

Estudio de la regulación del remodelado de pared celular mediado por Citoquininas durante la emergencia de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*

Tesinista: PETTINARI, Georgina Lucía

Director: Dr. DESIMONE, Marcelo

Universidad Nacional de Córdoba - Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - Carrera de Ciencias Biológicas





Tesina de Grado para optar al título de Bióloga

Estudio de la regulación del remodelado de pared celular mediado por Citoquininas durante la emergencia de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*

Tesinista: PETTINARI, Georgina Lucía

Firma:

Director: Dr. DESIMONE, Marcelo

Firma:

Cátedra de Fisiología Vegetal

Escuela de Biología

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Universidad Nacional de Córdoba



Tesina de Grado para optar al título de Bióloga

**Estudio de la regulación del remodelado de
pared celular mediado por Citoquininas
durante la emergencia de raíces laterales
en *Arabidopsis thaliana***

Tribunal examinador

Nombre y Apellido: Firma:

Nombre y Apellido: Firma:

Nombre y Apellido: Firma:

Calificación:

Fecha:

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	4
2. APÉNDICE	
2.1 Abreviaturas.....	5
2.2 Nomenclatura.....	6
3. INTRODUCCIÓN	
3.1 Sistema radical.....	7
3.2 Desarrollo de raíces laterales.....	8
3.3 Emergencia de RL y remodelación de tejidos.....	11
3.4 Enzimas de remodelado de pared celular.....	12
3.5 Fitohormonas y organogénesis.....	15
3.6 Hipótesis y objetivos.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Análisis <i>in silico</i>	26
4.2 Generalidades: material vegetal y condiciones de crecimiento.....	26
4.3 Determinación de la densidad de PRL y análisis de distribución de estadios.....	27
4.4 Tinción con Ioduro de Propidio (IP).....	29
4.5 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de regiones promotoras.....	30
4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
4.7 Clonación y transformación.....	32
4.8 Selección de plantas transgénicas.....	34
4.9 Análisis de co-localización.....	34
4.10 Análisis de actividad de promotores en plantas transgénicas.....	35
4.11 Protocolo de tinción de GUS.....	35
4.12 Electroforesis en gel de agarosa.....	36

5. RESULTADOS

5.1	Las CKs actúan durante la emergencia de RL vía AZG2 y alteran la progresión del desarrollo de los PRL.....	37
5.2	Las CKs, vía AZG2, provocan cambios en la estructura de la pared celular en los TCs.....	41
5.3	Las CKs modulan la expresión génica de <i>Expa17</i> y <i>Xtr6</i>	44
5.4	AZG2 está implicado en la regulación de la expresión de <i>Expa17</i> y <i>Xtr6</i> dependiente de CKs.....	55
6.	DISCUSIÓN.....	62
7.	CONCLUSIÓN.....	68
8.	AGRADECIMIENTOS.....	69
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	70

1. RESUMEN

El desarrollo de raíces laterales es un proceso de fundamental importancia para la determinación de la arquitectura del sistema radical de las plantas y, como tal, se encuentra sujeto a una fina regulación hormonal. En este trabajo se determinó la importancia de las citoquininas y su transportador AZG2 en el remodelado de pared celular que ocurre durante la etapa de emergencia en la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. La modificación de los niveles de citoquininas tanto por aplicación exógena como por cambios en la actividad de su transportador AZG2 (líneas mutantes *azg2-1* y *azg2-2*) provocó alteraciones en la progresión de los primordios de raíces laterales a través de las distintas capas de la raíz principal. A su vez, la tinción con yoduro de propidio permitió determinar que estas alteraciones se encuentran asociadas a modificaciones en las propiedades de las paredes celulares en los tejidos circundantes a los primordios. Finalmente, el análisis de actividad de promotor en plantas transgénicas transformadas con los constructos *pExpa17:GUS:GFP* y *pXtr6:GUS:GFP* permitió determinar que las citoquininas, vía AZG2, modulan la expresión de estos genes que codifican para Enzimas de Remodelado de Pared Celular. El hecho de que ambos genes respondan de igual manera a la alteración en los niveles de esta hormona podría indicar la existencia de un mecanismo regulatorio general mediado por citoquininas, mediante el cual actuarían en forma antagónica a las auxinas, regulando negativamente la expresión de diferentes Enzimas de Remodelado de Pared Celular durante la emergencia de raíces laterales.

2. APÉNDICE

2.1 Abreviaturas

BA	Benzil-adenina
CKs	Citoquininas
GFP	Proteína verde fluorescente
GUS	B-glucoronidasa
KO	Knock-out (línea con uno o más genes bloqueados)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRL	Primordio de raíz lateral
RFP	Proteína roja fluorescente
RL	Raíz lateral
TCs	Tejidos circundantes (células endodérmicas, corticales y epidérmicas rodeando a un PRL)
tZ	trans-Zeatina
WT	Wild type (genotipo salvaje)

2.2 Nomenclatura

<i>AtAzg2</i> ó <i>Azg2</i>	Gen (At: especie; Azg2: gen)
<i>AtExpa17</i> ó <i>Expa17</i>	Gen (At: especie; Expa17: gen)
<i>AtXtr6</i> ó <i>Xtr6</i>	Gen (At: especie; Xtr6: gen)
AZG2	Proteína
<i>azg2</i>	Genotipo KO
<i>azg2-1</i> y <i>azg2-2</i>	Líneas KO independientes obtenidas mediante inserciones de T-DNA
EXPA17	Proteína
<i>pAzg2</i>	Promotor del gen <i>Azg2</i>
<i>pAzg2:RFP</i>	Constructo (promotor:secuencia codificante)
<i>pExpa17</i>	Promotor del gen <i>Expa17</i>
<i>pExpa17:GUS:GFP</i>	Constructo (promotor:secuencia codificante 1:secuencia codificante 2)
<i>pXtr6</i>	Promotor del gen <i>Xtr6</i>
<i>pXtr6:GUS:GFP</i>	Constructo (promotor:secuencia codificante 1:secuencia codificante 2)
XTR6	Proteína

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Sistema radical

La colonización del ambiente terrestre por parte de las plantas fue uno de los eventos más importantes en la historia del planeta ya que, por primera vez, la productividad primaria comenzó a ocurrir en la superficie continental. A raíz de esto, los ecosistemas terrestres se complejizaron y los ciclos biogeoquímicos sufrieron grandes cambios a nivel global (Pires & Dolan, 2012).

Para que esta colonización resultara exitosa, las plantas debieron desarrollar tejidos especializados y órganos multicelulares que les permitieran asegurar la supervivencia y reproducción en su nuevo ambiente (Pires & Dolan, 2012). Entre ellos se destaca el sistema radical, que penetra activamente en el sustrato brindando anclaje y absorbiendo tanto agua como nutrientes minerales que luego transporta hacia la parte aérea (Raven & Edwards, 2001). A la vez, actúa como sitio de síntesis de muchos de los metabolitos que son necesarios para el crecimiento de la planta (Flores et al, 1999). Finalmente, aunque no menos importante, las raíces permiten establecer interacciones simbióticas con los microorganismos que habitan el suelo, los cuales aumentan la eficiencia en la adquisición de nutrientes y envían estímulos hormonales que promueven el crecimiento del vegetal (Berg, 2009).

Siendo la principal conexión entre las plantas y el suelo, las raíces deben adaptarse morfo-fisiológicamente a las condiciones cambiantes de la rizósfera como lo son la disponibilidad de agua y nutrientes, la competencia subterránea, la interacción con microorganismos benéficos y/o patógenos y la presencia de compuestos tóxicos (Hodge, 2006; Jung & McCouch, 2013; López-Bucio et al., 2003; Philippot et al., 2013). Considerando que se trata de organismos sésiles, la plasticidad de la arquitectura radical, es decir, la capacidad de las plantas de modificar la configuración espacial de su sistema radical en respuesta al ambiente, resulta entonces esencial para su supervivencia. Además, esta característica constituye un rasgo agronómico de gran importancia (Gautam et al., 2017; Grossman & Rice, 2012; Pacheco-Villalobos & Hardtke, 2012; Singh et al., 2016).

La plasticidad antes mencionada se logra gracias a que, a diferencia de los animales, las plantas poseen la capacidad de continuar desarrollando estructuras a lo largo de toda su vida. Así, el sistema radical está formado tanto por raíces embrionarias como post-embrionarias. Las raíces post-embrionarias que derivan de otras ya existentes se denominan raíces laterales (RLs), mientras que las que lo hacen de tejidos no radicales se conocen como raíces adventicias (Atkinson et al., 2014). En las dicotiledóneas, la radícula del embrión se desarrolla para formar la raíz principal de la planta adulta, a partir de la cual surgen continuamente RLs. Éstas, a su vez, repiten el patrón de ramificación formando RLs de órdenes sucesivamente mayores, estableciéndose así lo que se conoce como sistema radical alorríco (Bellini et al., 2014; Osmont et al., 2007). En consecuencia, es el crecimiento de las RLs el que finalmente determinará la arquitectura del sistema radical en este grupo de plantas.

3.2 Desarrollo de Raíces Laterales

Como se mencionó anteriormente, las RLs se desarrollan a partir de tejidos radicales preexistentes. Particularmente, estas se originan a partir de un grupo de células del periciclo situadas en los polos xilemáticos, denominadas células fundadoras de raíces laterales (CFRLs) (Casimiro et al., 2001).

Debido a la simplicidad de su anatomía, el organismo modelo de preferencia para el estudio del desarrollo de RLs es *Arabidopsis thaliana*. En esta planta, la raíz principal posee tres tejidos externos, endodermis, corteza y epidermis, cada uno formado por una única capa de células (Figura 1; Dolan et al., 1993; Péret et al., 2009a).

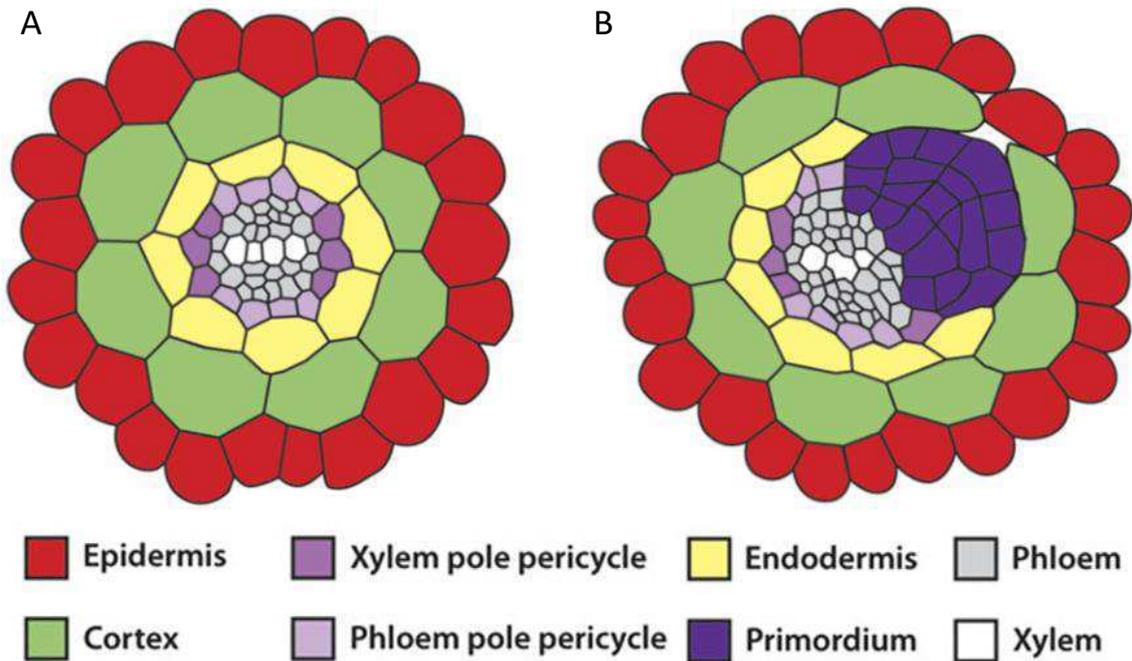


Figura 1: Esquema de la anatomía de la raíz principal de *Arabidopsis thaliana*. A) Cilindro vascular y capas celulares de la raíz principal. B) Formación de un primordio de raíz lateral en el polo xilemático del periciclo. Tomado de Péret et al., 2009a.

El proceso de formación de RLs puede dividirse cronológicamente en cuatro etapas principales: *priming*, iniciación, desarrollo y emergencia (Lee et al., 2015). La primer etapa, el *priming*, comprende los mecanismos de posicionamiento, especificación y activación de las CFRLs que determinarán la distribución de los primordios de raíces laterales (PRLs) a lo largo del eje de la raíz principal (Du & Scheres, 2017). A continuación, la reactivación del ciclo celular en las CFRLs y la migración de sus núcleos hacia la pared celular común dan lugar a la fase de iniciación, la cual culmina con una primer división anticlinal y asimétrica que origina dos células pequeñas y dos más grandes en los flancos, ambos tipos especificados para destinos diferentes. (Casimiro et al., 2001; Dubrovsky et al., 2000; 2001; 2006). Estas dos primeras etapas tienen lugar en una región ubicada en la transición entre el meristema radical y la zona de elongación, conocida como meristema basal (De Smet et al., 2007). Durante el desarrollo, las células más pequeñas resultantes de la etapa anterior forman el PRL mediante un programa de divisiones celulares orientadas y expansión celular (Malamy & Benfey, 1997). Esta etapa puede dividirse en una serie de estadios morfológicos según el número de capas celulares paralelas al cilindro vascular que forman el primordio (Figura 2; Malamy & Benfey, 1997; Péret et al.,

2009b). Al comienzo, una serie de divisiones anticlinales dan origen a un PRL compuesto por una única capa de células (estadio I). A continuación, estas células se dividen en forma periclinal formando un PRL con una capa interna y otra externa (estadio II). Posteriormente, nuevas rondas de divisiones anticlinales y periclinales dan como resultado un PRL en forma de domo que comienza a crecer a través de las capas celulares que lo rodean (estadios III-VII; Malamy & Benfey, 1997). A fines prácticos, algunos autores consideran a los PRL emergentes como primordios de estadio VIII. Este criterio será respetado en el presente trabajo.

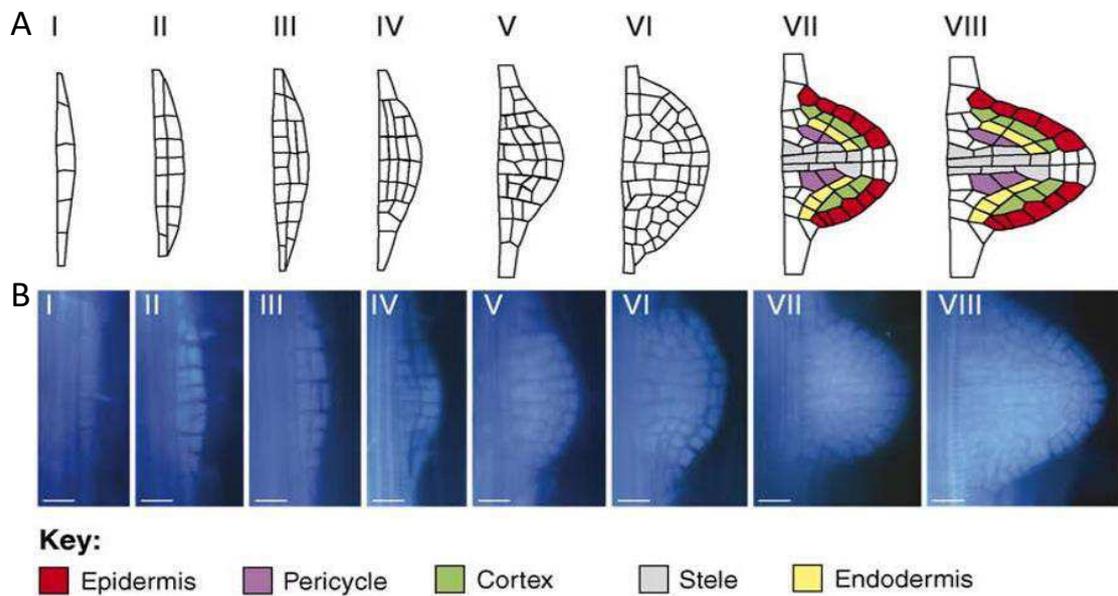


Figura 2: Estadios morfológicos durante el desarrollo de RLs en *Arabidopsis thaliana*. A) Representación esquemática de los diferentes estadios. B) Tinción con anilina azul para cada estadio. Tomado de Péret et al., 2009b.

Finalmente, durante la emergencia, el primordio se abre camino a través de los tejidos que lo rodean fundamentalmente mediante procesos de expansión celular. Así, alcanza y atraviesa la superficie de la raíz principal dando origen a una RL con tejidos diferenciados y un meristema completamente funcional (Malamy & Benfey, 1997).

El presente trabajo tiene como centro de estudio esta última etapa en la formación de RLs, haciendo énfasis en la regulación de los procesos de remodelación de tejidos que son necesarios para la correcta emergencia de los PRLs.

3.3 Emergencia de RLs y remodelación de tejidos

En su camino hacia la rizósfera, el primordio debe atravesar tres capas celulares de la raíz principal correspondientes a endodermis, corteza y epidermis. Estudios recientes han demostrado que estos tejidos no imponen una simple barrera física a la emergencia de los PRL, sino que el desarrollo morfológico de los PRL depende de las propiedades mecánicas de las paredes celulares en los tejidos circundantes (TCs) (Lucas et al., 2013). Según la capa celular que se considere, existen diferentes mecanismos a través de los cuales se modifican las propiedades de los TCs para promover la emergencia de los PRL.

Crecimiento a través de la endodermis: cambio de forma y pérdida de volumen.

Durante los primeros estadios del desarrollo de los PRLs, las células endodérmicas modifican drásticamente su forma para permitir la expansión del primordio en crecimiento. Así, estas células, aunque permanecen vivas, pierden volumen y se adelgazan hasta el punto en que las membranas en los lados opuestos se fusionan (Figura 3.A y 3.C). Sin embargo, la integridad de la vacuola y las membranas nunca está comprometida (Stoeckle et al., 2018; Vermeer et al., 2014; Vilches-Barro & Maizel, 2015).

Adicionalmente, la banda de Caspary es degradada localmente por encima del ápice del primordio permitiendo un crecimiento controlado del mismo a través de la endodermis (Stoeckle et al., 2018; Vermeer et al., 2014; Vilches-Barro & Maizel, 2015).

Crecimiento a través de corteza y epidermis: separación celular.

Aunque también permanecen vivas, las células corticales y epidérmicas no sufren grandes cambios en su forma ni pérdida de volumen como las endodérmicas, sino que son “empujadas” por el primordio en crecimiento, lo que resulta en la separación de las mismas durante la emergencia de la RL (Figura 3.B y 3.C; Péret et al., 2009a; Stoeckle et al., 2018; Vermeer et al., 2014; Vilches-Barro & Maizel, 2015).

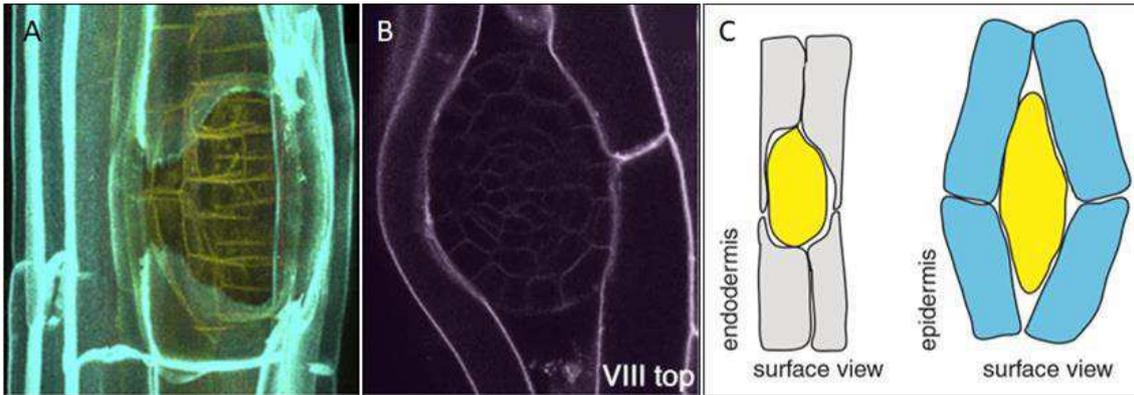


Figura 3: Respuesta diferencial de los TCs durante la emergencia de RLs. A) Las membranas a ambos lados de las células endodérmicas (cian) se fusionan para permitir el paso del primordio (amarillo). B) Las células epidérmicas se separan durante la emergencia del PRL. C) Representación esquemática de A y B. Aunque no están representadas, las células corticales se comportan de la misma manera que las epidérmicas. Tomado de Stoeckle et al., 2018 (A y B) y Vermeer et al., 2014 (C).

Remodelado de pared celular en los TCs

Las plantas difieren de los animales en su anatomía celular por la presencia de una pared celular rígida, la cual está compuesta por diversos polímeros (celulosa, hemicelulosa, pectinas y proteínas estructurales) que interaccionan entre sí mediante uniones covalentes y no covalentes (Taiz & Zeiger, 2006). Esta estructura mantiene a las células fuertemente unidas unas con otras, imponiendo una restricción mecánica al primordio emergente. En consecuencia, tanto la contracción como la separación de los TCs necesarias para completar el proceso de formación de RLs, implican inevitablemente el remodelado de sus paredes celulares (Péret et al., 2009a; Roberts et al., 2002; Stoeckle et al., 2018;).

