plasmodesmos del floema desde la parte aérea de la planta hasta el meristemo apical de la raíz principal (Imlau *et al.*, 1999).

Se crecieron plantas control y *srol1* en condiciones de luz blanca y se analizó la señal de la GFP a lo largo de la raíz principal, incluido el meristemo apical. Se comprobó que la funcionalidad del floema no estaba afectada en el mutante, ya que la señal GFP llegaba con normalidad al meristemo apical (Figura 67).

De este modo, para comprobar si *srol1* presentaba algún defecto en cuanto a la velocidad de transporte floemático, se crecieron plantas control y mutante en condiciones de luz blanca y, al quinto día después de la germinación, se añadió una gota de CFDA en la cara abaxial de un cotiledón de las plántulas (Oparka *et al.*, 1994). La CFDA, al ser una molécula de pequeño tamaño, se transporta pasivamente a través de los plasmodesmos del floema y, debido a su capacidad para emitir fluorescencia al oxidarse a CF, dicho transporte puede visualizarse a lo largo del tiempo. Se observó que la señal fluorescente alcanzó el meristemo apical de la raíz principal de las plantas control a los 30 minutos después de la adición; sin embargo, en las plantas *srol1* lo hizo transcurridas 2 horas (Figura 68). Teniendo en cuenta que la raíz principal del control tenía una longitud de  $20,34 \pm 2,48$  mm ( $n = 15$ ) y la del mutante  $6,51 \pm 0,93$  mm ( $n = 15$ ), la velocidad de transporte floemático fue de  $0,68 \pm$

0,08 mm/min y  $0,05 \pm 0,01$  mm/min respectivamente, trece veces menor en *srol1* con respecto al control.

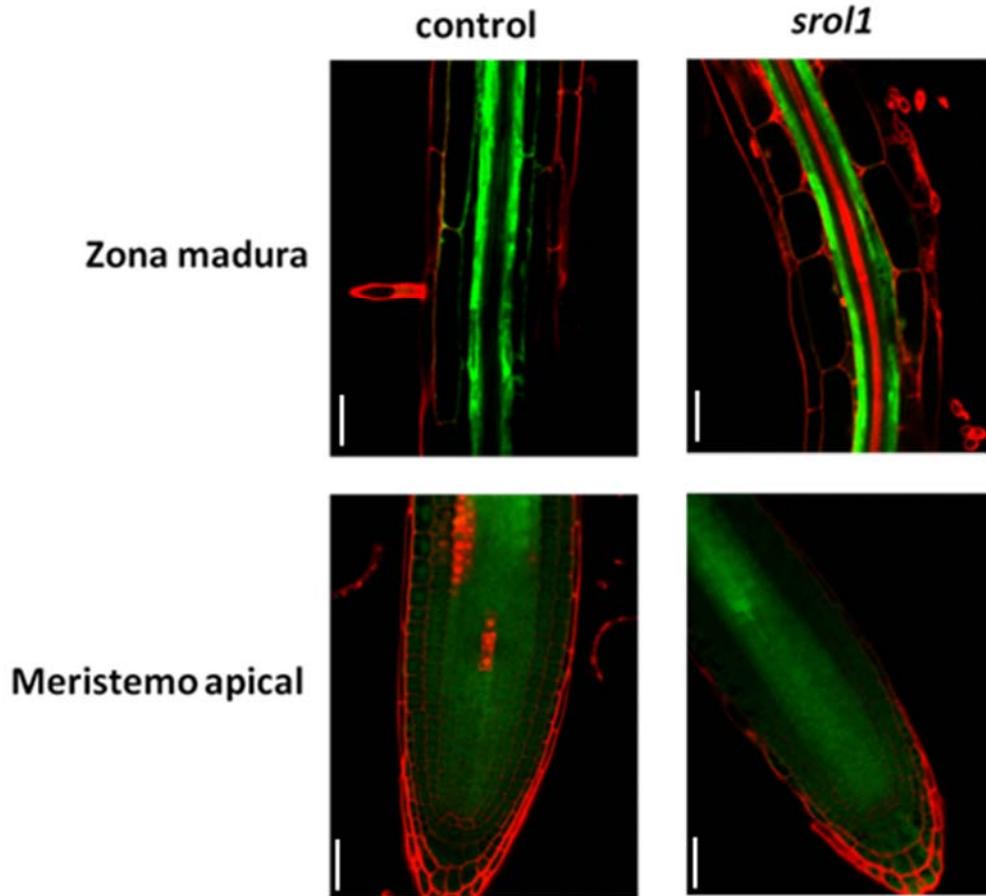


Figura 67. Imágenes a microscopía confocal, de la movilidad de la GFP por el floema, bajo la expresión del promotor de *SUC2* (*pSUC2::GFP*) (verde), a lo largo de la raíz principal hasta el meristemo apical, de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días y teñidas con yoduro de propidio (rojo) (n = 10). Barras = 25  $\mu$ m.

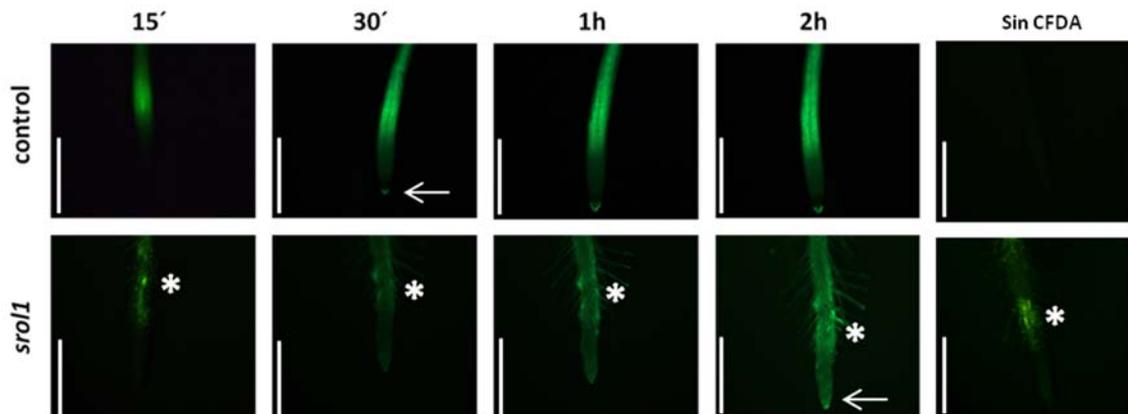


Figura 68. Imágenes a la lupa binocular de fluorescencia del transporte de CFDA, a través del floema y a lo largo de las 2 horas después de su adición, desde la parte aérea hacia el meristemo apical de la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días. Como control se muestran raíces sin la adición de CFDA

(n = 12). Las flechas blancas indican la llegada de CFDA a la cofia. Los asteriscos indican la autofluorescencia dispersa en el sistema radicular de *srol1*. Barras = 200  $\mu$ m.

### ***srol1* afecta a la dinámica del citoesqueleto**

El citoesqueleto es una red intracelular tridimensional y dinámica de proteínas que mantiene la forma y el tamaño de la célula y desempeña una función importante en el tráfico intracelular de vesículas y orgánulos, y en la división celular. En las células vegetales, consta de filamentos de actina, filamentos intermedios y microtúbulos. Los filamentos de actina están formados por una proteína globular llamada actina y los microtúbulos son estructuras tubulares constituidas por la polimerización de un dímero de proteínas globulares, la  $\alpha$  y la  $\beta$  tubulina. Debido a la gran cantidad de genes relacionados con la dinámica del citoesqueleto sobreexpresados específicamente en la raíz de *srol1* en condiciones de luz blanca con respecto al control (Anexo Figura 2), se llevó a cabo un análisis de la organización de algunos de sus componentes en las células de la raíz del mutante. Para ello, se cruzó *srol1* con algunos marcadores de filamentos de actina, como 35S::GFP-ABD2-GFP (Wang *et al.*, 2008) y de microtúbulos, como GFP-MBD (Marc *et al.*, 1998). ABD2 (*Actin Binding Domain 2*) es el dominio de unión a actina de la fimbrina (una proteína que se une a actina para formar la red de filamentos de actina); y MBD (*Microtubule Binding Domain*) es el dominio de unión a microtúbulos de MAP4 (*Microtubule-Associated Protein 4*).

Se analizó la expresión de los diferentes marcadores en las células de la corteza de la zona madura de la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca. La expresión de la GFP, bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y fusionada al ABD2, mostró que en las plantas control los filamentos de actina se extienden por todo el citoplasma de la célula; sin embargo, en el mutante se encuentran desorganizados y en la mayor parte de las células se concentran alrededor del núcleo, como se pudo comprobar por la tinción con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) (Figura 69A y B).

Al observar la expresión del marcador GFP-MBD, se comprobó que, en la zona madura de la raíz principal de las plantas control, los microtúbulos se disponían oblicuamente al eje longitudinal de las células de la corteza; sin embargo, en la mayor parte de las células corticales de la raíz del mutante *srol1*, estos elementos del

citoesqueleto se encontraban más dispersos y, en consecuencia, más desorganizados que en el control (Figura 70).

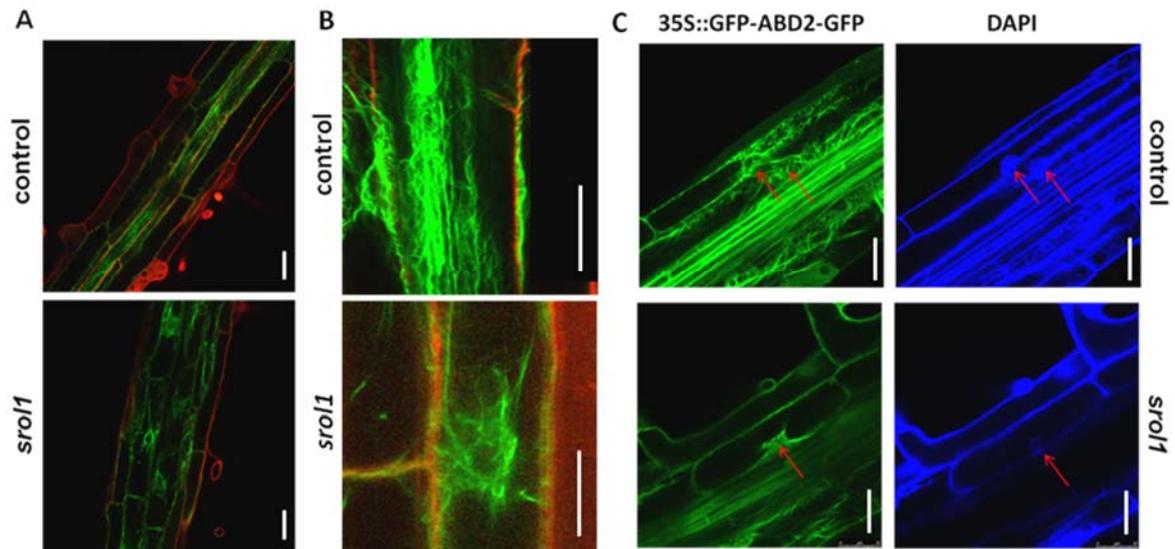


Figura 69. A) Imágenes a microscopía confocal, de la expresión 35S::GFP-ABD2-GFP (verde) en las células de la corteza de la zona madura de la raíz principal, teñida con yoduro de propidio (rojo), de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días (n = 10). B) Ampliación de las células de la corteza. C) Las flechas rojas señalan los núcleos teñidos con DAPI. Barras = 25 μm.

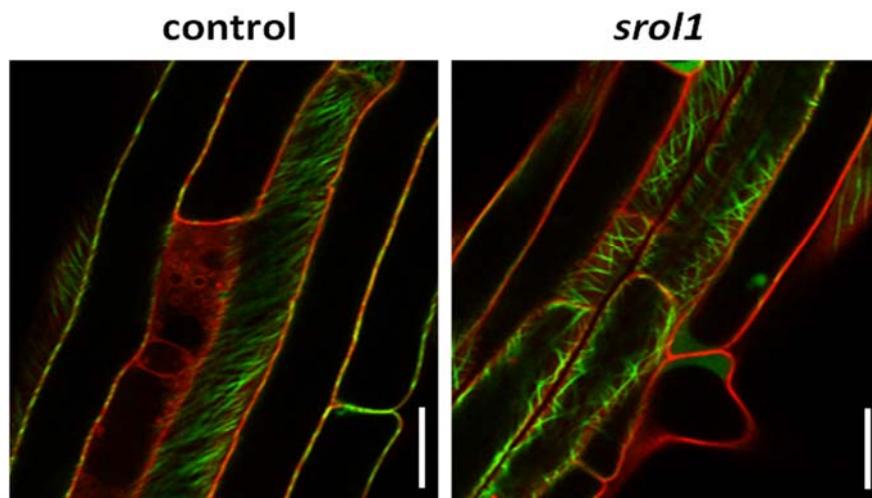


Figura 70. Imágenes a microscopía confocal de la expresión GFP-MBD (verde) en las células de la corteza de la zona madura de la raíz principal, teñida con yoduro de propidio (rojo), de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca durante 5 días (n = 10). Barras = 25 μm.

### **Efecto del hierro en el desarrollo del sistema radicular de *srol1***

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para las plantas. Actúa como cofactor en una gran variedad de procesos biológicos necesarios para la función, crecimiento y desarrollo de las células (Beinert *et al.*, 1997; Massé y Arguin, 2005). La transición entre dos estados redox, ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), mediante la ganancia o pérdida de un electrón, es una característica fundamental en las cadenas de transferencia de electrones de la fotosíntesis y la respiración (Kobayashi y Nishizawa, 2012; Thomine y Vert, 2013). Consecuentemente, la deficiencia de Fe resulta en una gran cantidad de efectos adversos en las plantas. Sin embargo, al tratarse de un metal pesado, es extremadamente reactivo y puede llegar a ser tóxico a altas concentraciones cuando se presenta de forma libre; además, la concentración intracelular de este metal esencial debe estar altamente regulada (Palmer y Guerinot, 2009; Mendoza-Cózatl *et al.*, 2011; Kobayashi y Nishizawa, 2012).

Debido a la gran cantidad de genes relacionados con homeostasis de hierro sobre-expresados específicamente en la raíz de *srol1* en condiciones de luz blanca con respecto al control (Anexo Figura 2), se llevó a cabo un análisis del desarrollo del sistema radicular del mutante con abundancia de este micronutriente en el medio. Para ello, se crecieron plantas control y *srol1* en condiciones de luz blanca, germinadas directamente en concentraciones crecientes de cloruro de hierro (4, 12, 20 y 40 mg/l  $\text{FeCl}_3$ ). A baja cantidad del metal en el medio, el control experimentó un crecimiento de la raíz principal similar al observado en las condiciones estándar pero a partir de 20 mg/l de  $\text{FeCl}_3$ , se inhibió significativamente ( $p < 0,05$ ) dicho crecimiento, alcanzando valores del 36 % de inhibición a 40 mg/l de  $\text{FeCl}_3$  (Figura 71A). Sin embargo, en el mutante, el  $\text{FeCl}_3$  favoreció significativamente el crecimiento de la raíz principal a bajas concentraciones y, solo a partir de 40 mg/l de  $\text{FeCl}_3$  en el medio se produjo un efecto significativamente inhibitorio, que no llegó a alcanzar los valores observados en las plantas control (Figura 71A).

Mediante una tinción histoquímica para la actividad GUS, se analizó la expresión del marcador *pSKP2B::GUS* y se comprobó que, tanto en el control como en *srol1*, se produjo un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) del número total de PRLs y RLs emergidas por milímetro de raíz principal, con respecto a las condiciones estándar, y dependiente de la concentración de  $\text{FeCl}_3$  (Figura 71B). En el caso de plantas crecidas en 40 mg/l de  $\text{FeCl}_3$  no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

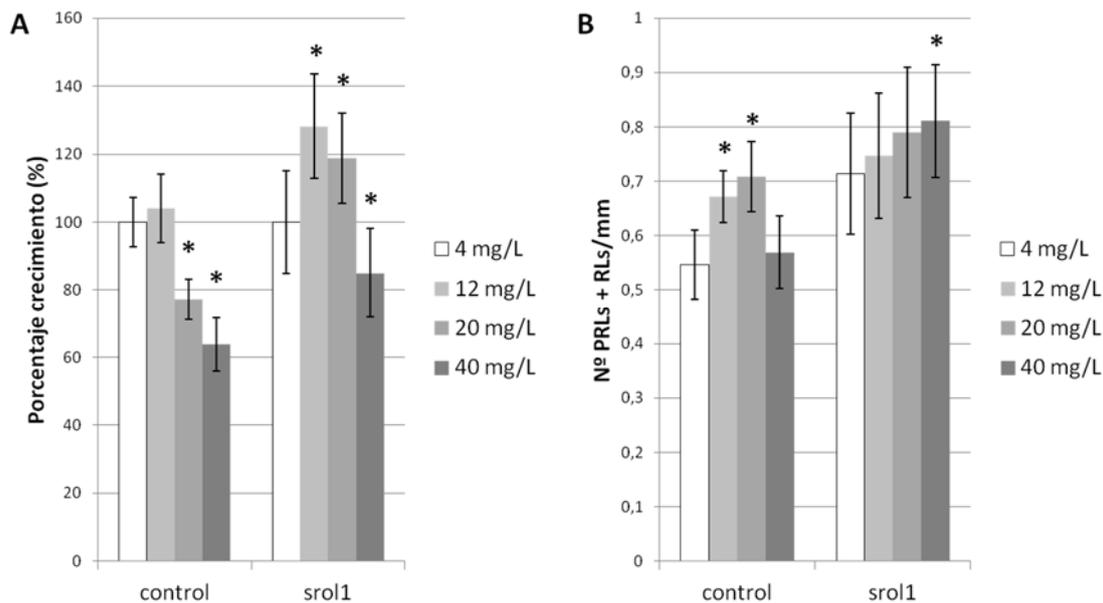


Figura 71. A) Porcentaje de crecimiento de la raíz principal y B) densidad de PRLs y RLs emergidas (n°/mm) de plantas control y *srol1* germinadas directamente en concentraciones crecientes de  $\text{FeCl}_3$  (4, 12, 20 y 40 mg/l) y crecidas en condiciones de luz blanca durante 8 días (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPRM.

### **Efecto de la variación del pH en el crecimiento de la raíz principal de *srol1***

El pH es una medida de acidez o alcalinidad de una disolución, que indica la concentración de iones hidronio  $[\text{H}_3\text{O}]^+$ . En la célula vegetal, el valor de pH varía según el compartimento y existe una homeostasis del mismo para hacer frente a los numerosos procesos que lo alteran, que van desde el propio metabolismo a factores ambientales. La homeostasis de pH es un regulador fundamental de procesos celulares que determinan y controlan el crecimiento vegetal (Pardo *et al.*, 2006; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009). Del establecimiento y el mantenimiento del balance de pH celular se encargan unas enzimas que transportan protones ( $\text{H}^+$ ) generando un potencial de gradiente electroquímico, y unos intercambiadores catión/ $\text{H}^+$  que utilizan este gradiente para acoplar el transporte pasivo de  $\text{H}^+$  al movimiento de cationes contra su potencial electroquímico (Blumwald y Poole, 1987).

Debido a la gran cantidad de genes relacionados con la homeostasis de pH sobre-expresados específicamente en la raíz de *srol1* en condiciones de luz blanca con respecto al control (Anexo Figura 2), se llevó a cabo un análisis del crecimiento de la raíz del mutante en medios con diferente pH. Para ello, se crecieron plantas control

y *srol1* en condiciones de luz blanca y bajo un filtro amarillo, germinadas directamente en medios de cultivo a pH 4.5, 5.8 y 7.0. En luz blanca, el crecimiento de la raíz principal del control se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) a pH 4.5 con respecto a las condiciones estándar, pero no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas a pH 7.0 (Figura 72A). Sin embargo, el crecimiento de la raíz del mutante no se vio afectado a pH 4.5 pero se incrementó sorprendentemente a pH 7.0 (Figura 72A). En luz amarilla, el crecimiento de la raíz principal tanto de las plantas control como *srol1*, no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las distintas condiciones, indicando que los efectos del pH y la luz amarilla no fueron aditivos (Figura 72B).

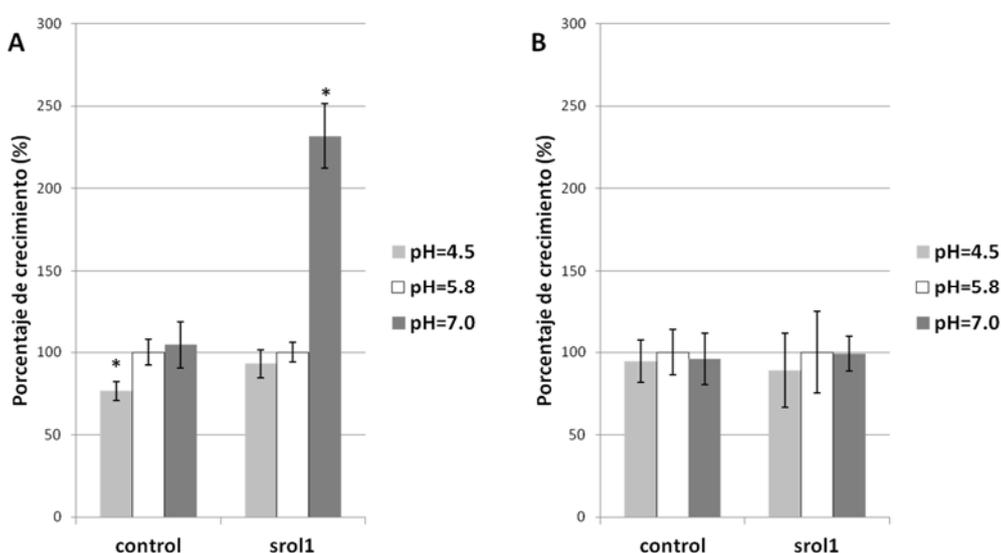


Figura 72. Porcentaje de crecimiento de la raíz principal de plantas control y *srol1* germinadas directamente en medios de cultivo a pH 4.5, 5.8 y 7.0, y crecidas, durante 8 días, en A) condiciones de luz blanca y B) bajo un filtro amarillo ( $n = 12$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

### **El sistema radicular de *srol1* no tiene grandes deficiencias en la capacidad de adquirir nutrientes**

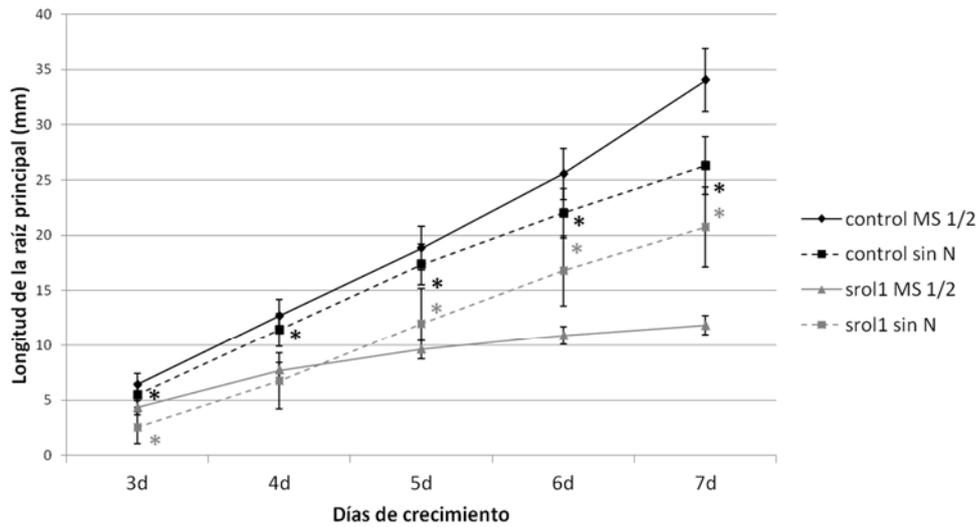
Un sistema radicular disminuido, como el de *srol1*, puede ser que adquiera una menor cantidad de nutrientes. Los principales macronutrientes requeridos para el crecimiento y desarrollo vegetal son el nitrógeno (N) y el fósforo (P), y la plasticidad de desarrollo de la raíz en respuesta a la deficiencia de los mismos es vital (López-Bucio *et al.*, 2003). Ante la deficiencia de nitrógeno, las plantas incrementan su capacidad para adquirirlo estimulando el crecimiento de la raíz en relación al tallo (Scheible *et al.*, 1997). Por otro lado, bajo la deficiencia de fosfato, en condiciones de luz, en

*Arabidopsis thaliana* se inhibe el crecimiento de la raíz principal y se estimula la formación de raíces laterales y pelos radiculares (Williamson *et al.*, 2001; Linkohr *et al.*, 2002; López-Bucio *et al.*, 2003; Pérez-Torres *et al.*, 2008), fenotipo similar al encontrado en *srol1*. Tal modificación de la arquitectura del sistema radicular (RSA, del inglés *Root System Architecture*) incrementa el área de absorción de P.

Para analizar el efecto de la deficiencia de N o P en el crecimiento de la raíz principal de *srol1*, se germinaron plantas control y mutante en medios con y sin estos macronutrientes y se realizó un seguimiento de la dinámica de crecimiento de la raíz durante cuatro días a partir de los tres días de la germinación. En deficiencia de N, se redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz principal del control, con respecto a las condiciones estándar; sin embargo, en *srol1*, se observó un incremento significativo (Figura 73). Al calcular el porcentaje de la inhibición experimentada cada día, se comprobó que el efecto inhibitorio del N en el crecimiento de la raíz de las plantas control comenzó a producirse entre el quinto y sexto día (Figura 73). Dicho efecto fue incrementándose con el tiempo, alcanzando un valor máximo el último día de tratamiento. Por el contrario, el crecimiento experimentado por el mutante bajo la deficiencia de N, fue obvio desde el tercer día después de la germinación y se incrementó con el tiempo hasta alcanzar un valor del 413,15 % entre el sexto y séptimo día (Figura 73).

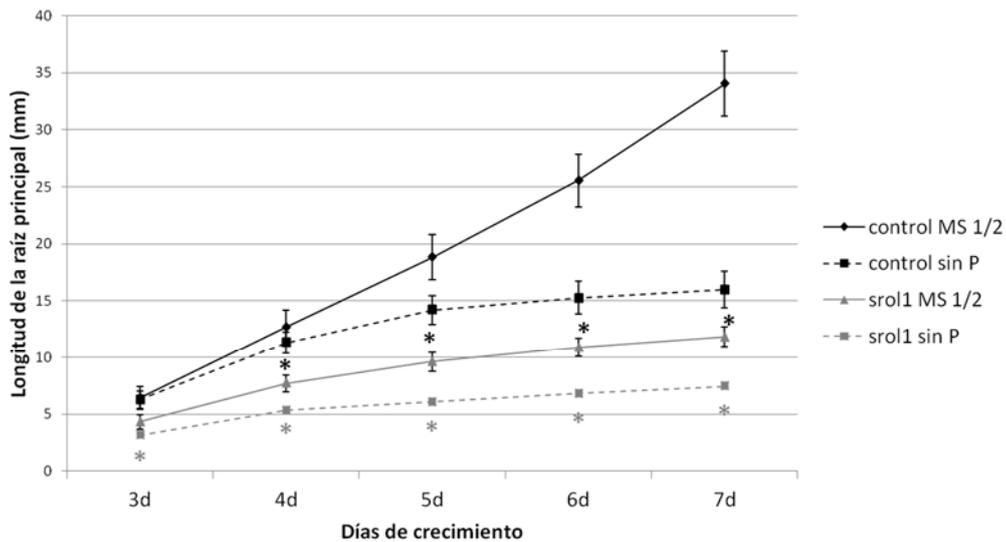
Ante la deficiencia de P, tanto el control como *srol1*, redujeron significativamente el crecimiento de la raíz principal con respecto a las condiciones estándar (Figura 74). Al calcular el porcentaje de inhibición, se comprobó que el efecto inhibitorio del P en el crecimiento de la raíz, tanto de las plantas control como mutante, fue evidente desde el tercer día después de la germinación (Figura 74). En el control, dicho efecto se incrementó con el tiempo, alcanzando su máximo valor el último día de tratamiento. En *srol1*, la inhibición fue máxima entre el cuarto y el quinto día y, a partir de ese momento, se redujo con el tiempo hasta alcanzar un valor del 35,66 % en el último intervalo (Figura 74). Esto hizo que se produjeran diferencias estadísticamente significativas, entre las plantas control y mutante, a partir del quinto día después de la germinación.

La capacidad de adquirir y transportar iones minerales es esencial para el crecimiento de la planta (Guerinot y Salt, 2001). El "ionoma" incluye todos los nutrientes minerales y las trazas de elementos que se encuentran en un organismo, y la ionómica se encarga de su estudio (Lahner *et al.*, 2003).



% inhibición	d3-d4	d4-d5	d5-d6	d6-d7
<b>control</b>	5,10	3,23	30,77	49,33
<b>srol1</b>	-25,75	-172,60	-278,24	-313,15
p-value	<b>0,004</b>	<b>1,34E-18</b>	<b>2,89E-25</b>	<b>1,62E-22</b>

Figura 73. Longitud de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas directamente en medio MS y en deficiencia de N, y crecidas durante 7 días en condiciones de luz blanca (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROP. 3d-7d, días después de la germinación. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio MS. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ) entre el mutante y el control.



% inhibición	d3-d4	d4-d5	d5-d6	d6-d7
<b>control</b>	19,05	53,35	84,15	91,12
<b>srol1</b>	35,88	60,44	41,61	35,66
p-value	<b>0,02</b>	0,06	<b>8,03E-12</b>	<b>2,40E-08</b>

Figura 74. Longitud de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas directamente en medio MS y en deficiencia de P, y crecidas durante 7 días en condiciones de luz blanca (n = 20). \*, diferencias estadísticamente

significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM. 3d-7d, días después de la germinación. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio MS. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ) entre el mutante y el control.

Para examinar el “ionoma” de *srol1*, se crecieron plantas control y mutante con el sistema radicular en condiciones de luz blanca y oscuridad. Se analizó la composición de boro (B), calcio (Ca), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), potasio (K), magnesio (Mg), manganeso (Mn), molibdeno (Mo), sodio (Na), níquel (Ni), fósforo (P), azufre (S), estroncio (Sr) y zinc (Zn) (Figura 75).