Para ello, las plantas hacen uso de distintas Enzimas de Remodelado de Pared Celular (ERPC) que degradan los polímeros de la pared o modifican sus interacciones, permitiéndole cumplir una gran diversidad de funciones, tales como soporte mecánico, adhesión celular, moldeo y regulación del desarrollo (Roberts et al., 2002).

3.4 Enzimas de remodelado de pared celular

Bajo el nombre de ERPC se engloba al conjunto de proteínas cuya acción resulta fundamental durante diversos procesos donde ocurren modificaciones de la pared celular, como la organogénesis, la abscisión de frutos y el crecimiento del tubo polínico.

Aunque la mayoría tiene acción enzimática, se incluye también a una superfamilia de proteínas, las expansinas, que actúan promoviendo el relajamiento de la pared de manera no enzimática.

Estudios recientes han demostrado que varios genes que codifican para ERPC se expresan en los TCs, donde actuarían promoviendo la emergencia de los PRL mediante el remodelado de las paredes celulares adyacentes a los mismos (Lee & Kim, 2013; Péret et al., 2009a y 2009b; Swarup et al., 2008).

En el marco de esta tesina, la atención se centrará en el estudio de dos genes particulares que codifican para ERPC, *Expansina 17 (Expa17)* y *Xiloglucano endo-transglicosilasa/hidrolasa 6 (Xtr6)*. La selección de estos dos genes fue realizada principalmente en base a su patrón de expresión, lo que los señala como posibles candidatos para regular el proceso.

Expa17 (At4g01630)

Las expansinas son proteínas no enzimáticas que promueven el relajamiento de la pared y la extensión celular en forma dependiente del pH. Una vez sintetizadas, son secretadas hacia el apoplasto donde actúan disminuyendo la adhesión entre los polisacáridos de la pared celular, permitiendo que se deslicen unos respecto a otros y provocando de esta manera la expansión de la pared. Estructuralmente, todas las expansinas cuentan con un péptido señal que las dirige hacia su destino (apoplasto) y dos dominios funcionales, uno de unión a polisacáridos y otro catalítico, encargado de la disociación de uniones no covalentes (Sampedro & Cosgrove, 2005).

El gen *AtExpa17 (At4g01630)* codifica para una proteína perteneciente a la familia de las α -Expansinas. Este grupo de expansinas actúan disociando localmente los puentes de

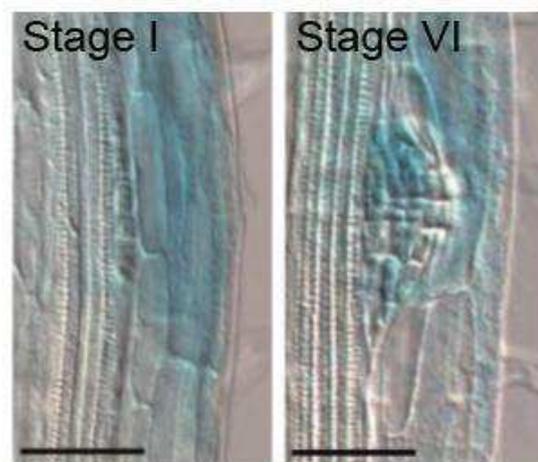


Figura 4: Expresión de *pExpa17:GUS* en PRL y TCs. Tomado de Lee & Kim, 2013.

hidrógeno entre los xiloglucanos que se encuentran en la superficie de la matriz de celulosa de la pared (Marowa, Ding, & Kong, 2016). Se sabe que *Expa17* se expresa en

raíces, PRL y TCs (Figura 4; Lee & Kim, 2013). Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de este gen aumenta la densidad de RLs mientras que en líneas knock-down creadas mediante RNAi ocurre lo contrario. Sin embargo, ninguna de estas condiciones de expresión provoca mayores cambios en la densidad de PRL (Lee & Kim, 2013). Todos estos datos señalan a EXPA17 como una ERPC que actuaría facilitando la emergencia de RLs.

Xtr6 (At4g25810)

Las xiloglucano endo-transglicosilasas/hidrolasas (XTHs) son proteínas enzimáticas que provocan la expansión de la pared celular mediante dos actividades catalíticas diferentes sobre los xiloglucanos. Por un lado, estas enzimas presentan una actividad endo-transglicosilasa (XET) que cataliza la ruptura no hidrolítica de una cadena de xiloglucano y su posterior unión con otra adyacente. Por el otro, la actividad endo-hidrolasa (XEH) de las XTH cataliza la ruptura hidrolítica de una cadena de xiloglucano provocando así un acortamiento irreversible de la misma (Eklöf & Brumer, 2010).

Estructuralmente, todas las XTHs presentan 1) un péptido señal ubicado en el extremo N-terminal que las dirige hacia el apoplasto; 2) un dominio de secuencia altamente conservada que actúa como sitio catalítico para ambas actividades (XET y XEH); 3) un sitio consenso de glicosilación cuya función aún no se conoce con claridad; 4) un grupo de cuatro residuos de Cisteína en la región C-terminal que actuarían formando puentes disulfuro (Shing Yiing et al., 2014).

Aunque existe un gran número de genes que codifican para XTHs, cada miembro de esta gran familia de proteínas presenta patrones de expresión específicos y responden de manera diferencial a los distintos tipos de hormonas, lo cual refleja la singularidad en la función fisiológica de cada uno de estos genes (Rose et al., 2002). Particularmente, el gen *AtXtr6* (At4g25810, sinónimo de

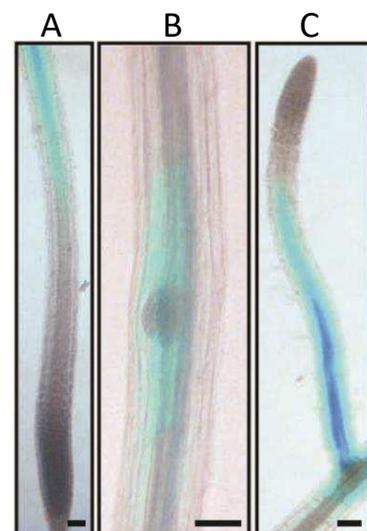


Figura 5: Expresión de *pXtr6:GUS*. A) Estela de la raíz principal. B) TCs. C) Estela de RL. Tomado de Swarup et al., 2008.

AtXth23) presenta altos niveles de expresión en silicua (fruto de *A. thaliana*) y raíz (Yokoyama & Nishitani, 2001). En esta última, su expresión ha sido detectada en los TCs y en el cilindro vascular, tanto de la raíz principal como de las RLs (Figura 5; Swarup et al., 2008). Aunque no se ha caracterizado la importancia fisiológica de esta enzima en raíz, su localización en los TCs señala a XTR6 como una ERPC posiblemente involucrada en la emergencia de RLs.

3.5 Fitohormonas y organogénesis

El proceso de emergencia de las RLs debe estar altamente regulado, en tiempo y espacio, para evitar daños excesivos o posibles infecciones que pueden darse durante la separación de los TCs (Laskowski et al., 2008; Roberts 2002; Swarup et al., 2008). Esta función regulatoria es coordinada por las hormonas vegetales en respuesta a señales ambientales, como las auxinas, que actúan como principales reguladoras de la formación y emergencia de RLs (Casimiro et al., 2003; Malamy, 2005).

Las fitohormonas, u hormonas vegetales, son moléculas señal capaces de actuar a bajas concentraciones, tanto en su sitio de síntesis como a largas distancias. Los niveles de las diferentes hormonas cambian durante el desarrollo en respuesta a señales ambientales, constituyendo un enlace entre las vías intrínsecas y extrínsecas que determinan el patrón de crecimiento y desarrollo de las plantas (Jung and McCouch, 2013).

A su vez, el solapamiento de las vías de señalización de distintas hormonas aporta un alto grado de complejidad a la hora de integrar diferentes señales para iniciar los procesos de organogénesis (Malamy, 2005). En este sentido se destaca principalmente el balance entre dos hormonas antagónicas, auxinas y citoquininas (CKs). La interacción entre ambas hormonas es específica del



Figura 6: Explantos de tabaco sometidos a concentraciones crecientes de auxinas (de izquierda a derecha) y de CKs (de abajo hacia arriba). Tomado de Skoog & Miller, 1957.

contexto o tejido de estudio y actúa regulando los procesos tanto de forma transcripcional como no transcripcional, mediante gradientes de síntesis y respuesta (Chandler & Werr, 2015).

Se ha demostrado que su relación está implicada en el control de numerosos procesos del desarrollo incluyendo la regeneración de órganos *in vitro* a partir de tejidos no diferenciados, donde una elevada proporción auxina:CK favorece la formación de raíces en el cultivo mientras que la situación contraria favorece la formación de tallos (Figura 6; Skoog & Miller, 1957).

Como se expuso anteriormente, la producción de raíces laterales es un evento morfogénico sumamente importante en las plantas y, como tal, también se encuentra regulado por el balance entre estas dos hormonas del desarrollo.

Auxinas como principales reguladoras del desarrollo de RLs

Las auxinas tienen un rol central en la formación de RLs y se ha determinado su importancia en cada una de las etapas de dicho proceso, desde la especificación de las CFRLs hasta la emergencia de los primordios (Figura 7; Berckmans et al., 2011; De Rybel et al., 2010; De Smet et al., 2007; Du & Scheres, 2017; Goh et al., 2012; Marhavý et al., 2013; Péret et al., 2009a,b, 2013; Roberts et al., 2016).

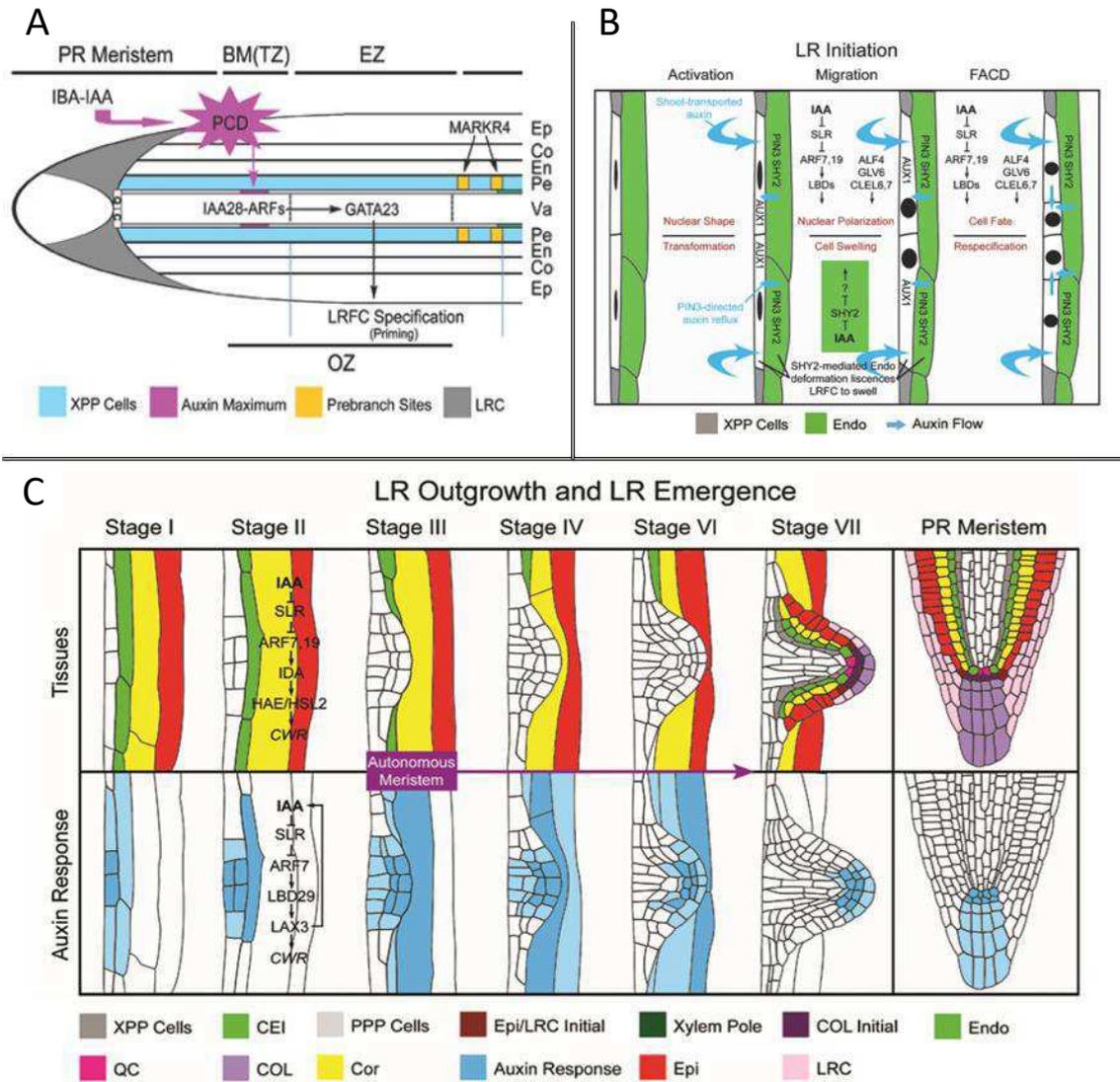


Figura 7: Las auxinas actúan como controladores centrales de la formación de RLs, regulando cada una de las etapas del proceso. Tomado de Du & Scheres, 2017.

- A) Las auxinas están involucradas en el posicionamiento de PRL y la especificación de CFRLs durante el *priming*. PCD, muerte celular programada; XPP cells, células del polo xilemático del periciclo; LRC, caperza lateral de la raíz; Ep, epidermis; Co, corteza; En, endodermis; Pe, periciclo; Va, cilindro vascular.
- B) Tanto el transporte (AUX1, PIN) como la señalización (módulo IAA/SLR-ARF7/ARF19) por auxinas son importantes para la iniciación de raíces laterales. FACD, primera división celular asimétrica.
- C) Principales eventos de señalización y respuesta a auxinas durante el desarrollo y la emergencia de RLs. XPP, polo xilemático del periciclo; QC, centro quiescente; CEI, células iniciales de corteza/epidermis; COL, columella; PPP, polo floemático del periciclo; Cor, corteza; Epi, epidermis; LRC, caperza lateral; CWR, remodelado de pared celular.

Particularmente durante el desarrollo y la emergencia de los PRL, las auxinas inducen la expresión de varias ERPC en los TCs favoreciendo así el remodelado de pared celular necesario para que los primordios crezcan a través de las capas celulares que los rodean, atraviesen la superficie de la raíz principal y emerjan dando lugar a RLs maduras.

Se ha demostrado que esta inducción mediada por auxinas es llevada a cabo mediante dos vías diferentes (Figura 7.C). En primer lugar, el factor de transcripción LBD29 (Lateral organ Boundaries Domain 29) induce la expresión del transportador de influjo LAX3 (Like-AUX1 3) en los TCs favoreciendo la acumulación de auxinas en dichos tejidos, e induciendo así la expresión de genes que codifican para distintas ERPC, incluidas EXPA17 y XTR6 (Figura 8.A y 11.B; Lee et al., 2015; Swarup et al., 2008). Particularmente para el caso de *Expa17*, se ha demostrado que el aumento en su expresión génica es mediado por LBD16 y LBD18, que actúan aguas abajo de LAX3 en la cascada de señalización mediada por auxinas (Lee et al., 2015). En segundo lugar, la acumulación de esta hormona en los TCs induce también la expresión del péptido señal IDA (Inflorescence Deficient in Abscission), cuya señalización mediante los receptores HAE (Haesa) y HSL2 (Haesa-like2) aumenta la expresión de *Expa17* y *Xtr6*, junto con otros genes que codifican para ERPC, favoreciendo así la degradación de pared celular necesaria para la emergencia de los PRL (Figura 8.C y 11.D; Kumpf et al., 2013).

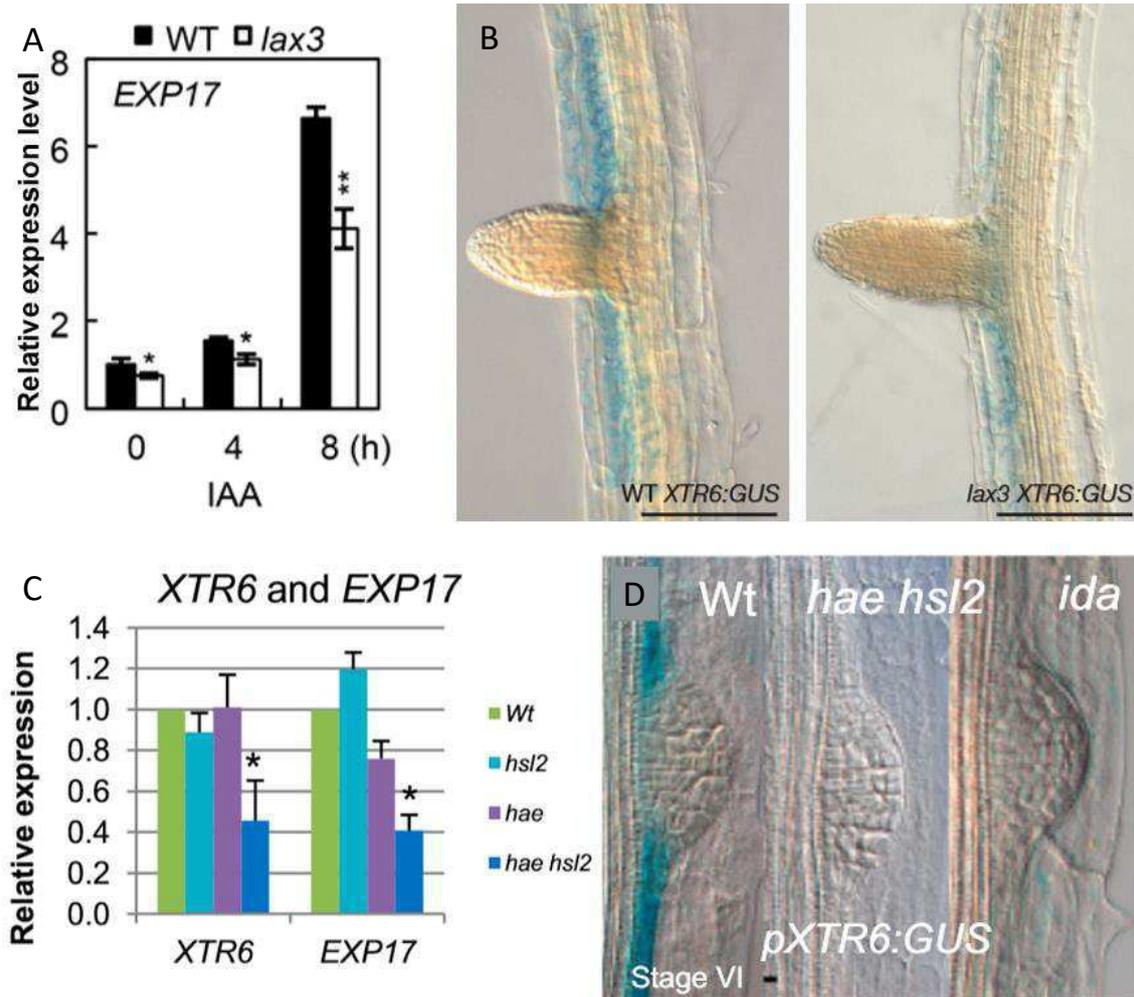


Figura 8: Las auxinas inducen la expresión de *Expa17* y *Xtr6* en los TCs. A y B) El transportador de auxinas LAX3 regula la expresión de *Expa17* (A; Tomado de Lee et al., 2015) y *Xtr6* (B; Tomado de Swarup et al., 2008). C y D) El péptido señal inducible por auxinas IDA, mediante sus receptores HAE y HSL2, regula la expresión de *Expa17* y *Xtr6*; Tomado de Kumpf et al., 2013.

Aunque las auxinas actúan como reguladores centrales durante la formación de RLs, otras hormonas (etileno, ácido abscísico, brasinosteroides y CKs), también modulan diferentes etapas de este proceso, ya sea positiva o negativamente (Figura 9; Fukaki & Tasaka, 2009). A continuación, nos centraremos en el rol de las CKs durante la formación de RLs.

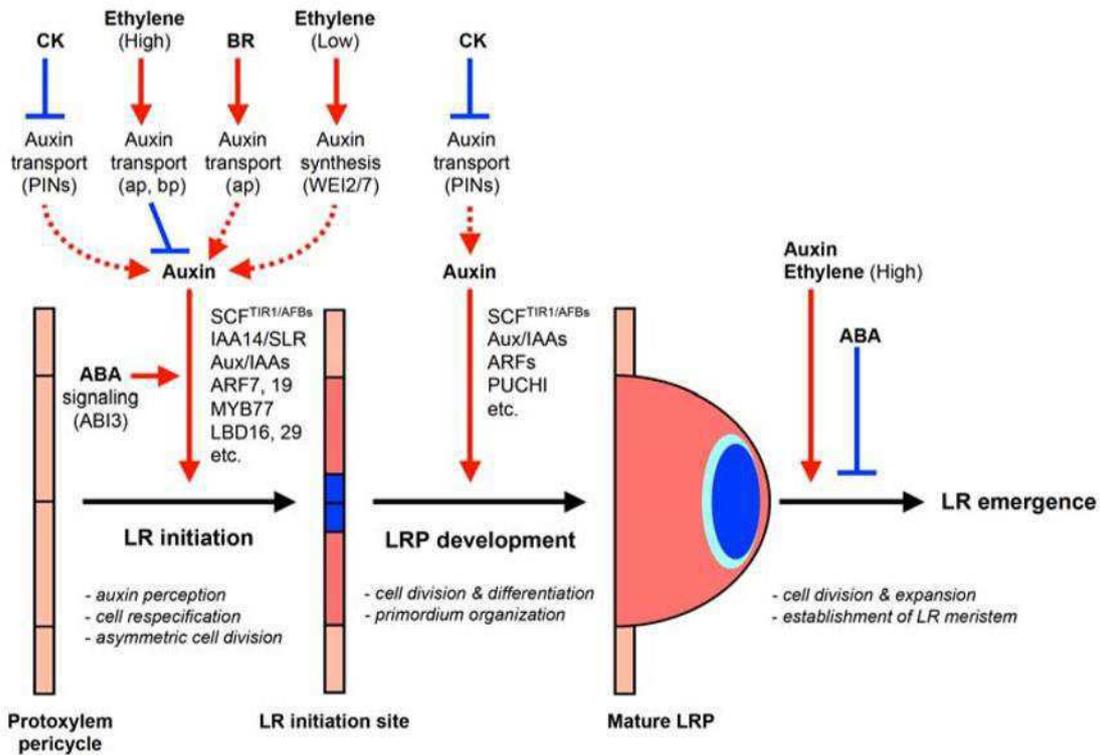


Figura 9: Acción de las diferentes hormonas durante la formación de LR. BR: Brassinosteroids; ABA: Abscisic acid. Tomado de Fukaki & Tasaka, 2009.

CKs y su acción durante la formación de RLs

Las CKs actúan como reguladores negativos de la formación de RLs, repitiéndose una vez más el patrón de interacción antagónico entre las dos principales hormonas del desarrollo. Esto ha sido demostrado mediante el análisis del fenotipo radical de plántulas sometidas a tratamiento con CKs exógenas o cuyos niveles endógenos estaban alterados: la aplicación externa de CKs resulta en una disminución de la densidad de RLs (Figura 10; Laplace et al., 2007), mientras que el efecto contrario se observa cuando disminuyen los niveles endógenos de la hormona, ya sea por mutaciones en los componentes de su vía de percepción (receptores AHK o elementos reguladores

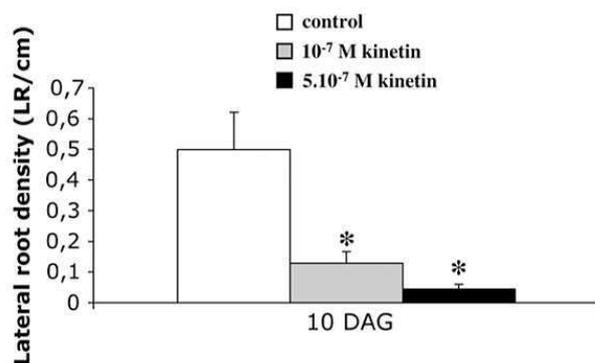


Figura 10: La aplicación de CKs exógenas disminuye la densidad de RLs. Tomado de Laplace et al., 2007.

ARR-B) o por sobreexpresión de su enzima degradadora (CK-oxidasa; Fukaki & Tasaka, 2009).

Las primeras etapas en la formación de RLs tienen lugar en zonas de la raíz con elevados niveles de CKs activas, pero cuya percepción está finamente regulada. Esto se debe a que la respuesta moderada a CKs es necesaria para un correcto posicionamiento de los primordios pero la desregulación de sus niveles tiene un efecto inhibitorio sobre la iniciación y el desarrollo de los mismos (Figura 9; Bielach et al., 2012; Chandler & Werr, 2015; Laplaze et al., 2007).

En células del polo xilemático del periciclo adyacentes a PRL existentes, la percepción y respuesta moderadas a CKs contribuyen a la regulación del priming y, por lo tanto, a un correcto posicionamiento de los PRL respecto a los ya existentes (Bielach et al., 2012). Se ha demostrado que mutaciones que disminuyen los niveles de síntesis o percepción de CKs en estas células provocan defectos en el posicionamiento de los primordios y aumentan la sensibilidad a señales inductoras de la iniciación (Figura 11; Bielach et al., 2012).

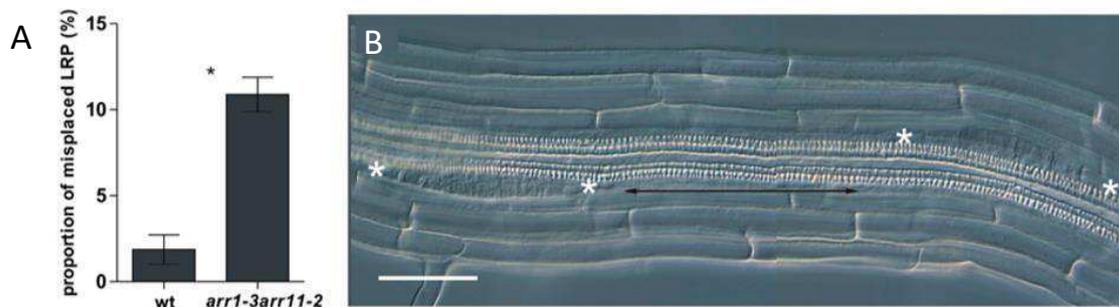


Figura 11: Niveles moderados de respuesta a CKs son necesarios para un correcto posicionamiento de los PRL durante la etapa de iniciación. A) La proporción de PRL ubicados fuera de lugar aumenta en plántulas Knock-Out (KO) para componentes de la vía de percepción de CKs. B) Dos PRL ubicados a una célula del periciclo de distancia en mutantes *arr1-3arr11-2*; * límites de los PRL. Tomado de Bielach et al., 2012.

Sin embargo, el tratamiento con CKs disminuye la densidad de PRL de manera dosis-dependiente, indicando que la alteración de su percepción por sobre ciertos niveles tiene un efecto inhibitorio sobre la iniciación de los primordios (Figura 12; Laplaze et al., 2007). Durante esta etapa, el transporte polar de auxinas mediado por los transportadores de eflujo PIN (PIN-FORMED) asegura la formación de un gradiente con máximo en las CFRLs, donde esta hormona favorece la progresión G1-S durante el ciclo

celular. De esta forma las auxinas inducen la re-especificación del destino celular y la primer división asimétrica durante la iniciación de las RLs (Lavenus et al., 2013). Cuando los niveles fisiológicos de CKs son alterados, su patrón espacial de respuesta durante la iniciación de los PRL comienza a solaparse con el de las auxinas (Bielach et al., 2012) y actúan de forma antagónica a las mismas controlando dos aspectos independientes: por un lado, aunque no afectan directamente la percepción de las auxinas en las CFRL, impiden la progresión G2-M durante el ciclo celular mediante su efecto regulador sobre la expresión de las ciclinas (Li et al., 2006); y por el otro, afectan el transporte polar de auxinas al alterar la expresión de los transportadores PIN (Laplaze et al., 2007).

Como se mencionó previamente, la disminución en la densidad de RLs provocada por las CKs no es explicada únicamente por su efecto durante la iniciación sino también durante el desarrollo de los PRLs. En este caso, se ha demostrado que el tratamiento con CKs modifica la distribución de estadios de desarrollo de los primordios, provocando una acumulación de PRL de estadios IV y V y disminuyendo la densidad en estadios posteriores (Figura 12.A; Laplaze et al., 2007). Esta alteración ha sido explicada nuevamente por cambios en la expresión de los transportadores PIN mediada por CKs. Durante el desarrollo de los primordios, estos transportadores se encargan de establecer un gradiente de auxinas con máximo en el tip de los PRL, regulando así el patrón de divisiones celulares que ocurren durante esta etapa. Por lo tanto, al alterar el transporte de auxinas, las CKs provocan divisiones desorganizadas en los PRL que llevan al arresto de los mismos e impiden que emerjan para dar lugar a RLs maduras (Figura 12.B; Laplaze et al., 2007; Fukaki & Tasaka, 2009).

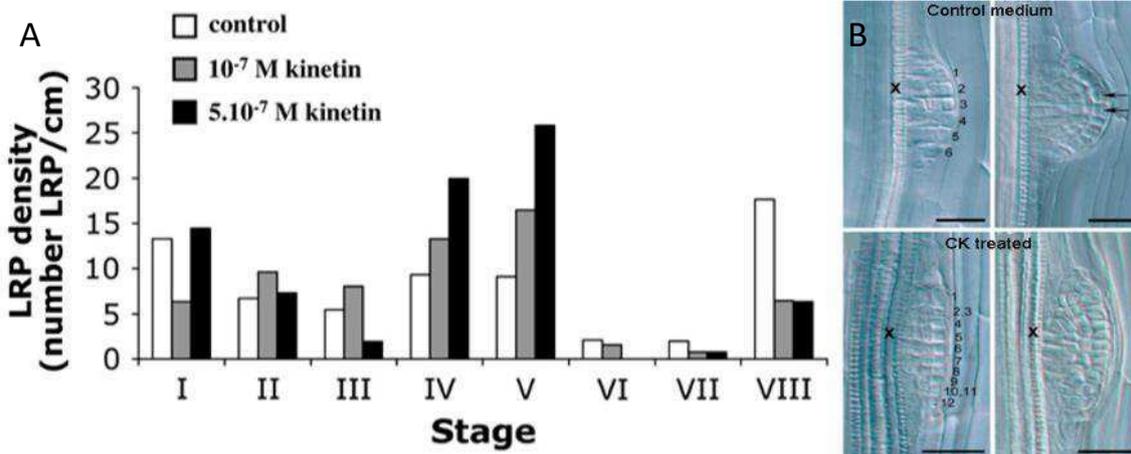


Figura 12: Las CKs perturban el desarrollo de los PRL. A) El tratamiento con CKs provoca cambios en la distribución de estadios de desarrollo de los PRL. B) Las CKs alteran el patrón de divisiones celulares en los PRL; las flechas indican divisiones periclinales; X xilema. Tomado de Laplace et al., 2007.

Transporte de CKs y regulación de la formación de RLs

En los párrafos anteriores se mencionó en varias oportunidades la importancia del transporte de auxinas durante el proceso de formación de RLs. Sin embargo, es escaso el conocimiento sobre los efectos provocados por cambios en el transporte de CKs durante este proceso.

En el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (FCEFYN) de la Universidad Nacional de Córdoba (UNC), se desarrolla actualmente un proyecto que estudia transportadores de la familia génica Aza-Guanine Resistant (*Azg1* y *Azg2*) involucrados en la regulación de la formación de RLs mediada por CKs. Puntualmente, *AZG2* es una proteína de membrana capaz de transportar CKs en plantas y forma parte de un mecanismo de inhibición de dicho proceso. Además, su expresión es inducida por auxinas, lo que sugiere que *AZG2* está involucrado en la interacción auxinas-CKs durante el desarrollo de RLs (Tessi, 2013).

AZG2 se localiza en los TCs, en un grupo específico de células ubicadas inmediatamente por encima de los PRL (Figura 13; Tessi, 2013; datos de tesina no publicados). Este patrón de expresión coincide con el de las ERPC previamente mencionadas como relevantes durante el proceso de emergencia de los PRL.

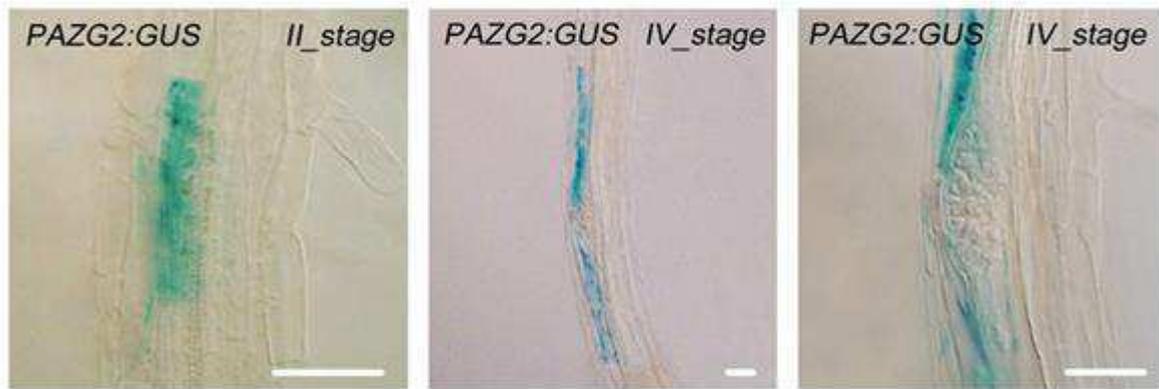


Figura 13: El transportador de CKs AZG2 se expresa en células de los TCs rodeando a PRL desde los primeros estadios de desarrollo. Tomado de Tessi, 2013.

El hecho de que exista un transportador de CKs localizado en los TCs a los PRL, hace suponer que, además de sus ya estudiadas funciones durante la iniciación y el desarrollo, esta hormona modularía la emergencia de los PRL actuando no sobre los primordios propiamente dichos sino sobre las capas celulares que los rodean.

Además, dado que la interrupción del gen *Azg2* mediante inserciones de T-DNA resulta en una mayor densidad de RLs respecto al genotipo salvaje, se puede inferir que AZG2 está involucrado en las etapas de crecimiento y emergencia durante la formación de RLs, posiblemente modulando la señal de CKs en los TCs. Sin embargo, aunque se ha caracterizado tanto la inducción como la actividad in vivo del transportador, no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales el transporte de CKs repercute en el fenotipo de RL.

3.6 Hipótesis y objetivos

De acuerdo a los antecedentes expuestos, se plantearon las siguientes hipótesis de trabajo:

Hipótesis 1

El transporte de CK mediado por AZG2 es parte de un mecanismo regulatorio de la formación de RL que actúa durante la emergencia de los PRL.

Hipótesis 2

Durante la emergencia de RL, alteraciones en los niveles de CKs debidos a aplicación exógena o cambios en la actividad de su transportador AZG2, modifican la expresión *Expa17* y *Xtr6* en los TCs.

En base a esto, se planteó como objetivo general de esta tesina estudiar la participación de la CKs y su transportador AZG2 en la emergencia de RLs en *Arabidopsis thaliana* y su importancia en la regulación de la expresión de *Expa17* y *Xtr6*. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la participación de las CKs y su transportador AZG2 durante la emergencia de RL.
2. Determinar la importancia de las CKs y su transportador AZG2 en el remodelado de pared celular durante la emergencia de RLs.
3. Realizar un análisis *in silico* del patrón de expresión de ambas ERPC y su respuesta al tratamiento hormonal con CKs.
4. Determinar el patrón de actividad de promotores de *Expa17* y *Xtr6* a nivel tisular en plantas de genotipo Wild Type (WT), tanto en condiciones normales de desarrollo como ante la exposición a CKs y compararlo con su expresión en genotipos con mutaciones en la secuencia génica de *Azg2*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Análisis *in silico*

Selección de genes candidatos

Se realizó una búsqueda en bases de datos para confeccionar una lista de genes que potencialmente codifican ERPC involucradas en el desarrollo de RLs. Además, se identificaron las zonas posiblemente implicadas en la regulación de la transcripción de dichos genes (región promotora) para su posterior uso experimental.

Análisis de expresión

Se analizó el patrón de expresión espacio-temporal y condicional de los genes candidatos a partir de datos de microarreglos publicados en Arabidopsis eFP Browser (Winter et al., 2007) con el fin de seleccionar aquellos expresados en raíces durante el desarrollo de RL y/o regulados por auxinas/citoquininas.

Las principales bases utilizadas fueron EFP Browser, Genvestigator, The Arabidopsis Information Resource, Aramemnon (Plant membrane protein database) y UniProt.

4.2 Generalidades: material vegetal y condiciones de crecimiento

Material vegetal

Los experimentos se realizaron utilizando la planta modelo para investigación *Arabidopsis thaliana*. Se trabajó con el ecotipo salvaje Col-0 y dos líneas con inserciones de T-DNA en el gen *Azg2* (At5g50300; líneas KO). Una de ellas, *azg2-1*, proviene de germoplasma depositado en el Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) mientras que la otra, *azg2-2*, de Syngenta. La presencia de las inserciones en el genoma ha sido confirmada en trabajos previos del grupo.

Condiciones generales de crecimiento

En todos los casos, tanto para plantas en macetas como en placas de Petri, se rompió la dormición de las semillas sometiéndolas durante 24-48 hs a 4°C en oscuridad. Posteriormente, el crecimiento se llevó a cabo en una cámara de cultivo a una

temperatura de 22°C y con una intensidad lumínica media de aproximadamente 40 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$ de radiación fotoactiva (PAR, por sus siglas en inglés) en un régimen de 16 hs luz/8 hs oscuridad.

Las plantas destinadas a transformación se cultivaron en bandejas utilizando como sustrato una mezcla de vermiculita y tierra en proporción 2:1.

4.3 Determinación de la densidad de PRL y análisis de distribución de estadios

Material vegetal

Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo salvaje Col-0 y de las líneas insercionales para *Azg2*, *azg2-1* y *azg2-2*.

Esterilización de semillas

Las semillas fueron esterilizadas mediante una incubación de 10 min con solución de lavado (Tritón 100X 0,05%) seguida de dos incubaciones de 5 min con etanol 96%. Previo a la siembra, las semillas fueron secadas a temperatura ambiente (RT) en una campana de flujo laminar.

Condiciones de crecimiento

La siembra se realizó en placas de Petri respetando las condiciones utilizadas por Tessi (medio sólido MS 0,5X agar 1% sin nitrógeno y KNO_3 5 mM; Tessi, 2013). Cada placa contenía 20 ml del medio.

Los tratamientos se realizaron nueve días después de la germinación. Para ello, las plántulas fueron incubadas con una solución de trans-Zeatina (tZ) 0,2 μM o medio MS 0,5X líquido (control) durante 20 horas, respetando las condiciones de crecimiento generales.

Fijación de las muestras

Las raíces fueron fijadas diez días después de la germinación mediante el protocolo de limpieza de raíz (*Root clearing protocol*; Tabla 1) para su posterior análisis en el microscopio.

Tabla 1: Protocolo de limpieza de raíz para visualización mediante la técnica de DIC.

Solución/Tratamiento	Tiempo de incubación	Temperatura
0% metanol:4% ácido hidroclorehídrico	15 min	55°C
7% NaOH:60% etanol	15 min	RT
Etanol 40%	10 min	RT
Etanol 20%	10 min	RT
Etanol 10%	10 min	RT
50% glicerol: 5% etanol/ Infiltración por vacío	10 min	RT
Conservación en glicerol 50%	-	RT

Análisis microscópico y cuantificación

La observación se llevó a cabo utilizando un microscopio Olympus BX61 con contraste diferencial interferencial (DIC).

Para cada combinación genotipo-tratamiento se analizaron entre 8 y 12 plantas. Para cada una de ellas se tomaron tres datos: número total de PRL, número de PRL en cada estadio de desarrollo y largo de raíz principal.

Para determinar el número de PRL de cada estadio se tuvieron en cuenta únicamente primordios que se encontraban perpendiculares al plano de observación, lo que permitía determinar el número de capas celulares presentes en cada caso. El largo de la raíz principal se obtuvo a partir de una imagen de la planta completa utilizando el software Fiji-ImageJ.

Con los datos obtenidos se construyeron tres variables distintas: densidad total de PRL (número total de PRL/largo de raíz principal), índice de emergencia (densidad de PRL de estadio VIII/densidad total de PRL) y densidad de PRL por estadio (número de PRL de cada estadio/largo de raíz principal).

Resulta apropiado aclarar que los experimentos tuvieron un fin exploratorio. Por lo tanto, los gráficos obtenidos a partir de estos datos representan las medias aritméticas y pueden ser consideradas únicamente las tendencias observadas en el análisis.

4.4 Tinción con Ioduro de Propidio (IP)

Material vegetal

Se utilizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo salvaje Col-0 y de las líneas mutantes *azg2-1* y *azg2-2*.

Esterilización de semillas

La esterilización de semillas se llevó a cabo de la misma manera que para el análisis de densidad de PRL.

Condiciones de crecimiento

La siembra se realizó en placas de Petri con medio sólido MS 0,5 X agar 1% sin nitrógeno y KNO₃ 5 mM. Cada placa contenía 20 ml del medio.

Los tratamientos se realizaron nueve días después de la germinación. Para ello, las placas fueron inundadas con 15 ml de tZ 0,2 μ M o medio MS 0,5 X líquido (control) e incubadas durante 20 horas respetando las condiciones de crecimiento generales.

Tinción con IP y visualización

Las plántulas fueron incubadas durante 20 minutos con una solución de IP 30 μ M disuelto en medio MS 0,5 X líquido. Una vez retirado el IP, las muestras fueron enjuagadas con MS 0,5 X y montadas en el portaobjetos para su visualización.

La observación se realizó mediante un microscopio confocal Nikon Eclipse Ti, utilizando un láser Helio-Neón para la excitación a 643 nm y capturando la emisión de fluorescencia a 613 nm.

Se tomaron imágenes de los OLTs rodeando a primordios de estadios V, VI y VII.

Análisis estadístico y de imágenes

Las imágenes obtenidas por microscopía confocal se analizaron con el software Fiji-ImageJ para determinar la intensidad de fluorescencia en las paredes celulares de los TCs, específicamente corteza y epidermis. Las intensidades fueron relativizadas a una posición control ubicada por encima o por debajo del LRP, del lado opuesto al mismo (Figura 14).