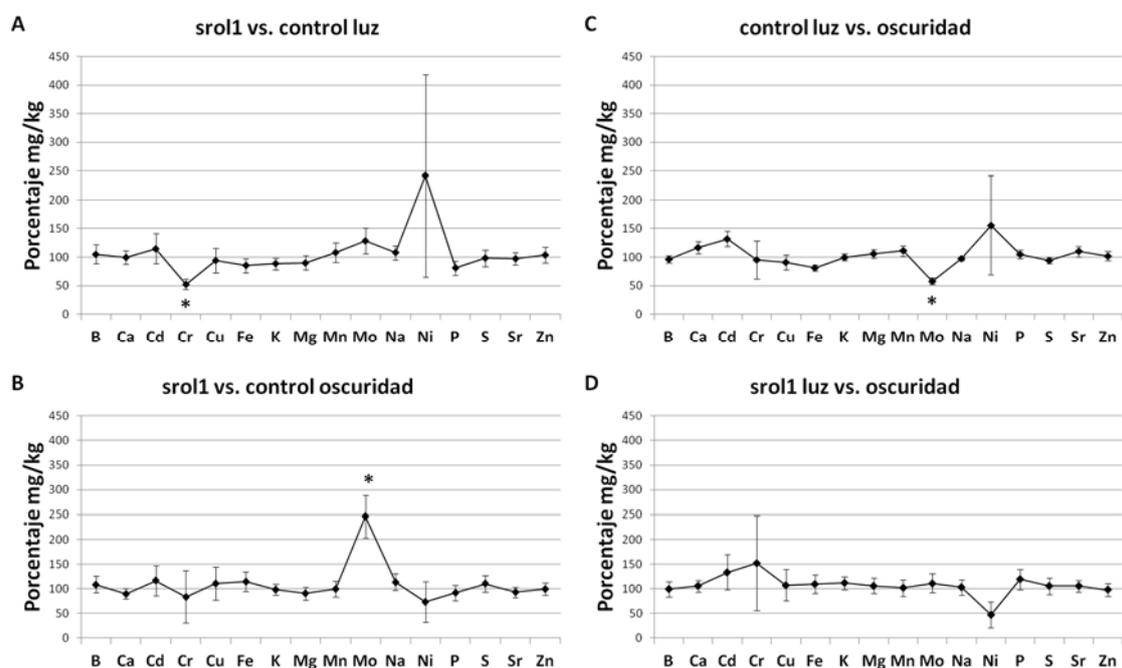


Figura 75. Análisis ionómico de plantas completas control y *srol1* crecidas con el sistema radicular en condiciones de luz blanca y oscuridad durante 12 días. Las gráficas representan el porcentaje (%) del contenido de trazas de elementos (mg/kg de peso seco) en las plantas *srol1* con respecto al control en luz (A) y oscuridad (B); y en las plantas control (C) y *srol1* (D) en oscuridad con respecto a las condiciones de luz. \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

Se comprobó que *srol1*, en condiciones de luz blanca, presentó un 47 % menos ( $p < 0,05$ ) de trazas de Cr, con respecto al control (Figura 75A); y, con la raíz crecida en oscuridad, un 146 % más ( $p < 0,05$ ) de trazas de Mo (Figura 75B). Cabe mencionar que las plantas control con la raíz crecida en oscuridad, mostraron un 42 % menos ( $p < 0,05$ ) de trazas de Mo con respecto a las que lo hicieron en luz (Figura 75C); sin embargo, el mutante no manifestó diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su composición mineral entre las dos condiciones de crecimiento (Figura 75D).

### **Análisis metabolómico en luz blanca/amarilla del control vs. *sro1***

Para definir el estado fisiológico o de desarrollo de las células, se necesita conocer los productos génicos (transcriptos o proteínas) y los intermediarios metabólicos que se producen en las mismas, tanto cualitativa como cuantitativamente. El metaboloma es la medida de los cambios en las concentraciones relativas de metabolitos como resultado de la represión o sobre-expresión de un gen (Oliver *et al.*, 1998). La determinación de la concentración de metabolitos efectiva requiere un análisis rápido y fiable para producir una instantánea metabólica de cada mutación (Teusink *et al.*, 1998). Oliver, (1997), desarrolló una estrategia mediante espectrometría de masas para obtener tales datos (Rashed *et al.*, 1995).

Con el objetivo de examinar el metaboloma de la raíz de *sro1*, se crecieron plantas control y mutante en condiciones de luz blanca y bajo un filtro amarillo. Sorprendentemente, el análisis metabolómico reveló muy pocos cambios en *sro1* con respecto al control. El análisis de la varianza (ANOVA) proporcionó un resumen de los metabolitos (según su masa y tiempo de retención expresados en daltons y segundos, respectivamente) que fueron potencialmente significativos ( $p < 0,05$ ) en el mutante comparado con las plantas control en luz blanca (Tabla 13).

	Picos(mz/rt)	FC	log2(FC)	p.value	-log10(p)
1	707.2/216	0.39212	-1.3507	2.2174e-11	10.654
2	480.2/314	3.1083	1.6361	9.7875e-10	9.0093
3	192.1/179	0.17983	-2.4753	4.8641e-08	7.313
4	535.3/1088	0.33736	-1.5676	5.3565e-08	7.2711
5	477.3/1164	0.49691	-1.0089	2.6095e-07	6.5834
6	539.4/1161	0.46656	-1.0999	4.4688e-06	5.3498
7	437.3/1085	0.48814	-1.0346	8.9937e-05	4.0461
8	294.9/8	0.32881	-1.6047	0.00059083	3.2285

Tabla 13. Los metabolitos más significativos ( $p < 0,05$ ), identificados mediante *t-tests*, en la raíz de plantas *sro1* crecidas durante 8 días en condiciones de luz blanca con respecto al control. mz/rt, masa/tiempo de retención expresados en Da/seg, respectivamente.

## Identificación de un metabolito relacionado con formas metiladas de auxina

Mediante los análisis de metabolómica anteriormente expuestos, se comprobó que la raíz de *srol1* acumulaba significativa ( $p < 0,05$ ) y selectivamente en condiciones de luz blanca pero no amarilla, un metabolito con una masa/tiempo de retención de 707.2/216 Da/seg (Tabla 13 y Figuras 76). Se observó que en la raíz de las plantas control, dicho compuesto también se encontraba selectivamente en luz blanca y no amarilla, pero significativamente en menores concentraciones que en el mutante (Figura 76).

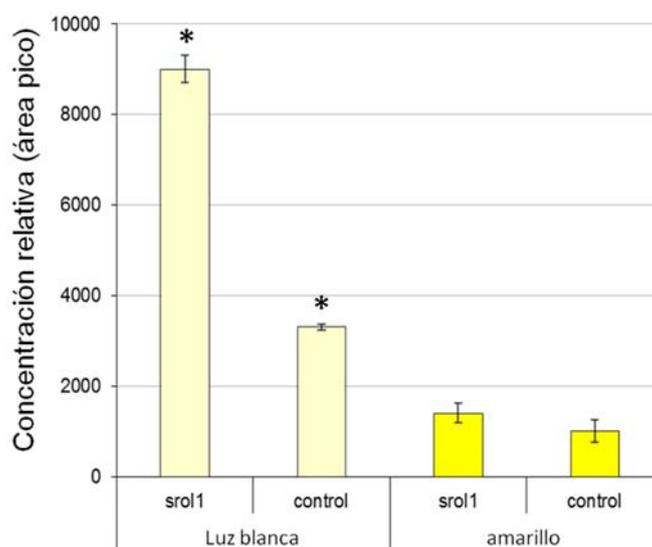


Figura 76. Concentraciones relativas (expresadas mediante el área de los picos) del metabolito con masa/tiempo de retención 707.2/216 Da/seg, identificado selectivamente en condiciones de luz blanca pero no amarilla, en la raíz de plantas control y *srol1* de 8 días. \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

Usando una aplicación *web*, llamada ChemSpider ([www.chemspider.com](http://www.chemspider.com)), que proporciona una base de datos de más de 30 millones de estructuras, se investigó cuál podría ser la naturaleza química del compuesto con masa/tiempo de retención 707.2/216 Da/seg. Los análisis revelaron que este metabolito podría estar relacionado con formas metiladas de auxina (no se menciona nada más acerca de este producto ya que está siendo patentado su uso) (Figura 77).

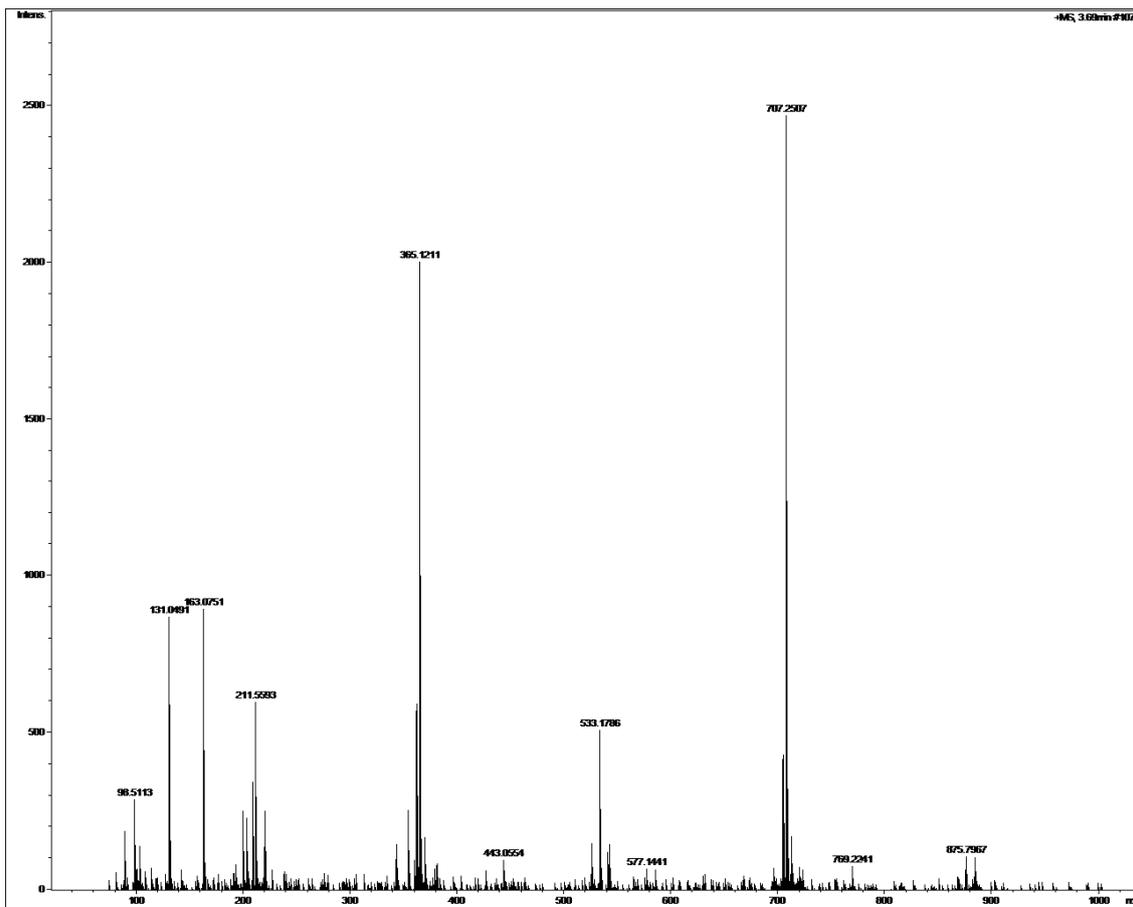


Figura 77. Cromatograma correspondiente a las raíces de plantas *srol1* crecidas es luz blanca durante 8 días.

Este metabolito podría resultar del catabolismo de AIA, ya que es una hormona fotosensible. En el medio de cultivo *Murashige and Skoog* (MS, Murashige y Skoog, 1962), las concentraciones de sales y nutrientes minerales aceleran la foto-degradación del AIA en condiciones de luz blanca (Dunlap y Robacker, 1988). La presencia de piridoxina (PN) o vitamina B6 en el medio MS incrementa la velocidad de foto-degradación del AIA (Leasure *et al.*, 2013). Esta degradación se puede eliminar prácticamente con el uso de un filtro coloreado amarillo que impide el paso de la luz UV y algunas longitudes de onda del azul (Stasinopoulos y Hangarter, 1990).

Para comprobar el efecto de la PN en el fenotipo de *srol1*, se germinaron plantas control y mutante en medio MS sin y con 25 µg/ml de PN y se crecieron con el sistema radicular en condiciones de luz blanca, oscuridad y luz amarilla. El último día de tratamiento, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de la raíz principal con respecto a las condiciones sin PN y se comprobó que, en luz blanca, un exceso de la vitamina B6 provocó una inhibición del crecimiento de la raíz tanto en el control como en *srol1*, siendo el efecto inhibitorio significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en este

último (Figura 78). Sin embargo, en las otras condiciones de estudio, el tratamiento no inhibió significativamente el crecimiento de la raíz principal en ninguno de los dos genotipos; si bien, en oscuridad, se produjo un leve efecto inhibitorio en la raíz del mutante, que no se apreció en las plantas control, lo cual implicó que existieran diferencias estadísticamente significativas entre ambos (Figura 78). Cuando las plantas se crecieron con el filtro amarillo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control y *srol1* (Figura 78).

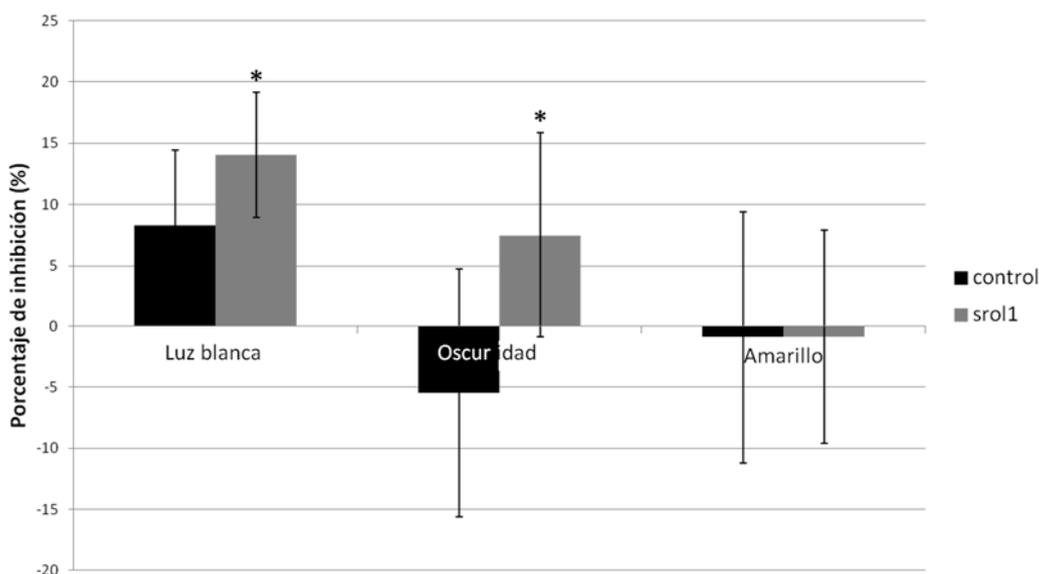


Figura 78. Porcentaje de inhibición de la raíz principal de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS sin o con 25 µg/ml de PN y crecidas durante 8 días con el sistema radicular en condiciones de luz blanca, oscuridad y luz amarilla (n= 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

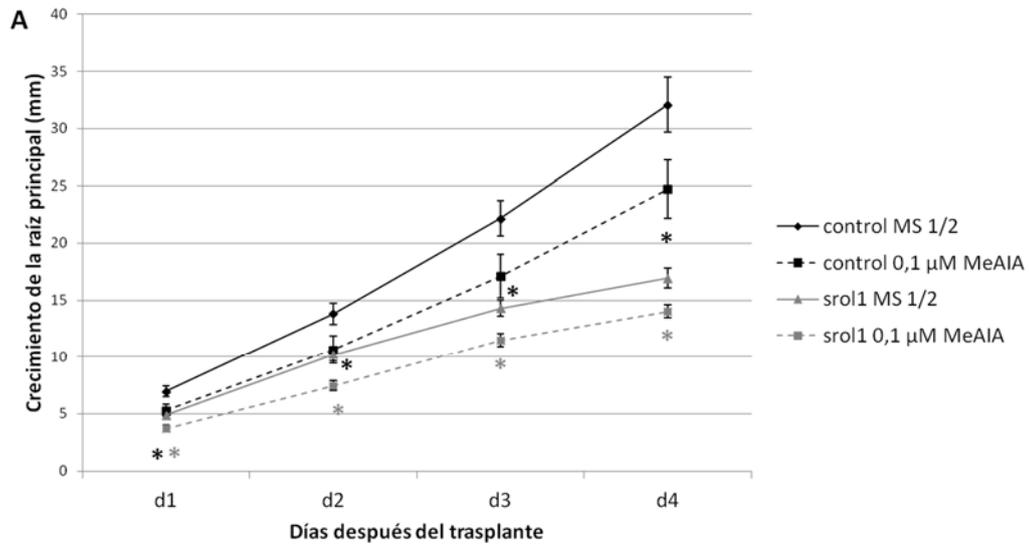
Con el fin de conocer la relación de *SROL1* con la ruta de las auxinas, se llevó a cabo un análisis del crecimiento radicular del mutante en presencia tanto de auxina metilada como de un inhibidor de la ruta de señalización de esta hormona.

Recientemente, se ha descubierto, en *Arabidopsis* y otras especies, una AIA carboximetiltransferasa (*IAMT1*) que metila AIA para formar el éster metil indol-3-acetato (MeAIA; Zubieta *et al.*, 2003; Qin *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2008), aunque sus niveles *in vivo* son difíciles de detectar (Narasimhan *et al.*, 2003). El MeAIA se usa como sustituto de AIA en estudios fisiológicos (Zimmerman y Hitchcock, 1937) y varios mutantes de la señalización de auxina muestran una sensibilidad reducida al MeAIA aplicado exógenamente, como a AIA (Qin *et al.*, 2005), sugiriendo que ambos comparten elementos de señalización. MeAIA es una forma inactiva de AIA (Yang *et*

*al.*, 2008) que se hidroliza a AIA mediante metilesterasas (de la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas) que, en *Arabidopsis*, se han denominado *MES* y, al menos, *AtMES17* es capaz de hidrolizar MeAIA *in vivo*.

Para analizar el efecto del MeAIA en *srol1*, se germinaron plantas control y mutantes en medio MS, a los tres días después de la germinación, se trasplantaron a 0, 0,1, 0,5 y 1  $\mu\text{M}$  de MeAIA y se realizó un seguimiento de la dinámica de crecimiento de la raíz principal durante los cuatro días siguientes al trasplante. Las concentraciones de 0,5 y 1  $\mu\text{M}$  de MeAIA inhibieron dramáticamente el crecimiento de la raíz tanto en el control como en *srol1* y las diferencias entre ambos no se apreciaron satisfactoriamente; por este motivo, la concentración de 0,1  $\mu\text{M}$  de MeAIA fue la más adecuada para el estudio. El conjugado de AIA redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz principal tanto en las plantas control como mutante, con respecto a las condiciones sin MeAIA (Figura 79A). La inhibición del crecimiento en el control, se mantuvo relativamente constante a lo largo de todo el tratamiento (Figura 79A); sin embargo, en *srol1*, la inhibición fue máxima dos días después del trasplante y desapareció totalmente un día más tarde, hasta el final del tratamiento (Figura 79A). Las diferencias entre las plantas control y mutante fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) todos los días del seguimiento. Además, se comprobó que la autofluorescencia que presenta *srol1* dispersa por el sistema radicular, en condiciones de luz blanca, sorprendentemente desapareció en aquellas plantas trasplantadas a 1  $\mu\text{M}$  de MeAIA (Figura 79B).

A raíz de este resultado y con el fin de ahondar en el papel de las auxinas en el mutante *srol1*, se analizó el efecto del ácido *p*-Clorofenoxiisobutírico (PCIB), también llamado ácido  $\alpha$ -(4-clorofenoxi) isobutírico, ácido 2-(*p*-clorofenoxi)-2-metilpropiónico o ácido clofíbrico, que actúa como inhibidor de la respuesta a auxina (Kim *et al.*, 2000; Xie *et al.*, 2000; Oono *et al.*, 2003). El PCIB posee similitud estructural con la auxina sintética ácido 4-clorofenoxiacético (Jönsson, 1961) y un carácter inhibitorio competitivo en las respuestas fisiológicas inducidas por auxina (MacRae y Bonner, 1953). Además, se ha comprobado que PCIB afecta a la ruta de señalización de auxina por regular la estabilidad de las proteínas Aux/IAA (Oono *et al.*, 2003) y, de esta manera, inhibe la expresión génica temprana inducida por auxina. PCIB inhibe la respuesta gravitrópica, la elongación de la raíz principal y la formación de raíces laterales inducida por auxina en la raíz principal de *Arabidopsis* (Oono *et al.*, 2003).



% inhibición	d0-d1	d1-d2	d2-d3	d3-d4
control	24,09	21,76	22,55	23,06
srol1	23,76	29,41	2,71	2,84
p-value	0,91	<b>0,03</b>	<b>1,46E-07</b>	<b>7,05E-07</b>

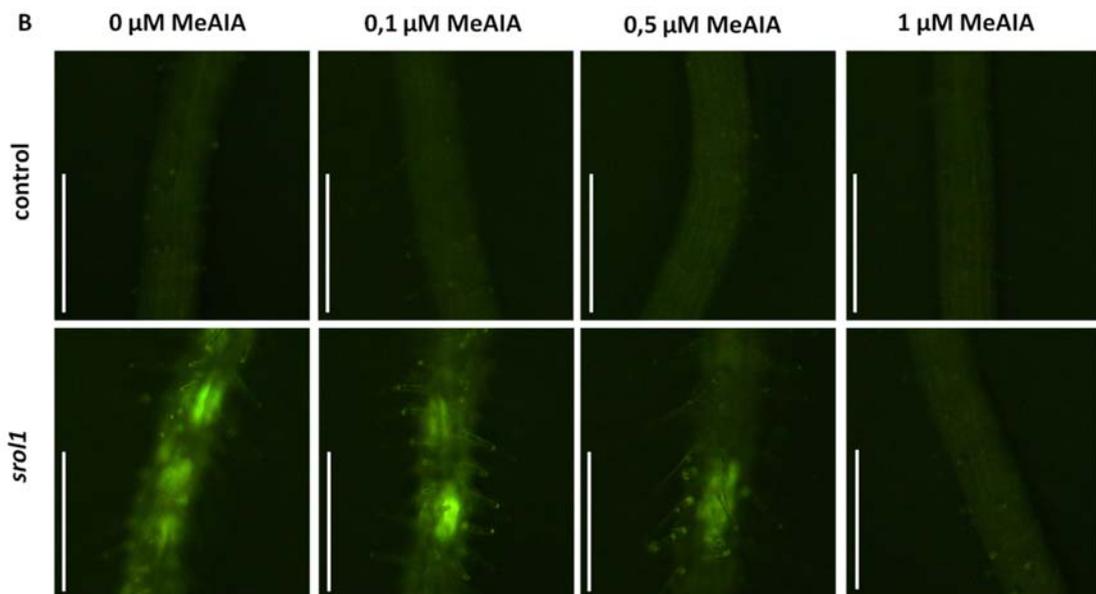


Figura 79. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS ½ y trasplantadas a medio fresco con o sin 0,1 μM de MeAIA al tercer día después de la germinación (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05). Las barras de error indican DESVPROP. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* (p < 0,05) entre el mutante y el control. B) Imágenes, mediante una lupa binocular de fluorescencia de la zona madura de la raíz principal de plantas control y *srol1* trasplantadas a 0, 0,1, 0,5 y 1 μM de MeAIA. Barras = 100 μm.

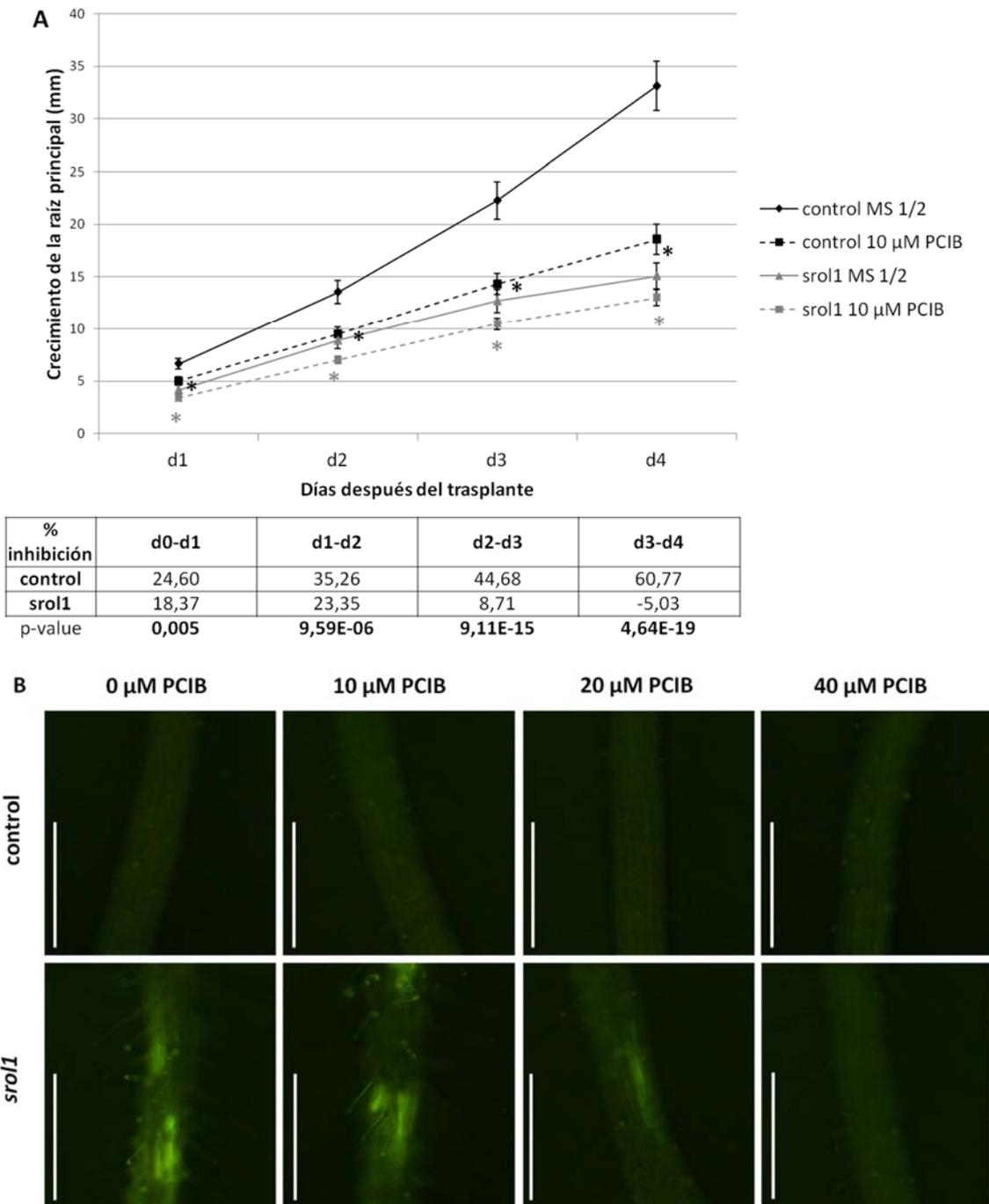


Figura 80. Crecimiento de la raíz principal (mm) de plantas control y *srol1* germinadas en medio MS ½ y trasplantadas a medio fresco con o sin 10 μM de PCIB al tercer día después de la germinación (n = 20). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM. d1-d4, días después del trasplante. En la tabla se indica el porcentaje de inhibición diario del crecimiento de la raíz principal con respecto al medio sin hormona. En negrita, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ) entre el mutante y el control. B) Imágenes, mediante una lupa binocular de fluorescencia de la zona madura de la raíz principal de plantas control y *srol1* trasplantadas a 0, 10, 20 y 40 μM de PCIB. Barras = 100 μm.

Se germinaron plantas control y *srol1* en medio MS, a los tres días después de la germinación, se trasplantaron a 0, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$  de PCIB y se realizó un seguimiento de la dinámica de crecimiento de la raíz principal durante los cuatro días siguientes al trasplante. Las concentraciones de 20 y 40  $\mu\text{M}$  de PCIB inhibieron considerablemente el crecimiento de la raíz tanto en el control como en el mutante, de tal modo, que las diferencias entre ambos genotipos no se pudieron apreciar satisfactoriamente; por ello, la concentración de 10  $\mu\text{M}$  de PCIB se consideró la más adecuada para el estudio. PCIB redujo significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz principal tanto en las plantas control como *srol1*, con respecto a las condiciones sin inhibir (Figura 80A). La inhibición del crecimiento en el control, un día después del trasplante, fue del 24,60 % y, gradualmente, se incrementó con el tiempo hasta alcanzar un valor del 60,77 % el último día de tratamiento (Figura 80A); sin embargo, en el mutante, la inhibición fue máxima dos días después del trasplante y disminuyó con el tiempo hasta desaparecer por completo el último día del seguimiento (Figura 80A). Las diferencias entre el control y el mutante fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) a lo largo de todo el tratamiento. Al igual que en el caso del tratamiento con MeAIA, se comprobó que la autofluorescencia que presenta *srol1* dispersa por el sistema radicular, en condiciones de luz blanca, se redujo sorprendentemente en aquellas plantas trasplantadas a 20  $\mu\text{M}$  de PCIB y desapareció en su totalidad en aquellas otras que permanecieron en presencia de 40  $\mu\text{M}$  de PCIB (Figura 80B).

### **¿Existe una señal desde la parte aérea que confiere el fenotipo *srol1*?**

Los análisis de metabolómica revelaron la existencia de un metabolito que se acumulaba en la raíz del mutante selectivamente en condiciones de luz blanca (Figura 76); por ello, esta acumulación podría ser una de las causas responsables del fenotipo *srol1* en luz. Para comprobar si dicho compuesto se sintetiza en la parte aérea del mutante y se transporta a la raíz, se generaron injertos. Esta técnica consiste en la inserción de la parte aérea de una planta (*scion*) en la raíz de otra (*stock*), de manera que los dos sistemas vasculares independientes puedan unirse y formar un continuo (Hottes, 1925). Es un proceso complicado en el que la regeneración de los órganos progresa correctamente (Kim *et al.*, 2001; Estañ *et al.*, 2005; Prassinis *et al.*, 2009), incluso se intercambia material genético entre las células de la zona implicada (Stegemann y Bock, 2009). En 2002, Colin Tumbull y colaboradores, desarrollaron un

método usando plántulas de *Arabidopsis* de 3-4 días, permitiendo experimentos de señalización a larga distancia desde momentos tempranos (Bainbridge *et al.*, 2006).

De esta manera, se crecieron plantas transgénicas *pSUC2::GFP*, *srol1/pSUC2::GFP* (*scion*) y silvestres (*stock*) en condiciones de luz blanca, y a los cuatro días después de la germinación, se generaron los injertos. Transcurrida una semana, se comprobó que la señal GFP había alcanzado el meristemo apical de la raíz principal en algunos de ellos (Figura 81B), indicando que se habían desarrollado con éxito, pero en ningún caso se observó que la parte aérea *srol1* indujera fenotipo alguno en la raíz silvestre, comparado con los injertos control (Figura 81A). La combinación inversa [*pSUC2::GFP* (*scion*) y *srol1* (*stock*)] no recuperó el fenotipo de raíz corta del mutante comparado con los injertos control [*srol1/pSUC2::GFP* (*scion*) y *srol1* (*stock*)] (datos no mostrados). Estos datos sugieren que no existe una señal móvil generada en la parte aérea que induzca el fenotipo de raíz corta.