Se analizaron 4 imágenes de cada combinación genotipo-tratamiento. En cada caso, el perfil de intensidades se obtuvo como un promedio trazando una línea de 40 unidades en las posiciones de interés.

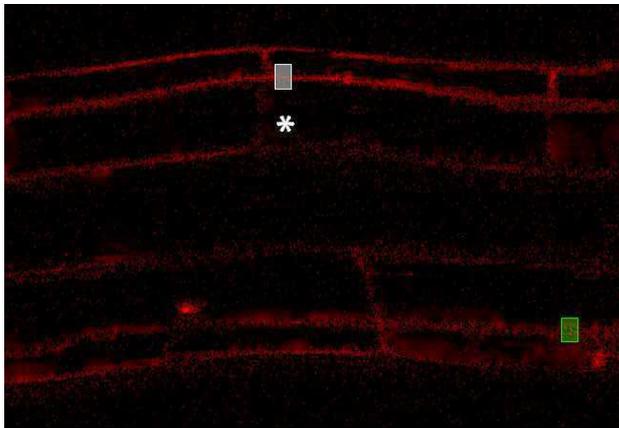


Figura 14: Análisis de la intensidad de fluorescencia de IP. Se consideró como posición problema (rectángulo blanco) a las paredes celulares ubicadas entre corteza y epidermis frente al PRL (*). Para relativizar los valores de intensidad, se tomó como posición control a las paredes celulares ubicadas entre corteza y epidermis del lado opuesto al primordio, por encima o por debajo del mismo (rectángulo verde).

Para el tratamiento estadístico de los datos se utilizó el software Infostat, donde se realizó un análisis de la varianza (ANAVA) y se compararon las medias mediante el test de Tukey. Para cumplir con el supuesto de homocedasticidad, los datos fueron transformados aplicando Ln.

4.5 Diseño de oligonucleótidos para la amplificación de regiones promotoras

Utilizando los softwares SeqBuilder y AmplifiX 1.5.4 se diseñaron oligonucleótidos sentido (S) y antisentido (AS) para amplificar la región promotora de los genes seleccionados (Tabla 2). Los mismos fueron diseñados de manera de amplificar fragmentos de entre 1500 y 2000 pb ubicados inmediatamente aguas arriba del comienzo de la secuencia codificante.

Tabla 2: Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de las regiones promotoras de los diferentes genes de ERPC.

	Oligonucleótido S	Oligonucleótido AS
<i>pExpa17</i> (1627 pb)	GGATCCGCATCATCCATGTGA- TAAGTACGTG	CATTGCGACCAATAGAGAGAAAA- TCTTCGTCAT
<i>pXtr6</i> (1524 pb)	GGATCCCTGCAGGGTATAATC- AAACGCTGAC	CACAATGGTGGAGTAACTGATCA- TCGCCAT

4.6 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la replicación *in vitro* de ADN se empleó la técnica de PCR. Para ello, se utilizó una polimerasa de ADN resistente a altas temperaturas, oligonucleótidos (*primers*), desoxiribonucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), buffer de PCR y ADN molde perteneciente a plantas salvajes de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo Col-0. La reacción se llevó a cabo en un termociclador de acuerdo a un protocolo base al cual se le modificaron las temperaturas de hibridación (*annealing*) y los tiempos de elongación, según lo necesario en cada caso particular (Tabla 3).

Tabla 3: Detalle de las reacciones de PCR para la amplificación de regiones promotoras.

Composición de la reacción (50 µl volumen final)	<i>pExpa17</i>	<i>pXtr6</i>
Buffer HF 5X	10 µl	10 µl
dNTPs 2mM	5 µl	5 µl
Oligonucleótidos S (10 µM)	2,5 µl	2,5 µl
Oligonucleótidos AS (10 µM)	2,5 µl	2,5 µl
Mg ²⁺	-	-
ADN	2 µl	2 µl
Taq Phusion	0,5 µl	0,5 µl
H ₂ O mQ	27,5 µl	27,5 µl
Temperatura de hibridación (Ta)	55 °C	55 °C
Tiempo de elongación	1 min.	1 min.

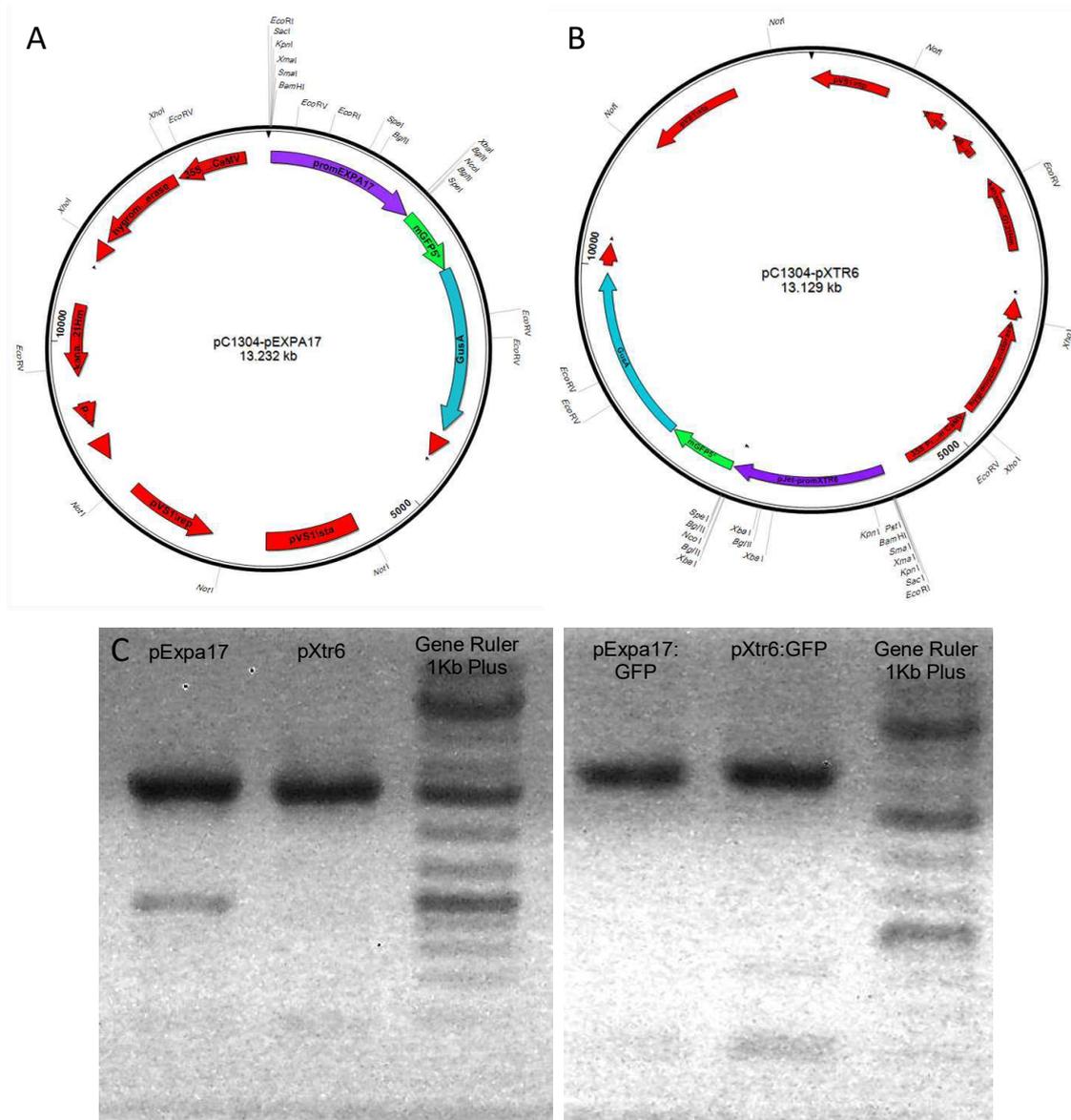


Figura 16: Resultados de la clonación de la región promotora de los genes de ERPC en vectores pCambia 1304. A) Esquema del vector pCambia 1304 con la inserción del promotor de *Expa17*. B) Esquema del vector pCambia 1304 con la inserción del promotor de *Xtr6*. C) Electroforesis del resultado de las PCRs que confirman la inserción de los fragmentos de interés en el vector pCambia 1304; a la izquierda, fragmentos de aproximadamente 1600 pb obtenidos utilizando el oligonucleótido universal M13 AS y los oligonucleótidos AS de las respectivas ERPC; a la derecha, fragmentos de aproximadamente 2500 pb obtenidos utilizando los oligonucleótidos S para las ERPC y el oligonucleótido AS específico para GFP.

4.8 Selección de plantas transgénicas

Esterilización de semillas

Las semillas transgénicas obtenidas se dejaron toda la noche en contacto con gas cloro en una campana cerrada para su esterilización. Para ello se mezclaron 15 ml de lavandina (55g/l), 10 ml de H₂O y 0,5 ml de HCl.

Selección de la T1

El vector pC1304 lleva un gen de resistencia en planta para Hygromicina, por lo que la selección se llevó a cabo en placas de Petri con 20 ml de medio sólido MS 0,5X al cual se le agregaron 4 µl de dicho antibiótico (concentración de trabajo del antibiótico: 50 µg/ml). Con el fin de obtener líneas homocigotas para los insertos, las plantas resistentes fueron transplantadas a potes con una mezcla 2:1 de vermiculita y tierra. Se mantuvieron las condiciones generales de cultivo para las fases de crecimiento y reproducción.

Selección de líneas homocigotas

El procedimiento de selección en placas se repitió hasta lograr la obtención de líneas puras (100% resistentes) para cada caso (Figura 17).

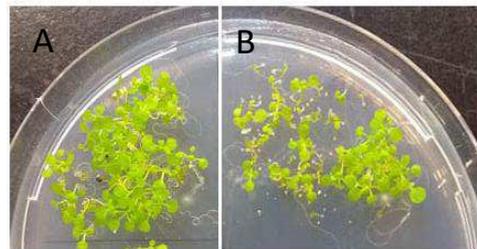


Figura 17: Plantas transgénicas T2 en selección con hygromicina. A) Ejemplo de línea homocigota (100% resistentes). B) Ejemplo de línea heterocigota.

4.9 Análisis de co-localización

Material vegetal

Se utilizaron plantas transgénicas de genotipo salvaje (Col-0) transformadas con dos reporteros fluorescentes distintos, *pAzg2:RFP-pExpa17:GUS:GFP* y *pAzg2:RFP-pXtr6:GUS:GFP*.

Esterilización de semillas y Condiciones de crecimiento

Las semillas fueron esterilizadas utilizando gas cloro. La siembra se realizó en placas de Petri con medio sólido MS 0,5 x agar 1% sin nitrógeno y KNO₃ 5 mM. Cada placa contenía 20 ml del medio.

Análisis microscópico

Las observaciones se realizaron utilizando microscopía de epifluorescencia en un microscopio Olympus BX61 utilizando luz UV con los filtros FITC (filtro de excitación: BP470-490; filtro de emisión: BA520IF) para GFP y WIY (filtro de excitación: BP545-580; filtro de emisión: BA610IF) para RFP, respectivamente.

4.10 Análisis de actividad de promotores en plantas transgénicas

Material vegetal

Se utilizaron plantas transgénicas de las líneas Col-0 y *azg2-1* que expresan los genes reporteros β -glucoronidasa (*GUS*) y *Green Fluorescent Protein (GFP)* bajo el control de los promotores silvestres de los genes *Expa17 (At4g01630)* y *Xtr6 (At4g25810)*.

Esterilización de semillas y Condiciones de crecimiento

La esterilización de semillas y el crecimiento de las plantas se llevó a cabo de la misma manera que para el análisis de co-localización.

Los tratamientos fueron realizados a los 9 días después de la germinación, inundando las placas con 15 ml de tZ 0,2 μ M o medio MS 0,5 X líquido (control) e incubándolas durante 20 horas bajo las condiciones de crecimiento generales.

Análisis microscópico

En primer lugar, para la visualización de los reporteros *pExpa17:GUS* y *pXtr6 GUS* se utilizó la técnica de microscopía DIC. En segundo lugar, el análisis de la señal fluorescente obtenida mediante los reporteros *pExpa17:GFP* y *pXtr6:GFP* se llevó a cabo mediante microscopía de epifluorescencia, utilizando luz UV con el filtro FITC (filtro de excitación: BP470-490; filtro de emisión: BA520IF). En ambos casos las observaciones se realizaron utilizando un microscopio Olympus BX61.

4.11 Protocolo de tinción de GUS

Las plántulas destinadas al análisis de actividad de los reporteros *pExpa17:GUS* y *pXtr6:GUS* fueron colocadas en tubos eppendorfs con 1 ml de solución de tinción (Tabla 4). Posteriormente fueron sometidas a vacío durante 5 minutos e incubadas 15 horas a 37°C. A continuación, las plántulas fueron decoloradas mediante repetidas incubaciones

con etanol 80% a 80°C durante 5 minutos. Finalmente fueron conservadas a temperatura ambiente utilizando el mismo medio (etanol 80%) hasta el momento de su visualización en el microscopio.

Tabla 4: Composición de la solución utilizada en el protocolo de tinción de GUS.

Compuesto	Concentración
Buffer NaPO ₄ pH 7	0,1 M
EDTA pH 7	10 mM
Ferricianuro de potasio pH 7	0,5 mM
Ferrocianuro de potasio pH7	3 mM
Triton X 100	0,2 % (v/v)
X-Glucuronidasa (X-Gluc)	1 mM (de una solución madre 100mM en dimetil sulfoxido- DMSO)

4.12 Electroforesis en gel de agarosa

Durante el proceso de clonación y transformación, se llevaron a cabo corridas electroforéticas para separar los fragmentos de ADN en varias oportunidades.

Las muestras destinadas a electroforesis se mezclaron con buffer de carga 6X para su siembra en el gel. Se utilizaron geles de agarosa 1% p/v en buffer TAE 0,5X (Tabla 5) a los cuales se les agregó 1 µl de Bromuro de Etidio (BrEt) por cada 25 ml de agar para el revelado. El buffer utilizado durante las corridas también fue TAE 0,5X.

Tabla 5: Composición Buffer TAE 0,5X (1 l.)

Compuesto	Concentración
Tris/HCl	2,42 g
Ac. Acético	0,571 ml
EDTA (pH 8,0)	0,1801 g
H ₂ O	Enrasar hasta 1 l

Para la visualización de los fragmentos se utilizó un transiluminador UV y se fotografiaron los geles. Finalmente, se estimó la longitud y cantidad de ADN de cada fragmento utilizando marcadores de peso molecular (DNA de bacteriófago λ digerido con la enzima PstI y GeneRuler 1kb Plus -Thermo Fisher®) mediante análisis de imágenes utilizando el software Fiji-ImageJ.

5. RESULTADOS

5.1 Las CKs actúan durante la emergencia de RLs vía AZG2 y alteran la progresión del desarrollo de los PRL.

Como se mencionó en la introducción, el transportador AZG2 forma parte de un mecanismo de regulación en respuesta a CKs durante la formación de RLs. Estudios previos realizados por nuestro grupo de trabajo demuestran que líneas KO para este transportador presentan un fenotipo radical donde la densidad de RLs está aumentada respecto al genotipo salvaje. Sin embargo, no se conocen los mecanismos moleculares mediante los cuales el transportador ejerce su efecto.

Debido a que las CKs alteran la distribución de los estadios de desarrollo de los PRL (Laplaze et al., 2007) y teniendo en cuenta el fenotipo observado en los mutantes *azg2*, se decidió estudiar el efecto de las CKs sobre la emergencia de PRL y la participación de AZG2 durante este proceso. Para ello, se calculó un índice de emergencia de PRL y se analizó la distribución de estadios de desarrollo en plántulas Col-0 y *azg2-1* de 10 días, incubadas con tZ 0,2 μ M o medio MS líquido 0,5X (control) durante 20 hs. Resulta apropiado aclarar que los experimentos tuvieron un fin exploratorio, por lo tanto, se presenta únicamente el análisis de las medias aritméticas obtenidas.

Las CKs, vía AZG2, modulan la emergencia de los PRL

Con el fin de analizar si existen cambios en las proporciones de PRL que llegan al último estadio de desarrollo y que eventualmente emergen para formar una RL, se calculó un índice de emergencia para las distintas condiciones estudiadas. El mismo se construyó teniendo en cuenta la densidad de PRL de estadio VIII respecto a la densidad total de primordios por planta (Figura 18).

En plántulas WT, el tratamiento con CKs disminuyó la densidad de PRL que llegan a estadio VIII respecto al control (MS 0,5X). En la condición control, los mutantes para *Azg2* presentaron un índice mayor respecto al genotipo salvaje. En presencia de CKs, la proporción de PRL emergentes en plántulas *azg2-1* disminuyó respecto al tratamiento control, aunque el efecto de la hormona no fue suficiente como para alcanzar el valor obtenido en el genotipo salvaje.

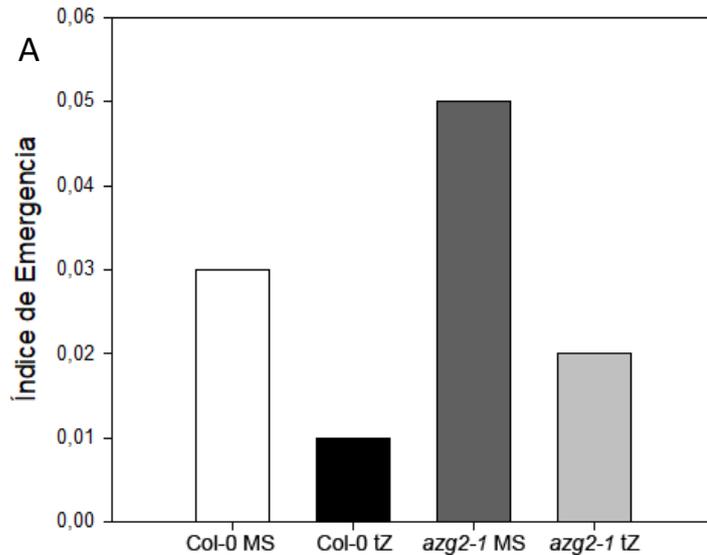


Figura 18: Efecto de las CKs y su transportador AZG2 sobre la emergencia de PRL. El índice de emergencia fue calculado utilizando la densidad de primordios de estadio VIII (emergentes) respecto a la densidad total de PRL por planta. Los valores corresponden a las medias aritméticas obtenidas en cada caso.

Estos resultados demuestran que las CKs, además de regular la iniciación y el desarrollo de los PRL, actúan modulando la emergencia de los mismos. Asimismo, indican que AZG2 formaría parte del mecanismo regulador durante esta etapa.

Las CKs, vía AZG2, provocan cambios en la distribución de estadios de desarrollo de los PRL

El siguiente paso para profundizar sobre el rol de las CKs y su transporte mediado por AZG2 en el desarrollo y emergencia de RLs fue analizar qué sucede con las densidades de PRL en cada estadio de desarrollo. A continuación, se describen los resultados más relevantes obtenidos mediante este análisis.

En primer lugar, se observó una disminución en la densidad de PRL de estadio III en plántulas WT tratadas con CKs (Figura 19.A y 19.B). Estudios previos muestran efectos diferentes según la concentración de hormona utilizada para el tratamiento (Laplaze et al., 2007). En cuanto al genotipo mutante, se registró un notable aumento en la densidad de primordios en este estadio tanto en la condición control (Figura 19.A y 19.C) como bajo tratamiento hormonal (Figura 19.A y 19.D).

En segundo lugar, en el estadio IV, y coincidiendo con lo reportado en estudios previos (Laplaze et al., 2007), se observó un aumento en la densidad de PRL cuando plántulas del genotipo Col-0 fueron incubadas con CKs (Figura 19.A y 19.B). Esta acumulación también se observó en plántulas *azg2-1* bajo tratamiento hormonal (Figura 19.A, 19.D y 19.E), pero no cuando fueron incubadas con el medio control (Figura 19.A y 19.C). Aunque más leve, el aumento en la densidad causado por el tratamiento con CKs también se observó en PRL de estadio V en ambos genotipos (Figura 19.A, 22.B y 19.E).

Finalmente, en los estadios VI, VII y VIII, las mayores densidades se observaron en plántulas *azg2-1* tanto en la condición control como bajo tratamiento con CKs (Figura 19.A, 19.C y 19.D). En cuanto al genotipo salvaje, la densidad de PRL disminuyó cuando plántulas Col-0 fueron tratadas con CKs, excepto para el estadio VII, donde la densidad de PRL resultó mayor bajo tratamiento hormonal (Figura 19.A y 19.B). A excepción de lo observado para el estadio VII, los datos de plántulas WT coinciden con los reportes bibliográficos, donde se muestra una disminución en la densidad de primordios avanzados (estadios VI, VII y VIII) cuando las plántulas son incubadas con CKs (Laplaze et al., 2007). La elevada densidad de PRL de estadio VII observada en el genotipo salvaje bajo tratamiento con CKs podría explicarse por la sensibilidad de la media aritmética a valores extremos.

En conjunto, la determinación del índice de emergencia y el análisis de distribución de estadios permiten confirmar el rol de AZG2 como modulador de la señal de CKs durante la formación de RL, actuando principalmente como un regulador negativo durante los últimos estadios de desarrollo y la etapa de emergencia de los PRL. Esto permite, a su vez, asignar el fenotipo observado en trabajos previos en líneas KO para *Azg2* a eventos que ocurren durante la progresión de los PRL a través de las diferentes capas de la raíz principal.

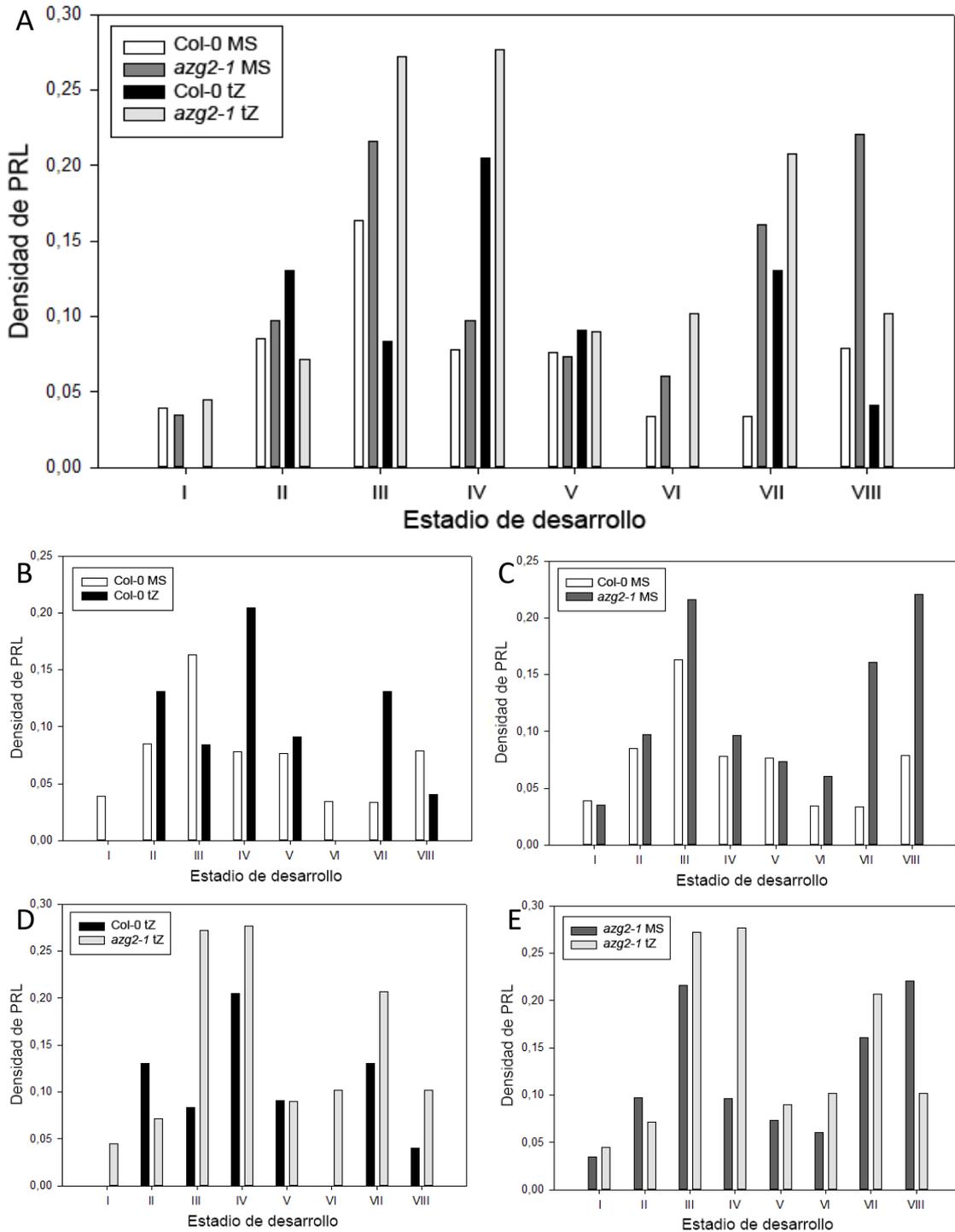


Figura 19: Análisis de la distribución de estadios de desarrollo de PRL en plántulas Col-0 y *azg2-1*, en condiciones control (MS 0,5 X) y bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μ M). A) Gráfico general para todas las combinaciones genotipo-tratamiento. B) Col-0 MS vs. Col-0 tZ. C) Col-0 MS vs. *azg2-1* MS. D) Col-0 tZ vs. *azg2-1* tZ. E) *azg2-1* MS vs. *azg2-1* tZ. Los valores corresponden a las medias aritméticas obtenidas en cada caso.

5.2 Las CKs, vía AZG2, provocan cambios en la estructura de la pared celular en los TCs.

Como se mencionó en la introducción, la separación celular necesaria para la emergencia de RLs implica inevitablemente el remodelado de pared celular en los TCs. Sin embargo, se desconoce la importancia fisiológica de las CKs o su transportador AZG2 durante este proceso.

AZG2 se expresa específicamente en un grupo de células rodeando a los PRL, de forma similar a LAX3 (Swarup et al., 2008). Esto hace suponer que puedan tener funciones equivalentes y que el rol regulatorio de las CKs durante la emergencia de RLs no se relacione solamente con alteraciones en los primordios propiamente dichos sino también con cambios en las propiedades de las paredes celulares de los TCs.

Para determinar si existen cambios en la actividad de remodelado de pared celular en corteza y epidermis asociados a la presencia de CKs y a su transporte mediado por AZG2, se estudió la alteración de la estructura de dichas paredes. Para ello, se recurrió a la tinción con IP.

El IP se une a los grupos carboxilos e hidroxilos con carga negativa de los homogalacturonanos, uno de los tipos de polisacáridos más abundantes en la pared celular. Recientemente se ha demostrado que el tratamiento con pectinasas reduce la intensidad de fluorescencia del IP, sugiriendo que esta tinción puede ser utilizada como un indicador de las propiedades físicas y químicas de la pared celular, y, por lo tanto, de la actividad de remodelado que en ella tiene lugar. (Kumpf et al., 2013; Rounds et al., 2011).

Se pudo observar que el tratamiento con CKs aumenta la intensidad de la señal de IP en TCs de plántulas WT con respecto al medio control (MS 0,5X), indicando que esta hormona disminuye el remodelado de pared celular durante la emergencia de RL (Figura 20).

Resulta de gran importancia destacar el hecho de que se detectó menor intensidad de señal en plántulas *azg2-1* no tratadas respecto al genotipo control, sugiriendo un aumento del remodelado de pared celular en los KO (Figura 20). Finalmente, las plántulas de genotipo mutante tratadas con CKs no mostraron diferencias significativas en la intensidad de señal de IP respecto al control (Col-0 MS 0,5X),

sugiriendo, en concordancia a lo que se conocía, que los mutantes presentan parcial insensibilidad a las CKs exógenas (Figura 20).

Para corroborar que estas diferencias estadísticas no fueran dependientes de la línea utilizada, el mismo análisis se llevó a cabo utilizando plantas de genotipo *azg2-2*. Ambos mutantes insercionales se comportaron de igual manera (Figura 20), demostrando así que cualquier interrupción en el gen *Azg2* provoca aumentos significativos en la señal de IP respecto al genotipo salvaje.

Estos resultados indican que las CKs y su transportador AZG2 actuarían modulando el remodelado de pared celular en células corticales y epidérmicas durante la emergencia de RLs.

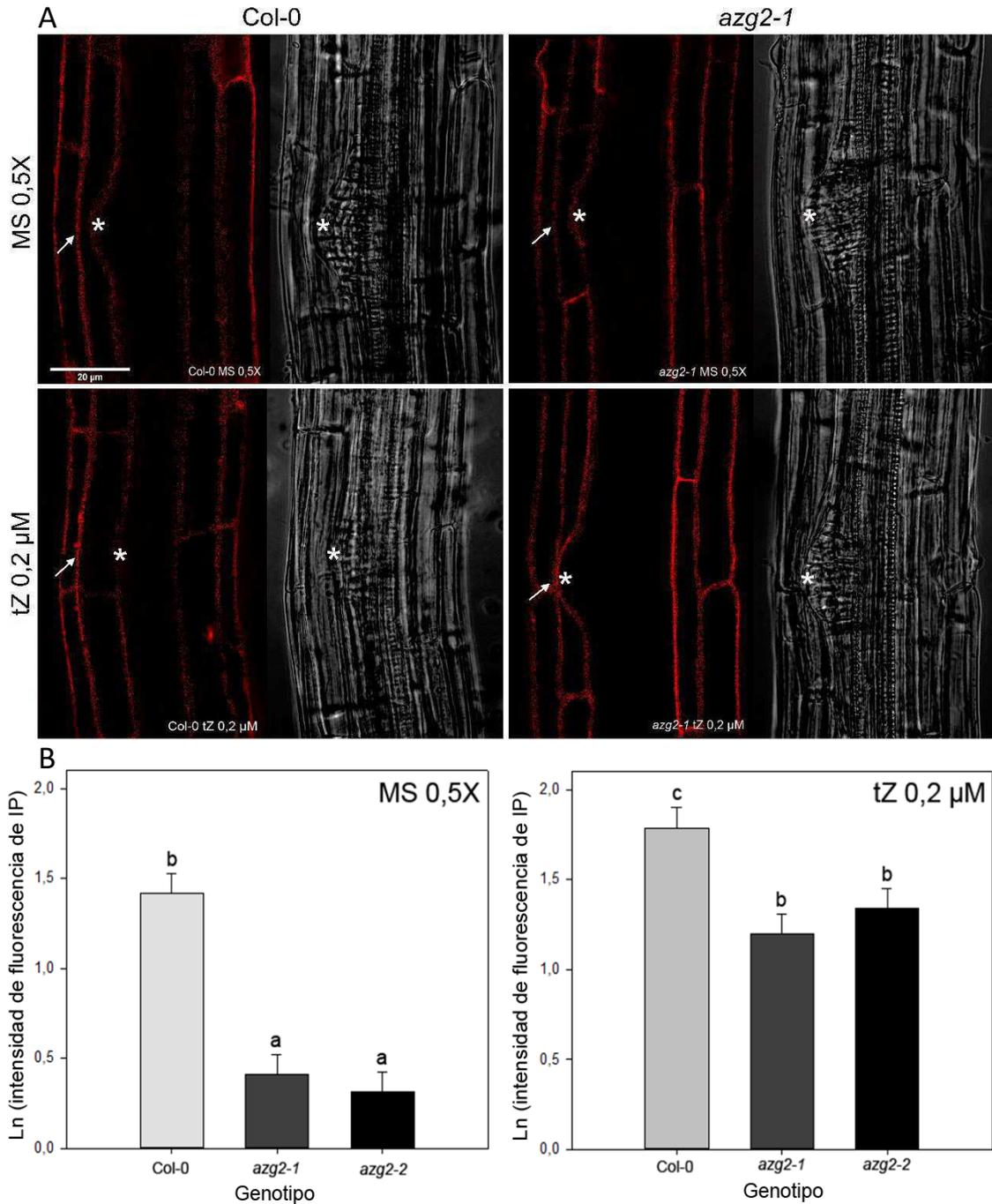


Figura 20: Análisis de la intensidad de fluorescencia de IP en los OLTs de genotipos WT, *azg2-1* y *azg2-2* sometidos a tratamiento con MS (control) y CKs (tZ 0,2 μM). A) Imágenes de la tinción obtenidas con microscopía confocal; a modo de ejemplo se muestran sólo los genotipos Col-0 y *azg2-1*; *ápice del PRL; la flecha indica la pared sobre la cual se realizaron las mediciones (límite corteza-epidermis); barra de escala: 20 μm. B) Cuantificación de la fluorescencia para los genotipos Col-0, *azg2-1* y *azg2-2*; si bien el análisis se realizó en conjunto para ambas condiciones de crecimiento (MS 0,5X y tZ 0,2 μM), los gráficos para cada una de ellas se muestran por separado para facilitar su interpretación; las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre las medias.

5.3 Las CKs modulan la expresión génica de *Expa17* y *Xtr6*

Los resultados presentados anteriormente permiten establecer un rol para las CKs durante la emergencia de los PRL, asociado a la remodelación de las paredes celulares de los TCs. Además, se demostró la dependencia del transportador AZG2 durante estos procesos.

Teniendo en cuenta que las ERPC son las encargadas de modificar las propiedades de las paredes celulares de los TCs, se puede hipotetizar que los cambios observados en presencia de CKs durante la emergencia de los PRL se deben a que esta hormona actuaría (directa o indirectamente) modulando los niveles de expresión génica de las ERPC en forma antagónica a las auxinas. Es por ello que se seleccionó un grupo de ERPC implicadas en la emergencia de RLs para determinar si existen cambios en su expresión génica asociados a la señalización por CKs.

En primer lugar, se recurrió a bases de datos y otras bibliografías disponibles para realizar una primera aproximación al patrón de expresión de estas ERPC y su regulación por CKs. Posteriormente, el análisis se profundizó mediante el estudio de plantas transgénicas transformadas con constructos en los cuales los genes reporteros GUS y GFP fueron colocados secuencialmente bajo el control de los promotores de las respectivas ERPC.

La expresión de Expa17 (At4g01630) en raíz disminuye en presencia de CKs

Como primera aproximación al estudio de la expresión génica a nivel tisular de *Expa17*, se recurrió a las bases de datos disponibles. Según la información brindada por eFP Browser, el gen se expresaría principalmente en raíz (Figura 21.A). Específicamente, el mayor nivel de expresión se daría al final de la zona de elongación y en la transición hacia la zona meristemática (Figura 21.B). En la zona de maduración, los niveles más altos corresponden a las células epidérmicas (Figura 21.B).

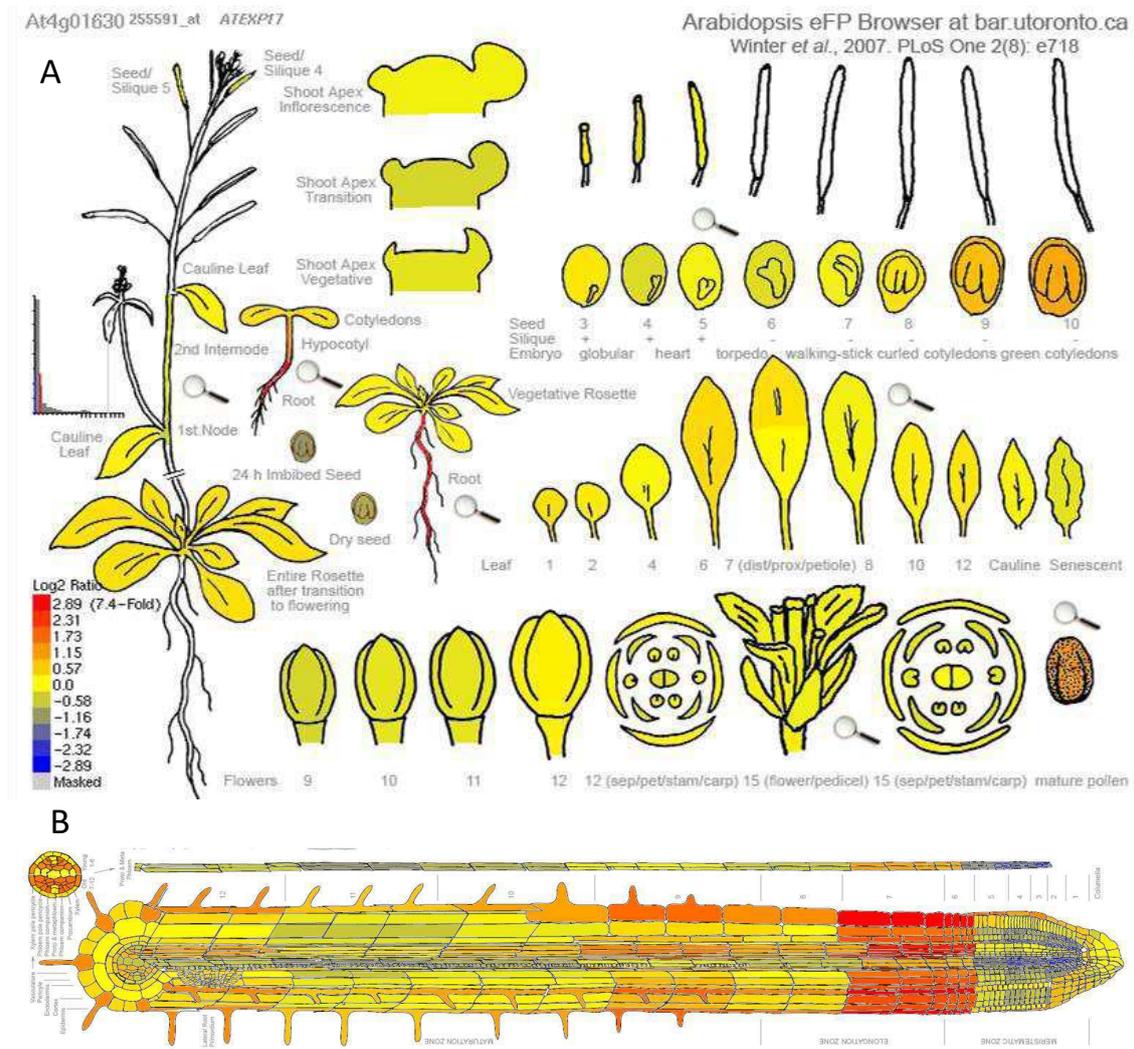


Figura 21: Esquemas mostrando la expresión relativa del gen *Expa17* en *A. thaliana* según eFP Browser (Winter et al., 2007). A) Mapa de expresión en los diferentes órganos durante el desarrollo. B) Mapa de expresión en raíz.

Una vez conocido el patrón de expresión tisular de *Expa17*, se indagó sobre su respuesta a la regulación hormonal dependiente de CKs. Para ello se recurrió nuevamente a la base eFP Browser junto con otros estudios disponibles, y se recolectó información correspondiente a la regulación mediada por diferentes tipos de CKs.

En primer lugar, se observó que el tratamiento con Zeatina, en cualquiera de los casos presentados, disminuye los niveles de expresión por debajo de los del control (Figura 22.A). En segundo lugar, la incubación con tZ durante 3 horas provocó una disminución en los niveles de expresión génica de *Expa17* (Figura 22.B). Finalmente, la expresión también disminuye luego de 30 min y 2 horas de tratamiento con Benziladenina (BA; Figura 22.C).

En síntesis, la información recolectada en las bases de datos permite concluir que el tratamiento con CKs, independientemente del tipo, disminuye los niveles de expresión génica de *Expa17*.

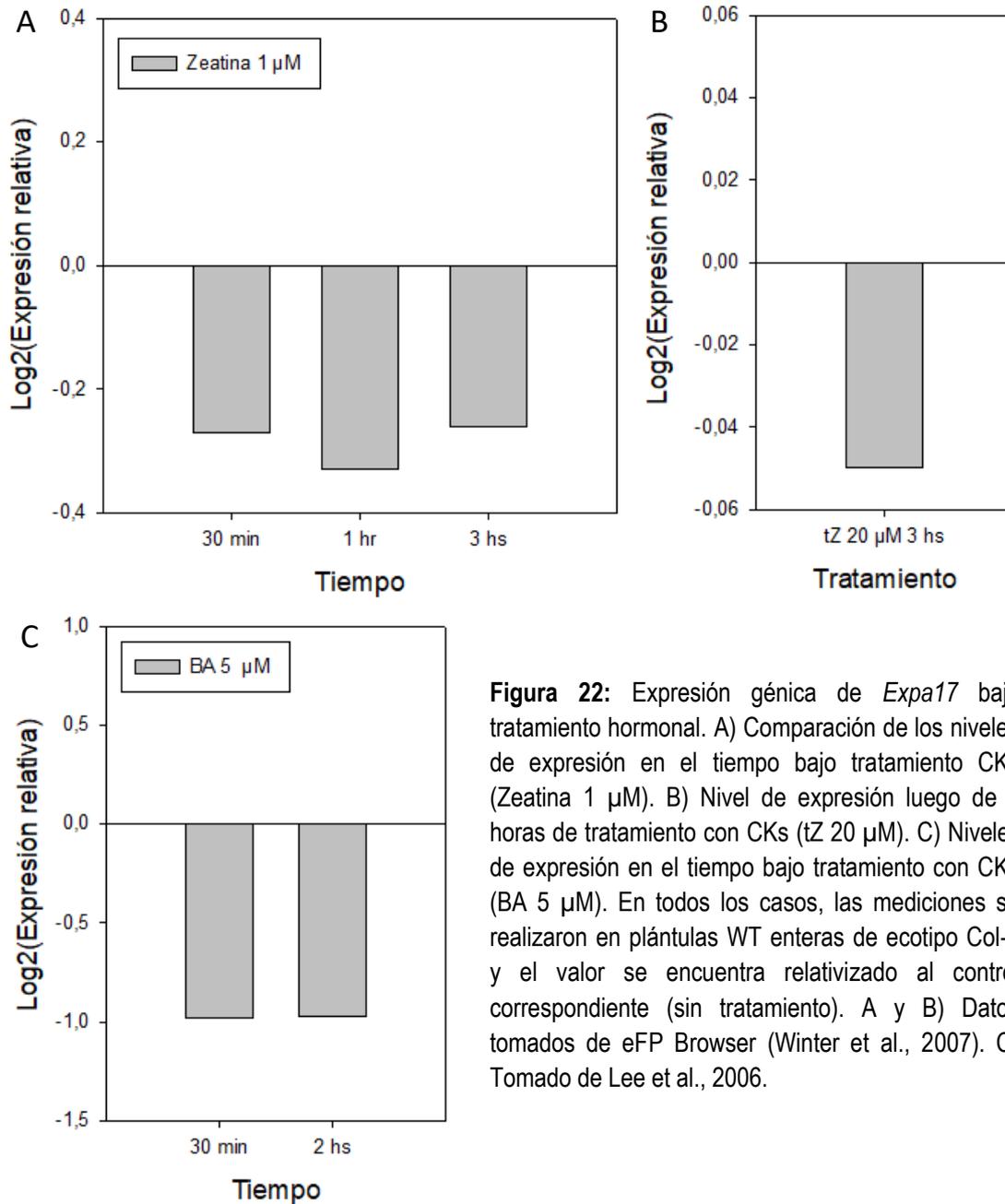


Figura 22: Expresión génica de *Expa17* bajo tratamiento hormonal. A) Comparación de los niveles de expresión en el tiempo bajo tratamiento CKs (Zeatina 1 μM). B) Nivel de expresión luego de 3 horas de tratamiento con CKs (tZ 20 μM). C) Niveles de expresión en el tiempo bajo tratamiento con CKs (BA 5 μM). En todos los casos, las mediciones se realizaron en plántulas WT enteras de ecotipo Col-0 y el valor se encuentra relativizado al control correspondiente (sin tratamiento). A y B) Datos tomados de eFP Browser (Winter et al., 2007). C) Tomado de Lee et al., 2006.