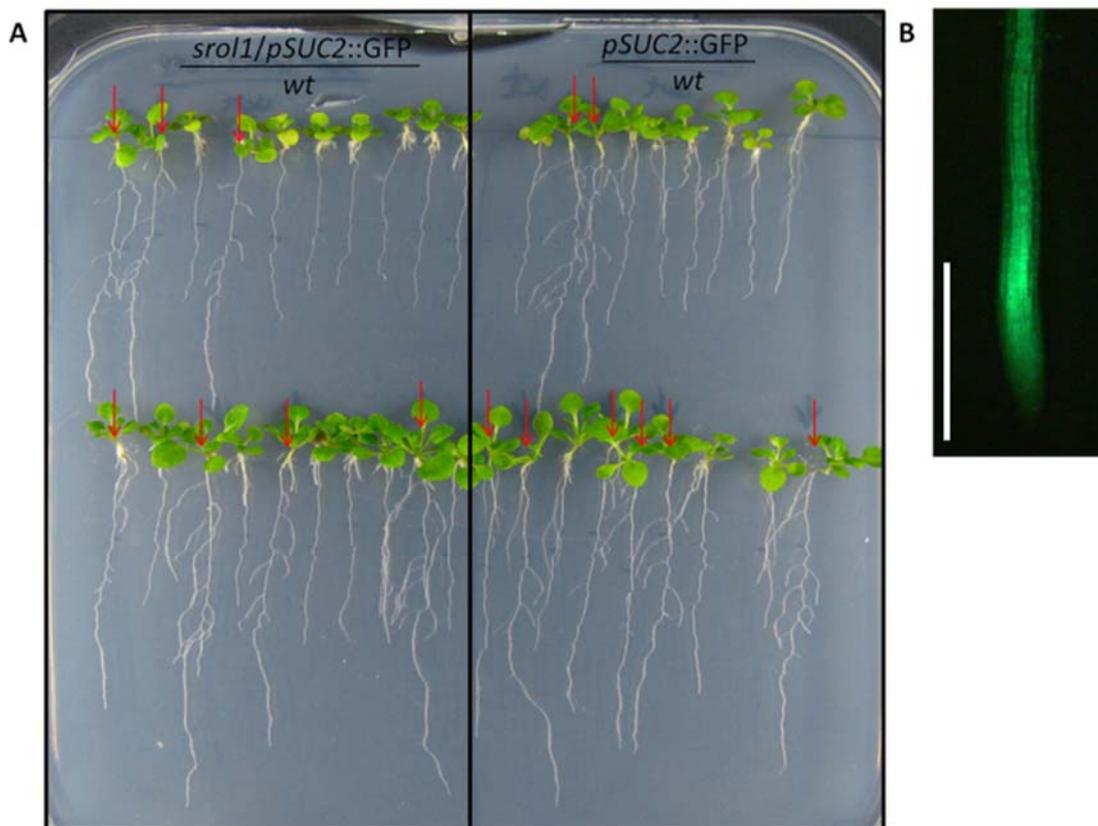


Figura 81. A) Injertos de 11 días de plántulas transgénicas *pSUC2::GFP* y *srol1/pSUC2::GFP* (*scion*) y silvestres (*stock*). Las flechas rojas indican aquellos que se desarrollaron con éxito. B) Imagen, mediante una lupa binocular de fluorescencia, del meristemo apical de la raíz principal de los injertos señalados en A). Barra = 200  $\mu$ m.

## **Estudio morfológico del sistema radicular de los mutantes de genes identificados en el análisis transcriptómico de *srol1***

En el análisis transcriptómico de *srol1*, en condiciones de luz blanca y amarilla, se identificaron genes cuya expresión estaba inducida y/o reprimida con respecto al control. Para entender la función de los mismos en el desarrollo radicular, se seleccionaron algunos de ellos en base a su nivel de expresión y/o pertenencia a alguna familia génica de especial relevancia (Tabla 14 y Anexo Tabla XXIII) y se consiguieron mutantes de T-DNA de estos, en diferentes colecciones públicas (<http://signal.salk.edu/cgibin/tdnaexpress>), que se llevaron a homocigosis para analizar su fenotipo a nivel del sistema radicular. Para ello, se crecieron plantas control y mutantes en condiciones de luz blanca y se cuantificó la longitud de la raíz principal, las RLs emergidas y los diferentes estadios de desarrollo de los PRLs.

Tras el estudio fenotípico de todos los mutantes seleccionados, se centró la atención en dos de los genes por su significativa implicación en el desarrollo del sistema radicular. Estos fueron *BiP3*, una chaperona implicada en la defensa contra el estrés de RE, y *HSFA6a*, un miembro de la familia de factores de transcripción implicados en la respuesta al estrés por calor (*HSF*, del inglés *Heat Stress Transcription Factor*).

BINDING IMMUNOGLOBULIN PROTEIN o Binding Protein (BiP) es el principal sistema de chaperonas del lumen del retículo endoplasmático (RE) (Otero *et al.*, 2010). En las plantas, BiP está implicado en la defensa contra varios estreses mediados por el RE. En *Arabidopsis thaliana*, hay tres genes que codifican BiP, siendo *BiP3* el principal (Koizumi, 1996; Martínez y Chrispeels, 2003; Iwata y Koizumi, 2005; Liu *et al.*, 2007; Iwata *et al.*, 2008, 2010; Tajima *et al.*, 2008; Liu y Howell, 2010). *BiP3* interacciona con y bloquea a bZIP28 (un factor de transcripción asociado a la membrana del RE) en condiciones no estresantes y se disocia de él, permitiendo su movilización al núcleo, en respuesta a determinados estreses mediados por el RE (Srivastava *et al.*, 2013). El gen *BiP3* (At1g09080) está sobre-expresado en *srol1* más de 60 veces en condiciones de luz blanca, y más de 24 veces en luz amarilla, con respecto al control (Tabla 14).

Fold change	inducidos <i>srol1</i> luz vs. control luz	reprimidos <i>srol1</i> luz vs. control luz	inducidos <i>srol1</i> amarillo vs. control amarillo	reprimidos <i>srol1</i> amarillo vs. control amarillo	inducidos control luz vs. control amarillo	reprimidos control luz vs. control amarillo	inducidos <i>srol1</i> luz vs. <i>srol1</i> amarillo	reprimidos <i>srol1</i> luz vs. <i>srol1</i> amarillo
At1g09080	+61.79		+24.28				+2.88	
At1g18830	+13.30		+2.95				+5.34	
At1g60050	+6.37		+6.84		+3.85		+3.58	
At1g68640	+2.20							
At1g76780				-3.02		-4.43		
At2g16630	+6.34						+4.23	
At2g24600	+15.74		+5.68				+3.95	
At2g24720	+3.33					-2.39		
At2g24850	+40.34		+2.99				+19.89	
At3g02730		-2.04			+2.12			
At3g03660	+4.69						+3.67	
At3g23250	+10.84		+6.14					
At3g44860	+42.36		+5.79				+9.02	
At3g44860	+42.36		+5.79				+9.02	
At3g44870	+19.82		+2.32				+8.19	
At3g48740		-39.09						-13.48
At3g55700	+18.87		+5.10				+3.26	
At4g21750	+4.33						+2.31	
At4g36740	+2.17							
At5g24240		-4.70		-3.29				
At5g39190	+13.86						+10.19	
At5g43840		-10.40			+4.38			
At5g53190		-12.90			+2.19			-3.56
At5g56860		-2.45			+2.34			

Tabla 14. Cambio de expresión de los genes identificados en el análisis transcriptómico de *srol1*, inducidos y/o reprimidos con respecto al control, y para los cuales se consiguieron mutantes de T-DNA para analizar su fenotipo a nivel del sistema radicular.

Tanto las plantas control como *bip3*, presentaron una dinámica de crecimiento de la raíz principal que se ajustaba a una recta; sin embargo, el mutante mostró una longitud de raíz significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) que el control todos los días del seguimiento (Figura 82A). En cuanto a la emergencia de RLs, *bip3* presentó un número significativamente mayor de RLs emergidas por milímetro de raíz principal, con respecto a las plantas control, tanto a los 8 días como a los 10 días de crecimiento (Figura 82B). Al analizar la proporción de PRLs en cada estadio de desarrollo, se comprobó que el mutante mostraba un número mayor de eventos de iniciación de PRLs (St I) comparado con el control, aunque no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 82C). Además, estos PRLs iniciados, se desarrollaron más rápidamente en *bip3* con respecto a las plantas control (el mutante

presentó un porcentaje menor de PRLs entre los St II-VII), observándose una mayor proporción de PRLs en estadio VIII, aunque tampoco existieron diferencias estadísticamente significativas (Figura 82C).

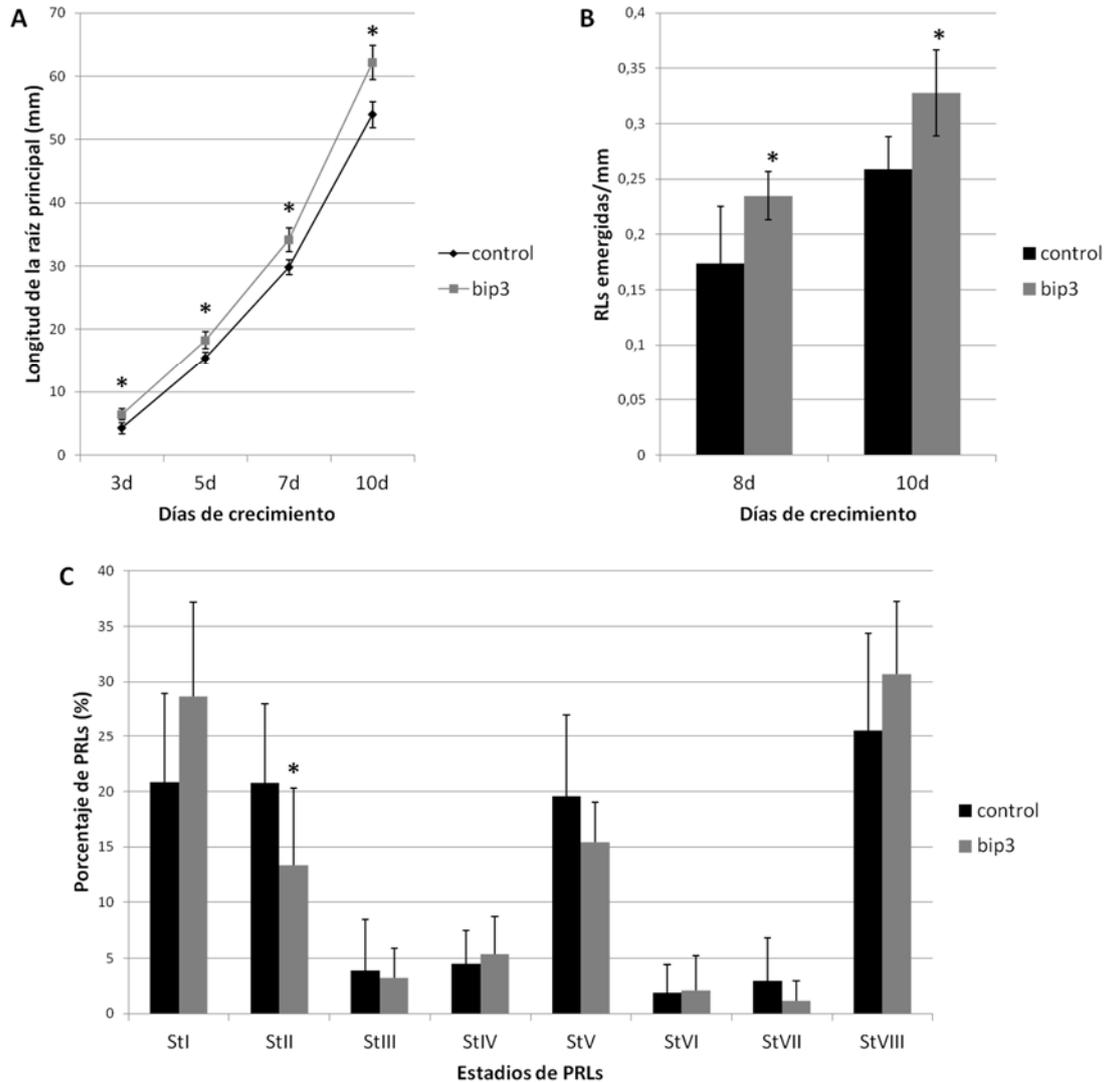


Figura 82. A) Longitud (mm) de la raíz principal a los 3, 5, 7 y 10 días, B) densidad de RLs emergidas ( $n^{\circ}/mm$ ) a los 8 y 10 días y C) porcentaje de estadios de desarrollo de los PRLs a los 8 días de plantas control y *bip3* crecidas, durante 10 días, en condiciones de luz blanca ( $n = 12$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

Los factores de transcripción de estrés por calor (Hsfs) son los últimos elementos de la cadena de transducción de señal que media la activación de genes de respuesta a calor y a un gran número de estreses químicos (Wu, 1995; Nover *et al.*, 1996; Morimoto, 1998; Scharf *et al.*, 1998; Schöffl *et al.*, 1998; Nakai, 1999). Esto permite la rápida acumulación de proteínas de choque térmico (Hsps) que

desempeñan una función importante en proteger contra el daño por estrés (Nover *et al.*, 1990; Nover, 1991, 1994; Gething y Sambrook, 1992; Craig *et al.*, 1993; Hartl y Martin, 1995; Kimura *et al.*, 1995; Waters y Schaal, 1996). En *Arabidopsis*, hay 21 Hsfs agrupados en 3 clases y 14 grupos (Nover *et al.*, 2001). *AtHsfA6a* actúa como un factor de transcripción de genes de respuesta a estrés mediante la ruta de señalización de ABA. Las plantas que sobre-expresan *AtHsfA6a* son hipersensibles a ABA y muestran tolerancia a la salinidad y la sequía (Hwang *et al.*, 2014). En *srol1*, la expresión de *AtHsfA6a* (At5g43840) está reprimida más de 10 veces con respecto al control, específicamente en condiciones de luz blanca (Tabla 14).

En plantas control y *hsfA6a*, crecidas en condiciones de luz blanca, la dinámica de crecimiento de la raíz principal se ajustó a una recta y no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre ambos genotipos (Figura 83A). En cuanto a la emergencia de RLs, el mutante presentó un número significativamente menor de RLs emergidas por milímetro de raíz principal, con respecto a las plantas control, a los 8 días; sin embargo, estas diferencias desaparecieron a los 10 días de crecimiento (Figura 83B). Al analizar la proporción de PRLs en cada estadio de desarrollo, se comprobó que *hsfA6a* mostraba un número significativamente mayor de PRLs recién iniciados (St II) comparado con el control (Figura 83C). Además, estos PRLs iniciados en el mutante, se quedaron parados en el St V del desarrollo con respecto a las plantas control, observándose una proporción de PRLs en estadio VIII significativamente menor (Figura 83C).

Para comprobar si los genes *BIP3* y *HSFA6a* participan en la misma ruta funcional de *SROL1*, se cruzaron plantas *bip3* y *hsfA6a* con *srol1* con el fin de analizar el sistema radicular de los dobles mutantes en cuanto a la longitud de la raíz principal. Para ello, se crecieron plantas silvestres, *srol1*, *bip3*, *hsfA6a* (controles), *bip3/srol1* y *hsfA6a/srol1* en condiciones de luz blanca y se realizó un seguimiento del crecimiento de la raíz. Los dobles mutantes no mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), con respecto a *srol1*, en cuanto a la longitud de la raíz principal (Figura 84), indicando que *BIP3* y *HSFA6a* no participan en la misma ruta funcional que *SROL1*.

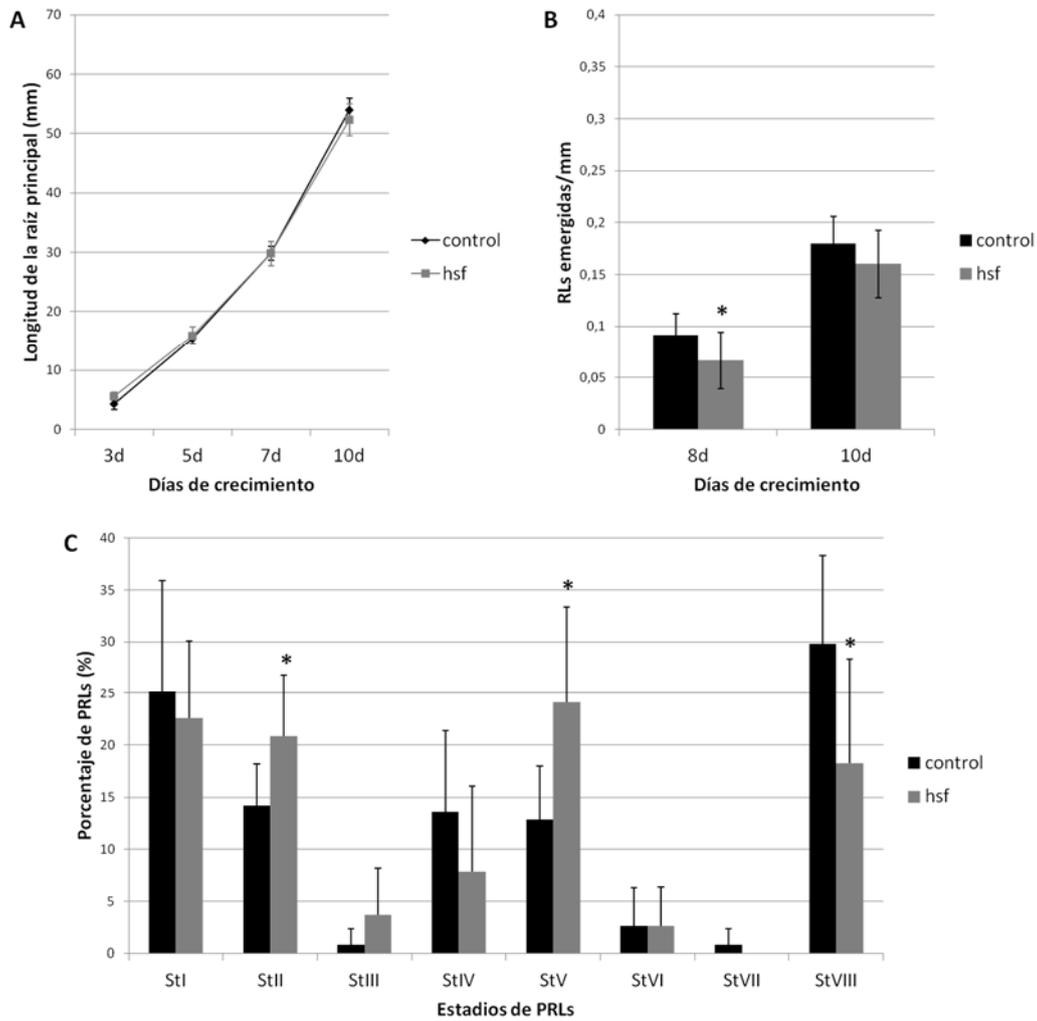


Figura 83. A) Longitud (mm) de la raíz principal a los 3, 5, 7 y 10 días, B) densidad de RLs emergidas ( $n^{\circ}/mm$ ) a los 8 y 10 días y C) porcentaje de estadios de desarrollo de los PRLs a los 8 días de plantas control y *hsfA6a* crecidas durante 10 días, en condiciones de luz blanca ( $n = 12$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

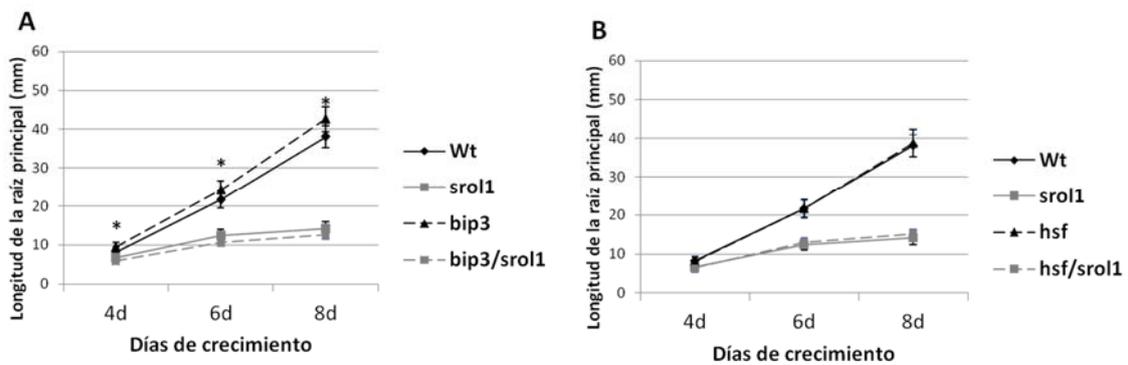


Figura 84. Longitud (mm) de la raíz principal de plantas silvestres (*Wt*), *srol1*, *bip3*, *bip3/srol1* (A), *hsfA6a* y *hsfA6a/srol1* (B) crecidas durante 8 días en condiciones de luz blanca ( $n = 12$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

## Mapeo posicional de *srol1*

Para el mapeo de la mutación en *srol1*, se cruzaron plantas mutantes en fondo *Columbia* (*Col-0*) con plantas del ecotipo *Landsbreg erecta*. Utilizando distintos marcadores moleculares polimórficos entre los dos ecotipos, se delimitó que la mutación se encontraba en el brazo largo del cromosoma 2, comprendida entre los marcadores CER460723 y CER451608 (Figura 85) (Tesis Doctoral Manzano C., 2011). En la región delimitada por estos dos marcadores, se encontraron un total de 40 genes. De 10 de ellos, aquellos que pudieran explicar el fenotipo observado, se llevó a cabo la secuenciación de la región genómica, y en ninguno de los casos se encontró alguna mutación puntual (Anexo Tabla XXIV) (Tesis Doctoral Manzano C., 2011).

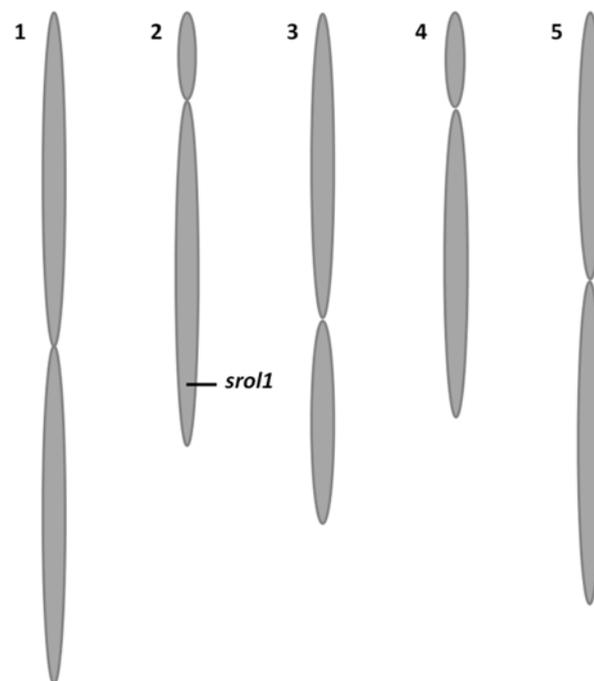


Figura 85. Delimitación de la mutación *srol1* en el brazo largo del cromosoma 2 de *Arabidopsis thaliana*.

Se identificaron mutantes de T-DNA para una gran mayoría de genes en el intervalo definido. Un análisis morfológico de estos mutantes no mostró que causaran defectos en el sistema radicular similares al identificado en *srol1*. Por ello, la siguiente estrategia para la identificación de la mutación responsable del fenotipo de *srol1*, fue una secuenciación del genoma completo del mutante. Se identificaron dos genes candidatos para *SROL1* con una mutación puntual en sus regiones codificantes. Estos

genes fueron At2g40070 y At2g40095. At2g40070 presentaba un cambio de una citosina por una timina (C->T) al principio del cuarto exón, lo cual producía un cambio aminoacídico de una serina por una fenilalanina (Ser->Phe); y At2g40095 mostraba un cambio de una guanina por una adenina (G->A) al comienzo del segundo exón, lo que provocaba un cambio aminoacídico de una glicina por ácido glutámico (Gly->Glu). Se consiguieron mutantes de T-DNA en estos genes para analizar su fenotipo a nivel del sistema radicular, y se comprobó que no presentaban ningún fenotipo de raíz corta. Esto podría deberse a que son alelos diferentes y, por ello, se generaron líneas transgénicas *srol1* que expresaban la secuencia genómica de ambos genes candidatos bajo el control de 2 Kb de su propio promotor, así como las regiones codificantes bajo la expresión del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). En ningún caso se recuperó el fenotipo silvestre. Además, se construyeron líneas transgénicas silvestres que sobre-expresaban (promotor 35S) las regiones codificantes de los genes At2g40070 y At2g40095, y tampoco se observó fenotipo alguno, por lo que se descartaron como candidatos del fenotipo de *srol1*.

Analizando la bibliografía, se encontró que en el intervalo de mapeo se hallaba el gen *VTC1* (Anexo Tabla XXV). Se observó que previamente se había descrito un alelo de *vtc1* (*vtc1-1*) que tenía un fenotipo casi idéntico al observado en *srol1* (Figura 86).



Figura 86. Imagen representativa de plantas control, *srol1* y *vtc1-1* crecidas en MS durante 10 días en condiciones de luz blanca.

*VTC1* codifica la enzima GDP-Man pirofosforilasa que está involucrada en la ruta D-Man/ L-Gal para la síntesis de ácido ascórbico (AsA; vitamina C) en las plantas (Wheeler *et al.*, 1998). El mutante *vtc1-1*, que presenta una actividad enzimática reducida, muestra una disminución de la síntesis de AsA (Conklin *et al.*, 1999). Por ello, para analizar si *sro1* presentaba una deficiencia de la síntesis de vitamina C, se crecieron plantas control y mutante, germinadas directamente, a 0, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de AsA en condiciones de luz blanca. Se comprobó que la vitamina C no recuperó el fenotipo en *sro1* sino que, por el contrario, inhibió significativamente ( $p < 0,05$ ) el crecimiento de la raíz principal, con respecto a las condiciones sin AsA, al igual que en el control, con el que no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas (Figura 87).

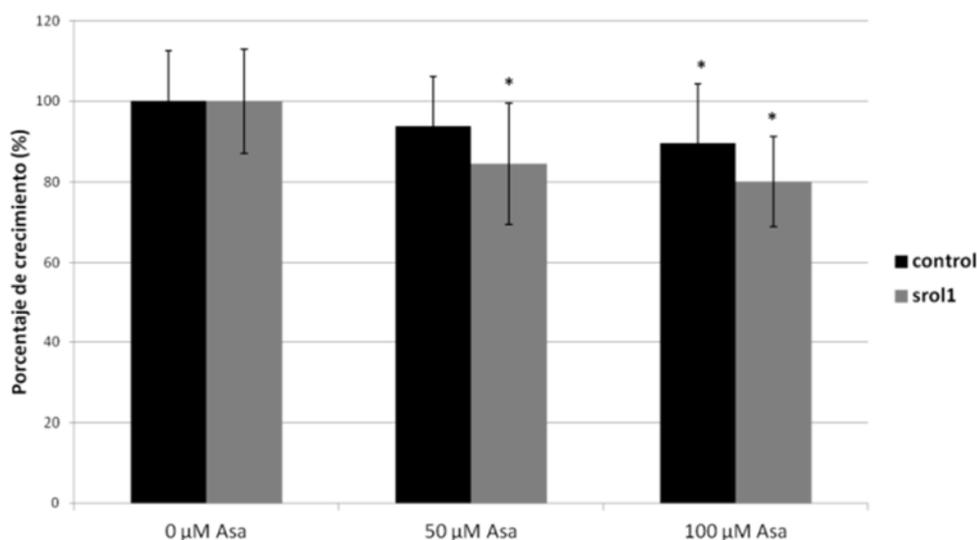


Figura 87. Porcentaje de crecimiento de la raíz principal de plantas control y *sro1* crecidas, durante 7 días, a 0, 50 y 100  $\mu\text{M}$  de AsA en condiciones de luz blanca ( $n = 25$ ). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPRM.

Mediante un sencillo procedimiento (descrito en Materiales y Métodos; Conklin *et al.*, 1996) para analizar la acumulación de AsA en la parte aérea, se demostró que *sro1* presentaba unos niveles significativamente mayores de vitamina C en las hojas con respecto al control, mientras que *vtc1-1* apenas acumulaba AsA, como se había descrito anteriormente (Conklin *et al.*, 1999) (Figura 88).

Para identificar la mutación, se secuenció el *locus VTC1* en *sro1*. Sin embargo, no se encontró ninguna mutación en dicho *locus*. Tras realizar una prueba de alelismo entre *vtc1-1* y *sro1*, se demostró que ambos mutantes no eran alélicos, por lo que se descartó *VTC1* como gen candidato de la mutación.

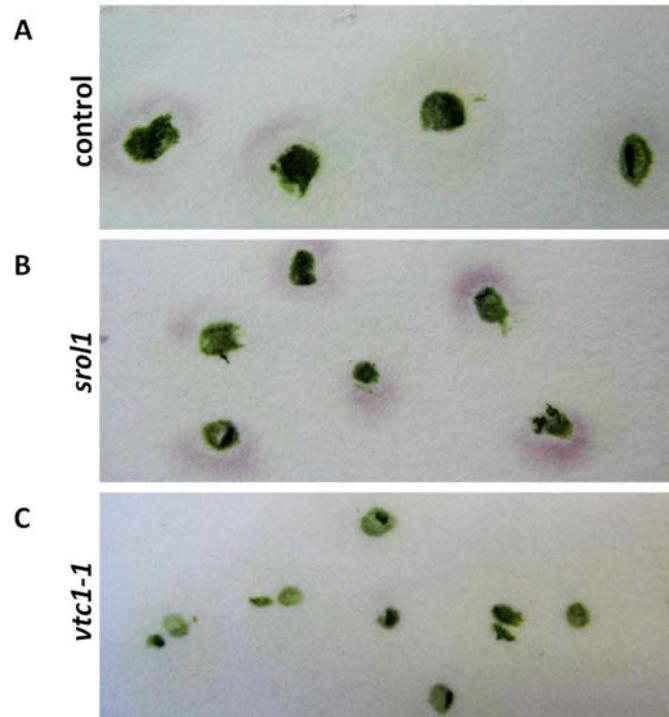


Figura 88. Acumulación de ácido ascórbico en las hojas de plantas control (A), *sro1* (B) y *vtc1-1* (C). El mutante *sro1* acumula más AsA (halo de color púrpura-azulado) en las hojas que las plantas control.

En el intervalo de mapeo de la mutación *sro1*, se identificó otra mutación puntual, una sustitución sinónima de una guanina por una adenina (G<->A), en el último nucleótido del cuarto exón del gen *LEW3* (At2g40190) (Figura 89).

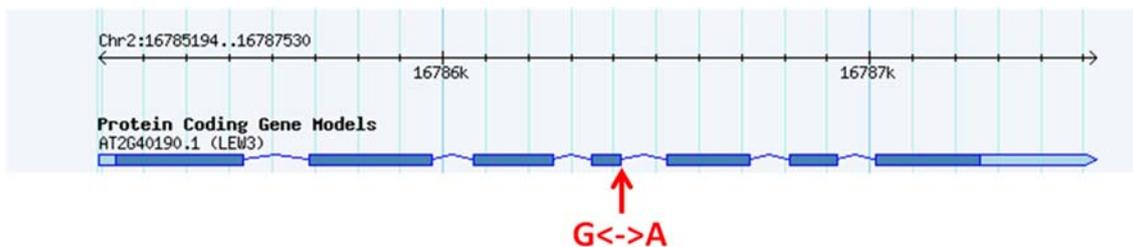


Figura 89. Localización de la mutación puntual en el gen *LEW3*.

Tras la secuenciación de la región codificante, se comprobó que dicha mutación provocaba un procesamiento incorrecto del ARNm, generando un transcrito alternativo que contiene un codón de parada de la traducción prematuro y, como consecuencia, una proteína truncada. *LEW3* es una  $\alpha$ -1,2-manosiltransferasa, localizada en la cara citosólica de la membrana del retículo endoplasmático (RE), que añade manosas, utilizando como sustrato GDP-Man, en los primeros pasos de la N-glicosilación de proteínas (Cipollo *et al.*, 2001; O'Reilly *et al.*, 2006). Para analizar el grado de glicosilación proteica en la raíz de *sro1* con respecto al control, se tiñeron las

proteínas separadas en un SDS-PAGE con una tinción específica de glicosilación proteica (descrito en Material y Métodos). En este gel se pudieron observar varias diferencias en la glicosilación de proteínas en términos cuantitativos. Uno de los cambios más significativos corresponde a una banda de aproximadamente unos 70 KDa que se tiñe débilmente en el mutante con respecto al control, tanto en raíces crecidas en luz como en oscuridad (Figura 90).