Sin embargo, la información disponible en estas bases corresponde a datos tomados en plántulas enteras. Es por ello que se recurrió al análisis del patrón de actividad del promotor de *Expa17* para determinar qué sucede concretamente con los niveles de expresión de este gen en raíz.

Para estudiar el patrón de expresión a nivel tisular de *Expa17* tanto en condiciones normales de desarrollo como bajo tratamiento con CKs y compararlo con los datos obtenidos del análisis *in silico*, se obtuvo un constructo donde los genes reporteros *GFP* y *GUS* se colocaron secuencialmente bajo el control del promotor de *Expa17* (p*Expa17*). La construcción se utilizó para transformar plantas salvajes de *A. thaliana* del ecotipo Col-0.

Una vez asegurada la homocigosis de las inserciones mediante análisis de resistencia a antibióticos, las plántulas fueron crecidas durante 9 días en placas de Petri conteniendo medio MS 0,5X sin nitrógeno y KNO₃ 5 mM. Para el tratamiento hormonal, las mismas se incubaron con una solución de tZ 0,2 μM durante 20 hs.

A diferencia de lo observado en las bases de datos, se detectó una intensa señal del reportero *pExpa17:GUS* en cotiledones e hipocótilo, la cual desaparece en el inicio de la zona de transición hacia la raíz. La tinción también se hizo evidente en tricomas de hojas en desarrollo (datos no mostrados).

En el medio control, la señal del reportero *pExpa17:GUS* se presentó en dos ubicaciones específicas de la raíz. En primer lugar, en células aparentemente corticales y/o epidérmicas de los TCs rodeando a PRL en diferentes estadios de desarrollo (Figura 23.A y 23.B). Aunque la tinción pudo ser detectada incluso en PRL de estadio II, su intensidad resultó mayor en primordios de estadios más avanzados. En segundo lugar, la señal fue detectada en la transición entre la zona de elongación y la zona meristemática de la raíz, coincidiendo con la información recolectada en el análisis *in silico* (Figura 23.C).

En cuanto al tratamiento hormonal, se observó una disminución notable de la señal del reportero en las raíces de plántulas tratadas con CKs, tanto en los TCs a los PRL (Figura 23.D y 23.E) como en la transición de la zona de elongación hacia la zona meristemática (Figura 23.F).

pExpa17:GUS/Col-0

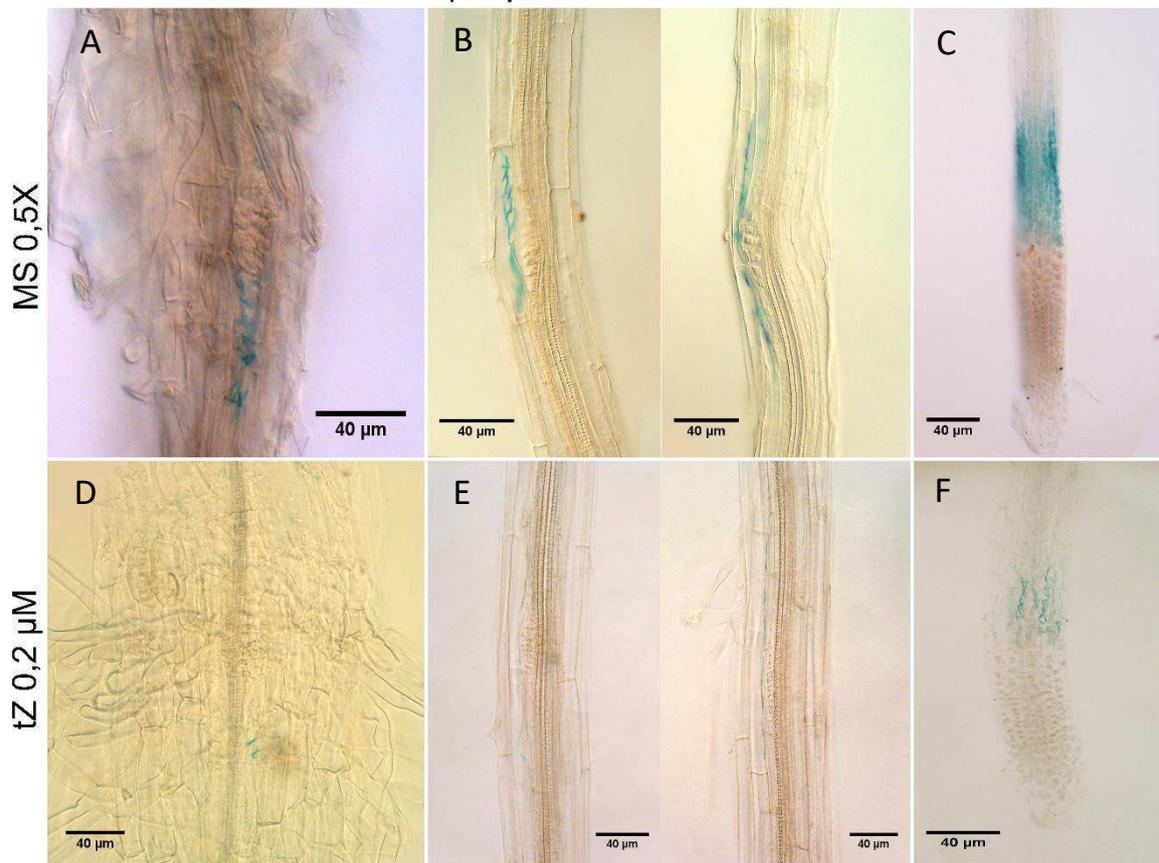


Figura 23: Expresión de *Expa17* en plantas Col-0 en condiciones control (MS 0,5X) y bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μ M), obtenida mediante el reportero *pExpa17:GUS*. A y D) Primordios de estadio V-VII (40x). B y E) PRL de estadio III-IV (40x). C y F) Transición zona de elongación-zona meristemática (20x). Barras de escala: 40 μ m.

Para una mejor caracterización del patrón de expresión en los TCs, se procedió al análisis del segundo reportero presente en las plantas transformadas, *pExpa17:GFP*. En el medio control, la señal fue localizada en células de los TCs, confirmando así el patrón revelado mediante la tinción de GUS (Figura 24.A y 24.B). Sin embargo, a diferencia de lo observado con el primer reportero, la fluorescencia se detectó únicamente en primordios avanzados, no siendo posible visualizarla en estadios más tempranos de su desarrollo.

La disminución en la actividad del promotor debida al tratamiento con CKs también se hizo evidente en la señal de GFP detectada en los TCs de primordios avanzados (Figura 24.C y 24.D), respaldando las observaciones obtenidas mediante el primer reportero.

pExpa17:GFP/Col-0

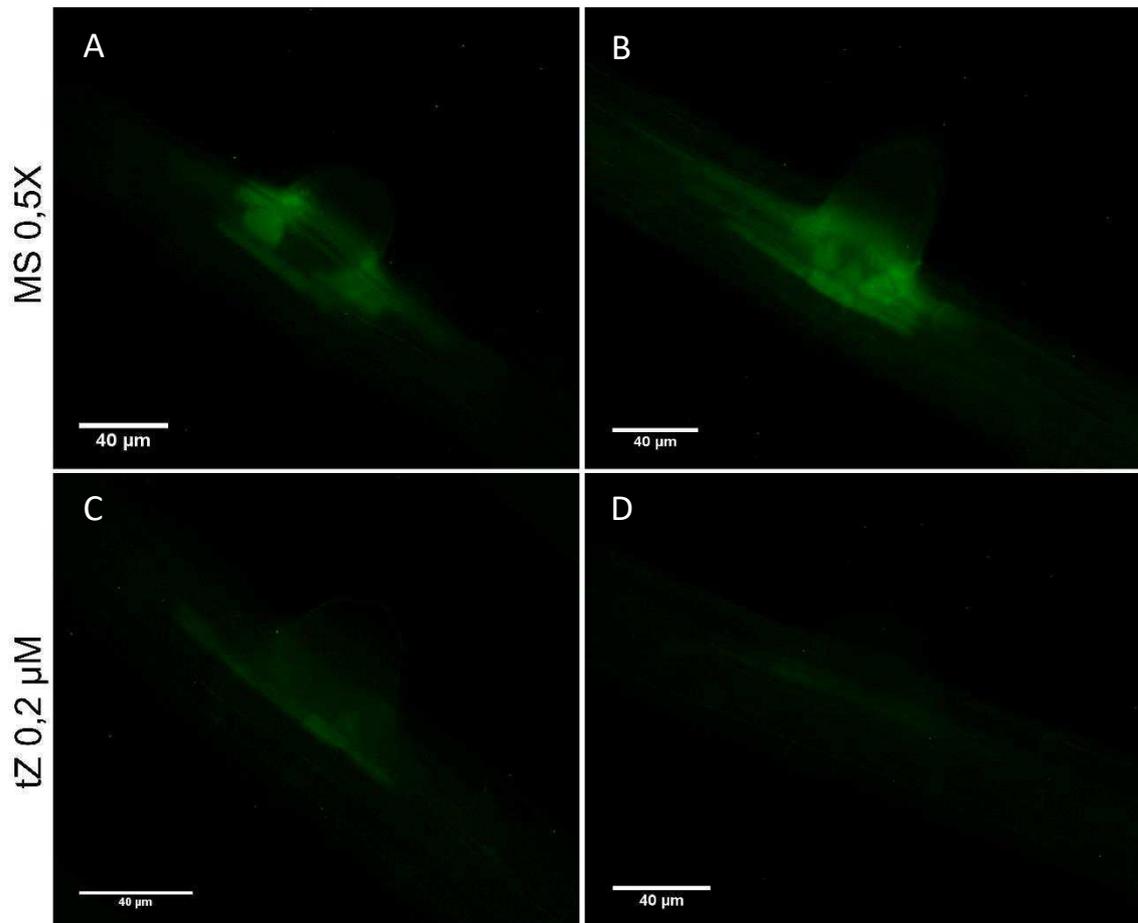


Figura 24: Expresión de *Expa17* en TCs de plantas Col-0 en condiciones control (MS 0,5X) y bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μM), obtenida mediante el reportero *pExpa17:GFP*. A y C) PRL de estadio VIII. B y D) Primordio emergido. Barras de escala: 40 μm.

Los resultados presentados en este apartado permiten destacar dos aspectos importantes. En primer lugar, el análisis de expresión de genes reporteros dirigidos por el promotor de *Expa17* permitió estudiar en forma más detallada la expresión de esta ERPC en raíz respecto a la información obtenida de bases de datos o estudios anteriores, determinando que la misma se encuentra limitada a un grupo de células corticales y/o epidérmicas, rodeando a los PRL y a la transición entre la zona de elongación y la zona meristemática. En segundo lugar, estos resultados indican que las CKs actuarían regulando negativamente los niveles de expresión de *Expa17* en raíz.

La expresión de Xtr6 (At4g25810) en raíz disminuye en presencia de CKs

Al igual que para *Expa17*, se recurrió a la base de datos eFP Browser para realizar una primera aproximación al patrón de expresión tisular del gen *Xtr6*. Según la

información brindada, el mismo se expresaría principalmente en plántulas, raíces y hojas en desarrollo (Figura 25.A). En raíz, los mayores niveles de expresión se darían en células de endodermis, periciclo y cilindro vascular ubicadas en las zonas de maduración y elongación de raíces maduras (Figura 25.B). Estos datos coinciden con estudios previos donde se describe el patrón de actividad del promotor *pXtr6* (Swarup et al., 2008). Sin embargo, dicho estudio detecta la expresión en células epidérmicas y corticales rodeando a PRL mientras que eFP Browser indica un elevado nivel de expresión en células del primordio propiamente dicho pero no en estas capas celulares. (Figura 25.B).

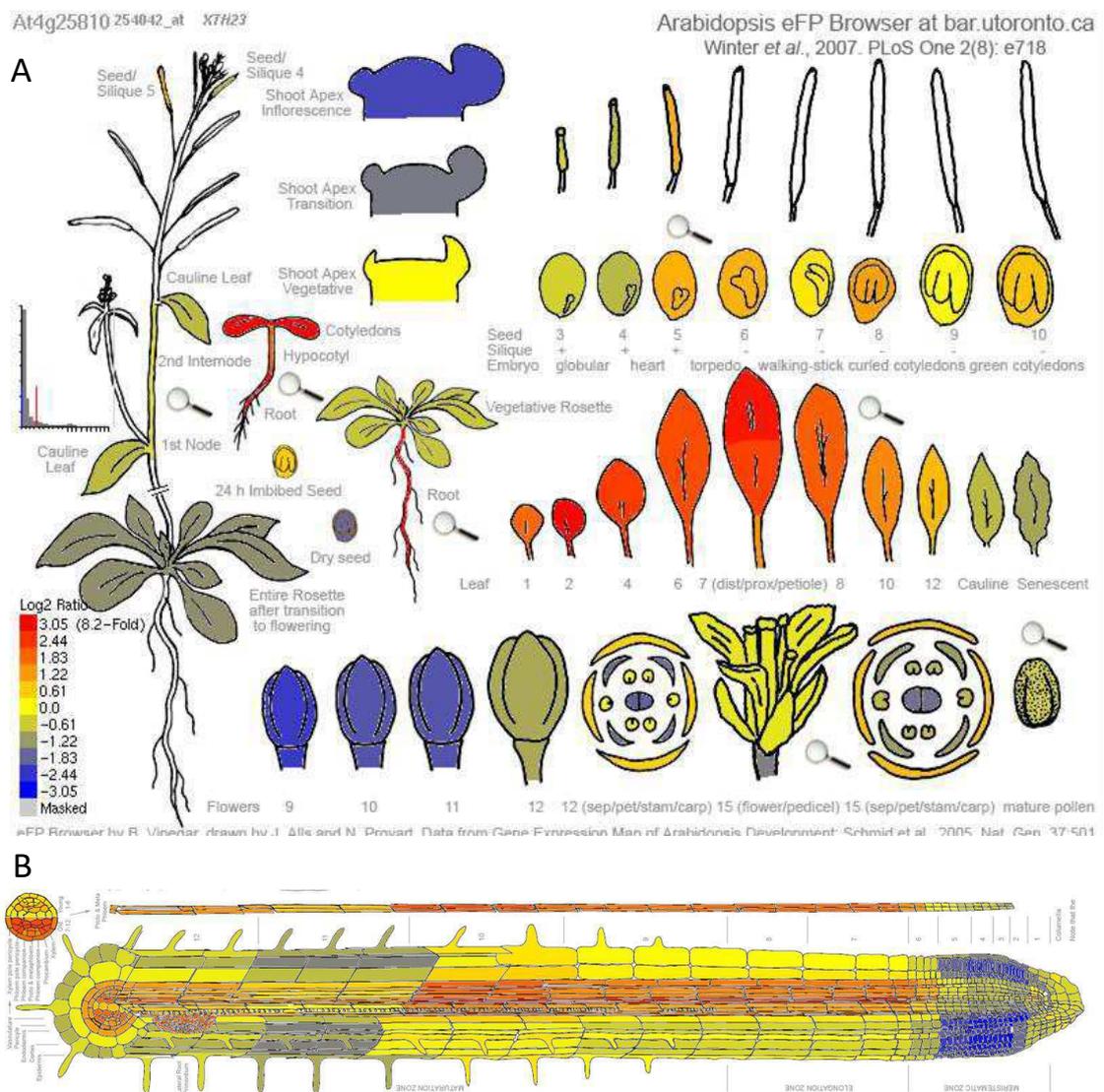


Figura 25: Esquemas mostrando la expresión relativa del gen *Xtr6* (*Xth23*) en *A. thaliana* según eFP Browser (Winter et al., 2007). A) Mapa de expresión en los diferentes órganos durante el desarrollo. B) Mapa de expresión en raíz.

En cuanto a la regulación dependiente de CKs, se analizaron datos de exposición a Zeatina y tZ brindados por eFP Browser. La respuesta a Zeatina parece depender del tiempo de exposición ya que los niveles disminuyeron por debajo de los del control al realizar tratamientos de 30 min y 3 hs, pero se observó un pico de expresión cuando las plántulas fueron incubadas durante 1 hr con esta hormona (Figura 26.A). Por otro lado, se observó que el tratamiento con tZ durante 3 hs disminuye la expresión génica de *Xtr6* (Figura 26.B).

En base a estos datos, se puede concluir que el efecto de las CKs sobre la expresión de *Xtr6* no resulta tan claro como en el caso de *Exp17*.

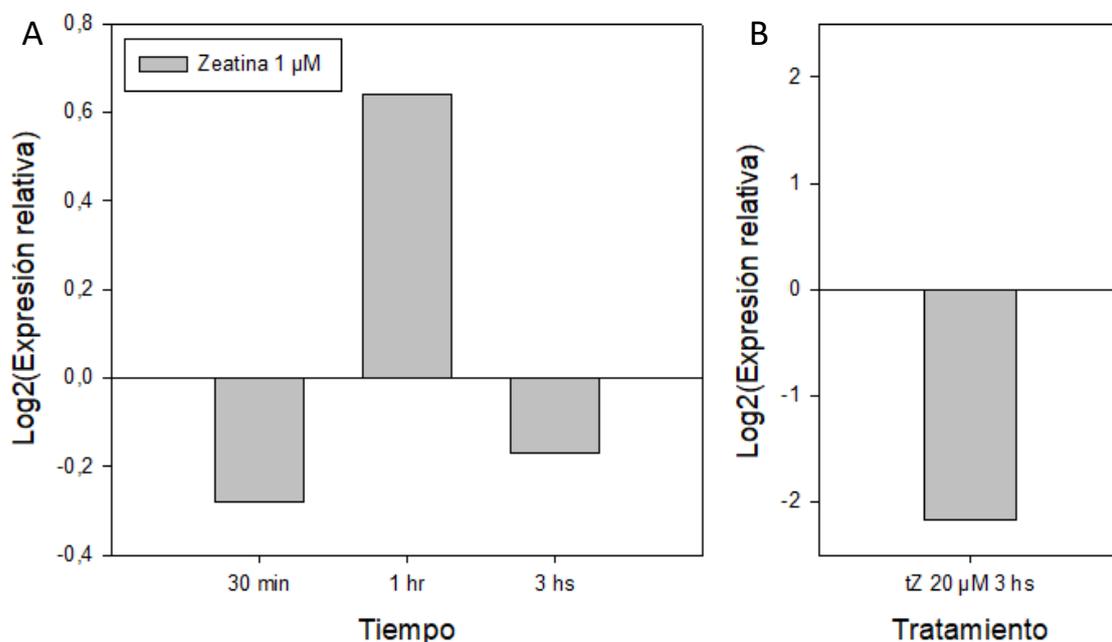


Figura 26: Expresión génica de *Xtr6* (*Xth23*) bajo tratamiento hormonal. A) Comparación de los niveles de expresión en el tiempo bajo tratamiento con CKs (Zeatina 1 µM). B) Nivel de expresión luego de 3 horas de tratamiento con CKs (tZ 20 µM). En todos los casos, las mediciones se realizaron en plántulas WT enteras de ecotipo Col-0 y el valor se encuentra relativizado al control correspondiente (sin tratamiento). Datos tomados de eFP Browser (Winter et al., 2007).

Sin embargo, al igual que para *Exp17*, esta información corresponde a datos obtenidos utilizando material de plántulas enteras. Para tener más certeza sobre los niveles de expresión de *Xtr6* en raíz se creó una construcción plasmídica donde el promotor del gen *Xtr6* (*pXtr6*) controla la expresión de los genes reporteros *GFP* y *GUS* en

el mismo transcripto. El mismo se utilizó para transformar plantas salvajes de *A. thaliana* del ecotipo Col-0.

Posteriormente al chequeo de homocigosis de las líneas, el crecimiento de las plántulas y el tratamiento hormonal fueron realizados de la misma forma que en el caso anterior.

En el medio control, la señal del reportero *pXtr6:GUS* se presentó en tejidos vasculares, periciclo, TCs y PRL. En primer lugar, y coincidiendo tanto con la información de bases de datos como de estudios previos (Swarup et al., 2008), la expresión en cilindro vascular y células del periciclo se observó desde el inicio de la zona de maduración hasta el ápice de la raíz principal (Figura 27.A y 27.C), aunque no de manera ininterrumpida en toda la extensión de la misma. En segundo lugar, y en concordancia con la información brindada por eFP Browser, la tinción se hizo evidente en células de los PRL propiamente dichos (Figura 27.B), aunque la señal disminuyó a medida que los primordios avanzaban en su desarrollo. Finalmente, a diferencia de lo observado en otros estudios (Swarup et al., 2008), la señal del reportero en los TCs se presentó únicamente en células endodérmicas (Figura 27.B).

El tratamiento con CKs provocó una disminución en la tinción observada en tejidos vasculares, periciclo y endodermis a lo largo de la raíz principal (Figura 27.D) e incluso en los alrededores de los primordios (Figura 27.E) aunque no se detectaron cambios notables de expresión en las zonas cercanas al tip de la raíz principal (Figura 27.F). En cuanto a los PRL en sí, en la mayoría de los casos se observó una disminución de la señal del reportero causada por la exposición a CKs (Figura 27.E).

pXtr6:GUS/Col-0

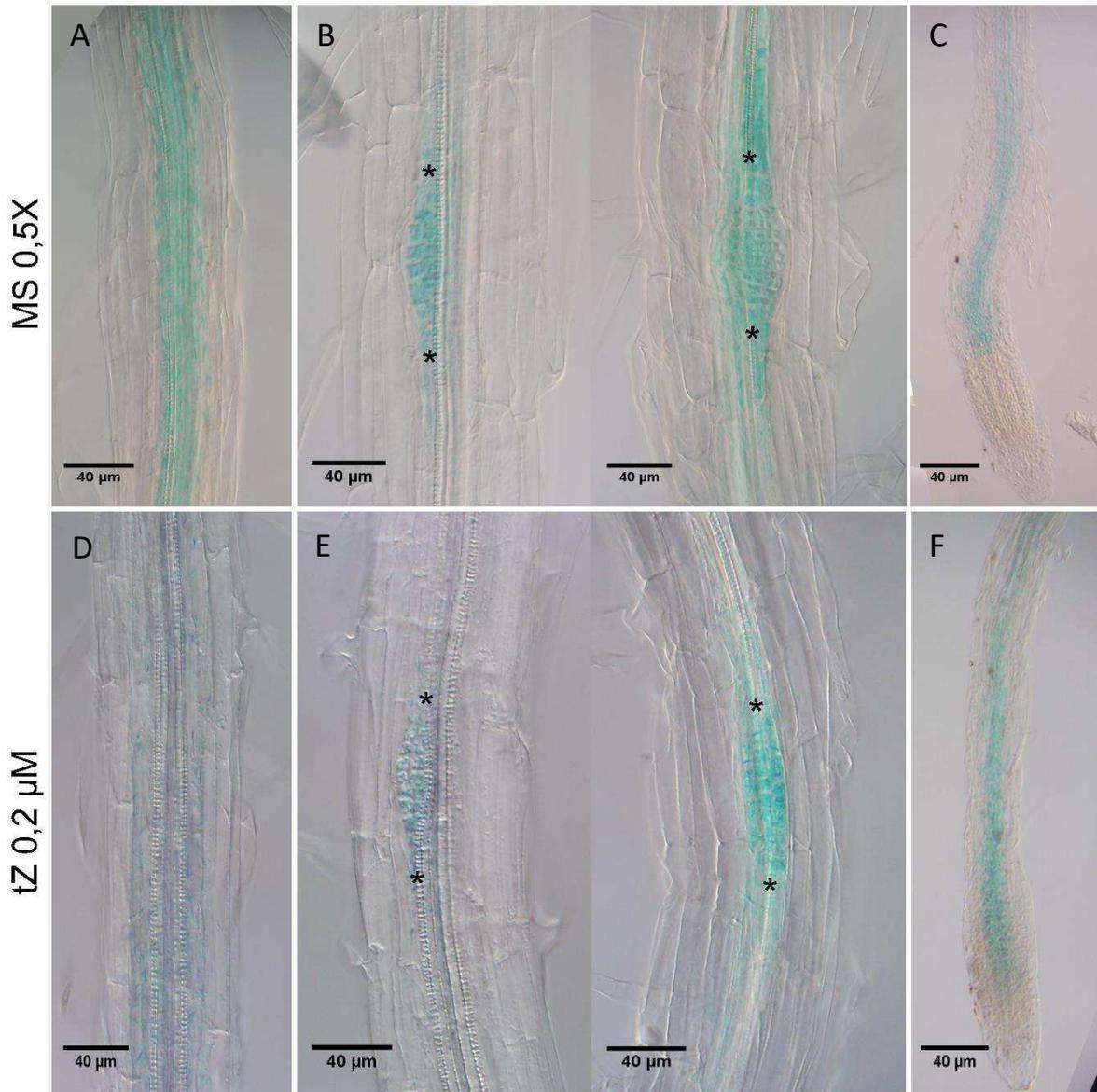


Figura 27: Expresión de *Xtr6* en plantas Col-0 en condiciones control (MS 0,5X) y bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μ M) obtenida mediante el reportero *pXtr6:GUS*. A y D) Expresión en cilindro vascular, periciclo y endodermis (40x). B y E) Expresión en PRL y TCs (40x). C y F) Tip de la raíz principal. Barras de escala: 40 μ m. * bordes del PRL.

Para continuar con la caracterización del patrón de expresión en los TCs, se procedió al análisis del segundo reportero presente en las plantas transformadas, *pXtr6:GFP*. En el medio control, la señal fue localizada en los alrededores de primordios ya emergidos, respaldando el patrón observado mediante la tinción de GUS (Figura 28.A y 28.B). El tratamiento con CKs provocó una disminución evidente en la señal fluorescente,

respaldando las observaciones obtenidas mediante el primer reportero analizado (Figura 28.C y 28.D).

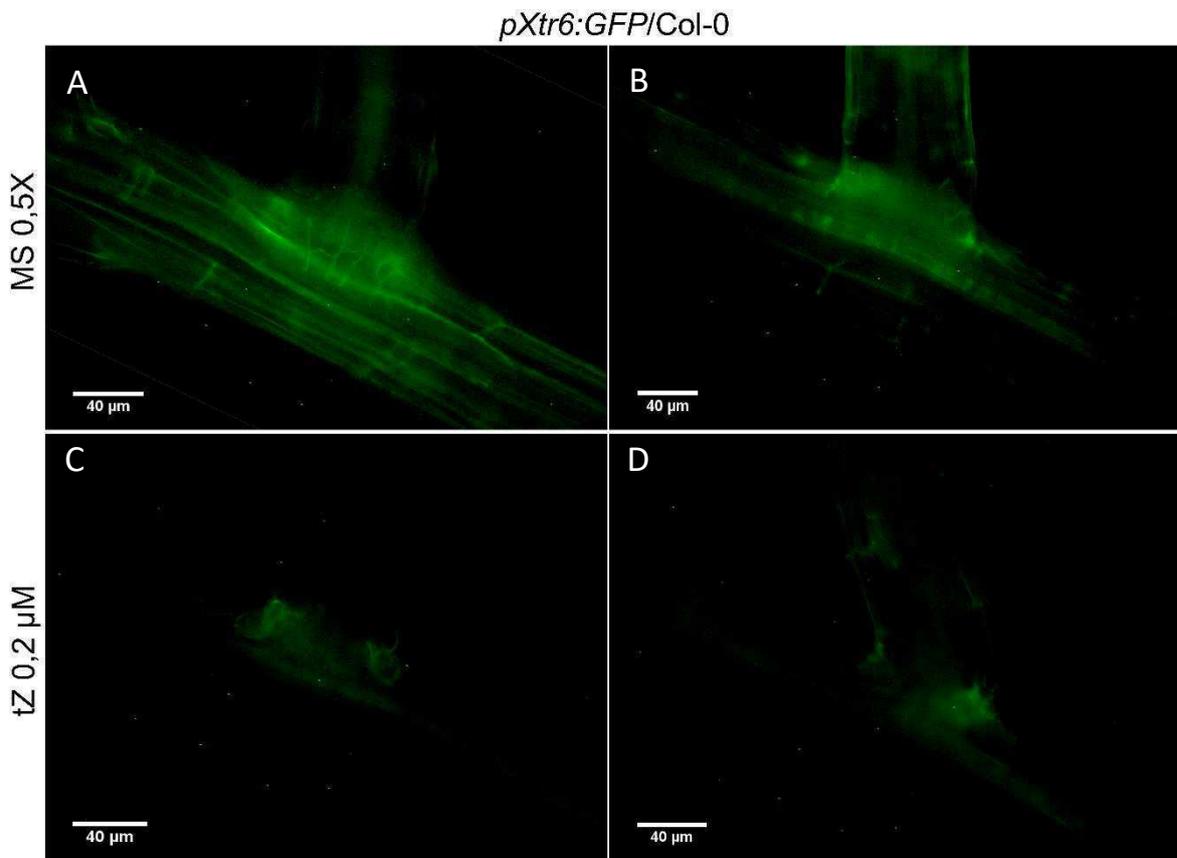


Figura 28: Expresión de *Xtr6* en primordios emergidos de plantas Col-0 en condiciones control (MS 0,5X) y bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μ M) obtenida mediante el reportero *pXtr6:GFP*. A y B) MS 0,5X. C y D) tZ 0,2 μ M. Barras de escala: 40 μ m.

En base a estos resultados se puede destacar que: en primer lugar, la señal obtenida mediante el reportero *pXtr6:GUS* permitió estudiar en forma más detallada la expresión de *Xtr6* en raíz respecto a la información obtenida en bases de datos o estudios anteriores, determinando que la misma se encuentra ubicada en tejidos vasculares, periciclo y endodermis a lo largo de la raíz principal, en los PRL propiamente dichos y en células endodérmicas de los TCs. En segundo lugar, al igual que para *Expa17*, estos resultados indican que las CKs actuarían regulando negativamente los niveles de expresión de *Xtr6* en raíz. El hecho de que ambos genes de ERPC respondan de igual manera a la aplicación de CKs exógenas podría indicar un mecanismo global de regulación mediado por esta hormona.

5.4 AZG2 está implicado en la regulación de la expresión de *Expa17* y *Xtr6* dependiente de CKs

Una vez determinada la importancia de las CKs en la regulación de la expresión génica de ambas ERPC seleccionadas, resta conocer el rol del transportador AZG2 en este proceso. Para ello se llevó a cabo un análisis de co-localización y posteriormente se estudió la expresión de *Expa17* y *Xtr6* transformando plantas *azg2-1* con los constructos utilizados en el apartado anterior, tanto en condiciones control (MS 0,5X) como bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μ M). Debido a que AZG2 se expresa únicamente en TCs, el análisis se centró específicamente en estos tejidos.

El patrón de expresión de Azg2 presenta mayor similitud con el de Xtr6 que con el de Expa17

Para determinar la importancia de AZG2 en la regulación de la expresión de las ERPC estudiadas, es importante analizar el solapamiento de la expresión génica del transportador con cada una de las enzimas. Para ello se utilizaron plantas de genotipo Col-0 transformadas con el reportero *RFP* dirigido bajo el control del promotor de *Azg2* (*pAzg2*) y el reportero *GFP* dirigido bajo el control del promotor de las ERPC (*pExpa17* y *pXtr6*).

En el caso de *Expa17* se observó una escasa coincidencia en los patrones de expresión de ambos genes, resaltándose la localización más superficial de *Expa17* respecto al transportador (Figura 29.A).

Por el contrario, se detectó un mayor solapamiento en los patrones de expresión de *Xtr6* y *Azg2*. Aparentemente, las señales de ambos reporteros coinciden en células corticales (Figura 29.B) y endodérmicas (Figura 29.C).

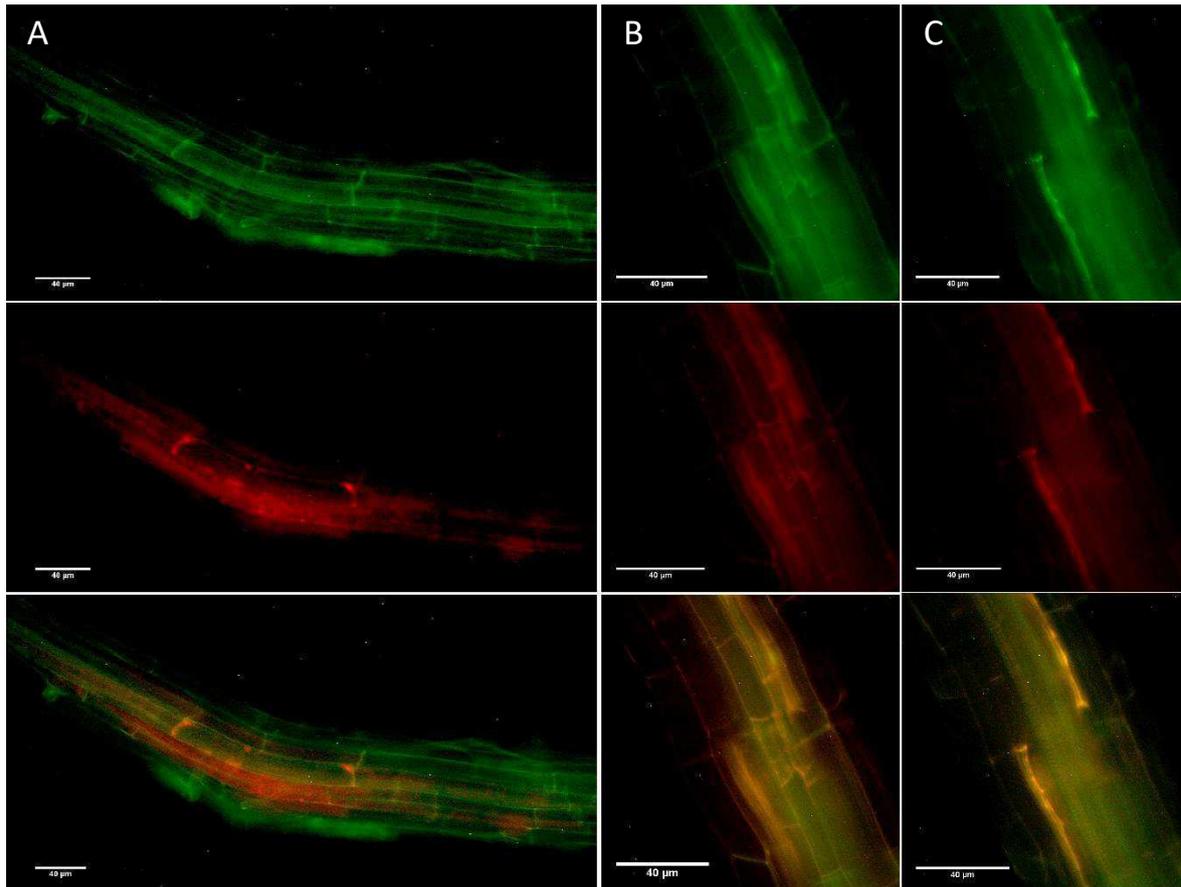


Figura 29: Análisis de co-localización para los genes de las ERPC estudiadas y *Azg2* en plantas Col-0. A) *pExpa17* (GFP) vs. *pAzg2* (RFP). B y C) *pXtr6* (GFP) vs. *pAzg2* (RFP). El color amarillo indica solapamiento de expresión. Barras de escala: 40 µm.

En base a estos resultados, se espera que la expresión de *Xtr6* dependa en mayor grado de la presencia/ausencia del transportador que la de *Expa17*.

AZG2 modula la expresión de *Expa17* en estadios específicos del desarrollo de los PRL

Utilizando ambos reporteros para *Expa17*, se analizó la señal en plantas *azg2-1* en TCs de primordios en diferentes estadios de desarrollo, con y sin exposición a CKs.

La señal de *pExpa17:GUS* se analizó en PRL de estadios III-IV y en otros más avanzados, próximos a la emergencia. En cuanto a los primeros, no se observaron grandes diferencias de tinción en plantas *azg2-1* incubadas en el medio control (MS 0,5X) respecto al genotipo salvaje. Sin embargo, cuando los mutantes fueron tratados con CKs (tZ 0,2 µM) se detectó una disminución de la señal en los TCs respecto al mismo genotipo en condiciones control (Figura 30.A, 30.B y 30.C). Respecto a la señal observada en PRL más

avanzados, las raíces de plantas mutantes incubadas en el medio control presentaron mayor tinción respecto al genotipo salvaje (Figura 30.D y 30.E). El tratamiento con CKs provocó una disminución de la expresión del reportero en plantas *azg2-1* (Figura 30.F), pero el efecto fue notablemente menor que el provocado por esta hormona en el genotipo salvaje (Figura 23.D).

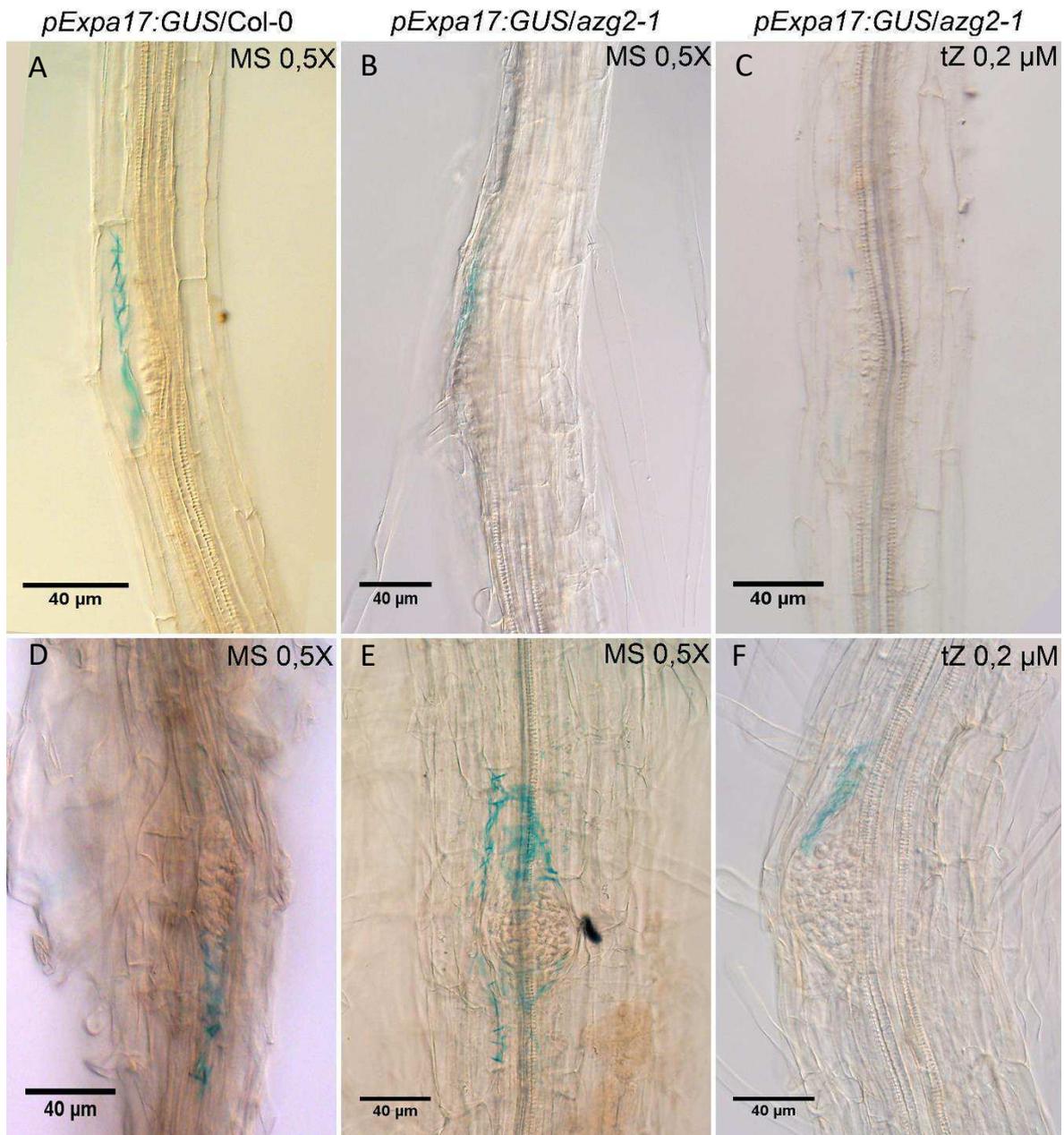


Figura 30: Expresión de *Expa17* en TCs de plantas Col-0 y *azg2-1* en condiciones control (MS 0,5X) y bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μ M) obtenida mediante el reportero *pExpa17:GUS*. A, B y C) PRL entre los estadios III-IV. D, E y F) PRL próximos a emergencia. Barras de escala: 40 μ m.

Para continuar con el análisis, se recurrió nuevamente al reportero *pExpa17:GFP*, con el cual se observó la señal en los TCs de PRL de estadio VIII y en primordios ya emergidos, en medio control. Confirmando lo observado mediante la tinción de GUS, se detectó una mayor intensidad de fluorescencia en TCs a PRL de estadio VIII de plántulas mutantes respecto al genotipo salvaje (Figura 31.A y 31.C). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre genotipos en cuanto a la señal observada en primordios ya emergidos (Figura 31.B y 31.D).