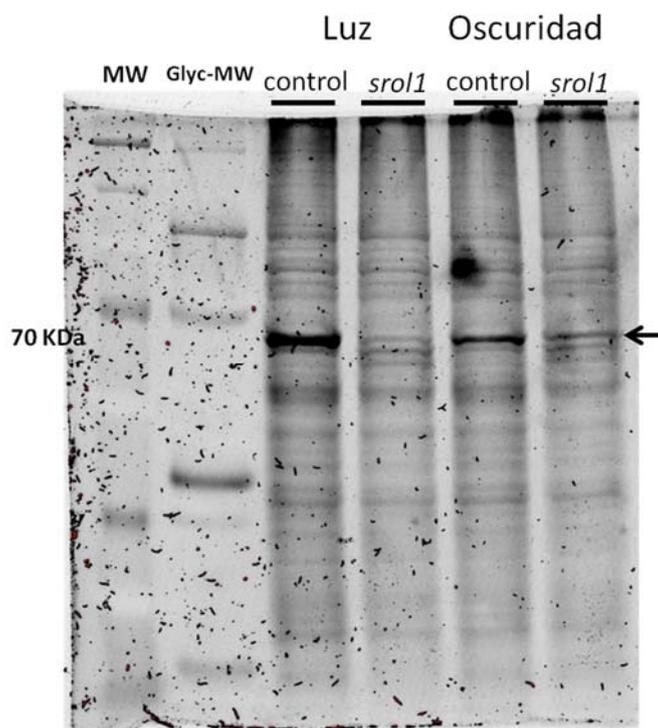


Figura 90. SDS-PAGE teñido con *Pro-Q® Emerald 300 Glycoprotein Gel and Blot Stain Kit (P21857)* para la detección de glicoproteínas. La flecha indica la banda de 70 KDa más débilmente teñida en *srol1*. En el pocillo de la izquierda se muestra el marcador de peso molecular (MW).

Mediante espectrometría de masas, se identificó que dicha banda correspondía a la  $\beta$ -glucosidasa 23 ( $\beta$ -GLU23, también llamada PYK10). Esta proteína está involucrada en respuestas a estrés y es necesaria para el crecimiento de la raíz en presencia del hongo *Piriformospora indica* (Sherameti *et al.*, 2008). Al crecer plantas control y *srol1* junto a este hongo, se observó que en ningún caso se incrementó el desarrollo de la parte aérea con respecto a las condiciones sin el hongo (Figura 91A); sin embargo, el crecimiento de las raíces control fue casi el doble en presencia del hongo comparado con las plantas crecidas en ausencia del mismo, pero en el mutante no se apreció este incremento, siendo el peso fresco de la raíz un poco menor con respecto a la condición control (Figura 91B), indicando que en el mutante *srol1* no existe, o tiene reducidos los niveles, de la proteína PYK10.

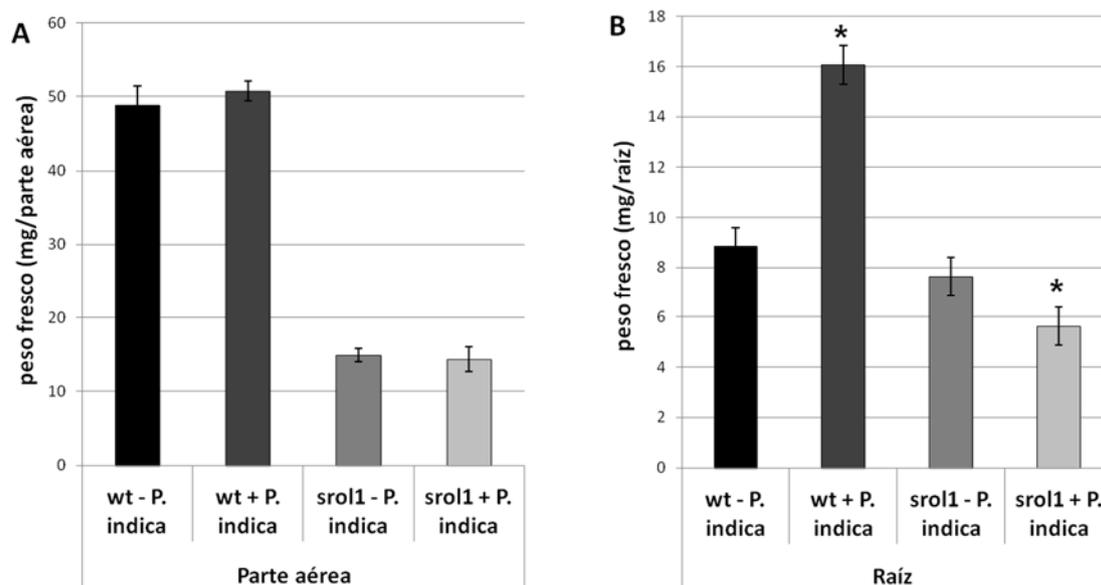


Figura 91. Peso fresco de (A) la parte aérea (mg/parte aérea) y (B) del sistema radicular (mg/raíz) de plantas control (wt) y *srol1* crecidas durante 15 días en ausencia (-) o presencia (+) del hongo *Piriformospora indica* en condiciones de luz blanca (n = 15). \*, diferencias estadísticamente significativas determinadas por la prueba *t-Student's* ( $p < 0,05$ ). Las barras de error indican DESVPROM.

Las glicoproteínas son componentes esenciales de la membrana plasmática de las células. Para comprobar si existía alguna diferencia entre el control y *srol1* en cuanto a las propiedades de la membrana plasmática, se llevó a cabo una tinción con el colorante FM® 4-64 de la raíz principal de plantas control y mutantes crecidas con el sistema radicular en condiciones de luz blanca, amarilla y en oscuridad. El colorante FM® 4-64 es un compuesto lipofílico que se intercala entre los fosfolípidos de la membrana plasmática y, en estas circunstancias, emite fluorescencia en el rango de longitud de onda correspondiente al rojo (excitación/emisión máxima ~515/640 nm). De este modo, es una herramienta muy útil para visualizar la morfología y dinámica de la membrana plasmática y de orgánulos vacuolares, así como para estudiar los procesos de endocitosis.

En todas las condiciones de estudio, tanto en el control como en *srol1*, la incorporación e internalización del compuesto en la membrana plasmática fue incrementándose con el tiempo. En luz blanca, la raíz principal de las plantas mutantes presentaron mayor dificultad para dicha incorporación comparado con las plantas control (Figura 92A). Además, dependiente también del tiempo de tinción, en el control se observaron procesos de endocitosis, eventos que sucedieron en la raíz principal de *srol1* más débilmente (Figura 92B). En luz amarilla, no se apreciaron diferencias entre el control y el mutante y, en ningún caso, se llegaron a observar procesos de

endocitosis. Además, la incorporación del compuesto se produjo con mayor facilidad con respecto a la luz blanca, de hecho, las imágenes a microscopía confocal, en este caso, se pudieron obtener a nivel del centro quiescente mientras que en luz blanca, solo superficialmente (a nivel de la epidermis) y, tras únicamente 15 minutos de tinción, se captó una señal fluorescente más intensa que en luz blanca (Figura 92A). Por último, en las raíces crecidas en oscuridad, se apreciaron diferencias entre las plantas control y *srol1* pero estas fueron más leves que en luz blanca. La incorporación del compuesto también ocurrió con mayor facilidad (aunque menor que en luz amarilla), ya que, en este caso, las imágenes también se pudieron obtener a nivel del centro quiescente. Y en estas condiciones, tampoco se llegaron a observar procesos de endocitosis ni en el control ni en el mutante (Figura 92A).

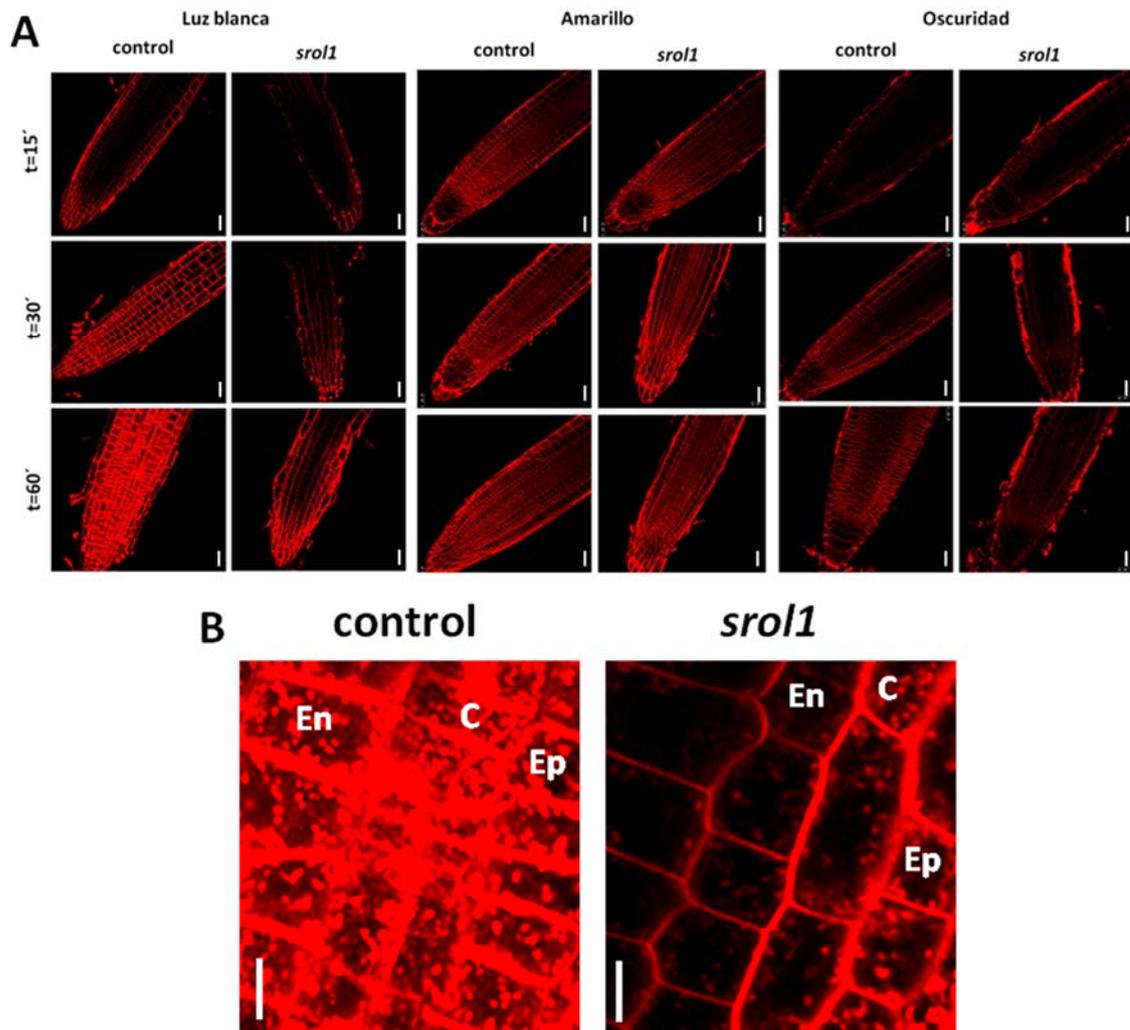


Figura 92. A) Imágenes a microscopía confocal, del meristemo apical y la zona de elongación de la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas, durante 7 días, con el sistema radicular en condiciones de luz blanca, amarilla y oscuridad, tras la tinción con el colorante FM® 4-64 durante 15, 30 y 60 minutos (n = 10). B) Procesos de endocitosis

en la epidermis (Ep), corteza (C) y endodermis (En) de la raíz principal de plantas control y *srol1* tras 60 minutos de tinción. Barras = 25  $\mu$ m.

Para comprobar que la raíz principal del mutante, con respecto al control, pudiera presentar una pared celular con diferentes propiedades, se llevó a cabo una digestión enzimática parcial de la misma, en las raíces de plantas control y *srol1* crecidas en luz blanca, previa a la tinción con el colorante FM® 4-64. El meristemo apical y la zona de elongación de la raíz principal se digirieron totalmente, por ello las observaciones se realizaron en la epidermis a nivel de la zona madura de la raíz (Figura 93).

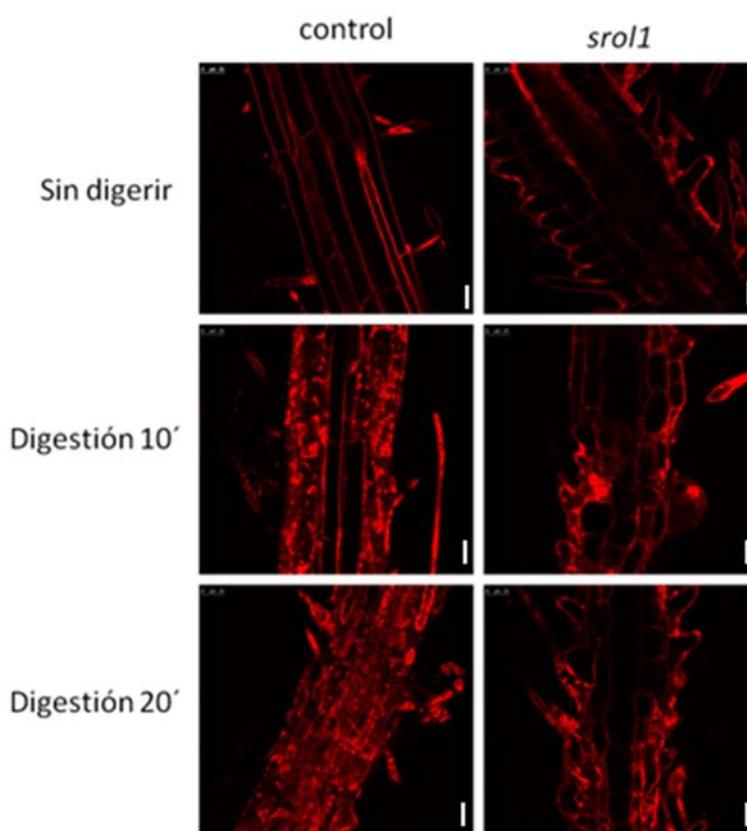


Figura 93. Imágenes a microscopía confocal, de la zona madura de la raíz principal de plantas control y *srol1* crecidas en condiciones de luz blanca durante 7 días, tras la digestión parcial de la pared celular con celulasa y pectoliasa durante 10 y 20 minutos y la tinción con el colorante FM® 4-64 durante 15 minutos (n = 10). Barra = 25  $\mu$ m.

Sin ningún tratamiento enzimático, se comprobó que, al igual que ocurría en el meristemo apical y en la zona de elongación, el mutante presentó mayor dificultad que el control para incorporar el colorante en la membrana plasmática a nivel de la zona madura de la raíz (Figura 93). Al digerir parcialmente la pared celular con celulasa y pectoliasa, se observó que la raíz principal de *srol1* fue más resistente a dicha

digestión comparado con las plantas control, manteniendo la integridad de la pared celular en algunas zonas, incluso después de 20 minutos de tratamiento enzimático (Figura 93). Estos resultados sugieren que la raíz del mutante, en luz blanca, presenta una pared celular alterada, con respecto al control.

Como estrategia definitiva para verificar que la mutación *sro11* afecta a la actividad de LEW3, se están generando líneas transgénicas *sro11* que expresen la región codificante del gen *LEW3* bajo el control del promotor 35S y así comprobar si recuperan el fenotipo silvestre.



## ***Discusión***



## DISCUSIÓN

### BLOQUE I:

#### **Identificación de nuevos genes implicados en el desarrollo de las raíces laterales**

En este trabajo, se ha utilizado un marcador de RLs descrito recientemente, *SKP2B::GUS*, que se expresa en todas las etapas del desarrollo de las RLs, incluyendo las células fundadoras de los PRLs (Manzano *et al.*, 2012). Usando la expresión del promotor *pSKP2B::GFP* como marcador en la raíz y una estrategia de separación celular y transcriptómica, se han identificado más de 600 genes que co-expresan con *SKP2B* (genes *cs-SKP2B*). La mayoría de ellos están presentes en las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema (De Smet *et al.*, 2008) (Anexo Tabla IV). El análisis fenotípico de más de 35 líneas de inserción de T-DNA, reveló que muchos de estos genes están involucrados en el crecimiento de la raíz así como en la formación y/o emergencia de las raíces laterales (Anexo Tabla I). Cuando se analizaron en detalle los diferentes estadios de desarrollo de los PRLs en algunas de estas líneas mutantes, se encontró una proporción menor de PRLs en estadio VIII y una acumulación en estadios IV-V, sugiriendo un retraso en el desarrollo de los PRLs en estos mutantes en un punto crítico del desarrollo de las RLs, ya que en ese momento deben romper la banda de Caspary e iniciar la emergencia. Uno de estos mutantes es *gh3.1-2*. El gen *GH3.1* codifica una pseudo-AIA-amido sintasa, que cataliza la síntesis de conjugados amino-ácido indol-3-acético (AIA), proporcionando un mecanismo para que las plantas hagan frente al exceso de auxina. De esta manera, los mutantes de T-DNA en este gen son hipersensibles a auxina (Staswick *et al.*, 2005). Además, la sobre-expresión de genes de respuesta a auxina, como *IAA3*, *IAA7*, *IAA17*, *GH3.2* y *GH3.3*, incrementa el número de raíces laterales (Yang *et al.*, 2014). Estos datos sugieren que la homeostasis de la auxina libre/conjugada es necesaria para propiciar la emergencia de los PRLs. También se analizó el mutante *st4b-1*. *ST4B* codifica una sulfotransferasa, una enzima que puede modificar y/o bloquear la actividad de los brasinoesteroides, una fitohormona que promueve el desarrollo de las RLs. Los BRs promueven la iniciación de las RLs por incrementar el

transporte acrópeto de auxina (Bao *et al.*, 2004), sugiriendo una posible función de ST4B en este proceso a través de la ruta de señalización de los brasinoesteroides. También se analizó la función de WLIM1, una proteína involucrada en la unión y ensamblaje de los filamentos de actina. Se ha propuesto que los filamentos de actina se necesitan para la correcta localización de los transportadores de auxina PIN (Lanza *et al.*, 2012). La re-distribución de auxina mediante estas proteínas PIN está involucrada en la iniciación y posicionamiento de diversos órganos, incluyendo las raíces laterales (Benková *et al.*, 2003). Es posible que defectos en el ensamblaje de actina conlleven a una incorrecta localización de las proteínas PIN y, por consiguiente, a defectos en el desarrollo de las RLs. Es interesante remarcar que el mutante *srol1*, identificado en este trabajo como un mutante con defectos en el desarrollo del sistema radicular, tiene alterada la distribución de los filamentos de actina y microtúbulos. En el grupo de genes *cs-SKP2B* se han identificado tres transportadores de auxina, PIN3, PIN4 y PIN7. Se ha mostrado que los mutantes *pin3* presentan una reducción significativa en la densidad de raíces laterales mientras que no se observan diferencias en *pin7* en relación con las plantas control (Laskowski *et al.*, 2008). Sin embargo, *pin2/pin3* o *pin2/pin7* desarrollan una mayor densidad de RLs que el control (Laskowski *et al.*, 2008), indicando que las proteínas PIN desempeñan una función importante en el desarrollo y emergencia de las RLs. También se analizó el mutante *clsy1-5*. El gen remodelador de la cromatina, *CHR38/CLSY1*, codifica una proteína que posee un dominio SNF2 involucrada en la ruta de silenciamiento de la ARN polimerasa IVa (PolIVa). Esta *CHR38/CLSY1* actúa junto con RDR2 (RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2) y NRPD1a (NUCLEAR RNA POLYMERASE D 1A) en la producción de pequeños ARNs interferentes (siARNs) endógenos de 24 nucleótidos. El proceso de silenciamiento de ARN causa un fenotipo de silenciamiento en las células que rodean a las células formadoras de siARNs. Recientemente se ha descrito que estos siARNs son importantes reguladores del desarrollo de la raíz (Meng *et al.*, 2010). Este trabajo apoya la idea de que la producción de siARNs puede regular la formación de RLs, aunque hasta la fecha existen pocos datos de cómo pueden actuar a nivel molecular. Estos datos demuestran que muchos de los genes *cs-SKP2B* expresados en los primeros estadios del desarrollo de las RLs, participan en la formación y/o desarrollo de las RLs. Además, este estudio genómico contribuirá a entender cómo se inician los PRLs desde un punto de vista global y ayudará a revelar la complejidad de este proceso a nivel molecular.

La señalización de auxina es muy importante durante todas las etapas del desarrollo de las raíces laterales (Benková *et al.*, 2003; Dubrovsky *et al.*, 2008; De Rybel *et al.*, 2010) y también desempeña una función importante en reprogramar las células de la corteza y de la epidermis que rodean a los PRLs para facilitar la emergencia durante las etapas finales de su desarrollo. El módulo IAA/LAX3 regula la expresión de enzimas remodeladoras de la pared celular que parecen estar involucradas en la separación celular (Swarup *et al.*, 2008). En el grupo de genes *cs-SKP2B* se han identificado los genes *IAA3*, *LAX3* y *LAX2*, así como varias enzimas que participan en los procesos de remodelación de la pared celular (Anexo Tabla I). La identificación de estos genes seguramente se debe a que *SKP2B* también se expresa en las células de la corteza y de la epidermis que rodean a los PRLs durante la formación de las raíces laterales (Manzano *et al.*, 2012). Relacionadas con la regulación por auxinas, se ha encontrado que la familia génica de las acuaporinas está muy representada en el grupo *cs-SKP2B*. Estas proteínas son reguladas por auxinas y facilitan la emergencia de las raíces laterales gracias al turgor producido por gradientes de agua (Péret *et al.*, 2012).

Otra familia génica altamente representada en el grupo de genes *cs-SKP2B* son las *PEROXIDASAS* pertenecientes a la clase III, óxido-reductasas específicas de plantas que están involucradas en diversos procesos fisiológicos. En *Arabidopsis*, se han descrito más de 73 genes que codifican para la clase III de peroxidasas (Hiraga *et al.*, 2001; Passardi *et al.*, 2006). Las peroxidasas se asocian con la formación de lignina en la pared celular primaria (Ros Barceló, 1997) y la unión entre moléculas durante la elongación celular (Iiyama *et al.*, 1994). La actividad peroxidasa también se relaciona con el mantenimiento de células madre y la división y diferenciación celular en el meristemo apical de la raíz (Jiang y Feldman, 2005; Tsukagoshi *et al.*, 2010). Cabe destacar que la actividad peroxidasa en plantas tiene la capacidad de oxidar la hormona AIA (Gazaryan *et al.*, 1996; Cosio *et al.*, 2008; Peer *et al.*, 2013), reduciendo así la cantidad de auxina activa. La sobre-expresión de una peroxidasa aniónica en plantas de tabaco reprime la formación de raíces laterales, probablemente debido a la oxidación del AIA y a la reducción de la cantidad de auxina activa necesaria para la formación de los PRLs (Lagrimini *et al.*, 1997). Recientemente, Passaia y colaboradores (2014) han mostrado que las reacciones redox mediadas por la familia *GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPX)* desempeñan una función importante en determinar la arquitectura de la raíz más que en el desarrollo de la parte aérea. Análisis genéticos han demostrado que los mutantes *gpx* afectan diferencialmente a la formación de las

RLs. Todos los mutantes *gpx*, excepto *gpx3-2*, desarrollan una densidad de PRLs mayor que las plantas control, sugiriendo que la actividad GPX actúa como un represor de la formación de RLs. Estos autores han propuesto que *GPX1* y *GPX7* desempeñan una función más relevante en el control de la arquitectura de la raíz y el desarrollo de las raíces laterales que otros miembros de la familia y que estas dos enzimas están involucradas en el control dependiente de auxina de la formación de las raíces laterales. En este trabajo se ha mostrado que hay una correlación entre la formación de las RLs y la acumulación de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$ . En el grupo de genes *cs-SKP2B*, también se encuentran varias enzimas que pueden estar involucradas en la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como citocromos P450 (12 miembros de la familia), ATRBOCH NADPH oxidasa, proteínas lipoxigenasa o transportadoras de electrones (Anexo Tabla I). Estos resultados demuestran que la señalización ROS es importante durante el desarrollo de las RLs.

En *Arabidopsis*, *UPB1*, un factor de transcripción del tipo bHLH, modula el balance entre la proliferación y la diferenciación celular en el meristemo de la raíz, marcando el límite entre la zona de división y diferenciación (Tsukagoshi *et al.*, 2010). Se ha propuesto que *UPB1* reprime directamente un grupo de genes *PEROXIDASA* en dicha zona de transición, incrementando la señalización por  $H_2O_2$  necesaria para la diferenciación en el RAM. Sin embargo, hasta la fecha no se había atribuido una función a *UPB1* en el desarrollo de las RLs. En este trabajo se muestra que *UPB1* se expresa en las células de la periferia de los PRLs, fuera de las células proliferativas, sugiriendo una función en la diferenciación celular al reprimir los genes *PEROXIDASA* como ocurre en el meristemo apical de la raíz (Tsukagoshi *et al.*, 2010). Tsukagoshi y colaboradores (2010) también han mostrado que la inhibición química de las peroxidases reduce la actividad proliferativa en el meristemo, probablemente por desacoplar la división y la diferenciación celular, promoviendo la diferenciación celular. Este trabajo ha mostrado que *UPB1* y la función peroxidasa son necesarios para el desarrollo adecuado de las RLs, especialmente durante la emergencia de las mismas.

La señalización de auxina desempeña un papel importante tanto en el control del crecimiento de la raíz principal como en la formación y desarrollo de las raíces laterales. Esta hormona regula el balance entre la proliferación y la diferenciación celular en el meristemo de la raíz así como en los primordios de raíces laterales. La señalización de auxina está involucrada tanto en la especificación de las células fundadoras como en la formación de las raíces laterales (Dubrovsky *et al.*, 2008;

Fukaki *et al.*, 2002; De Rybel *et al.*, 2010; Lavenus *et al.*, 2013). Los análisis de los estudios transcriptómicos de raíces tratadas con auxina mostraron que la mayoría de los genes *PEROXIDASA*, incluidos los presentes en el grupo de genes *cs-SKP2B*, no están regulados por esta hormona (datos no mostrados). Tsukagoshi y colaboradores (2010) han propuesto que la actividad peroxidasa regulada por *UPB1* actúa independientemente de la ruta de auxina para controlar el crecimiento del meristemo de la raíz principal. Sin embargo, existen evidencias de que la respuesta a auxina involucra a la señalización via ROS (Ma *et al.*, 2013). En este trabajo, se presentan evidencias de que, al menos, la función de *PER7* y *PER57* no se requieren para la formación de las raíces laterales de forma dependiente de auxina. Cabe destacar que varias *PEROXIDASAS* incluidas entre los genes *cs-SKP2B* están inducidas por Naxillin. Este compuesto químico, que promueve la formación de RLs, induce la expresión de un grupo de genes diferente al inducido por auxina, incluyendo varias *PEROXIDASAS* (De Rybel *et al.*, 2012). En conjunto, los datos del presente trabajo sugieren que la actividad peroxidasa regulada por *UPB1* es importante para la emergencia de los primordios, pero no para la especificación de células fundadoras del periciclo. Además, la función de estas peroxidasas parece ser independiente de auxinas, estableciéndose un nuevo punto de control (Figura 94).

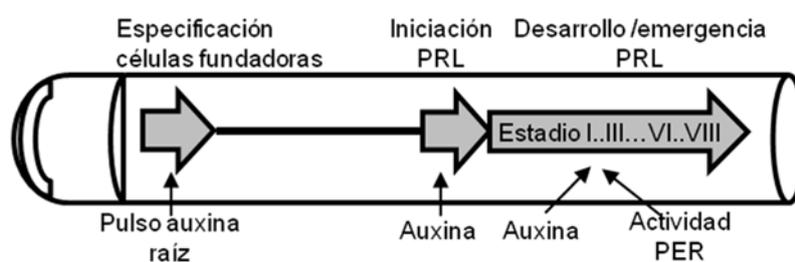


Figura 94. Esquema simplificado del desarrollo de las raíces laterales. Las células fundadoras del periciclo se especifican en el meristemo basal por la acción de un pulso de auxina de la raíz y mediante el control de un "reloj" radicular. En la zona de diferenciación, estas células fundadoras entran en el programa de formación de PRLs de una manera dependiente de auxina. El desarrollo de los PRLs puede detenerse o progresar a lo largo de los diferentes estadios de desarrollo, que están controlados por la señalización de auxina y la actividad *PEROXIDASA*, probablemente mediante rutas independientes.

Aunque todavía se necesita llevar a cabo más experimentos para determinar su modo de acción exacto, este trabajo ha puesto de manifiesto la importancia de la señalización por ROS durante el desarrollo de las raíces laterales, especialmente durante la emergencia de los primordios.

## **BLOQUE II:**

### **Identificación de *SROL1* y otros genes implicados en el desarrollo del sistema radicular**

Mediante mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS) de plantas transgénicas *pSKP2B::GUS*, se ha identificado, entre otros mutantes con sistema radicular alterado (Tesis Doctoral Manzano, C., 2011), un mutante recesivo con un sistema radicular muy reducido y elevada densidad de RLs y pelos radiculares: *srol1* (del inglés *short root in light*).

El mutante *srol1* tiene una mutación que afecta al gen *LEW3*, que codifica para una  $\alpha$ -1,2-manosiltransferasa, localizada en la cara citosólica de la membrana del retículo endoplasmático (RE). Esta proteína añade manosas a un dolicol utilizando como sustrato GDP-Manosa, en los primeros pasos del proceso de N-glicosilación, antes de que estos cuerpos glucídicos sean translocados al lumen del RE y se unan a las proteínas en formación (Cipollo *et al.*, 2001; O'Reilly *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2009) (Figura 95). Más tarde, estos cuerpos son modificados con diferentes glicanos para formar estructuras complejas necesarias para la señalización del plegamiento, transporte y función de las proteínas en los sistemas eucariotas (Herscovics y Orlean, 1993; Burda y Aebi, 1999; Gemmill y Trimble, 1999; Cipollo *et al.*, 2001; Helenius y Aebi, 2004; O'Reilly *et al.*, 2006; Weerapana y Imperiali, 2006).

La síntesis incorrecta de N-glicanos conduce frecuentemente a un proceso de N-glicosilación reducido o modificado, que tiene una variedad de efectos secundarios. La tunicamicina (Tm), un inhibidor del proceso de N-glicosilación proteica (Iwata y Koizumi, 2005), reduce drásticamente el crecimiento de la raíz principal de las plantas tratadas (Watanabe y Lam, 2008; Ozgur *et al.*, 2014). En *Arabidopsis*, el mutante nulo en *LEW3* causado por una inserción de T-DNA es letal, indicando la función esencial de este gen en las plantas (Zhang *et al.*, 2009). Tanto el mutante *lew3-1* como *srol1* son alelos viables que afectan al desarrollo de la planta. El mutante *lew3-1*, que tiene un cambio de aminoácido en la posición Gly148, muestra varios defectos en el desarrollo, incluyendo un fenotipo disminuido con hojas estrechas, fertilidad reducida, silicuas pequeñas y defectos de pared celular. La mutación *lew3* afecta al depósito de

celulosa y hemicelulosa en las paredes celulares secundarias, resultando en paredes celulares más finas y un xilema colapsado, y es probable que otras proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular estén afectadas por la mutación *lew3*. Además, la germinación de la semilla y/o el crecimiento de las plántulas mutantes *lew3-1* son sensibles al estrés osmótico y al ABA (Zhang *et al.*, 2009). Sin embargo, el mutante *srol1* muestra un fenotipo más severo en términos de crecimiento radicular, ya que *srol1* desarrolla una raíz muy corta. Estos resultados demuestran las importantes funciones biológicas del proceso de N-glicosilación en las plantas y en el desarrollo de la raíz.

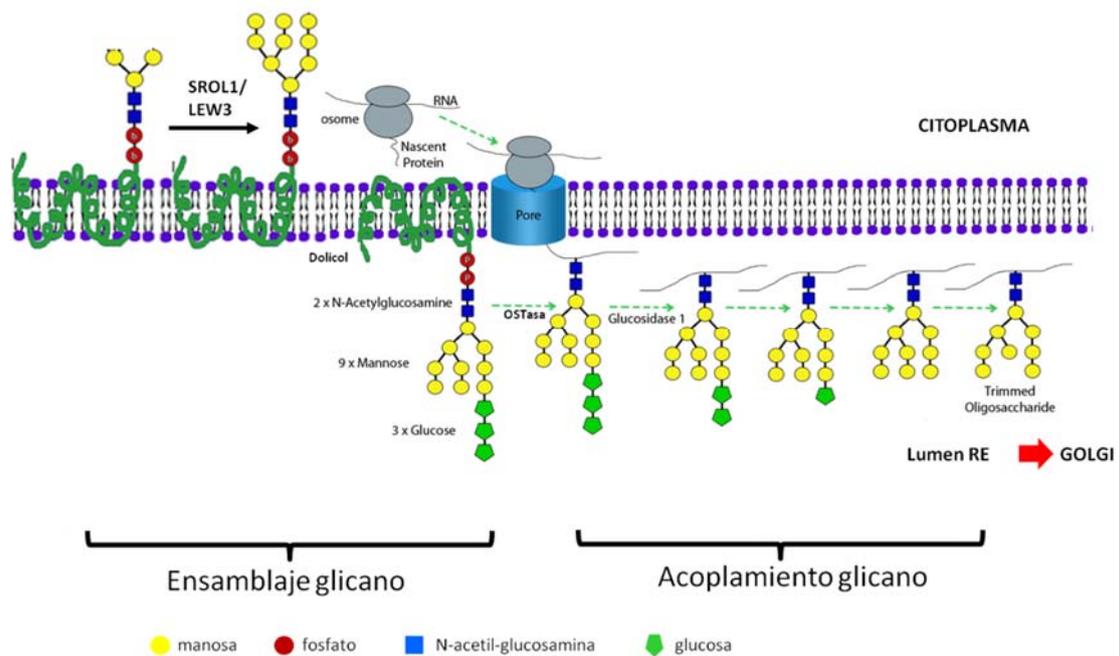


Figura 95. Proceso de N-glicosilación en *Arabidopsis*. La N-glicosilación comienza con el ensamblaje del oligosacárido Man<sub>5</sub>GluNAc<sub>2</sub> al lípido dolicol fosfato, entonces el glicano se traslada a la cara luminal del RE y más tarde se incrementa por las glucosiltransferasas. Seguidamente, el lípido unido al oligosacárido es transferido por el complejo OST a un residuo de Asn determinado de los péptidos secretorios en formación, y se modifica para formar una estructura glucídica compleja (Zhang *et al.*, 2009).

El fenotipo de raíz corta del mutante *srol1* se debe a la mutación en *LEW3* y la incidencia directa de la luz sobre la raíz exacerba dicho fenotipo, ya que raíces de *srol1* crecidas en oscuridad presentan apariencia silvestre (Figura 43). Además, este efecto depende más de la calidad que de la intensidad de la luz, puesto que plantas *srol1* crecidas en distintas calidades de luz recuperan parcialmente el fenotipo, sobre todo en presencia de luz amarilla (Figura 41); sin embargo, esto no sucede cuando se reduce la intensidad de luz que incide sobre la raíz (Figura 40). Tras analizar el efecto de la calidad de la luz en la tasa de división celular en el meristemo apical de la raíz

(RAM) y en la elongación celular de la zona de elongación en *srol1*, se ha observado que, en presencia de luz blanca, el mutante muestra defectos en ambos procesos; sin embargo, con luz amarilla, se reduce la capacidad proliferativa del RAM pero se recupera la capacidad de elongación celular (Figuras 44-48). Esto es bastante sorprendente ya que la luz amarilla no es absorbida o, mejor dicho, utilizada por las plantas. Sin embargo, no está claro si esta longitud de onda puede tener una posible función en la biología de la raíz. Se ha descrito que la hormona AIA es inestable en presencia de luz blanca mientras que la luz filtrada reduce su catabolismo, por lo que es posible que el fenotipo del mutante *srol1* esté relacionado con el catabolismo del AIA. Algunos estudios han demostrado que el uso de un filtro amarillo, que elimina los rayos UV y algunas longitudes de onda del azul, suprime el efecto inhibitorio de la luz blanca en el crecimiento de la raíz (Stasinopoulos y Hangarter, 1990). En un trabajo previo del grupo del Dr. Mark Estelle, se ha descrito un mutante de raíz corta denominado *wxr1* (*weak auxin response1*) (Ge *et al.*, 2010), un alelo del gen *ROOT UV-B SENSITIVE2 (RUS2)* (Leasure *et al.*, 2009). La eliminación de la luz UV-B mediante un filtro amarillo recupera parcialmente el crecimiento de la raíz en *wxr1*, sugiriendo que la luz UV contribuye al fenotipo *wxr1* pero, en este caso, la reversión del crecimiento se debe más a la intensidad de la luz que a longitud de onda utilizada (Ge *et al.*, 2010).

Aunque la luz actúa como un factor de estrés para el sistema radicular, influyendo negativamente en su desarrollo (Yokawa *et al.*, 2011; Silva-Navas *et al.*, sin publicar), y el sistema radicular de la mayoría de las plantas se desarrolla bajo tierra, las raíces pueden estar expuestas a la luz filtrada a través del suelo, al menos los primeros 2-3 cm. Es importante remarcar que las raíces expresan foto-receptores (fitocromos, fototropinas y criptocromos), aunque su función molecular en estos órganos no está del todo clara (Ruppel *et al.*, 2001; Mullen *et al.*, 2002; Galen *et al.*, 2007; Molas y Kiss, 2008). Un estudio ha demostrado que los fitocromos, especialmente los fitocromos cromóforos, están implicados en la inhibición del crecimiento de la raíz mediada por ácido jasmónico (JA), indicando que esta hormona está involucrada en la respuesta a la luz en la raíz (Costigan *et al.*, 2011). En el análisis transcriptómico de *srol1*, se han identificado varios factores de transcripción implicados en la respuesta a JA, y el mutante es más resistente a la inhibición por la hormona con respecto al control (Figura 62). Además, mediante cruces con mutantes de diferentes foto-receptores, se ha comprobado que el fenotipo *srol1* no está mediado

por estos receptores lumínicos, ya que los dobles mutantes no recuperan el crecimiento radicular (Figura 49).

En este trabajo se muestra que el mutante *sro1* es deficiente en el proceso de N-glicosilación. El análisis de los perfiles de proteínas del control y el mutante *sro1* ha mostrado que el mutante acumula niveles bajos de la proteína  $\beta$ -glucosidasa 23 ( $\beta$ -GLU23), que tiene alterada glicosilación o estabilidad en *sro1* (Figura 90).  $\beta$ -GLU23 o PYK10 es una proteína involucrada en respuestas al estrés y es necesaria para la interacción beneficiosa con el hongo *Piriformospora indica* (Sherameti *et al.*, 2008). Estos autores han demostrado que PYK10 se necesita para el crecimiento de la raíz en presencia del hongo. En este trabajo se ha mostrado que el mutante *sro1* no presenta, o tiene reducidos los niveles, de la proteína PYK10 (Figura 91), ya que carece de la capacidad de incrementar su sistema radicular en presencia del hongo, lo que pone de manifiesto una clara relación entre el proceso de N-glicosilación y la resistencia a patógenos.

El proceso de glicosilación también se requiere para el transporte de las Protón-ATPasas a la vacuola (Gillespie *et al.*, 1991). Así, en *sro1*, probablemente muchos de estos canales no se localizan correctamente y es posible que esto genere gradientes de pH diferentes entre el interior de la célula y la región apoplástica. Esta diferencia de pH afecta a la polarización de la membrana, conduciendo a la alteración de la permeabilidad de la misma, como se observa por la reducida incorporación de la sonda FM® 4-64, que depende de la carga de la membrana, cuando las raíces crecen en presencia de luz (Figura 92). De acuerdo con esto, se generaría un ambiente ácido en el interior de la célula que impide el crecimiento celular (Pardo *et al.*, 2006; Rodríguez-Rosales *et al.*, 2009) y ello explicaría que un pH=7.0 del medio de cultivo favorezca el crecimiento de la raíz principal del mutante *sro1* (Figura 72A). Así se establece una conexión entre el proceso de N-glicosilación, la luz y el pH. La homeostasis del pH intracelular es un proceso altamente conservado en todos los organismos. Algunas arqueobacterias han desarrollado un sistema de transporte iónico activado por una longitud de onda de 575 nm (correspondiente al amarillo) e independiente de la concentración iónica (Fu *et al.*, 2012). Aunque muy especulativo, ya que no se han encontrado ortólogos de este sistema de transporte regulado por luz amarilla en plantas superiores, este sistema podría explicar que, en el mutante *sro1*, los efectos del pH y la luz amarilla no sean aditivos (Figura 72B).

Defectos en el proceso de N-glicosilación conllevan a la interrupción de la homeostasis de las proteínas en el RE, provocando estrés mediado por el RE que activa la ruta de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*). El sistema UPR induce la sobre-expresión de *BiP3*, una chaperona implicada en la defensa contra el estrés de RE (Srivastava *et al.*, 2013, Ozgur *et al.*, 2014), que se une a las proteínas no glicosiladas para prevenir su agregación y así aliviar el estrés (Koiwa *et al.*, 2003; Henquet *et al.*, 2008; Schröder, 2008; Zhang *et al.*, 2008). *BiP3* también aumenta la expresión bajo estrés abiótico ya que, bajo estas condiciones, la demanda de proteínas en las células puede exceder a la capacidad de formación de las mismas por parte del RE, produciéndose una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen. El mutante *lew3* incrementa los niveles de expresión de *BiP3* bajo estrés abiótico, como el estrés osmótico y el tratamiento con ABA, indicando que la N-glicosilación, el sistema UPR y el estrés abiótico están íntimamente relacionados (Zhang *et al.*, 2009). El mutante *sro1* sobre-expresa *BiP3* cuando la raíz crece en presencia de luz. Esto sugiere que la N-glicosilación y el sistema UPR también están relacionados con la luz y el desarrollo de las raíces. Las proteínas no glicosiladas que se acumulan en el lumen del RE, se degradan a través de la ruta del proteasoma (sistema Ub) (Iwata y Koizumi, 2012; Howell, 2013). En el mutante *sro1*, la degradación del marcador DII-VENUS dependiente de auxina ocurre de manera parecida que en el control (Figura 53), indicando que la respuesta a auxina y el sistema Ub funcionan correctamente.

Como se ha comentado anteriormente, en el mutante *sro1* la expresión de *BiP3* está inducida (Tabla 14). *BiP3* retiene al factor de transcripción bZIP28 en el lumen del RE bajo condiciones no estresantes y se disocia de él en respuesta a estrés mediado por el RE, permitiendo su movilización al núcleo e inducción de sus genes diana, entre ellos *BiP3*. La sobre-expresión de *BiP3* retiene o bloquea a bZIP28 en el RE incluso bajo condiciones estresantes, bloqueando la transducción de señal de bZIP28. En el mutante de T-DNA *bip3* no se producen transcritos de *BiP3*, por lo que bZIP28 está constitutivamente activado, incluso en situaciones no estresantes (Srivastava *et al.*, 2013). La sobre-expresión de algunos factores de transcripción de respuesta a estrés abiótico incrementa la tolerancia a dicho estrés y favorece la longitud de la raíz principal (Jung *et al.*, 2013). En el mutante de T-DNA *bip3*, la movilización de bZIP28 constitutivamente al núcleo favorece el desarrollo del sistema radicular, tanto a nivel del crecimiento de la raíz principal como del desarrollo de las

RLs (Figura 82), mostrando una mayor tolerancia a las condiciones de crecimiento que el control.

Mediante el análisis transcriptómico de *srol1*, se ha identificado otro gen que ha resultado estar implicado en el desarrollo del sistema radicular, *HSFA6a*. Los factores de transcripción de estrés por calor HsfA regulan la activación de genes de respuesta a calor (Nover *et al.*, 1996). En el mutante *srol1*, la expresión de *AtHsfA6a* está reprimida con respecto al control, específicamente en condiciones de luz blanca (Tabla 14). No se ha descrito nada acerca del efecto de la expresión de *HsfA* en el desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis*; sin embargo, hay evidencias de la función que desempeñan los factores HsfB en el desarrollo de la raíz (Begum *et al.*, 2013). Estos pueden actuar como represores de los genes de respuesta a estrés por calor (Czarnecka-Verner *et al.*, 2000, 2004). La sobre-expresión de *HsfB4* resulta en una producción extra de células de la cofia de las RLs (Begum *et al.*, 2013). Normalmente, en *Arabidopsis*, las células de la cofia de las RLs limitan el crecimiento de las mismas (Dolan *et al.*, 1993; Benfey y Scheres, 2000; Truernit y Haseloff, 2008). De esta manera, *HsfB4* desempeña una función importante en el desarrollo de las RLs (Begum *et al.*, 2013). Así mismo, mutantes de activadores de la expresión génica, como HsfA, tendrían un efecto parecido al descrito anteriormente, lo cual podría explicar la acumulación de PRLs en estadio V observada en el mutante *hsfA6a* (Figura 83C), y sugerir también una función para la clase A de *Hsf* en el desarrollo de las RLs. En conjunto, estos datos apoyan la idea de que genes de estrés RE están implicados en el desarrollo del sistema radicular.

La maquinaria de ensamblaje de proteínas en el RE requiere la formación de enlaces disulfuro, que causan la producción de  $H_2O_2$ , una reacción catalizada por ERO1 (*ER oxidoreductase 1*) (Sevier y Kaiser, 2008). El  $H_2O_2$  tiene dos efectos diferentes en las células: (1) es uno de los segundos mensajeros que regulan la defensa antioxidante en respuesta a condiciones de estrés (Gechev *et al.*, 2002); y (2), excesiva cantidad de  $H_2O_2$  en las células, causa daños irreversibles en las mismas y conduce a la muerte celular (Gechev *et al.*, 2006). El estrés de RE provocado por tunicamicina induce un incremento en la producción de  $H_2O_2$  ya que, debido a la acumulación de proteínas no glicosiladas en el RE, se activa el sistema UPR y se induce la expresión de *ERO1* (Ozgun *et al.*, 2014). Además, la iluminación de raíces, incluso durante unos pocos segundos, induce una situación de estrés para estos órganos, lo que conlleva a una inmediata y fuerte producción de ROS, especialmente

de  $H_2O_2$  (Yokawa et al., 2011). El mutante *srol1* induce la expresión de *ERO1* y presenta unos niveles de  $H_2O_2$  significativamente más elevados en el meristemo apical y en la zona de elongación, con respecto al control, cuando las raíces crecen en presencia de luz blanca, diferencias que desaparecen en luz amarilla y cuando las raíces crecen en oscuridad (Figura 63). La expresión del gen *ERO1* también se puede inducir en condiciones de alta salinidad, contribuyendo a la formación de  $H_2O_2$  (Ozgur et al., 2014). Esto podría explicar la mayor sensibilidad presentada por el mutante *srol1* al crecimiento en un medio salino, con respecto al control (Figura 66). Para reducir o re-organizar los enlaces disulfuro incorporados en las proteínas, las células utilizan glutatión (GSH) en el lumen del RE (Tu y Wiessman, 2004). El mutante *srol1* también induce la expresión de glutatión transferasas. En las plantas, existe un equilibrio dinámico entre la formación de ROS y la actividad antioxidante (Hancock et al., 2001; Mittler, 2002). Para protegerse de las ROS generadas, las plantas poseen enzimas detoxificantes y antioxidantes de bajo peso molecular, como el ácido ascórbico (AsA) (Hancock et al., 2001; Vranová et al., 2002). La ascorbato peroxidasa (APX) es una de las enzimas detoxificantes de  $H_2O_2$  más importantes en las células, especialmente en los cloroplastos y el citoplasma (Asada, 2006). El mutante *srol1* reduce la expresión de genes *APX* pero presenta altos niveles de AsA acumulados en la parte aérea (Figura 88). Es interesante mencionar que las plantas no solo usan la GDP-Man como sustrato en la síntesis de polisacáridos de la pared celular y/o glicoproteínas, sino también en la formación de L-ascorbato (Smirnov y Wheeler, 2000; Lukowitz et al., 2001; Linster y Clarke, 2008) (Figura 96). Debido a la deficiencia en la ruta de N-glicosilación, en el mutante *srol1* el exceso de GDP-Man puede estar siendo utilizado para la síntesis de ácido ascórbico, lo cual podría explicar la acumulación de AsA en las hojas. De esta manera, el fenotipo de raíz corta descrito para *vtc1-1*, un mutante deficiente en la síntesis de AsA, no se debe a dicha deficiencia como se ha propuesto (Conklin et al., 1999), si no que este fenotipo, probablemente, es consecuencia de la falta de N-glicosilación de ciertas proteínas. Las ROS generadas inhiben la proliferación celular en el RAM y, por consiguiente, la elongación de la raíz principal, por alterar la distribución de auxina en el meristemo (Pasternak et al., 2005). El mutante *srol1* presenta una reducida capacidad proliferativa en el meristemo apical, como se ha comentado en apartados anteriores (Figura 44), así como defectos en cuanto a la distribución de auxina en el RAM, presentando una acumulación de la hormona en la cofia lateral y una menor distribución de la misma por el cilindro vascular de la raíz principal, con respecto al

control, como se ha observado mediante la visualización del marcador DII-VENUS (Figura 53).

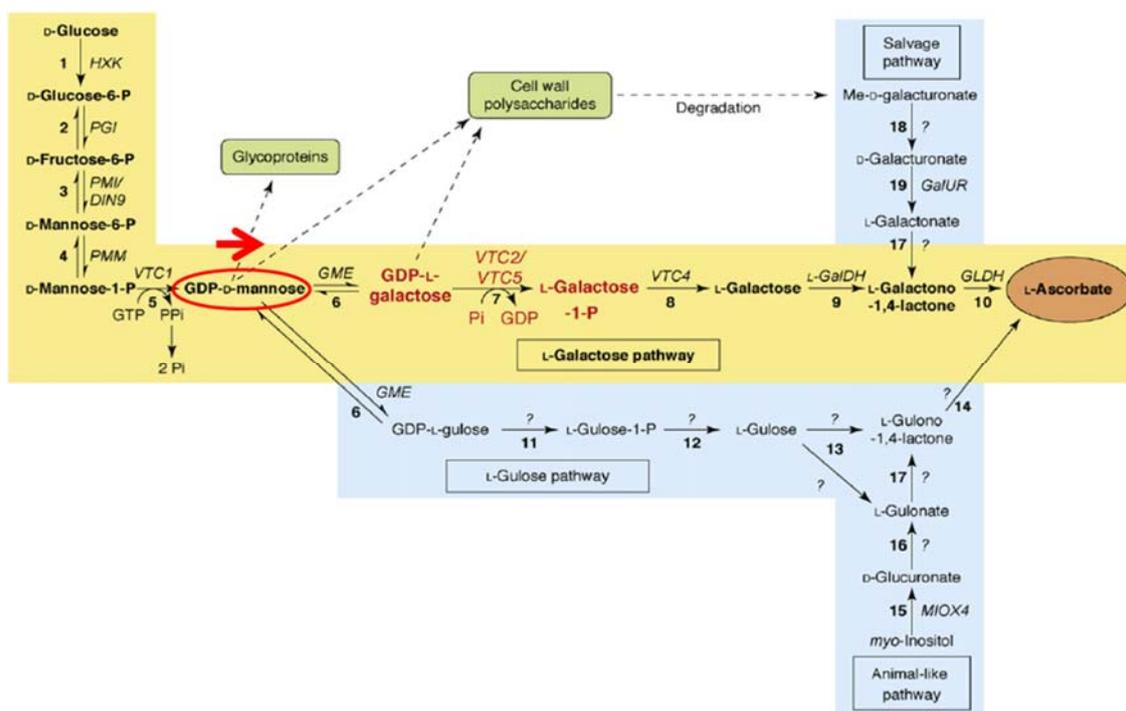


Figura 96. Rutas biosintéticas de L-ascorbato en las plantas superiores. La ruta L-galactosa es la principal, señalada en amarillo con los intermediarios metabólicos en negrita. Las rutas biosintéticas alternativas están señaladas en azul (Linster y Clarke, 2008).

La señalización mediada por ROS puede regular la señalización por calcio (Suzuki *et al.*, 2011), regulando el desarrollo de pelos radiculares a través de la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Foreman *et al.*, 2003). El mutante *sro1* induce la expresión de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasas y otros transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$ , así como proteínas de unión a calcio, como la calmodulina, uno de los reguladores de la transducción de la señal de calcio en las células. Esto explicaría la mayor densidad de pelos radiculares presentada por el mutante con respecto al control.

El estrés de RE conlleva un gasto energético extra en términos de uso de ATP. Este gasto adicional puede desencadenar una disfunción mitocondrial (Yoshida *et al.*, 2011) que inhibe la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis (Noctor *et al.*, 2007). Esto explicaría que en el mutante *sro1* se encuentren reprimidos muchos genes relacionados con la actividad cloroplástica, entre ellos *PGR5* (*Proton gradient regulation 5*). *PGR5* codifica una proteína localizada en los tilacoides, importante en el flujo cíclico de electrones dependiente de ferredoxina (CEF) junto al fotosistema I (Munekage *et al.*, 2002). Un mutante sensible a ABA, *abo5*, en condiciones de alta

intensidad de luz, también muestra niveles reducidos de transcritos de *PGR5* junto con un incremento en los niveles de  $H_2O_2$  en el meristemo apical de la raíz principal. Es interesante destacar que *abo5* presenta una reducción significativa del sistema radicular, defecto que se atenúa cuando el mutante se crece con un fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad, es decir, reduciendo la cantidad de luz y, por consiguiente, el nivel de estrés en la raíz como consecuencia de la misma (Liu *et al.*, 2010). Estos resultados se pueden relacionar con lo observado en el mutante *srol1*.

El análisis transcriptómico de *srol1* también ha revelado la inducción de la expresión de muchos genes de la familia *citocromo P450* (*CYPs*). Las *CYPs* son un grupo de hemo-proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial. El genoma de *Arabidopsis* contiene más de 286 genes *CYPs* (Paquette *et al.*, 2000), de los cuales muchos se expresan en respuesta a la radiación UV (Narusaka *et al.*, 2004), participando en la detoxificación de las ROS generadas (Suzuki *et al.*, 2012). Ante estrés oxidativo, y mediante la señalización por JA (Narusaka *et al.*, 2004), las *CYPs* intervienen en la biosíntesis de AIA (Zhao y Shichi, 1998; Normanly y Bartel, 1999; Hull *et al.*, 2000; Mikkelsen *et al.*, 2000) y las plantas sobre-expresoras de *CYPs* presentan un fenotipo de sobreproducción de auxina (Zhao *et al.*, 2002).

En las plantas, en respuesta al estrés mediado por el RE se activa la autofagia del RE (Liu *et al.*, 2012). La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas, mediante el cual, el citoplasma, incluyendo el exceso de orgánulos o aquellos deteriorados o aberrantes, se engloba en vesículas de doble membrana y se libera dentro del lisosoma/vacuola para su descomposición y eventual reciclado de las macromoléculas resultantes, constituyendo un proceso reparador (Bergamini *et al.*, 2007). La deficiencia de nitrógeno puede inducir el proceso de autofagia celular (Doelling *et al.*, 2002; Hanaoka *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2005, 2009; Xiong *et al.*, 2005, 2007). Ante la deficiencia de nitrógeno, el mutante *srol1* incrementa sorprendentemente el crecimiento de la raíz principal con respecto a las condiciones control (Figura 73). Estos datos parecen indicar que la deficiencia de nitrógeno alivia los efectos que genera el estrés de RE en el mutante *srol1*, al inducir la degradación del RE.

Como se comentó en el apartado de resultados, el mutante *srol1* muestra un sistema radicular muy reducido, lo que hace pensar que este mutante tenga una menor capacidad para adquirir nutrientes. El análisis ionómico de *srol1* ha revelado que la raíz es funcional en cuanto a la absorción de nutrientes (Figura 75). No

obstante, las plantas mutantes muestran una proporción significativamente menor de trazas de Cr con respecto al control en luz blanca. El Cr(VI) induce la generación de ROS en respuesta al estrés (Martin *et al.*, 1998; Horie *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2013; Trinh *et al.*, 2014). Presumiblemente, la generación de ROS debida a la incidencia directa de la luz en la raíz de *srol1*, podría estar reduciendo parte del contenido endógeno de cromo. Por otro lado, el incremento significativo de la proporción de trazas de Mo en las plantas mutantes *srol1*, con respecto al control, cuando las raíces crecen en oscuridad se explica por el hecho de que el Mo actúa como cofactor en el metabolismo de ROS en oscuridad. El Mo y la enzima xantina deshidrogenasa (XDH) catalizan la conversión de los productos catabólicos de las purinas, hipoxantina y xantina, en ácido úrico, que es degradado a alantoína y alantoato. Estos metabolitos pueden atenuar los niveles de ROS (Brychkova *et al.*, 2008; Galeeva *et al.*, 2012). Este podría ser un mecanismo que explica, en parte, la recuperación del crecimiento de la raíz de *srol1* en oscuridad.

En el análisis transcriptómico de *srol1*, también se han identificado muchos genes relacionados con el transporte floemático, que disminuyen su expresión específicamente en el mutante. Los ensayos experimentales han revelado que *srol1* presenta defectos en cuanto a la velocidad del transporte floemático (Figura 68). El transporte de carbohidratos desde los tejidos fotosintéticos puede ser un factor limitante del crecimiento del sistema radicular (Bingham y Stevenson, 1993; Freixes *et al.*, 2002) y varios estudios han demostrado que la arquitectura del sistema radicular está muy relacionada con el estado de carbono en la raíz (Bingham *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Freixes *et al.*, 2002; Lee-Ho *et al.*, 2007; MacGregor *et al.*, 2008). El mutante *Ird3*, que presenta un transporte floemático defectuoso, tiene reducido el crecimiento de la raíz principal, probablemente por una menor capacidad proliferativa en el meristemo apical y expansión celular (Ingram *et al.*, 2011). Estas evidencias podrían relacionarse con los mismos defectos observados en el mutante *srol1*, como ya se ha comentado anteriormente.

La expansión celular está regulada por la interacción entre los filamentos de actina y los microtúbulos (Collings *et al.*, 2006), que forman un entramado por todo el citoplasma (Collings y Allen, 2000; Wasteneys, 2002; 2004; Wasteneys y Collings, 2004). Los filamentos de actina son esenciales para el tráfico polarizado de vesículas que contienen nuevos materiales de membrana plasmática y pared celular (Lee *et al.*, 2008; Zonia y Munnik, 2008; 2009; Hable y Hart, 2010). En *Arabidopsis*, la

desorganización de los filamentos de actina inhibe la elongación de la raíz (Andreeva *et al.*, 2010), la división celular en el meristemo apical (Wasteneys y Galway, 2003) y afecta a la distribución de auxina por alterar la re-localización en la membrana plasmática de algunas proteínas transportadoras (Friml *et al.*, 2002; Harrison y Masson, 2008). En las plantas, las GTPasas relacionadas con Rho (ROP; RHO OF PLANTS) regulan el citoesqueleto de actina en respuesta a estreses abióticos (Fu *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2002; Vernoud *et al.*, 2003; Nibau *et al.*, 2006). En *Arabidopsis* hay 11 ROPs (Kost *et al.*, 1999; Li *et al.*, 1999; Molendijk *et al.*, 2001) que interactúan con RICs (*ROP-interactive1 CRIB motif-containing protein*) para promover el ensamblaje de actina (Gu *et al.*, 2005). Se ha descrito que la actividad de las proteínas ROPs influyen en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Carol *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007) y en la expresión de genes de calmodulina (Venus y Oelmüller, 2013). El análisis transcriptómico de *srol1* ha revelado que el mutante sobre-expresa genes *ROPs*, *RICs* y calmodulina. La sobre-expresión de ROPs induce la formación de pelos radiculares (Jones *et al.*, 2002), fenómeno observado en *srol1*, y la agrupación de los filamentos de actina en el citoplasma (Venus y Oelmüller, 2013), como también se ha visualizado en la raíz del mutante mediante el marcador de actina 35S::GFP-ABD2-GFP (Figura 69). Esta desorganización del citoesqueleto puede ser la causa del defecto que muestra *srol1* en la localización del transportador de auxina PIN4 en el meristemo apical de la raíz (Figura 55E). *PIN4* desempeña una función importante en generar un sumidero de auxina por debajo del centro quiescente, esencial para el patrón de la distribución de esta hormona (Friml *et al.*, 2002). A pesar de este defecto, se ha comprobado, mediante la visualización del factor de transcripción PLETHORA2 (Figura 51) y marcadores celulares (Figura 50), que el mutante *srol1* no presenta problemas en el mantenimiento del centro quiescente, así como en la identidad celular de otros tejidos de la raíz, pero sí en la capacidad proliferativa del meristemo radicular.

En la zona madura de la raíz de *Arabidopsis*, los microtúbulos se disponen oblicuamente al eje longitudinal de las células de la corteza (Wasteneys, 2002; 2004; Wasteneys y Collings, 2004). Estos polímeros de tubulina están sujetos a una dinámica continua de des- y polimerización (Desai y Mitchison, 1997). El tratamiento con la droga oryzalin promueve la despolimerización de los microtúbulos en la raíz de *Arabidopsis*, lo que conlleva a una desorganización de los mismos (Paredes *et al.*, 2006). El mutante *ark1* presenta pelos radiculares con microtúbulos más largos por una despolimerización reducida (Sakai *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2008). *ARMADILLO-REPEAT KINESIN1 (ARK1)*, originalmente llamado *MORPHOGENESIS OF ROOT*

*HAIR2* (*MRH2*) (Jones *et al.*, 2006), promueve la despolimerización de los microtúbulos en los pelos radiculares (Sakai *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2008; Eng y Wasteneys, 2014) y la sobre-expresión de *ARK1* resulta en una incrementada despolimerización de los mismos (Eng y Wasteneys, 2014). El análisis transcriptómico de *sro1* ha revelado que el mutante induce la expresión de *ARK1* en la raíz principal específicamente en condiciones de luz blanca, y presenta una desorganización del entramado de microtúbulos con respecto al control (Figura 70). Estos datos podrían indicar una nueva función de *ARK1* en la despolimerización de microtúbulos en la raíz principal. En *Oryza sativa*, un mutante de pérdida de función, sensible a la temperatura, causado por una inserción de T-DNA en el gen *OsGNA1*, que codifica una glucosamina-6-P acetiltransferasa involucrada en la biosíntesis *de novo* de la UDPN-acetilglucosamina (UDPN-GlcNAc), presenta un fenotipo de raíz corta, alteración en la estabilidad de los microtúbulos y acortamiento de las células en la zona de elongación (Jiang *et al.*, 2005). En las células animales, las proteínas de unión a microtúbulos, como Tau, MAP2 y MAP4, se modifican mediante O-GlcNAc y se ha sugerido que la acetilación incrementa la estabilidad de los microtúbulos (Maruta *et al.*, 1986; Grabarek *et al.*, 1995). Estas observaciones apoyan la idea de que la glicosilación de proteínas desempeña una función importante en el metabolismo de las células, la estabilización de los microtúbulos y el tamaño de las células en las raíces.

El mutante *sro1* presenta muchos cambios a nivel transcriptómico pero, sorprendentemente, muy pocos a nivel metabólico. Sin embargo, se ha identificado un metabolito que podría estar relacionado con formas metiladas de auxina, conjugada con una estructura glucídica también metilada, que se acumula selectivamente en la raíz de *sro1* en condiciones de luz blanca pero no cuando la raíz crece en luz amarilla (Figura 76), correlacionándose con la recuperación del fenotipo; y que, según se ha demostrado mediante el uso de injertos, no se transporta desde la parte aérea (Figura 81). La formación del conjugado AIA-Glu está catalizada por las UDP-glucosiltransferasas (*UGT*) (Szerszen *et al.*, 1994), enzimas que están sobre-expresadas en el mutante *sro1*. Se ha descrito que la acumulación de AIA-Glu puede provocar un fenotipo similar al de una alta concentración de auxina (Mikkelsen *et al.*, 2004). Los conjugados de AIA están implicados, entre otros procesos, en la protección de la hormona libre contra la degradación oxidativa (Cohen y Bandurski, 1982) y, en el caso de MeAIA, en la regulación del crecimiento celular (Shulaev *et al.*, 1997; Dudareva *et al.*, 2000; Murfitt *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2003). MeAIA es una molécula no polar que puede difundir a través de las membranas, a diferencia del AIA y otros

conjugados de AIA que requieren un sistema de transporte activo (Qin *et al.*, 2005). De esta manera, MeAIA está implicado en la regulación de la distribución de auxina (Li *et al.*, 2008). La enzima AtMES17 cataliza *in vivo* la hidrólisis de MeAIA a AIA (Yang *et al.*, 2008). Se ha demostrado que el estrés de RE reduce la expresión de hidrolasas de AIA-amino (Kiyosue *et al.*, 1994) y el análisis transcriptómico de *sro1* ha revelado que la expresión de *MES17* está reducida en el mutante cuando crece en luz blanca. Esto explicaría la acumulación de formas metiladas de auxina en la raíz del mutante *sro1* en estas condiciones, así como la mayor resistencia mostrada al tratamiento con MeAIA exógeno, con respecto al control (Figura 79). Los mutantes *axr1-3* y *axr2-1*, que presentan incrementada estabilidad de las proteínas Aux/IAA, muestran resistencia al inhibidor de la señalización de auxina, PCIB (Oono *et al.*, 2003). El mutante *sro1* también muestra mayor resistencia a PCIB con respecto al control (Figura 80), sugiriendo una relación directa entre *SROL1* y la homeostasis y señalización de las auxinas. Tanto PCIB como yokonolide B (YkB), otro inhibidor de la degradación de Aux/IAA, producen una drástica reducción en el crecimiento de la raíz principal de las plantas tratadas (Hayashi *et al.*, 2003; Oono *et al.*, 2003); de esta manera, las formas metiladas de auxina identificadas en la raíz de *sro1*, pueden estar relacionadas, en parte, con el fenotipo del mutante, aunque esta idea necesitaría de más experimentos para su demostración.

Se ha mostrado que la auxina induce una rápida activación del flujo de protones dependiente de ATP hacia la pared celular, lo que conlleva al movimiento relativo de los polímeros de carbohidratos y, consecuentemente, a la pérdida de pared celular (Perrot-Rechenmann, 2010). La formación de los conjugados de AIA reduce la pérdida de pared celular inducida por auxina (Ding *et al.*, 2008). Por lo que el mutante *sro1*, en condiciones de luz blanca, podría acumular formas metiladas de auxina en la raíz para evitar una pérdida de pared celular adicional. Además, *sro1* induce la expresión de genes que codifican proteínas que dan rigidez a la pared (como poligalacturonasas y pectin esterasas) y reduce la expresión de genes de glicosil hidrolasas, enzimas que hidrolizan los polímeros de la pared. Esto podría explicar la aparente resistencia que presenta el mutante, con respecto al control, a la digestión enzimática de la pared celular con celulasa y pectoliasa (Figura 93).

Los datos demuestran que este estudio genético contribuirá al entendimiento del desarrollo del sistema radicular, a nivel del crecimiento de la raíz principal y/o desarrollo de las RLs. Además, este trabajo ha puesto de manifiesto la importancia del

proceso de N-glicosilación de proteínas en el desarrollo de la raíz, y su relación con la luz, aunque todavía se necesita más información para determinar su modo de acción exacto.



## ***Conclusiones***



## CONCLUSIONES

1. La mayoría de los genes *cs-SKP2B* se expresan en las células del periciclo enfrentadas a los polos de protoxilema. En concreto, los genes *ST4B*, *ATHB-12*, *GH3.1*, *CLSY1* y *WLIM1* son necesarios para propiciar la emergencia de los PRLs. También se han identificado los genes *IAA3*, *LAX3* y *LAX2*, así como varias enzimas que participan en los procesos de remodelación de la pared celular para facilitar la emergencia de los PRLs durante las etapas finales de su desarrollo.

2. Los genes que codifican enzimas con actividad peroxidasa son una familia génica altamente representada en el grupo de genes *cs-SKP2B*, así como varias enzimas que pueden estar involucradas en la formación de ROS. En este trabajo se ha demostrado que la señalización vía ROS es importante para la emergencia de las RLs, pero no para la especificación de las células fundadoras del periciclo en el meristemo basal.

3. Los genes *PEROXIDASA* actúan en una ruta diferente que la auxina en la ramificación de la raíz principal.

4. El gen *UPB1*, un factor transcripcional que reprime varias peroxidasas, se expresa en las células de la periferia de los PRLs y su actividad es necesaria para la correcta emergencia de las raíces laterales.

5. El mutante *sro1* es un alelo recesivo que afecta al gen *AT2G40190*, que codifica la enzima LEW3 implicada en el proceso de N-glicosilación de proteínas en el retículo endoplasmático.

6. El fenotipo de raíz corta del mutante *sro1* está condicionado por la incidencia directa de la luz blanca sobre la raíz, de una manera independiente de foto-receptores, y este efecto depende más de la calidad que de la intensidad de la luz.

7. El mutante *sro1* presenta una reducida capacidad proliferativa en el RAM y de elongación celular en la zona de elongación. La luz amarilla afecta a la proliferación celular y, en el caso del mutante *sro1*, recupera la capacidad de elongación celular.

8. El pH neutro favorece el crecimiento de la raíz del mutante *srol1* en presencia de luz blanca pero no en luz amarilla. Así se establece una conexión entre el proceso de N-glicosilación, la luz y el pH.

9. En el mutante *srol1*, el entramado de filamentos de actina y microtúbulos se encuentra desorganizado, lo que impide una correcta expansión celular.

10. En el mutante *srol1*, la deficiencia en el proceso de N-glicosilación conlleva a estrés de RE, que se incrementa en presencia de luz, indicando una relación entre la N-glicosilación de proteínas, el estrés de RE, la luz y el desarrollo de las raíces.

11. El mutante *srol1* muestra defectos en la localización del transportador de auxina PIN4 en el RAM pero no presenta defectos en cuanto a la señalización y respuesta a auxina, ni en el mantenimiento de la identidad celular de los tejidos de la raíz.

12. El crecimiento radicular del mutante *srol1* muestra respuestas diferenciales a hormonas y deficiencias nutricionales respecto al control.

13. El sistema radicular del mutante *srol1*, aun siendo menor que el de plantas control, es funcional en cuanto a la absorción de nutrientes.

14. El mutante *srol1* presenta una velocidad del transporte floemático menor que el control.

15. El mutante *srol1* es deficiente en la N-glicosilación de la proteína  $\beta$ -GLU23 o PYK10, involucrada en respuestas a patógenos, poniendo de manifiesto una clara relación entre el proceso de N-glicosilación y la resistencia al estrés biótico.

16. En el mutante *srol1*, debido a la deficiencia en la ruta de N-glicosilación, el metabolito GDP-Man está siendo utilizado para la síntesis de AsA. De esta manera, el fenotipo de raíz corta del mutante *vtc1-1* se debe, probablemente, a la falta de N-glicosilación de ciertas proteínas.

17. El mutante *srol1* presenta muchos cambios a nivel transcriptómico pero muy pocos a nivel metabolómico. Se ha identificado un metabolito relacionado con formas metiladas de auxina, que se acumula en la raíz del mutante cuando crece en presencia de luz blanca.

18. En el análisis transcriptómico del mutante *srol1*, se han identificado los genes *BiP3* y *HSFA6a*, que están implicados en el desarrollo del sistema radicular a nivel del crecimiento de la raíz principal y/o desarrollo de las RLs, independientemente a la ruta funcional de *SROL1*.



## ***Bibliografía***



## BIBLIOGRAFÍA

Abel S., Nguyen M.D., Chow W., Theologis A. (1995). *ACS4*, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*: Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19093–19099.

Aida M., Vernoux T., Furutani M., Traas J., Tasaka M. (2002). *Roles of PIN-FORMED1* and *MONOPTEROS* in pattern formation of the apical region of the *Arabidopsis* embryo. *Development*, **129(17)**, 3965-74.

Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Bllou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y.S., Amasino R., Scheres B. (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell*, **119(1)**, 109-20.

Allan E. F., Trewavas A. (1986). Tissue-dependent heterogeneity of cell growth in the root apex of *Pisum sativum*. *Bot Gaz*, **147**, 258-269.

Alonso J.M., Stepanova A.N., Lisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C., Ecker J.R. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science.*, **301(5633)**, 653-7.

Andreeva Z., Barton D., Armour W.J., Li M.Y., Liao L.F., McKellar H.L., Pethybridge K.A., Marc J. (2010). Inhibition of phospholipase C disrupts cytoskeletal organization and gravitropic growth in *Arabidopsis* roots. *Planta*, **232(5)**, 1263-79.

Arrigoni O., De Tullio M.C. (2002). Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. *Biochim Biophys Acta.*, **1569(1-3)**, 1-9. Review.

Asada K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, **141**, 391–396.

Bainbridge K., Bennett T., Turnbull C., Leyser O. (2006). Grafting. *Methods Mol Biol.*, **323**, 39-44.

Banerjee R., Batschauer A. (2005). Plant blue-light receptors. *Planta.*, **220(3)**, 498-502.

Bao F., Shen J., Brady S.R., Muday G.K., Asami T., Yang Z. (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **134(4)**, 1624-31.

Barlow, P. W. (1984). Positional controls in root development. In Barlow, P. W., Carr, D. J., (Eds.) Positional controls in plant development. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 281-318.

Bass D.A., Parce J.W., Dechatelet L.R., Szejda P., Seeds M.C., Thomas M. (1983). Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol.*, **130(4)**, 1910-7.

Bassermann F., Eichner R., Pagano M. (2014). The ubiquitin proteasome system - implications for cell cycle control and the targeted treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1843(1)**, 150-62.

Beeckman T., Burssens S., Inzé D. (2001). The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.*, **52(Spec Issue)**, 403-11.

Beemster G.T., Baskin T.I. (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **116(4)**, 1515-26.

Beemster G.T., Fiorani F., Inzé D. (2003). Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant Sci.*, **8(4)**, 154-8.

Begum T., Reuter R., Schöfl F. (2013). Overexpression of *AtHsfB4* induces specific effects on root development of *Arabidopsis*. *Mech Dev.*, **130(1)**, 54-60.

Beinert H., Holm R.H., Münck E. (1997). Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science*, **277(5326)**, 653-9. Review.

Bemis S.M., Torii K.U. (2007). Autonomy of cell proliferation and developmental programs during *Arabidopsis* aboveground organ morphogenesis. *Dev Biol.*, **304(1)**, 367-81.

Benfey P.N., Scheres B. (2000). Root development. *Curr Biol.*, **10(22)**, R813-5.

Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, **115(5)**, 591-602.

Benková E., Hejatko J. (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Mol. Biol.*, **69**, 383–396.

Bennett M.J., Marchant A., Green H.G., May S.T., Ward S.P., Millner P.A., Walker A.R., Schulz B., Feldmann K.A. (1996). *Arabidopsis* *AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science.*, **273(5277)**, 948-50.

Bennett M.J., Marchant A., May S.T., Swarup R. (1998). Going the distance with auxin: unravelling the molecular basis of auxin transport. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **353(1374)**, 1511-5. Review.

Bergamini E., Cavallini G., Donati A., Gori Z. (2007). The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Ann N. Y. Acad Sci.*, **1114**, 69-78.

Bernatzky R., Tanksley S.D. (1986). Toward a saturated linkage map in tomato based on isozymes and random cDNA sequences. *Genetics*, **112(4)**, 887-98.

Bertaud D. S., Gandar P. W. (1986). A simulation model for cell proliferation in root apices. II. Patterns of cell proliferation. *Ann Bot.*, **58**, 303-320.

Bhalerao R.P., Eklöf J., Ljung K., Marchant A., Bennett M., Sandberg G. (2002). Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J.*, **29(3)**, 325-32.

Bhalerao R.P., Bennett M.J. (2003). The case for morphogens in plants. *Nat Cell Biol.*, **5(11)**, 939-43.

Bingham I.J., Stevenson E.A. (1993). Control of root growth: effects of carbohydrates on the extension branching and rate of respiration of different fractions of wheat roots. *Physiol. Plant*, **88**, 149-158.

Bingham I.J., Blackwood J.M., Stevenson E.A. (1998). Relationship between tissue sugar content, phloem import and lateral root initiation in wheat. *Physiol. Plant*, **103**, 107-113.

Birnboim H.C., Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7(6)**, 1513-23.

Blakely E.A., Tobias C.A., Yang T.C., Smith K.C., Lyman J.T. (1979). Inactivation of human kidney cells by high-energy monoenergetic heavy-ion beams. *Radiat Res.*, **80(1)**, 122-60.

Blakely W.F., Ward J.F., Joner E.I. (1982). A quantitative assay of deoxyribonucleic acid strand breaks and their repair in mammalian cells. *Anal Biochem.*, **124(1)**, 125-33.

Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature*, **433(7021)**, 39-44.

Blumwald E., Poole R.J. (1987). Salt tolerance in suspension cultures of sugar beet : induction of na/h antiport activity at the tonoplast by growth in salt. *Plant Physiol.*, **83(4)**, 884-7.

Boerjan W., Cervera M.T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., Van Onckelen H., Van Montagu M., Inzé D. (1995). Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell*, **7(9)**, 1405-19.

Bolstad B.M., Irizarry R.A., Astrand M., Speed T.P. (2003). A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, **19**, 185-193.

Brady S.M., Orlando D.A., Lee J.Y., Wang J.Y., Koch J., Dinneny J.R., Mace D., Ohler U., Benfey P.N. (2007). A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*, **318**, 801-806.

Briggs W.R., Christie J.M., Salomon M. (2001). Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxid Redox Signal*, **3(5)**, 775-88. Review.

Briggs W.R., Lin C.T. (2012). Photomorphogenesis--from one photoreceptor to 14: 40 years of progress. *Mol Plant*, **5(3)**, 531-2.

Britsch L. (1990). Purification and characterization of flavone synthase I, a 2-oxoglutarate-dependent desaturase. *Arch Biochem Biophys.*, **282(1)**, 152-60.

Britsch L., Dedio J., Saedler H., Forkmann G. (1993). Molecular characterization of flavanone 3 beta-hydroxylases. Consensus sequence, comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues. *Eur J Biochem.*, **217(2)**, 745-54.

Brunoud G., Wells D.M., Oliva M., Larrieu A., Mirabet V., Burrow A.H., Beeckman T., Kepinski S., Traas J., Bennett M.J., Vernoux T. (2012). A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature*, **482(7383)**, 103-6.

Brychkova G., Alikulov Z., Fluhr R., Sagi M. (2008). A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1 Arabidopsis* mutant. *Plant J.*, **54(3)**, 496-509.

Burbach C., Markus K., Zhang Y., Schlicht M., Baluška F. (2012). Photophobic behavior of maize roots. *Plant Signal Behav.*, **7(7)**, 874-8.

Burda P., Aebi M. (1999). The dolichol pathway of N-linked glycosylation. *Biochim Biophys Acta*, **1426(2)**, 239-57. Review.

Canamero R.C., Bakrim N., Bouly J.P., Garay A., Dudkin E.E., Habricot Y., Ahmad M. (2006). Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **224(5)**, 995-1003.

Cardozo T., Pagano M. (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **5(9)**, 739-51. Review.

Carmody R.J., Cotter T.G. (2000). Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis *in vitro*. *Cell Death Differ.*, **7(3)**, 282-91.

Carol R.J., Takeda S., Linstead P., Durrant M.C., Kakesova H., Derbyshire P., Drea S., Zarsky V., Dolan L. (2005). A RhoGDP dissociation inhibitor spatially regulates growth in root hair cells. *Nature*, **438(7070)**, 1013-6.

Carrier D.J., Bakar N.T., Swarup R., Callaghan R., Napier R.M., Bennett M.J., Kerr I.D. (2008). The binding of auxin to the *Arabidopsis* auxin influx transporter AUX1. *Plant Physiol.*, **148(1)**, 529-35.

Casero P. J., García-Sánchez C., Lloret P. G., Navascués J. (1989). Morphological features of pericycle cells in relation to their topographical location in onion adventitious root. *New Phytol.*, **112**, 527-532.

Casero P. J., Casimiro I., Lloret P. G. (1995). Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in four plant species: *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, and *Daucus carota*. *Protoplasma*, **188**, 49-58.

Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P. J., Bennett M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell*, **13**, 843-852.

Casimiro I., Beeckman T., Graham N., Bhalerao R., Zhang H., Casero P., Sandberg G., Bennett M. J. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.*, **8**, 165-871.

Celenza J.L. Jr., Grisafi P.L., Fink G.R. (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, **9(17)**, 2131-42.

Chandler P.M., Marion-Poll A., Ellis M., Gubler F. (2002). Mutants at the slender 1 locus of barley cv Himalaya. Molecular and physiological characterization. *Plant Physiol.*, **129**, 181–190.

Charlton P. (1983). The lateral approach. Interview by Laurence Dopson. *Nurs Times*, **79(37)**, 14.

Chen F., D'Auria J.C., Tholl D., Ross J.R., Gershenzon J., Noel J.P., Pichersky E. (2003). An *Arabidopsis thaliana* gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. *Plant J.*, **36**, 577-588.

Chen M., Chory J., Fankhauser C. (2004). Light signal transduction in higher plants. *Annual Review of Genetics*, **38**, 87–117.

Cho M., Lee S.H., Cho H.T. (2007). P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell*, **19(12)**, 3930-43.

Christie R.M. (2007). Why is indigo blue? *Biotech Histochem.*, **82(2)**, 51-6. Review.

Cipollo J.F., Trimble R.B., Chi J.H., Yan Q., Dean N.J. (2001). The yeast *ALG11* gene specifies addition of the terminal alpha 1,2-Man to the Man5GlcNAc2-PP-dolichol N-glycosylation intermediate formed on the cytosolic side of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem.*, **276(24)**, 21828-40.

Cohen J.D., Bandurski R.S. (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **33**, 403–430.

Collings D.A., Allen N.S. (2000). Cortical actin interacts with the plasma membrane and microtubules. In: *Staiger CJ, BaluSka F, Volkmann D, Barlow PW, eds. Actin: a Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic*, 145–163.

Collings D.A., Lill A.W., Himmelspach R., Wasteneys G.O. (2006). Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubule-microfilament cross-talk in the control of root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.*, **170(2)**, 275-90.

Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T., Doerner P. (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J.*, **20(4)**, 503-8.

Conklin P.L., Williams E.H., Last R.L. (1996). Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient *Arabidopsis* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **93(18)**, 9970-4.

Conklin P.L., Norris S.R., Wheeler G.L., Williams E.H., Smirnoff N., Last R.L. (1999). Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **96(7)**, 4198-203.

Cormack R.G. (1949). Intercellular inclusion in white mustard roots induced by colchicine treatment. *Nature*, **163(4140)**, 362.

Correll M.J., Kiss J.Z. (2005). The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. *Plant Cell Physiol.*, **46(2)**, 317-23.

Cosgrove D.J. (2000). Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiol Biochem.*, **38(1-2)**, 109-24. Review.

Cosio C., Vuillemin L., De Meyer M., Kevers C., Penel C., Dunand C. (2008). An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation thanks to its auxin oxidase activity. *Planta*, **229**, 823-836.

Costigan S.E., Warnasooriya S.N., Humphries B.A., Montgomery B.L. (2011). Root-localized phytochrome chromophore synthesis is required for photoregulation of root elongation and impacts root sensitivity to jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **157(3)**, 1138-50.

Craig E.A., Gambill B.D., Nelson R.J. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev.*, **57(2)**, 402-14.

Czarnecka-Verner E., Yuan C.X., Scharf K.D., Englich G., Gurley W.B. (2000). Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Mol Biol.*, **43(4)**, 459-71.

Czarnecka-Verner E., Pan S., Salem T., Gurley W.B. (2004). Plant class B HSFs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP. *Plant Mol Biol.*, **56(1)**, 57-75.

Danielson J.A., Johanson U. (2010). Phylogeny of major intrinsic proteins. *Adv Exp Med Biol.*, **679**, 19-31. Review.

De Rybel B., Vassileva V., Parizot B., Demeulenaere M., Grunewald W., Audenaert D., Van Campenhout J., Overvoorde P., Jansen L., Vanneste S., Möller B., Wilson M., Holman T., Van Isterdael G., Brunoud G., Vuylsteke M., Vernoux T., De Veylder L., Inzé D., Weijers D., Bennett M.J., Beeckman T. (2010). A novel aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr Biol.*, **20(19)**, 1697-706.

De Rybel B., Audenaert D., Xuan W., Overvoorde P., Strader L.C., Kepinski S., Hoye R., Brisbois R., Parizot B., Vanneste S., Liu X., Gilday A., Graham I.A., Nguyen L., Jansen L., Njo M.F., Inzé D., Bartel B., Beeckman T. (2012). A role for the root cap

in root branching revealed by the non-auxin probe naxillin. *Nat Chem Biol.*, **8(9)**, 798-805.

De Simone S., Oka Y., Nishioka N., Tadano S., Inoue Y. (2000). Evidence of phytochrome mediation in the low-pH-induced root hair formation process in lettuce (*Lactuca sativa L. cv. Grand Rapids*) seedlings. *Journal of Plant Research*, **113**, 45–53.

De Smet I., Signora L., Beeckman T., Inzé D., Foyer C.H., Zhang H. (2003). An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J.*, **33(3)**, 543-55.

De Smet I., Tetsumura T., De Rybel B., Frei dit Frey N., Laplaze L., Casimiro I., Swarup R., Naudts M., Vanneste S., Audenaert D., Inzé D., Bennett M.J., Beeckman T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, **134(4)**, 681-90.

De Smet I., Vassileva V., De Rybel B., Levesque M.P., Grunewald W., Van Damme D., Van Noorden G., Naudts M., Van Isterdael G., De Clercq R., Wang J.Y., Meuli N., Vanneste S., Friml J., Hilson P., Jürgens G., Ingram G.C., Inzé D., Benfey P.N., Beeckman T. (2008). Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science.*, **322(5901)**, 594-7.

De Veylder L., Beemster G.T., Beeckman T., Inzé D. (2001). *CKS1At* overexpression in *Arabidopsis thaliana* inhibits growth by reducing meristem size and inhibiting cell-cycle progression. *Plant J.*, **25(6)**, 617-26.

del Pozo J.C., Boniotti M.B., Gutierrez C. (2002). *Arabidopsis E2F<sub>c</sub>* functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell.*, **14(12)**, 3057-71.

del Pozo J.C., Dharmasiri S., Hellmann H., Walker L., Gray W.M., Estelle M. (2002). AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the *Arabidopsis* Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell*, **14(2)**, 421-33.

del Pozo J.C., Diaz-Trivino S., Cisneros N., Gutierrez C. (2006). The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCFSKP2A pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18(9)**, 2224-35.

del Pozo J.C., Manzano C. (2014). Auxin and the ubiquitin pathway. Two players-one target: the cell cycle in action. *J Exp Bot.*, **65(10)**, 2617-32.

Dello Ioio R., Linhares F.S., Scacchi E., Casamitjana-Martinez E., Heidstra R., Costantino P., Sabatini S. (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol.*, **17(8)**, 678-82.

Dello Ioio R., Linhares F.S., Sabatini S. (2008). Emerging role of cytokinin as a regulator of cellular differentiation. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **11**, 23–27.

Desai A., Mitchison T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **13**, 83-117. Review.

Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435(7041)**, 441-5.

Dill A., Sun T. (2001). Synergistic derepression of gibberellins signaling by removing *RGA* and *GAI* function in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **159**, 777–785.

Ding X., Cao Y., Huang L., Zhao J., Xu C., Li X., Wang S. (2008). Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase *GH3-8* suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell Jan*, **20(1)**, 228-40.

Ditengou F.A., Teale W.D., Kochersperger P., Flittner K.A., Kneuper I., van der Graaff E., Nziengui H., Pinosa F., Li X., Nitschke R., Laux T., Palme K. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105(48)**, 18818-23.

Doelling J.H., Walker J.M., Friedman E.M., Thompson A.R., Vierstra R.D. (2002). The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem.*, **277(36)**, 33105-14.

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

Dreher K., Callis J. (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann Bot.*, **99(5)**, 787-822.

Dubrovsky J.G., Doerner P.W., Colón-Carmona A., Rost T.L. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **124(4)**, 1648-57.

Dubrovsky J.G., Rost T.L., Colón-Carmona A., Doerner P. (2001). Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **214(1)**, 30-6.

Dubrovsky J.G., Gambetta G.A., Hernández-Barrera A., Shishkova S., González I. (2006). Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot.*, **97(5)**, 903-15.

Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil S., Ivanchenko M.G., Friml J., Shishkova S., Celenza J., Benková E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105(25)**, 8790-4.

Dudareva N., Murfitt L.M., Mann C.J., Gorenstein N., Kolosova N., Kish C.M., Bonham C., Wood K. (2000). Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers. *Plant Cell*, **12(6)**, 949-61.

Dunlap J.R., Robacker K.M. (1988). Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic Acid in tissue culture media. *Plant Physiol.*, **88(2)**, 379-82.

Dunphy W.G. (1994). The decision to enter mitosis. *Trends Cell Biol.*, **4(6)**, 202-7.

Dyachok J., Zhu L., Liao F., He J., Huq E., Blancaflor E.B. (2011). SCAR mediates light-induced root elongation in *Arabidopsis* through photoreceptors and proteasomes. *Plant Cell*, **23(10)**, 3610-26.

Edgar R., Domrachev M., Lash A.E. (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 207-210.

Eng R.C., Wasteneys G.O. (2014). The Microtubule Plus-End Tracking Protein ARMADILLO-REPEAT KINESIN1 Promotes Microtubule Catastrophe in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, **26(8)**, 3372-86.

Estañ M.T., Martinez-Rodriguez M.M., Perez-Alfocea F., Flowers T.J., Bolarin M.C. (2005). Grafting raises the salt tolerance of tomato through limiting the transport of sodium and chloride to the shoot. *J Exp Bot.*, **56(412)**, 703-12.

Evans L.S., Lewin K.F., Santucci K.A., Owen E.M. (1989). Yields of field-grown soybeans exposed to simulated acidic deposition. *Environ Pollut.*, **61(1)**, 47-57.

Feldman L.J., Briggs W.R. (1987). Light-regulated gravitropism in seedling roots of maize. *Plant Physiol.*, **83**, 241-3.

Finnegan E.J., Genger R.K., Peacock W.J., Dennis E.S. (1998). DNA methylation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, **49**, 223-247.

Fleet C.M., Sun T. (2005). A DELLAcate balance: the role of gibberellins in plant morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **8**, 77–85.

Foreman J., Demidchik V., Bothwell J.H.F. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, **422**, 442–446.

Foyer C., Rowell J., Walker D. (1983). Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta*, **157(3)**, 239-44.

Freixes S., Thibaud M.C., Tardieu F. Muller B. (2002). Root elongation and branching is related to local hexose concentration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Environ.*, **25**, 1357–1366.

Frescas D., Pagano M. (2008). Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and beta-TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer*, **8(6)**, 438-49.

Frigerio M., Alabadi D., Perez-Gomez J., Garica-Carcel L., Phillips A.L., Hedden P., (2006). Transcriptional regulation of gibberellin metabolism genes by auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **142**, 553–563.

Friml J., Wiśniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, **415(6873)**, 806-9.

Friml J. (2003). Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol.*, **6(1)**, 7-12. Review.

Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, **426(6963)**, 147-53.

Fu H.Y., Chang Y.N., Jheng M.J., Yang C.S. (2012). Ser(262) determines the chloride-dependent colour tuning of a new halorhodopsin from *Haloquadratum walsbyi*. *Biosci Rep.*, **32(5)**, 501-9.

Fu Y., Wu G., Yang Z. (2001). Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *J Cell Biol.*, **152(5)**, 1019-32.

Fukaki H., Tameda S., Masuda H., Tasaka M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant J.*, **29(2)**, 153-68.

Fukaki H., Nakao Y., Okushima Y., Theologis A., Tasaka M. (2005). Tissue-specific expression of stabilized *SOLITARY-ROOT/IAA14* alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **44(3)**, 382-95.

Fukaki H., Taniguchi N., Tasaka M. (2006). *PICKLE* is required for *SOLITARY-ROOT/IAA14*-mediated repression of *ARF7* and *ARF19* activity during *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant J.*, **48(3)**, 380-9.

Fukaki H., Okushima Y., Tasaka M. (2007). Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int Rev Cytol.*, **256**, 111-37. Review.

Fukaki H., Tasaka M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol.*, **69**, 437-449.

Galeeva E.I., Trifonova T.V., Ponomareva A.A., Viktorova L.V., Minibayeva F.V. (2012). Nitrate reductase from *Triticum aestivum* leaves: regulation of activity and possible role in production of nitric oxide. *Biochemistry (Mosc)*, **77(4)**, 404-10.

Galen C., Rabenold J.J., Liscum E. (2007). Light-sensing in roots. *Plant Signal Behav.*, **2(2)**, 106-8.

Gazaryan I.G., Lagrimini L.M., Ashby G.A., Thorneley R.N. (1996). Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochem J.*, **313(Pt 3)**, 841-7.

Ge L., Peer W., Robert S., Swarup R., Ye S., Prigge M., Cohen J.D., Friml J., Murphy A., Tang D., Estelle M. (2010). *Arabidopsis* *ROOT UVB SENSITIVE2/WEAK AUXIN RESPONSE1* is required for polar auxin transport. *Plant Cell*, **22(6)**, 1749-61.

Gechev T.S., Gadjev I., Van Breusegem F., Inzé D., Dukiandjiev S., Toneva V., Minkov I. (2002). Hydrogen peroxide protects tobacco from oxidative stress by inducing a set of antioxidant enzymes. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **59**, 708–714.

Gechev T.S., Van Breusegem F., Stone J.M., Denev I., Laloi C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, **28**, 1091–1101.

Geldner N., Friml J., Stierhof Y.D., Jürgens G., Palme K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, **413(6854)**, 425-8.

Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Müller P., Delbarre A., Ueda T., Nakano A., Jürgens G. (2003). The *Arabidopsis* *GNOM ARF-GEF* mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, **112(2)**, 219-30.

Geldner N., Richter S., Vieten A., Marquardt S., Torres-Ruiz R.A., Mayer U., Jürgens G. (2004). Partial loss-of-function alleles reveal a role for *GNOM* in auxin transport-related, post-embryonic development of *Arabidopsis*. *Development*, **131(2)**, 389-400.

Gemmill T.R., Trimble R.B. (1999). Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta*, **1426(2)**, 227-37. Review.

Gething M.J., Sambrook J. (1992). Protein folding in the cell. *Nature*, **355(6355)**, 33-45. Review.

Gillespie J., Ozanne S., Tugal B., Percy J., Warren M., Haywood J., Apps D. (1991). The vacuolar H(+)-translocating ATPase of renal tubules contains a 115-kDa glycosylated subunit. *FEBS Lett.*, **282(1)**, 69-72.

Glickman M.H., Ciechanover A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.*, **82(2)**, 373-428. Review.

Gomes D., Agasse A., Thiébaud P., Delrot S., Gerós H., Chaumont F. (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim Biophys Acta.*, **1788(6)**, 1213-28.

Grabarek Z., Mabuchi Y., Gergely J. (1995). Properties of troponin C acetylated at lysine residues. *Biochemistry*, **34**, 11872–11881.

Gray W.M., Ostin A., Sandberg G., Romano C.P., Estelle M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **95(12)**, 7197-202.

Gray W.M., del Pozo J.C., Walker L., Hobbie L., Risseuw E., Banks T., Crosby W.L., Yang M., Ma H., Estelle M. (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, **13(13)**, 1678-91.

Gray W.M., Kepinski S., Rouse D., Leyser O., Estelle M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature.*, **414(6861)**, 271-6.

Gray W.M., Muskett P.R., Chuang H.W., Parker J.E. (2003). *Arabidopsis SGT1b* is required for SCF(TIR1)-mediated auxin response. *Plant Cell.*, **15(6)**, 1310-9.

Gu Y., Fu Y., Dowd P., Li S., Vernoud V., Gilroy S., Yang Z. (2005). A *Rho* family GTPase controls actin dynamics and tip growth via two counteracting downstream pathways in pollen tubes. *J Cell Biol.*, **169(1)**, 127-38.

Guerinot M.L., Salt D.E. (2001). Fortified foods and phytoremediation. Two sides of the same coin. *Plant Physiol.*, **125(1)**, 164-7. Review.

Guilfoyle T.J., Hagen G. (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol.*, **10(5)**, 453-60.

Guo H., Yang H., Mockler T.C., Lin C. (1998). Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science*, **279(5355)**, 1360-3.

Hable W.E., Hart P.E. (2010). Signaling mechanisms in the establishment of plant and fucoid algal polarity. *Mol Reprod Dev.*, **77(9)**, 751-8.

Haecker A., Gross-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Herrmann M., Laux T. (2004). Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **131(3)**, 657-68.

Hanaoka H., Noda T., Shirano Y., Kato T., Hayashi H., Shibata D., Tabata S., Ohsumi Y. (2002). Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiol.*, **129(3)**, 1181-93.

Hancock J.T., Desikan R., Neill S.J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochem Soc Trans.*, **29(Pt 2)**, 345-50. Review.

Harrison B.R., Masson P.H. (2008). *ARL2*, *ARG1* and *PIN3* define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Plant J.*, **53(2)**, 380-92.

Hartl F.U., Martin J. (1995). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Curr Opin Struct Biol.*, **5(1)**, 92-102. Review.

Hayashi K., Jones A.M., Ogino K., Yamazoe A., Oono Y., Inoguchi M., Kondo H., Nozaki H. (2003). Yokonolide B, a novel inhibitor of auxin action, blocks degradation of AUX/IAA factors. *J Biol Chem.*, **278(26)**, 23797-806.

Hedden P., Kamiya Y. (1997). Gibberellin biosynthesis: Enzymes, Genes and Their Regulation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, **48**, 431-460.

Heidstra R., Welch D., Scheres B. (2004). Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev.*, **18(16)**, 1964-9.

Helenius A., Aebi M. (2004). Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem.*, **73**, 1019-49. Review.

Hemm M.R., Rider S.D., Ogas J., Murry D.J., Chapple C. (2004). Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J.*, **38(5)**, 765-78.

Henquet M., Lehle L., Schreuder M., Rouwendal G., Molthoff J., Helsper J., van der Krol S., Bosch D. (2008). Identification of the gene encoding the alpha1,3-mannosyltransferase (*ALG3*) in *Arabidopsis* and characterization of downstream n-glycan processing. *Plant Cell*, **20(6)**, 1652-64.

Henrissat B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J.*, **280(Pt 2)**, 309-16.

Herscovics A., Orlean P. (1993). Glycoprotein biosynthesis in yeast. *FASEB J.*, **7(6)**, 540-50.

Hershko A. (2005). The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ.*, **12(9)**, 1191-7. Review.

Himanen K., Boucheron E., Vanneste S., de Almeida Engler J., Inzé D., Beeckman T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*, **14(10)**, 2339-51.

Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.*, **42(5)**, 462-8. Review.

Hobbie L., Estelle M. (1995). The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.*, **7(2)**, 211-20.

Hochholdinger F., Park W.J., Sauer M., Woll K. (2004). From weeds to crops: genetic analysis of root development in cereals. *Trends Plant Sci.*, **9(1)**, 42-8. Review.

Hochholdinger F., Zimmermann R. (2008). Conserved and diverse mechanisms in root development. *Curr Opin Plant Biol.*, **11(1)**, 70-4.

Hodge S. (2004). Effective management of technological change is essential to future developments in medicine and public health. *J R Soc Promot Health*, **124(6)**, 242.

Holton T.A., Brugliera F., Lester D.R., Tanaka Y., Hyland C.D., Menting J.G., Lu C.Y., Farcy E., Stevenson T.W., Cornish E.C. (1993). Cloning and expression of *cytochrome P450* genes controlling flower colour. *Nature.*, **366(6452)**, 276-9.

Horemans N., Foyer C.H., Asard H. (2000). Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends Plant Sci.*, **5(6)**, 263-7. Review.

Horie M., Nishio K., Endoh S., Kato H., Fujita K., Miyauchi A., Nakamura A., Kinugasa S., Yamamoto K., Niki E., Yoshida Y., Iwahashi H. (2013). Chromium(III)

oxide nanoparticles induced remarkable oxidative stress and apoptosis on culture cells. *Environ Toxicol.*, **28(2)**, 61-75.

Hottes A.C. (1925). Practical plant propagation: an exposition of the art and science of increasing plants as practiced by the nurseryman, florist and gardener. *New York: A. T. De La Mare Company, Inc.*

Howell S.H. (2013). Endoplasmic reticulum stress responses in plants. *Annu Rev Plant Biol.*, **64**, 477-99.

Hull A.K., Vij R., Celenza J.L. (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **97(5)**, 2379-84.

Huq E., Al-Sady B., Hudson M., Kim C., Apel K., Quail P.H. (2004). Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis. *Science*, **305(5692)**, 1937-41.

Hwang S.M., Kim D.W., Woo M.S., Jeong H.S., Son Y.S., Akhter S., Choi G.J., Bahk J.D. (2014). Functional characterization of *Arabidopsis HsfA6a* as a heat-shock transcription factor under high salinity and dehydration conditions. *Plant Cell Environ.*, **37(5)**, 1202-22.

Iiyama K., Lam T., Stone B.A. (1994). Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiol.*, **104(2)**, 315-320.

Ikeda A., Ueguchi-Tanaka M., Sonoda Y., Kitano H., Koshioka M., Futsuhara Y. (2001). Slender rice, a constitutive gibberellins response mutant, is caused by a null mutation of the *SLR1* gene, an ortholog of the height- regulating gene *GAI/RGA/RHT/D8*. *Plant Cell*, **13**, 999–1010.

Ikeda A., Sonoda Y., Vernieri P., Perata P., Hirochika H., Yamaguchi J. (2002). The slender rice mutant, with constitutively activated gibberellins signal transduction, has enhanced capacity for abscisic acid level. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 974–979.

Imlau A., Truernit E., Sauer N. (1999). Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell*, **11(3)**, 309-22.

Ingram P., Dettmer J., Helariutta Y., Malamy J.E. (2011). *Arabidopsis Lateral Root Development 3* is essential for early phloem development and function, and hence for normal root system development. *Plant J.*, **68(3)**, 455-67.

Ivanchenko M.G., Coffeen W.C., Lomax T.L., Dubrovsky J.G. (2006). Mutations in the *Diageotropica (Dgt)* gene uncouple patterned cell division during lateral root initiation from proliferative cell division in the pericycle. *Plant J.*, **46(3)**, 436-47.

Iwama A., Yamashino T., Tanaka Y., Sakakibara H., Kakimoto T., Sato S., (2007). *AHK5* histidine kinase regulates root elongation through an *ETR1*-dependent abscisic acid and ethylene signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **48**, 375–380.

Iwata Y., Koizumi N. (2005). An *Arabidopsis* transcription factor, AtbZIP60, regulates the endoplasmic reticulum stress response in a manner unique to plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **102(14)**, 5280-5.

Iwata Y., Fedoroff N.V., Koizumi N. (2008). *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *The Plant Cell*, **20**, 3107–3121.

Iwata Y., Nishino T., Takayama S., Koizumi N. (2010). Characterization of a plant-specific gene induced by endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **74**, 2087–2091.

Iwata Y., Koizumi N. (2012). Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends Plant Sci.*, **17(12)**, 720-7.

Jarillo J.A., Gabrys H., Capel J., Alonso J.M., Ecker J.R., Cashmore A.R. (2001). Phototropin-related *NPL1* controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature*, **410(6831)**, 952-4.

Jiang H., Wang S., Dang L., Wang S., Chen H., Wu Y., Jiang X., Wu P. (2005). A novel short-root gene encodes a glucosamine-6-phosphate acetyltransferase required for maintaining normal root cell shape in rice. *Plant Physiol.*, **138(1)**, 232-42.

Jiang K., Feldman L.J. (2005). Regulation of root apical meristem development. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **21**, 485-509. Review.

Jiao Y., Lau O.S., Deng X.W. (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet.*, **8(3)**, 217-30. Review.

Johnson E., Bradley M., Harberd N.P., Whitelam G.C. (1994). Photoresponses of Light-Grown *phyA* Mutants of *Arabidopsis* (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiol.*, **105(1)**, 141-149.

Jones M.A., Shen J.J., Fu Y., Li H., Yang Z., Grierson C.S. (2002). The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth. *Plant Cell.*, **14(4)**, 763-76.

Jones M.A., Raymond M.J., Smirnov N. (2006). Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **45(1)**, 83-100.

Jones M.A., Raymond M.J., Yang Z., Smirnov N. (2007). NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *J Exp Bot.*, **58(6)**, 1261-70.

Jönsson A. (1961). Chemical structure and growth activity of auxin and antiauxins. *Encyclopedia of Plant Physiology*, **14**, 959–1006.

Jung J.K., McCouch S. (2013). Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. *Front Plant Sci.*, **4**, 186.

Jung Y.J., Lee I.H., Nou I.S., Lee K.D., Rashotte A.M., Kang K.K. (2013). BrRZFP1 a *Brassica rapa* C3HC4-type RING zinc finger protein involved in cold, salt and dehydration stress. *Plant Biol (Stuttg.)*, **15(2)**, 274-83.

Jurado S., Abraham Z., Manzano C., López-Torrejón G., Pacios L.F., del Pozo J.C. (2010). The *Arabidopsis* cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell.* **22(12)**, 3891-904.

Kapulnik Y., Delaux P.P.-M., Resnick N., Mayzlish-Gati E., Winer S., Bhattacharya C., (2011). Strigolactones affect lateral root formation and root hair elongation in *Arabidopsis*. *Planta*, **233**, 209–216.

Kartal G., Temel A., Arican E., Gozukirmizi N. (2009). Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division. *Plant Growth Regul.*, **58**, 261–267.

Kepinski S., Leyser O. (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435(7041)**, 446-51.

Kim M., Canio W., Kessler S., Sinha N. (2001). Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science*, **293(5528)**, 287-9.

Kim S.K., Chang S.C., Lee E.J., Chung W.S., Kim Y.S., Hwang S., Lee J.S. (2000). Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize. *Plant Physiol.*, **123**, 997–1004.

Kimura Y., Yahara I., Lindquist S. (1995). Role of the protein chaperone YDJ1 in establishing hsp90-mediated signal transduction pathways. *Science*, **268**, 1362-1365.

Kiss J.Z., Mullen J.L., Correll M.J., Hangarter R.P. (2003). Phytochromes A and B mediate red-light-induced positive phototropism in roots. *Plant Physiol.*, **131(3)**, 1411-7.

Kiyosue T., Beetham J.K., Pinot F., Hammock B.D., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (1994). Characterization of an *Arabidopsis* cDNA for a soluble epoxide hydrolase gene that is inducible by auxin and water stress. *Plant J.*, **6(2)**, 259-69.

Kleine T., Lockhart P., Batschauer A. (2003). An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant J.*, **35(1)**, 93-103.

Kleine-Vehn J., Dhonukshe P., Swarup R., Bennett M., Friml J. (2006). Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *Plant Cell.*, **18(11)**, 3171-81.

Kleine-Vehn J., Friml J. (2008). Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **24**, 447-73.

Kleine-Vehn J., Leitner J., Zwiewka M., Sauer M., Abas L., Luschnig C., Friml J. (2008). Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105(46)**, 17812-7.

Kobayashi T., Nishizawa N.K. (2012). Iron uptake, translocation, and regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Biol.*, **63**, 131-52.

Koiwa H., Li F., McCully M.G., Mendoza I., Koizumi N., Manabe Y., Nakagawa Y., Zhu J., Rus A., Pardo J.M., Bressan R.A., Hasegawa P.M. (2003). The STT3a subunit isoform of the *Arabidopsis* oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *Plant Cell*, **15**(10), 2273-84.

Koizumi N. (1996). Isolation and responses to stress of a gene that encodes a luminal binding protein in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **37**(6), 862-5.

Koltai H., Dor E., Hershenhorn J., Joel D.M., Weininger S., Lekalla S., (2010). Strigolactones' effect on root growth and root-hair elongation maybe mediated by auxin-efflux carriers. *J. Plant Growth Regul.*, **29**, 129–136.

Koncz C., Németh K., Rédei G.P., Schell J. (1992). T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol.*, **20**(5), 963-76. Review.

Kost B., Lemichez E., Spielhofer P., Hong Y., Toliaas K., Carpenter C., Chua N.H. (1999). Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *J Cell Biol.*, **145**(2), 317-30.

Kurup S., Runions J., Köhler U., Laplaze L., Hodge S., Haseloff J. (2005). Marking cell lineages in living tissues. *Plant J.*, **42**(3), 444-53.

Lagrimini L.M., Joly R.J., Dunlap J.R., Liu T.T. (1997). The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Mol Biol.*, **33**, 887-895.

Lahner B., Gong J., Mahmoudian M., Smith E.L., Abid K.B., Rogers E.E., Gueriot M.L., Harper J.F., Ward J.M., McIntyre L., Schroeder J.I., Salt D.E. (2003). Genomic scale profiling of nutrient and trace elements in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol.*, **21**(10), 1215-21.

Lange T. (1994). Purification and partial amino-acid sequence of gibberellin 20-oxidase from *Cucurbita maxima* L. endosperm. *Planta.*, **195**(1), 108-15.

Lanza M., Garcia-Ponce B., Castrillo G., Catarcha P., Sauer M., Rodriguez-Serrano M., Pérez-García A., Sánchez-Bermejo E., T C M, Leo del Puerto Y., Sandalio L.M., Paz-Ares J., Leyva A. (2012). Role of actin cytoskeleton in brassinosteroid

signaling and in its integration with the auxin response in plants. *Dev Cell.*, **22(6)**, 1275-85.

Laplaze L., Parizot B., Baker A., Ricaud L., Martinière A., Auguy F., Franche C., Nussaume L., Bogusz D., Haseloff J. (2005). *GAL4-GFP* enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot.*, **56(419)**, 2433-42.

Laplaze L., Benková E., Casimiro I., Maes L., Vanneste S., Swarup R., (2007). Cytokinin act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell*, **19**, 3889– 3900.

Laskowski M. J., Williams M. E., Nusbaum C., Sussex I. M. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, **121**, 3303-3310.

Laskowski M., Biller S., Stanley K., Kajstura T., Prusty R. (2006). Expression profiling of auxin-treated *Arabidopsis* roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant Cell Physiol.*, **47(6)**, 788-92.

Laskowski M., Grieneisen V.A., Hofhuis H., Hove C.A., Hogeweg P., Marée A.F., Scheres B. (2008). Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biol.*, **6(12)**, e307.

Lavenus J., Goh T., Roberts I., Guyomarc'h S., Lucas M., De Smet I., Fukaki H., Beeckman T., Bennett M., Laplaze L. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.*, **18(8)**, 450-8.

Laxmi A., Pan J., Morsy M., Chen R. (2008). Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **3(1)**, e1510.

Leasure C.D., Tong H., Yuen G., Hou X., Sun X., He Z.H. (2009). *ROOT UV-B SENSITIVE2* acts with *ROOT UV-B SENSITIVE1* in a root ultraviolet B-sensing pathway. *Plant Physiol.*, **150(4)**, 1902-15.

Leasure C.D., Yi-Pei C., Zheng-Hui H. (2013). Enhancement of Indole-3-Acetic Acid Photodegradation by Vitamin B6. *Molecular Plant*, **6(6)**, 1992–1995. LETTER TO THE EDITOR.

Lechner E., Achard P., Vansiri A., Potuschak T., Genschik P. (2006). F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol.*, **9(6)**, 631-8.

Lee H.O., Cho M., Lee J.H., Kim H.S., Yun Y., Lee H. (2007). *SuPr-1*-mediated desumoylation regulates the repressor activity of *DeltaNp63alpha*. *FEBS Lett.*, **581(29)**, 5640-4.

Lee Y.J., Szumlanski A., Nielsen E., Yang Z. (2008). Rho-GTPase-dependent filamentous actin dynamics coordinate vesicle targeting and exocytosis during tip growth. *J Cell Biol.*, **181(7)**, 1155-68.

Li H., Lin Y., Heath R.M., Zhu M.X., Yang Z. (1999). Control of pollen tube tip growth by a Rop GTPase-dependent pathway that leads to tip-localized calcium influx. *Plant Cell.*, **11(9)**, 1731-42.

Li L., Hou X., Tsuge T., Ding M., Aoyama T., Oka A., Gu H., Zhao Y., Qu L.J. (2008). The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.*, **27(3)**, 575-84.

Li W., Ye Y. (2008). Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci.*, **65(15)**, 2397-406.

Lin C., Ahmad M., Cashmore A.R. (1996). *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development. *Plant J.*, **10(5)**, 893-902.

Lin C., Shalitin D. (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.*, **54**, 469-96. Review.

Lin P.C., Hwang S.G., Endo A., Okamoto M., Koshiba T., Cheng W.H. (2007). Ectopic expression of *ABSCISIC ACID 2/GLUCOSE INSENSITIVE 1* in *Arabidopsis* promotes seed dormancy and stress tolerance. *Plant Physio*, **143**, 745-58.

Linkohr B.I., Williamson L.C., Fitter A.H., Leyser H.M. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant J.*, **29(6)**, 751-60.

Linster C.L., Clarke S.G. (2008). L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of *VTC2*. *Trends Plant Sci.*, **13(11)**, 567-73.

Liu J., Brown C.R., Chiang H.L. (2005). Degradation of the gluconeogenic enzyme fructose-1, 6-bisphosphatase is dependent on the vacuolar ATPase. *Autophagy*. **1(3)**, 146-56.

Liu J.X., Srivastava R., Che P., Howell S.H. (2007). An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28. *Plant Cell*, **19(12)**, 4111-9.

Liu J.X., Howell S.H. (2010). bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **22(3)**, 782-96.

Liu Y., Xiong Y., Bassham D.C. (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy*. **5(7)**, 954-63.

Liu Y., He J., Chen Z., Ren X., Hong X., Gong Z. (2010). *ABA overly-sensitive 5 (ABO5)*, encoding a pentatricopeptide repeat protein required for cis-splicing of mitochondrial nad2 intron 3, is involved in the abscisic acid response in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **63(5)**, 749-65.

Liu Y., Burgos J.S., Deng Y., Srivastava R., Howell S.H., Bassham D.C. (2012). Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **24(11)**, 4635-51.

Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.*, **28(4)**, 465-74.

Ljung K., Hull A.K., Kowalczyk M., Marchant A., Celenza J., Cohen J.D., Sandberg G. (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol.*, **49(3-4)**, 249-72. Review.

Ljung K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J., Sandberg G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, **17(4)**, 1090-104.

Lloret P. G., Casero P. J. (2002). Lateral root initiation. in *Plant roots: the hidden half*. (eds. Waisel, Y., Eshel, A., Kafkafi, L.; Marcel Dekker, New York), 127–156.

López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol.*, **6(3)**, 280-7.

Lucas M., Guédon Y., Jay-Allemand C., Godin C., Laplaze L. (2008). An auxin transport-based model of root branching in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **3(11)**, e3673.

Lucas M., Kenobi K., von Wangenheim D., Voß U., Swarup K., De Smet I., Van Damme D., Lawrence T., Péret B., Moscardi E., Barbeau D., Godin C., Salt D., Guyomarc'h S., Stelzer E.H., Maizel A., Laplaze L., Bennett M.J. (2013). Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **110(13)**, 5229-34.

Lui H., Wang H., DeLong C., Fowke L.C., Crosby W.L., Fobert P.R. (2000). The *Arabidopsis* Cdc2a-interacting protein ICK2 is structurally related to ICK1 and is a potent inhibitor of cyclin-dependent kinase activity *in vitro*. *Plant J.*, **21(4)**, 379-85.

Lukowitz W., Nickle T.C., Meinke D.W., Last R.L., Conklin P.L., Somerville C.R. (2001). *Arabidopsis cyt1* mutants are deficient in a mannose-1-phosphate guanylyltransferase and point to a requirement of N-linked glycosylation for cellulose biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98(5)**, 2262-7.

Luschnig C., Gaxiola R.A., Grisafi P., Fink G.R. (1998). EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.*, **12(14)**, 2175-87.

Luxová M. (1975). Some aspects of the differentiation of primary root tissues. *In* Torrey, J. G., Clarkson, D. T. (Eds.) *The development and function of roots*. Academic Press, New York, 73-90.

Ma N.L., Rahmat Z., Lam S.S. (2013). A Review of the "Omics" Approach to Biomarkers of Oxidative Stress in *Oryza sativa*. *Int J Mol Sci.*, **14(4)**, 7515-41.

Macgregor D.R., Deak K.I., Ingram P.A., Malamy J.E. (2008). Root system architecture in *Arabidopsis* grown in culture is regulated by sucrose uptake in the aerial tissues. *Plant Cell.*, **20(10)**, 2643-60.

MacRae D.H., Bonner J. (1953). Chemical structure and antiauxin activity. *Physiol Plant*, **6**, 485–510.

Mähönen A.P., Bishopp A., Higuchi M., Nieminen K.M., Kinoshita K., Törmäkangas K., Ikeda Y., Oka A., Kakimoto T., Helariutta Y. (2006). Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science*, **311(5757)**, 94-8.

Mähönen A.P., ten Tusscher K., Siligato R., Smetana O., Díaz-Triviño S., Salojärvi J., Wachsman G., Prasad K., Heidstra R., Scheres B. (2014). PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature*, **515(7525)**, 125-9.

Malamy J.E., Benfey P.N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **124(1)**, 33-44.

Mallory A.C., Bartel D.P., Bartel B. (2005). MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell*, **17(5)**, 1360-75.

Mandoli D.F., Tepperman J., Huala E., Briggs W.R. (1984). Photobiology of diagravitropic maize roots. *Plant Physiol.*, **75(2)**, 359-63.

Manzano C. (2011). SKP2B un nuevo marcador para el estudio del desarrollo radicular. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

Manzano C., Ramirez-Parra E., Casimiro I., Otero S., Desvoves B., De Rybel B., Beeckman T., Casero P., Gutierrez C., del Pozo J.C. (2012). Auxin and epigenetic regulation of *SKP2B*, an F-box that represses lateral root formation. *Plant Physiol.*, **160(2)**, 749-62.

Manzano C., Pallero-Baena M., Casimiro I., De Rybel B., Orman-Ligeza B., Van Isterdael G., Beeckman T., Draye X., Casero P., del Pozo J.C. (2014). The Emerging Role of Reactive Oxygen Species Signaling during Lateral Root Development. *Plant Physiol.*, **165(3)**, 1105-1119.

Marc J., Granger C.L., Brincat J., Fisher D.D., Kao T., McCubbin A.G., Cyr R.J. (1998). A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell*, **10(11)**, 1927-40.

Marchant A., Kargul J., May S.T., Muller P., Delbarre A., Perrot-Rechenmann C., Bennett M.J. (1999). *AUX1* regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.*, **18(8)**, 2066-73.

Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklöf J., Casero P.J., Bennett M., Sandberg G. (2002). *AUX1* promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell*, **14(3)**, 589-97.

Marín-Rodríguez M.C., Orchard J., Seymour G.B. (2002). Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J Exp Bot.*, **53(377)**, 2115-9.

Martin B.D., Schoenhard J.A., Sugden K.D. (1998). Hypervalent chromium mimics reactive oxygen species as measured by the oxidant-sensitive dyes 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine. *Chem Res Toxicol.*, **11(12)**, 1402-10.

Martínez I.M., Chrispeels M.J. (2003). Genomic analysis of the unfolded protein response in *Arabidopsis* shows its connection to important cellular processes. *Plant Cell.*, **15(2)**, 561-76.

Martinez-Zapater J. M., Salinas J. (1998). Eds. *Arabidopsis Protocols*, **82**, *Methods in Molecular Biology* (Humana, Totowa, NJ).

Maruta H., Greer K., Rosenbaum J.L. (1986). The acetylation of alpha-tubulin and its relationship to the assembly and disassembly of microtubules. *J Cell Biol.*, **103**, 571–579.

Massé E., Arguin M. (2005). Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends Biochem Sci.*, **30(8)**, 462-8.

Maule A., Gaudioso-Pedraza R., Benitez-Alfonso Y. (2013). Callose deposition and symplastic connectivity are regulated prior to lateral root emergence. *Commun Integr Biol.*, **6(6)**, e26531.

Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science*, **282(5389)**, 662, 679-82. Review.

Mendoza-Cózatl D.G., Jobe T.O., Hauser F., Schroeder J.I. (2011). Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance, and transcriptional responses induced by cadmium and arsenic. *Curr Opin Plant Biol.*, **14(5)**, 554-62.

Meng Y., Ma X., Chen D., Wu P., Chen M. (2010). MicroRNA-mediated signaling involved in plant root development. *Biochem Biophys Res Commun*, **393(3)**, 345-9. Review.

Meyerowitz E. M., Somerville C. R. (1994). *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Mikkelsen M.D., Hansen C.H., Wittstock U., Halkier B.A. (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem.*, **275(43)**, 33712-7.

Mikkelsen M.D., Naur P., Halkier B.A. (2004). *Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis. *Plant J.*, **37(5)**, 770-7.

Mironov V., Van Montagu M., Inzé D. (1997). Regulation of cell division in plants: an *Arabidopsis* perspective. *Prog Cell Cycle Res.*, **3**, 29-41. Review.

Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, **7(9)**, 405-10. Review.

Molas M.L., Kiss J.Z. (2008). *PKS1* plays a role in red-light-based positive phototropism in roots. *Plant Cell Environ.*, **31(6)**, 842-9.

Molendijk A.J., Bischoff F., Rajendrakumar C.S., Friml J., Braun M., Gilroy S., Palme K. (2001). *Arabidopsis thaliana* Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO J.*, **20(11)**, 2779-88.

Moon J., Parry G., Estelle M. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell*, **16(12)**, 3181-95. Review.

Moreno-Risueno M.A., Van Norman J.M., Moreno A., Zhang J., Ahnert S.E., Benfey P.N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science*, **329(5997)**, 1306-11.

Morimoto R.I. (1998). Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.*, **12(24)**, 3788-96. Review.

Moubayidin L., Di Mambro R., Sabatini S. (2009). Cytokinin–auxin crosstalk. *Trends Plant Sci.*, **14**, 557–562.

Mukhopadhyay D., Riezman H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, **315(5809)**, 201-5. Review.

Mullen J.L., Wolverton C., Ishikawa H., Hangarter R.P., Evans M.L. (2002). Spatial separation of light perception and growth response in maize root phototropism. *Plant Cell Environ.*, **25(9)**, 1191-6.

Müller A., Guan C., Gälweiler L., Tänzler P., Huijser P., Marchant A., Parry G., Bennett M., Wisman E., Palme K. (1998). *AtPIN2* defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control. *EMBO J.*, **17(23)**, 6903-11.

Muller B., Sheen J. (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, **453**, 1094–1097.

Munekage Y., Hojo M., Meurer J., Endo T., Tasaka M., Shikanai T. (2002). *PGR5* is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell.*, **110(3)**, 361-71.

Munns R., Tester M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu Rev Plant Biol.*, **59**, 651-81.

Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, **15**, 473-497.

Murfitt L.M., Kolosova N., Mann C.J., Dudareva N. (2000). Purification and characterization of S-adenosyl-L-methionine: benzoic acid carboxyl methyltransferase, the enzyme responsible for biosynthesis of the volatile ester methyl benzoate in flowers of *Antirrhinum majus*. *Arch Biochem Biophys.*, **382(1)**, 145-51.

Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T., Kimura T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, *pGWBs*, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng.*, **104(1)**, 34-41.

Nakai A. (1999). New aspects in the vertebrate heat shock factor system: Hsf3 and Hsf4. *Cell Stress Chaperones*, **4(2)**, 86-93. Review.

Nakayama K.I., Nakayama K. (2006). Ubiquitin system regulating G1 and S phases of cell cycle. *Tanpakushitsu Kakusan Koso.*, **51(10 Suppl)**, 1362-9. Review.

Narasimhan K., Basheer C., Bajic V.B., Swarup S. (2003). Enhancement of plant-microbe interactions using a rhizosphere metabolomics-driven approach and its application in the removal of polychlorinated biphenyls. *Plant Physiol.*, **132**, 146–153.

Narusaka Y., Narusaka M., Seki M., Umezawa T., Ishida J., Nakajima M., Enju A., Shinozaki K. (2004). Crosstalk in the responses to abiotic and biotic stresses in *Arabidopsis*: analysis of gene expression in *cytochrome P450* gene superfamily by cDNA microarray. *Plant Mol Biol.*, **55(3)**, 327-42.

Neuteboom L.W., Veth-Tello L.M., Clijdesdale O.R., Hooykaas P.J., van der Zaal B.J. (1999). A novel subtilisin-like protease gene from *Arabidopsis thaliana* is expressed at sites of lateral root emergence. *DNA Res.*, **6(1)**, 13-9.

Nibau C., Wu H.M., Cheung A.Y. (2006). RAC/ROP GTPases: 'hubs' for signal integration and diversification in plants. *Trends Plant Sci.*, **11(6)**, 309-15.

Nibau C., Gibbs D. J., Coates J. C. (2008) Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation. *New Phytol.*, **179(3)**, 595-614.

Noctor G., De Paepe R., Foyer C.H. (2007). Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.*, **12(3)**, 125-34.

Normanly J., Bartel B. (1999). Redundancy as a way of life - IAA metabolism. *Curr Opin Plant Biol.*, **2(3)**, 207-13.

Nover L., Neumann D., Scharf K.D. (1990). Heat Shock and Other Stress Response Systems of Plants. *Results Problems in Cell Differentiation*, **19**, Springer Verlag, Berlin.

Nover L. (1991). HSFs and HSPs--a stressful program on transcription factors and chaperones. *New Biol.*, **3(9)**, 855-9. Review.

Nover L. (1994). The heat stress response as part of the plant stress network: an overview with six tables. *NATO-ASI Series on Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants*, JH Cherry (ed), Springer Verlag, Berlin, 3-45.

Nover L., Scharf K.D., Gagliardi D., Vergne P., Czarnecka-Verner E., Gurley W.B. (1996). The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones*, **1(4)**, 215-23. Review.

Nover L., Bharti K., Döring P., Mishra S.K., Ganguli A., Scharf K.D. (2001). *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones*, **6(3)**, 177-89. Review.

O'Reilly M.K., Zhang G. Imperiali B. (2006). *In vitro* evidence for the dual function of *Alg2* and *Alg11*: essential mannosyltransferases in N-linked glycoprotein biosynthesis. *Biochemistry*, **45**, 9593–9603.

Okushima Y., Overvoorde P.J., Arima K., Alonso J.M., Chan A., Chang C., Ecker J.R., Hughes B., Lui A., Nguyen D., Onodera C., Quach H., Smith A., Yu G., Theologis A. (2005). Functional genomic analysis of the *AUXIN RESPONSE FACTOR* gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of *ARF7* and *ARF19*. *Plant Cell*, **17(2)**, 444-63.

Okushima Y., Fukaki H., Onoda M., Theologis A., Tasaka M. (2007). *ARF7* and *ARF19* regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **19(1)**, 118-30.

Oliver S. G. (1997). *Microbiology*, **143**, 1483–1487.

Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.*, **16(9)**, 373-8.

Olsen S.K., Lima C.D. (2013). Structure of a ubiquitin E1-E2 complex: insights to E1-E2 thioester transfer. *Mol Cell*, **49(5)**, 884-96.

Oono Y., Ooura C., Rahman A., Aspuria E.T., Hayashi K., Tanaka A., Uchimiya H. (2003). p-Chlorophenoxyisobutyric acid impairs auxin response in *Arabidopsis* root. *Plant Physiol.*, **133(3)**, 1135-47.

Oparka K.J., Duckett C.M., Prior D.A.M, Fisher D.B. (1994). Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, **6**, 759-66.

Oparka K. J., Prior D. A. M., Wright K. M. (1995) Symplastic communication between primary and developing lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **46**, 187-197.

Osmont K.S., Sibout R., Hardtke C.S. (2007). Hidden branches: developments in root system architecture. *Annu Rev Plant Biol.*, **58**, 93-113. Review.

Otero J.H., Lizák B., Hendershot L.M. (2010). Life and death of a BiP substrate. *Semin Cell Dev Biol.*, **21(5)**, 472-8.

Otonello L., Frumento G., Arduino N., Dapino P., Tortolina G., Dallegri F. (2001). Immune complex stimulation of neutrophil apoptosis: investigating the involvement of oxidative and nonoxidative pathways. *Free Radic Biol Med.*, **30(2)**, 161-9.

Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **2(6)**, a001537.

Ozgur R., Turkan I., Uzilday B., Sekmen A.H. (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot.*, **65(5)**, 1377-90.

Palmer C.M., Gueriot M.L. (2009). Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. *Nat Chem Biol.*, **5(5)**, 333-40.

Papdi C., Abraham E., Joseph M.P., Popescu C., Koncz C., Szabados, L. (2008). Functional identification of *Arabidopsis* stress regulatory genes using the controlled cDNA overexpression system. *Plant Physiol.*, **147**, 528-542.

Paquette S.M., Bak S., Feyereisen R. (2000). Intron-exon organization and phylogeny in a large superfamily, the paralogous *cytochrome P450* genes of *Arabidopsis thaliana*. *DNA Cell Biol.*, **19(5)**, 307-17.

Pardo J.M., Cubero B., Leidi E.O., Quintero F.J. (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *J Exp Bot.*, **57(5)**, 1181-99.

Paredes A.R., Somerville C.R., Ehrhardt D.W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science.*, **312(5779)**, 1491-5.

Parizot B., Laplaze L., Ricaud L., Boucheron-Dubuisson E., Bayle V., Bonke M., De Smet I., Poethig S.R., Helariutta Y., Haseloff J., Chriqui D., Beeckman T., Nussaume L. (2008). Diarch symmetry of the vascular bundle in *Arabidopsis* root

encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiol.*, **146(1)**, 140-8.

Parizot B., De Rybel B., Beeckman T. (2010). VisualLRTC: a new view on lateral root initiation by combining specific transcriptome data sets. *Plant Physiol.*, **153(1)**, 34-40.

Passaia G., Queval G., Bai J., Margis-Pinheiro M., Foyer C.H. (2014). The effects of redox controls mediated by glutathione peroxidases on root architecture in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot.*, **65(5)**, 1403-13.

Passardi F., Tognolli M., De Meyer M., Penel C., Dunand C. (2006). Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta*, **223(5)**, 965-74.

Pasternak T., Potters G., Caubergs R., Jansen M.A. (2005). Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *J Exp Bot.*, **56(418)**, 1991-2001.

Peer W.A. (2013). From perception to attenuation: auxin signalling and responses. *Curr Opin Plant Biol.*, **16(5)**, 561-8.

Peer W.A., Cheng Y., Murphy A.S. (2013). Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *J Exp Bot.*, **64(9)**, 2629-39.

Péret B., De Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplaze L., Beeckman T., Bennett M.J. (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.*, **14(7)**, 399-408.

Péret B., Li G., Zhao J., Band L.R., Voß U., Postaire O., Luu D.T., Da Ines O., Casimiro I., Lucas M., Wells D.M., Lazzerini L., Nacry P., King J.R., Jensen O.E., Schäffner A.R., Maurel C., Bennett M.J. (2012). Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nat Cell Biol.*, **14(10)**, 991-8.

Péret B., Middleton A.M., French A.P., Larrieu A., Bishopp A., Njo M., Wells D.M., Porco S., Mellor N., Band L.R., Casimiro I., Kleine-Vehn J., Vanneste S., Sairanen I., Mallet R., Sandberg G., Ljung K., Beeckman T., Benková E., Friml J., Kramer E., King J.R., De Smet I., Pridmore T., Owen M., Bennett M.J. (2013).

Sequential induction of auxin efflux and influx carriers regulates lateral root emergence. *Mol Syst Biol.*, **9**, 699.

Perez-Perez J.M. (2007). Hormone signaling and root development: an update on the latest *Arabidopsis thaliana* research. *Funct. Plant Biol.*, **34**, 163–171.

Pérez-Torres C.A., López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., Ibarra-Laclette E., Dharmasiri S., Estelle M., Herrera-Estrella L. (2008). Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell*, **20(12)**, 3258-72.

Pernisova M., Klima P., Horak J., Valkova M., Malbeck J., Soucek P. (2009). Cytokinin modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 3609–3614.

Perrot-Rechenmann C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, **2(5)**, a001446.

Peters J.M. (1998). SCF and APC: the Yin and Yang of cell cycle regulated proteolysis. *Curr Opin Cell Biol.*, **10(6)**, 759-68. Review.

Petrásek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J.J., Abas M., Seifertová D., Wisniewska J., Tadele Z., Kubes M., Covanová M., Dhonukshe P., Skupa P., Benková E., Perry L., Krecek P., Lee O.R., Fink G.R., Geisler M., Murphy A.S., Luschnig C., Zazimalová E., Friml J. (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, **312(5775)**, 914-8.

Petrásek J., Friml J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, **136(16)**, 2675-88.

Prassinis C., Ko J.H., Lang G., Iezzoni A.F., Han K.H. (2009). Rootstock-induced dwarfing in cherries is caused by differential cessation of terminal meristem growth and is triggered by rootstock-specific gene regulation. *Tree Physiol.*, **29(7)**, 927-36.

Provar N.J., Gil P., Chen W., Han B., Chang H.S., Wang X., Zhu T. (2003). Gene expression phenotypes of *Arabidopsis* associated with sensitivity to low temperatures. *Plant Physiol.*, **132(2)**, 893-906.

Qin G., Gu H., Zhao Y., Ma Z., Shi G., Yang Y., Pichersky E., Chen H., Liu M., Chen Z., Qu L.J. (2005). An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell.*, **17(10)**, 2693-704.

Qin X., Zeevaart J.A. (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **96(26)**, 15354-61.

Quail P.H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **3(2)**, 85-93. Review.

Rani Debi B., Chhun T., Taketa S., Tsurumi S., Xia K., Miyao A., (2005). Defects in root development and gravity response in the *aem1* mutant of rice are associated with reduced auxin efflux. *J. Plant Physiol.*, **162**, 678–685.

Rashed M.S., Ozand P.T., Bucknall M.P., Little D. (1995). Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatr Res.*, **38(3)**, 324-31.

Rashotte A.M., Brady S.R., Reed R.C., Ante S.J., Muday G.K. (2000). Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **122(2)**, 481-90.

Reed J.W., Nagpal P., Poole D.S., Furuya M., Chory J. (1993). Mutations in the gene for the red/far-red light receptor phytochrome B alter cell elongation and physiological responses throughout *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, **5(2)**, 147-57.

Reed J.W., Nagatani A., Elich T.D., Fagan M., Chory J. (1994). Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in *Arabidopsis* Development. *Plant Physiol.*, **104(4)**, 1139-1149.

Reed R.C., Brady S.R., Muday G.K. (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **118(4)**, 1369-78.

Ren H., Santner A., del Pozo J.C., Murray J.A., Estelle M. (2008). Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *Plant J.*, **53(5)**, 705-16.

Rizzini L., Favory J.J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schäfer E., Nagy F., Jenkins G.I., Ulm R. (2011). Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science*, **332(6025)**, 103-6.

Roberts A.W., Roberts E.M., Delmer D.P. (2002). *Cellulose synthase (CesA)* genes in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Eukaryot Cell*, **1(6)**, 847-55.

Rodríguez-Rosales M.P., Gálvez F.J., Huertas R., Aranda M.N., Baghour M., Cagnac O., Venema K. (2009). Plant NHX cation/proton antiporters. *Plant Signal Behav.*, **4(4)**, 265-76.

Rogg L.E., Lasswell J., Bartel B. (2001). A gain-of-function mutation in *IAA28* suppresses lateral root development. *Plant Cell*, **13(3)**, 465-80.

Ros Barceló A. (1997). Lignification in plant cell walls. *International Review of Cytology*, **176**, 87-132.

Rost T. L., Jones T. J., Falk R. H. (1988). Distribution and relationship of cell division and maturation events in *Pisum sativum* (*Fabaceae*) seedling roots. *Am J Bot.*, **75**, 1571-1583.

Roycewicz P.S., Malamy J.E. (2014). Cell wall properties play an important role in the emergence of lateral root primordia from the parent root. *J Exp Bot.*, **65(8)**, 2057-69.

Ruegger M., Dewey E., Hobbie L., Brown D., Bernasconi P., Turner J., Muday G., Estelle M. (1997). Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell*, **9(5)**, 745-57.

Ruppel N.J., Hangarter R.P., Kiss J.Z. (2001). Red-light-induced positive phototropism in *Arabidopsis* roots. *Planta*, **212(3)**, 424-30.

Ruyter-Spira C., Kohlen W., Charnikhova T., Van Zeijl A., Van Bezouwen L., De Ruijter N., (2011). Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another below- ground role for strigolactones? *Plant Physiol.*, **155**, 721–734.

Ruzicka K., Simásková M., Duclercq J., Petrásek J., Zazimalová E., Simon S., Friml J., Van Montagu M.C., Benková E. (2009). Cytokinin regulates root meristem

activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **106(11)**, 4284-9.

Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P., Scheres B. (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell*, **99(5)**, 463-72.

Sabatini S., Heidstra R., Wildwater M., Scheres B. (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes dev.*, **17(3)**, 354-8.

Sakai T., Honing H., Nishioka M., Uehara Y., Takahashi M., Fujisawa N., Saji K., Seki M., Shinozaki K., Jones M.A., Smirnov N., Okada K., Wasteneys G.O. (2008). Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **53(1)**, 157-71.

Sakamoto K., Briggs W.R. (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell*, **14(8)**, 1723-35.

Salisbury F.J., Hall A., Grierson C.S., Halliday K.J. (2007). Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant J.*, **50(3)**, 429-38.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santner A., Estelle M. (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J.*, **61(6)**, 1029-40.

Scharf K.D., Heider H., Höfeld I., Lyck R., Schmidt E., Nover L. (1998). The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol Cell Biol.*, **18(4)**, 2240-51.

Scheible W.R., Gonzalez-Fontes A., Lauerer M., Muller-Rober B., Caboche M., Stitt M. (1997). Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. *Plant Cell*, **9(5)**, 783-798.

Scheres B., Benfey P.N. (1999). Asymmetric cell division in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.*, **50**, 505-537.

Scheres B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, **8(5)**, 345-54. Review.

Schöffl F., Prändl R., Reindl A. (1998). Regulation of the heat-shock response. *Plant Physiol.*, **117(4)**, 1135-41. Review.

Schröder M. (2008). Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell Mol Life Sci.*, **65(6)**, 862-94. Review.

Sevier C.S., Kaiser C.A. (2008). *Ero1* and redox homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1783**, 549–556.

Sharrock R.A., Quail P.H. (1989). Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.*, **3(11)**, 1745-57.

Sherameti I., Venus Y., Drzewiecki C., Tripathi S., Dan V.M., Nitz I., Varma A., Grundler F.M., Oelmüller R. (2008). PYK10, a beta-glucosidase located in the endoplasmic reticulum, is crucial for the beneficial interaction between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *Plant J.*, **54(3)**, 428-39.

Sherr C.J., Roberts J.M. (1995). Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*, **9(10)**, 1149-63. Review.

Sherr C.J., Roberts J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.*, **13(12)**, 1501-12. Review.

Shulaev V., Silverman P., Raskin I. (1997). Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature*, **385**, 718–721.

Silva-Navas J., Manzano C., Pallero-Baena M., Moreno-Risueño M., Navarro-Neila S., Tellez B., Pollmann S., Carrasco-Loba V., Casimiro I., Casero P., Garcia-Mina J.M., Baigorri R., Gallego F.J., del Pozo J.C. Root development and responses are alerted by light. Sin publicar.

Skaar J.R., Pagano M. (2009). Control of cell growth by the SCF and APC/C ubiquitin ligases. *Curr Opin Cell Biol.*, **21(6)**, 816-24.

Smalle J., Vierstra R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol.*, **55**, 555-90. Review.

Smirnoff N., Pallanca J.E. (1996). Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem Soc Trans.*, **24(2)**, 472-8. Review.

Smirnoff N., Wheeler G.L. (2000). Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **35(4)**, 291-314.

Smith S., De Smet I. (2012). Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, **367(1595)**, 1441-52.

Somers D.E., Quail P.H. (1995). Phytochrome-Mediated Light Regulation of PHYA- and PHYB-GUS Transgenes in *Arabidopsis thaliana* Seedlings. *Plant Physiol.*, **107(2)**, 523-534.

Srivastava R., Deng Y., Shah S., Rao A.G., Howell S.H. (2013). BINDING PROTEIN is a master regulator of the endoplasmic reticulum stress sensor/transducer bZIP28 in *Arabidopsis*. *Plant Cell.*, **25(4)**, 1416-29.

Stals H., Inzé D. (2001). When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.*, **6(8)**, 359-64. Review.

Stasinopoulos T.C., Hangarter R.P. (1990). Preventing photochemistry in culture media by long-pass light filters alters growth of cultured tissues. *Plant Physiol.*, **93(4)**, 1365-9.

Staswick P.E., Serban B., Rowe M., Tiryaki I., Maldonado M.T., Maldonado M.C., Suza W. (2005). Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell.*, **17(2)**, 616-27.

Stegemann S., Bock R. (2009). Exchange of genetic material between cells in plant tissue grafts. *Science*, **324(5927)**, 649-51.

Steinmann T., Geldner N., Grebe M., Mangold S., Jackson C.L., Paris S., Gälweiler L., Palme K., Jürgens G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science*, **286(5438)**, 316-8.

Stepanova A.N., Hoyt J.M., Hamilton A.A., Alonso J.M. (2005). A Link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17(8)**, 2230-42.

Storey J.D., Tibshirani R. (2003). Statistical methods for identifying differentially expressed genes in DNA microarrays. *Methods Mol Biol.*, **224**, 149-57.

Strieter E.R., Korasick D.A. (2012). Unraveling the complexity of ubiquitin signaling. *ACS Chem Biol.*, **7(1)**, 52-63.

Suryadinata R., Holien J.K., Yang G., Parker M.W., Papaleo E., Šarčević B. (2013). Molecular and structural insight into lysine selection on substrate and ubiquitin lysine 48 by the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34. *Cell Cycle*, **12(11)**, 1732-44.

Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, **14**, 691–699.

Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R., Miller G. (2012). ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell Environ.*, **35(2)**, 259-70.

Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Péret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M.P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J.D., Taylor C.G., Schachtman D.P., May S., Sandberg G., Benfey P., Friml J., Kerr I., Beeckman T., Laplace L., Bennett M.J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol.*, **10(8)**, 946-54.

Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K., Bennett M. (2001). Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.*, **15(20)**, 2648-53.

Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik D., Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L., Millner P., Tsurumi S., Moore I., Napier R., Kerr I.D., Bennett M.J. (2004). Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *Plant Cell*, **16(11)**, 3069-83.

Szerszen J.B., Szczyglowski K., Bandurski R.S. (1994). *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science.*, **265(5179)**, 1699-701.

Tajima H., Iwata Y., Iwano M., Takayama S., Koizumi N. (2008). Identification of an *Arabidopsis* transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochem Biophys Res Commun.*, **374**(2), 242-7.

Tammariello S.P., Quinn M.T., Estus S. (2000). NADPH oxidase contributes directly to oxidative stress and apoptosis in nerve growth factor-deprived sympathetic neurons. *J Neurosci.*, **20**(1), RC53.

Tatematsu K., Kumagai S., Muto H., Sato A., Watahiki M.K., Harper R.M., Liscum E., Yamamoto K.T. (2004). *MASSUGU2* encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.*, **16**(2), 379-93.

Teixeira L.K., Reed S.I. (2013). Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem.*, **82**, 387-414.

Ten Hove C.A., Willemsen V., de Vries W.J., van Dijken A., Scheres B., Heidstra R. (2010). *SCHIZORIZA* encodes a nuclear factor regulating asymmetry of stem cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Curr Biol.*, **20**(5), 452-7.

Teusink B., Walsh M.C., van Dam K., Westerhoff H.V. (1998). The danger of metabolic pathways with turbo design. *Trends Biochem Sci.*, **23**(5), 162-9. Review.

Thomine S., Vert G. (2013). Iron transport in plants: better be safe than sorry. *Curr Opin Plant Biol.*, **16**(3), 322-7.

Tian C.E., Muto H., Higuchi K., Matamura T., Tatematsu K., Koshiba T., Yamamoto K.T. (2004). Disruption and overexpression of *auxin response factor 8* gene of *Arabidopsis* affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. *Plant J.*, **40**(3), 333-43.

Tian Q., Reed J.W. (1999). Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development.*, **126**(4), 711-21.

Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell.*, **15**(2), 533-43.

Tiwari S.B., Hagen G., Guilfoyle T.J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell*, **16**(2), 533-43.

Tong H., Leasure C.D., Hou X., Yuen G., Briggs W., He Z.H. (2008). Role of root UV-B sensing in *Arabidopsis* early seedling development. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **105**(52), 21039-44.

Tóth R., Kevei E., Hall A., Millar A.J., Nagy F., Kozma-Bognár L. (2001). Circadian clock-regulated expression of phytochrome and cryptochrome genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **127**(4), 1607-16.

Traas J., Hülskamp M., Gendreau E., Höfte H. (1998). Endoreduplication and development: rule without dividing? *Curr Opin Plant Biol.*, **1**(6), 498-503. Review.

Trinh N.N., Huang T.L., Chi W.C., Fu S.F., Chen C.C., Huang H.J. (2014). Chromium stress response effect on signal transduction and expression of signaling genes in rice. *Physiol Plant*, **150**(2), 205-24.

Truernit E., Haseloff J. (2008). A simple way to identify non-viable cells within living plant tissue using confocal microscopy. *Plant Methods*, **4**, 15.

Tsuchisaka A., Theologis A. (2004). Unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol.*, **136**, 2982–3000.

Tsukagoshi H., Busch W., Benfey P.N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell.*, **143**(4), 606-16.

Tu B.P., Weissman J.S. (2004). Oxidative protein folding in eukaryotes: mechanisms and consequences. *Journal of Cell Biology*, **164**, 341–346.

Ubeda-Tomás S., Federici F., Casimiro I., Beemster G. T. S., Bhalerao R., Swarup R., Doerner P., Haseloff J., Bennett M. J. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Current Biology*, **19**, 1194-1199.

Uehara T., Okushima Y., Mimura T., Tasaka M., Fukaki H. (2008). Domain II mutations in *CRANE/IAA18* suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **49**(7), 1025-38.

Usami T., Mochizuki N., Kondo M., Nishimura M., Nagatani A. (2004). Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate *Arabidopsis* root greening under blue light. *Plant Cell Physiol.*, **45(12)**, 1798-808.

Vandepoele K., Raes J., De Veylder L., Rouzé P., Rombauts S., Inzé D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14(4)**, 903-16.

Vanneste S., De Rybel B., Beemster G.T., Ljung K., De Smet I., Van Isterdael G., Naudts M., Iida R., Gruijssem W., Tasaka M., Inzé D., Fukaki H., Beeckman T. (2005). Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.*, **17(11)**, 3035-50.

Vanneste S., Friml J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell.*, **136(6)**, 1005-16.

Venus Y., Oelmüller R. (2013). *Arabidopsis* ROP1 and ROP6 influence germination time, root morphology, the formation of F-actin bundles, and symbiotic fungal interactions. *Mol Plant.*, **6(3)**, 872-86.

Vernoud V., Horton A.C., Yang Z., Nielsen E. (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **131(3)**, 1191-208.

Verslues P.E., Agarwal M., Katiyar-Agarwal S., Zhu J., Zhu J.K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.*, **45(4)**, 523-39.

Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benková E., Benjamins R., Beeckman T., Luschnig C., Friml J. (2005). Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development*, **132(20)**, 4521-31.

Vieten A., Sauer M., Brewer P.B., Friml J. (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.*, **12(4)**, 160-8.

Vissenberg K., Oyama M., Osato Y., Yokoyama R., Verbelen J.P., Nishitani K. (2005). Differential expression of *AtXTH17*, *AtXTH18*, *AtXTH19* and *AtXTH20* genes in

*Arabidopsis* roots. Physiological roles in specification in cell wall construction. *Plant Cell Physiol.*, **46(1)**, 192-200.

Vranová E., Inzé D., Van Breusegem F. (2002). Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot.*, **53(372)**, 1227-36. Review.

Waisel D.B., Burns J.P., Johnson J.A., Hardart G.E., Truog R.D. (2002). Guidelines for perioperative do-not-resuscitate policies. *J Clin Anesth.*, **14(6)**, 467-73.

Wang H., Qi Q., Schorr P., Cutler A.J., Crosby W.L., Fowke L.C. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J.*, **15(4)**, 501-10.

Wang H., Zhou Y., Gilmer S., Whitwill S., Fowke L.C. (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.*, **24(5)**, 613-23.

Wang I.C., Chen Y.J., Hughes D., Petrovic V., Major M.L., Park H.J., Tan Y., Ackerson T., Costa R.H. (2005). Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol.*, **25(24)**, 10875-94.

Wang Q.M., Luo X., Studzinski G.P. (1997). Cyclin-dependent kinase 6 is the principal target of p27/Kip1 regulation of the G1-phase traverse in 1,25-dihydroxyvitamin D3-treated HL60 cells. *Cancer Res.*, **57(14)**, 2851-5.

Wang X., Zhang J., Yuan M., Ehrhardt D.W., Wang Z., Mao T. (2012). *Arabidopsis* microtubule destabilizing protein40 is involved in brassinosteroid regulation of hypocotyl elongation. *Plant Cell*, **24(10)**, 4012-25.

Wang Y.S., Yoo C.M., Blancaflor E.B. (2008). Improved imaging of actin filaments in transgenic *Arabidopsis* plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytol.*, **177(2)**, 525-36.

Warnasooriya S.N., Montgomery B.L. (2011). Spatial-specific regulation of root development by phytochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav.*, **6(12)**, 2047-50.

Wasteneys G.O. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J Cell Sci.*, **115**(Pt 7), 1345-54. Review.

Wasteneys G.O., Galway M.E. (2003). Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annu Rev Plant Biol.*, **54**, 691-722.

Wasteneys G.O. (2004). Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Curr Opin Plant Biol.*, **7**(6), 651-60. Review.

Wasteneys G.O., Collings D.A. (2004). Expanding beyond the great divide: the cytoskeleton and axial growth. In: Hussey PJ, ed. *The Plant Cytoskeleton in Cell Differentiation and Development*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 83–115.

Watanabe N., Lam E. (2008). BAX inhibitor-1 modulates endoplasmic reticulum stress-mediated programmed cell death in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.*, **283**(6), 3200-10.

Waters E.R., Schaal B.A. (1996). Heat shock induces a loss of rRNA-encoding DNA repeats in *Brassica nigra*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **93**(4), 1449-52.

Webster P. L., MacLeod R. D. (1980). Characteristics of root apical meristem cell population kinetic: a review of analyses and concepts. *Environ Exp Bot.*, **20**, 335-358.

Weerapana E., Imperiali B. (2006). Asparagine-linked protein glycosylation: from eukaryotic to prokaryotic systems. *Glycobiology*, **16**(6), 91R-101R.

Weijers D., Benková E., Jäger K.E., Schlereth A., Hamann T., Kientz M., Wilmoth J.C., Reed J.W., Jürgens G. (2005). Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. *EMBO J.*, **24**(10), 1874-85.

Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnoff N. (1998). The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*, **393**(6683), 365-9.

Williamson L.C., Ribrioux S.P., Fitter A.H., Leyser H.M. (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **126**(2), 875-82.

Wilmoth J.C., Wang S., Tiwari S.B., Joshi A.D., Hagen G., Guilfoyle T.J., Alonso J.M., Ecker J.R., Reed J.W. (2005). *NPH4/ARF7* and *ARF19* promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant J.*, **43(1)**, 118-30.

Wisniewska J., Xu J., Seifertová D., Brewer P.B., Ruzicka K., Blilou I., Rouquié D., Benková E., Scheres B., Friml J. (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, **312(5775)**, 883.

Wu C. (1995). Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, **11**, 441-69. Review.

Wu G., Lewis D.R., Spalding E.P. (2007). Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell*, **19(6)**, 1826-37.

Xie Q., Frugis G., Colgan D., Chua N.H. (2000). *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.*, **14(23)**, 3024-36.

Xiong Y., Contento A.L., Bassham D.C. (2005). *AtATG18a* is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **42(4)**, 535-46.

Xiong Y., Contento A.L., Bassham D.C. (2007). Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis*. *Autophagy.*, **3(3)**, 257-8.

Xu J., Scheres B. (2005). Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity. *Plant Cell.*, **17(2)**, 525-36.

Yang F., Song Y., Yang H., Liu Z., Zhu G., Yang Y.J. (2014). An auxin-responsive endogenous peptide regulates root development in *Arabidopsis*. *Integr Plant Biol.*, **56(7)**, 635-47.

Yang W., Lee H.W., Hellinga H., Yang J.J. (2002). Structural analysis, identification, and design of calcium-binding sites in proteins. *Proteins*, **47(3)**, 344-56.

Yang X., Lee S., So J.H., Dharmasiri S., Dharmasiri N., Ge L., Jensen C., Hangarter R., Hobbie L., Estelle M. (2004). The IAA1 protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of SCF(TIR1). *Plant J.*, **40(5)**, 772-82.

Yang Y., Hammes U.Z., Taylor C.G., Schachtman D.P., Nielsen E. (2006). High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr Biol.*, **16(11)**, 1123-7.

Yang Y., Xu R., Ma C.J., Vlot A.C., Klessig D.F., Pichersky E. (2008). Inactive methyl indole-3-acetic acid ester can be hydrolyzed and activated by several esterases belonging to the *AtMES* esterase family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **147(3)**, 1034-45.

Yin H., Yan B., Sun J., Jia P., Zhang Z., Yan X., Chai J., Ren Z., Zheng G., Liu H. (2012). Graft-union development: a delicate process that involves cell-cell communication between scion and stock for local auxin accumulation. *J Exp Bot.*, **63(11)**, 4219-32.

Yokawa K., Kagenishi T., Kawano T., Mancuso S., Baluška F. (2011). Illumination of *Arabidopsis* roots induces immediate burst of ROS production. *Plant Signal Behav.*, **6(10)**, 1460-4.

Yokawa K., Fasano R., Kagenishi T., Baluška F. (2014). Light as stress factor to plant roots - case of root halotropism. *Front Plant Sci.*, **5**, 718.

Yoo C.M., Wen J., Motes C.M., Sparks J.A., Blancaflor E.B. (2008). A class I ADP-ribosylation factor GTPase-activating protein is critical for maintaining directional root hair growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **147(4)**, 1659-74.

Yoshida K., Watanabe C.K., Hachiya T., Tholen D., Shibata M., Terashima I., Noguchi K. (2011). Distinct responses of the mitochondrial respiratory chain to long- and short-term high-light environments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.*, **34(4)**, 618-28.

Zádníková P., Petrásek J., Marhavy P., Raz V., Vandenbussche F., Ding Z., Schwarzerová K., Morita M.T., Tasaka M., Hejátko J., Van Der Straeten D., Friml J., Benková E. (2010). Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development.*, **137(4)**, 607-17.

Zeng M., Xiao F., Zhong X., Jin F., Guan L., Wang A., Liu X., Zhong C. (2013). Reactive oxygen species play a central role in hexavalent chromium-induced apoptosis in Hep3B cells without the functional roles of p53 and caspase-3. *Cell Physiol Biochem.*, **32(2)**, 279-90.

Zenser N., Ellsmore A., Leasure C., Callis J. (2001). Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **98(20)**, 11795-800.

Zhang H., Forde B.G. (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, **279(5349)**, 407-9.

Zhang H., Forde B.G. (2000). Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J Exp Bot.*, **51(342)**, 51-9.

Zhang H., Hu B., Ji Y., Kato A., Song Y. (2008). The effect of calnexin deletion on the expression level of binding protein (BiP) under heat stress conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Lett.*, **13(4)**, 621-31.

Zhang M., Henquet M., Chen Z., Zhang H., Zhang Y., Ren X., van der Krol S., Gonneau M., Bosch D., Gong Z. (2009). *LEW3*, encoding a putative alpha-1,2-mannosyltransferase (ALG11) in N-linked glycoprotein, plays vital roles in cell-wall biosynthesis and the abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **60(6)**, 983-99.

Zhao C., Shichi H. (1998). Prevention of acetaminophen-induced cataract by a combination of diallyl disulfide and N-acetylcysteine. *J Ocul Pharmacol Ther.*, **14(4)**, 345-55.

Zhao N., Ferrer J.L., Ross J., Guan J., Yang Y., Pichersky E., Noel J.P., Chen F. (2008). Structural, biochemical, and phylogenetic analyses suggest that indole-3-acetic acid methyltransferase is an evolutionarily ancient member of the *SABATH* family. *Plant Physiol.*, **146(2)**, 455-67.

Zhao X.J., Jones D.R., Wang Y.H., Grimm S.W., Hall S.D. (2002). Reversible and irreversible inhibition of CYP3A enzymes by tamoxifen and metabolites. *Xenobiotica*, **32(10)**, 863-78.

Zhou Y., Wang H., Gilmer S., Whitwill S., Fowke L.C. (2003). Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **216(4)**, 604-13.

Zimmerman P., Hitchcock A.E. (1937). Comparative effectiveness of acids, esters, and salts as growth substances and methods of evaluating them. *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **8**, 337-350.

Zonia L., Munnik T. (2008). Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. *J Exp Bot.*, **59(4)**, 861-73.

Zonia L., Munnik T. (2009). Uncovering hidden treasures in pollen tube growth mechanics. *Trends Plant Sci.*, **14(6)**, 318-27.

Zubieta C., Ross J.R., Koscheski P., Yang Y., Pichersky E., Noel J.P. (2003). Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell*, **15(8)**, 1704-16.

Zuo J., Niu Q.W., Chua N.H. (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.*, **24**, 265-273.