Todos estos datos indican que AZG2 formaría parte del mecanismo regulador de la expresión de *Expa17* mediado por CKs aunque su importancia durante el mismo dependería del estadio de desarrollo en el cual se encuentran los PRL.

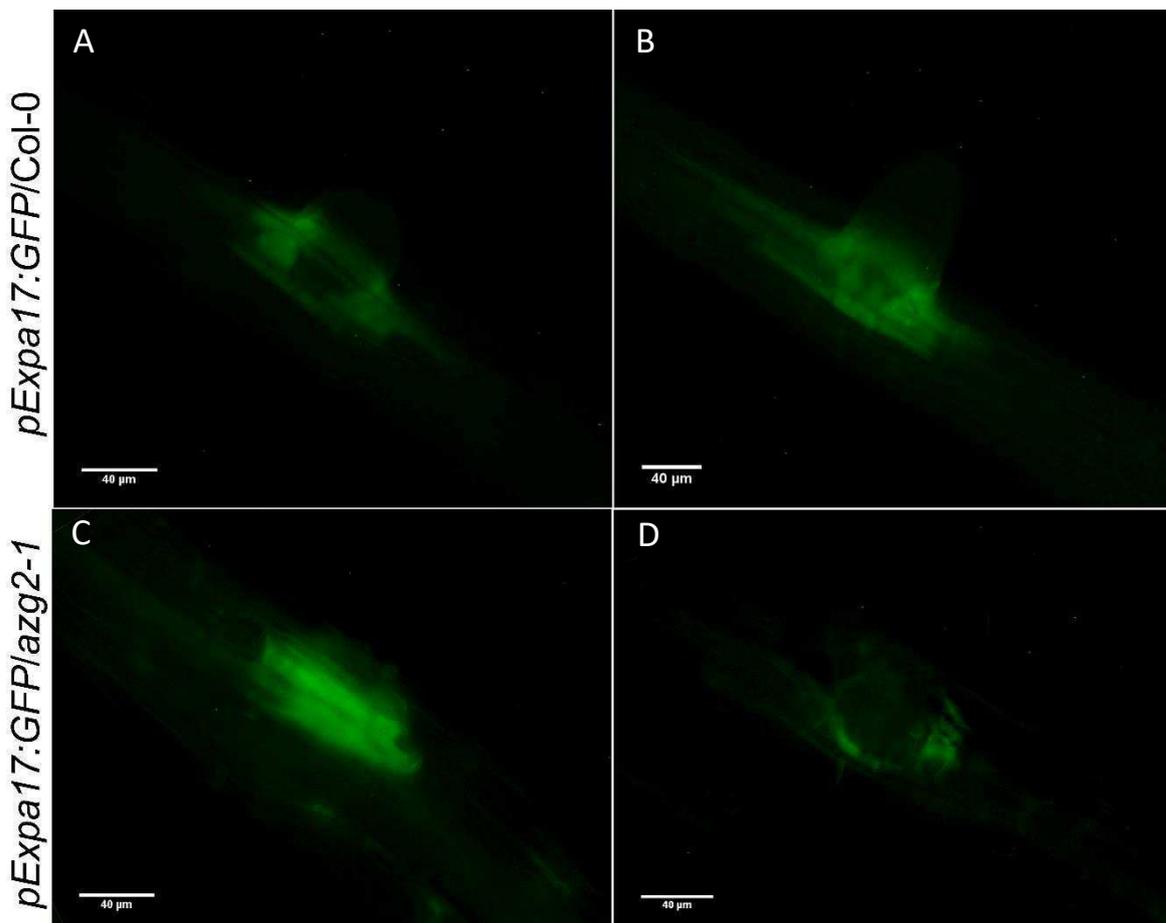


Figura 31: Expresión de *Expa17* en plantas *Col-0* y *azg2-1* en condiciones control (MS 0,5X) obtenida mediante el reportero *pExpa17:GFP*. A y C) Primordio de estadio VIII. B y D) Primordio emergido. Barras de escala: 40 μ m.

AZG2 modula la expresión de Xtr6 en TCs

Para estudiar el rol del transportador AZG2 en la regulación de la expresión de *Xtr6*, se utilizó el reportero *pXtr6:GUS* y se analizó la señal obtenida en plantas *azg2-1* en condiciones control (MS 0,5X) y bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μ M) para PRL en diferentes estadios de desarrollo.

En primer lugar, en el medio control, la tinción observada en los alrededores de los PRL de todos los estadios analizados resultó mayor en las raíces de plantas KO respecto a las salvajes (Figura 32.A y 32.B). En segundo lugar, el genotipo mutante no mostró cambios en la expresión del reportero causados por el tratamiento con CKs (Figura 32.B y 32.C). En tercer lugar, la señal del reportero fue detectada incluso en células corticales y epidérmicas rodeando a primordios ya emergidos en plantas *azg2-1* pero no en el genotipo salvaje (Figura 32.D y 32.E).

En cuanto a la expresión en células de los primordios propiamente dichos, la disminución de la tinción observada en el genotipo Col-0 a medida que los PRL avanzaban en el desarrollo no se hizo evidente en los mutantes *azg2-1*, bajo ninguna de las condiciones de crecimiento estudiadas.

Para continuar con el análisis, se observó la señal fluorescente obtenida mediante el reportero *pXtr6:GFP* en plantas de ambos genotipos incubadas en condiciones control (MS 0,5X). Tanto en primordios próximos a emergencia como en PRL ya emergidos, se observó un aumento en la señal de GFP en TCs del genotipo mutante respecto al salvaje. Además, en plantas *azg2-1*, se detectó una fluorescencia intensa en capas más externas de los TCs (Figura 33). Todas estas observaciones coinciden con las obtenidas mediante el primer reportero.

En conjunto, estos datos indican que AZG2 formaría parte importante del mecanismo de regulación de la expresión de *Xtr6* mediado por CKs durante gran parte de la formación de RLs.

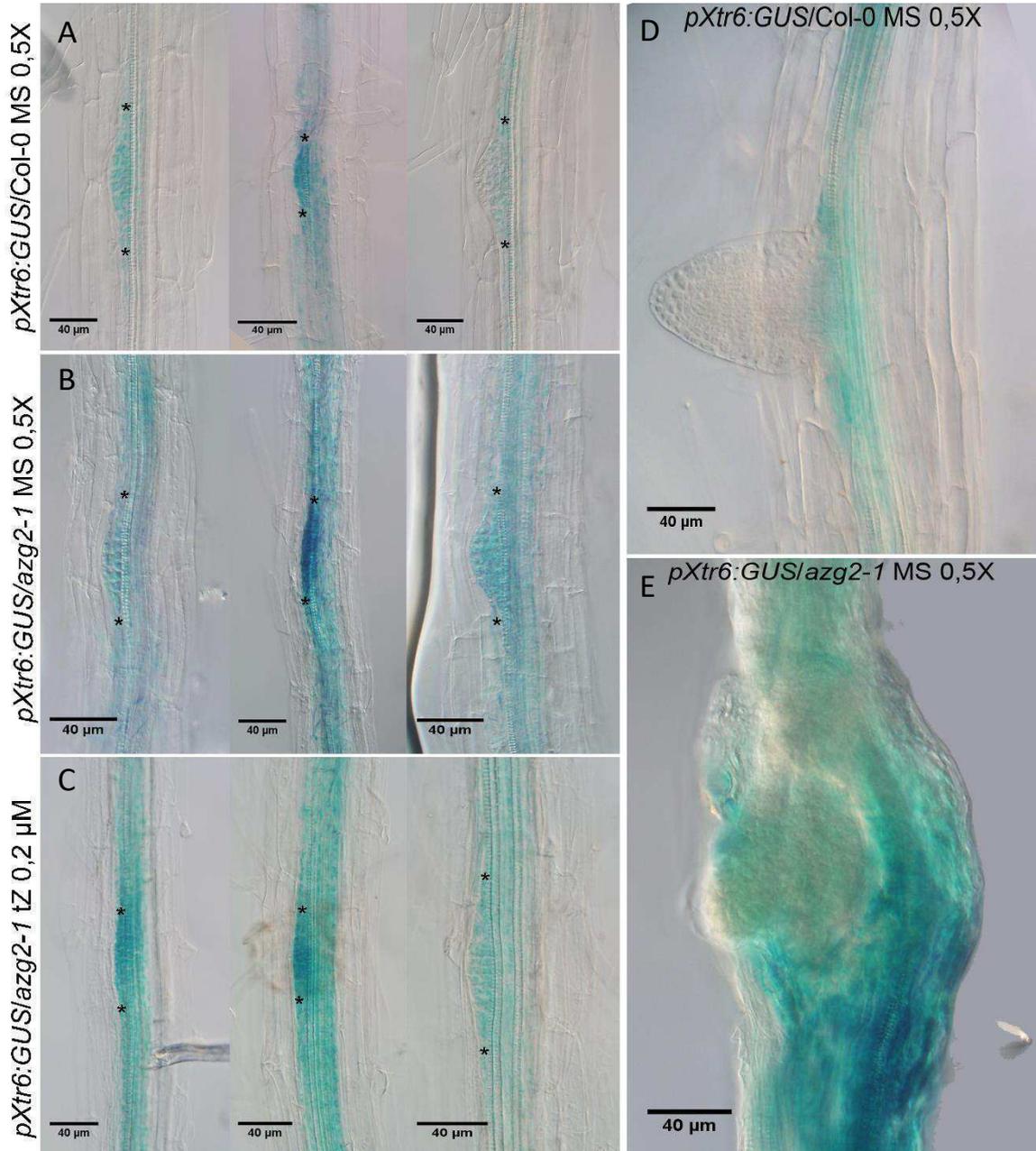


Figura 32: Expresión de *Xtr6* en TCs y PRL de plantas Col-0 y *azg2-1* crecidas en medio control (MS 0,5X) y bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μM, obtenida mediante el reportero *pXtr6:GUS*). A) Col-0 MS 0,5X. B) *azg2-1* MS 0,5X. C) *azg2-1* tZ 0,2 μM. D y E) Primordios emergidos. Barras de escala: 40 μm; * bordes del PRL; Imágenes tomadas a 40x.

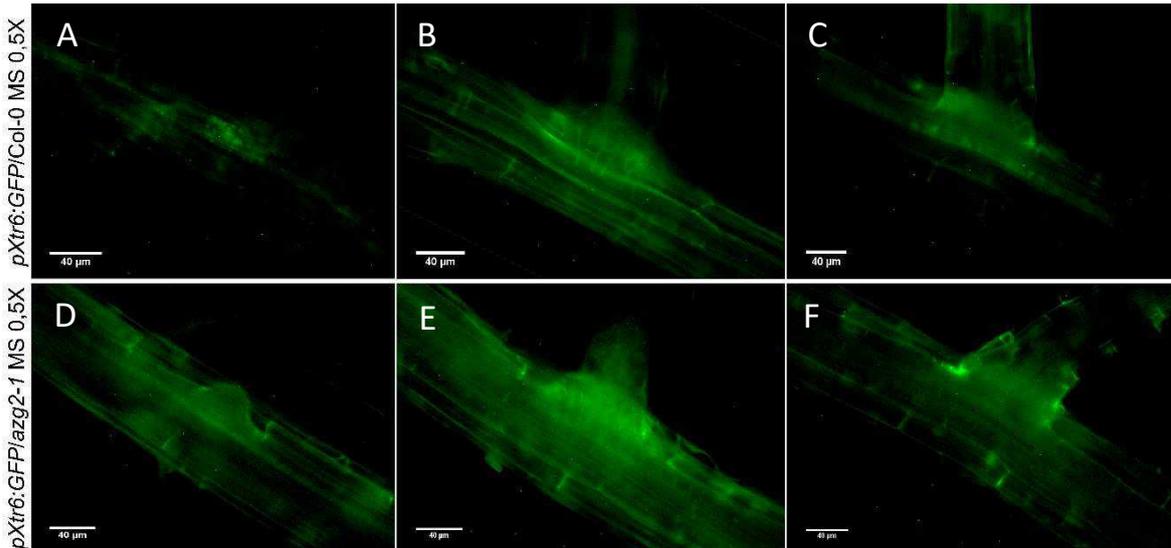


Figura 33: Expresión de *Xtr6* en TCs de plantas Col-0 y *azg2-1* en condiciones control (MS 0,5X) y bajo tratamiento con CKs (tZ 0,2 μm) obtenida mediante el reportero *pXtr6:GFP*. A y D) PRL próximos a emergencia. B, C, E y F) Primordios emergidos. Barras de escala: 40 μm.

Los resultados obtenidos a partir de estos análisis indican que, en ambos casos, el transportador forma parte de un mecanismo regulatorio que modula la expresión de *Expa17* y *Xtr6* durante la emergencia de RLs.

6. DISCUSIÓN

Las CKs actúan modulando la emergencia de los PRL vía AZG2

Como todo proceso de desarrollo, la formación de RLs está sujeta a una fina regulación hormonal, siendo el balance auxinas-CKs uno de los principales puntos de control (Fukaki & Tasaka, 2009; Bielach et al., 2007). En el caso de las CKs, se ha demostrado que esta hormona actúa como un regulador negativo del desarrollo de RLs, fundamentalmente debido a su acción durante la iniciación y el desarrollo de los PRL (Laplaze et al., 2007; Bielach et al., 2012; Chandler & Werr, 2015).

Estudios recientes realizados por este grupo de trabajo han demostrado la importancia del transportador de CKs, AZG2, en la formación de RLs. Al analizar el fenotipo radical, se determinó que plantas KO para este gen presentan una mayor densidad de RL respecto al genotipo salvaje. Esto indica que AZG2 tendría una función clave en la señalización por CKs durante el desarrollo de RLs aunque no se ha estudiado cuál de las etapas resulta particularmente afectada (Tessi, 2013; datos de tesina no publicados).

Por otro lado, ha sido demostrado que las CKs alteran la progresión del desarrollo de los PRL provocando cambios en la distribución de los estadios (Laplaze et al., 2007). Específicamente, el tratamiento con CKs aumenta la proporción de primordios en estadios IV y V y disminuye la proporción de PRL más avanzados.

Teniendo en cuenta ambos estudios, se planteó la hipótesis de que las CKs actúan modulando la etapa de emergencia durante la formación de RLs y su transporte mediado por AZG2 es parte importante de este mecanismo regulador.

Es por ello que se estudió el índice de emergencia y la densidad de los diferentes estadios de desarrollo en plántulas Col-0 y *azg2-1* crecidas tanto en condiciones control como bajo tratamiento con CKs. En primer lugar, la disminución del índice en el genotipo salvaje causada por la exposición a CKs permite asignar un rol a esta hormona durante la emergencia de los PRL (Figura 18). En segundo lugar, el aumento detectado tanto en el índice de emergencia (Figura 18) como en la densidad de estadios VI, VII y VIII para los

mutantes *azg2-1* (Figura 19) indica que este transportador formaría parte del mecanismo regulador de la emergencia de los PRL mediado por CKs.

Las CKs modulan el remodelado de pared celular en los TCs durante la emergencia de RL

Se ha demostrado que el desarrollo morfológico de los PRL, además de depender del patrón de divisiones celulares que en ellos ocurren, está fuertemente asociado a las propiedades mecánicas de los TCs (Lucas et al., 2013). Esto indica que la coordinación de procesos entre los PRL y los TCs es fundamental para la correcta emergencia.

Teniendo en cuenta entonces que los TCs cumplen una función importante en la emergencia de los PRL, el efecto de las CKs sobre la progresión del desarrollo de los PRL y destacando la localización restringida de *Azg2* en células corticales de estos tejidos, se hipotetizó que el rol de las CKs durante esta etapa podría estar asociado a cambios en las propiedades de las paredes celulares de los TCs. Es por ello que se recurrió a la tinción con IP, mediante la cual se analizó la intensidad de fluorescencia en las paredes de TCs a PRL de estadios V, VI y VII.

En primer lugar, el tratamiento con CKs provocó un aumento en la tinción en el genotipo salvaje, lo cual indica la exposición a esta hormona disminuye la degradación de pared celular en estos tejidos (Figura 20). Esto permite confirmar que el rol de las CKs durante la emergencia de los PRL estaría asociado al remodelado de pared celular en los TCs.

Por otro lado, los mutantes crecidos en medio control presentaron menor intensidad de fluorescencia en las paredes analizadas, indicando un aumento en la degradación de componentes de la pared celular durante la emergencia de los PRL en los genotipos *azg2-1* y *azg2-2* (Figura 20). Sin embargo, se ha detectado un aumento significativo en la tinción en las líneas mutantes sometidas a tratamiento con CKs, aunque no lo suficientemente elevado como para alcanzar el aumento causado por esta hormona en el genotipo salvaje (Figura 20). Esta reducción parcial del efecto causado por CKs en las líneas KO podría explicarse de dos formas alternativas, aunque no excluyentes. En primer lugar, podría indicar que el transporte de CKs mediado por *AZG2* actuaría modulando el remodelado de pared celular en células corticales y epidérmicas durante la emergencia de RL, aunque posiblemente exista otra forma de transporte involucrada en el proceso.

En concordancia con esta explicación, estudios recientes han caracterizado la importancia de dos transportadores de CKs, ABC14 (ATP-Binding Cassette 14) y PUP14 (Purine Permease 14), durante el crecimiento y desarrollo de *A. thaliana* (Kang et al., 2017). En segundo lugar, existe una gran diversidad de mecanismos de remodelado de pared celular por lo que la diferencia observada en los mutantes bajo tratamiento con CKs podría deberse a que AZG2 podría estar implicado en la regulación de algunos de ellos pero no de la totalidad de los mismos.

Las CKs regulan la expresión de Expa17 y Xtr6

Las plantas hacen uso de un conjunto de enzimas conocidas como ERPC para modificar las propiedades de las paredes celulares y permitir a esta estructura cumplir con su gran abanico de funciones.

Durante la formación de RLs, las auxinas inician una cascada de señalización que culmina con la inducción de varios genes de ERPC promoviendo así la emergencia de los PRL (Kumpf et al., 2013; Lee et al., 2015; Swarup et al., 2008). Teniendo en cuenta todo lo mencionado previamente y el hecho de que las CKs actúan como hormonas antagónicas a las auxinas en diferentes procesos de desarrollo, se planteó la hipótesis de que las CKs modulan la remodelación de tejidos durante la emergencia de RLs mediante la regulación de la expresión de ERPC en los TCs.

Debido a su patrón de expresión génica y a su reportada inducción por auxinas durante el desarrollo de RLs, se seleccionó a *Expa17* y *Xtr6* como genes candidatos para analizar los cambios en su expresión debidos al tratamiento con CKs. La información recolectada en bases de datos sobre la regulación hormonal de ambos genes de ERPC permite concluir que la expresión génica de *Expa17* está fuertemente sujeta a la regulación por CKs (Figura 22) mientras que el efecto de esta hormona sobre *Xtr6* no resulta tan claro (Figura 26). Sin embargo, como se mencionó previamente, estos datos fueron obtenidos utilizando plántulas enteras como muestras. Es por ello que para estudiar con mayor certeza qué sucede con la expresión en raíz bajo tratamiento con CKs, se generaron constructos donde los genes reporteros *GUS* y *GFP* fueron colocados secuencialmente bajo el control de los promotores endógenos de la respectivas ERPC y

los mismos se utilizaron para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* de genotipo Col-0.

En el caso de *Expa17*, la señal de ambos reporteros en raíz fue detectada en células de los TCs y en la transición entre la zona de elongación y la zona meristemática (Figura 23.A-C, 24.A-B). Cabe destacar que, a diferencia de la tinción de GUS, la cual pudo ser detectada desde estadios tempranos en el desarrollo de los PRL, la señal de GFP se observó únicamente en primordios avanzados. Esto podría deberse a la mayor amplificación de la señal debida a la actividad de la beta glucoronidasa. El tratamiento con CKs provocó una disminución de la expresión de ambos reporteros, indicando que esta hormona actuaría regulando negativamente los niveles de *Expa17* en raíz durante la emergencia de RLs (Figura 23.D-F, 24.C-D).

En cuanto a *Xtr6*, la señal fue detectada en cilindro vascular, periciclo, células endodérmicas de los TCs y PRL (Figura 27.A-C). Resulta importante mencionar que en estudios previos donde se analizó la expresión de *pXtr6:GUS* la tinción detectada en TCs correspondía a células epidérmicas y corticales y que no se había observado expresión en células de los PRL propiamente dichos. Estas diferencias podrían deberse al largo de los promotores utilizados para llevar a cabo el estudio (aproximadamente 1 kb en Swarup et al., 2008 y 1524 pb en esta tesina). El hecho de que este gen se exprese en los PRL podría indicar un papel activo de los mismos en la regulación de su emergencia, sintetizando esta enzima y luego secretándola hacia los TCs, facilitando así la remodelación local de pared celular a medida que el primordio va atravesando las diferentes capas de la raíz principal. El patrón observado mediante la señal de GFP no resultó tan claro como en el caso del primer reportero, aunque sí se destaca una mayor intensidad de señal en los alrededores de los PRL (Figura 28.A y 28.B). Nuevamente, esto podría explicarse por la mayor sensibilidad de la tinción de GUS respecto a la proteína fluorescente.

El tratamiento con CKs provocó una disminución de la expresión de ambos reporteros, indicando que esta hormona actuaría regulando negativamente los niveles de *Xtr6* en raíz durante la emergencia de RLs (Figura 27.D-E y 28.C-D). La ausencia de cambios en la tinción observada en zonas cercanas al tip de la raíz principal bajo tratamiento hormonal podría deberse a que la señal de CKs se encuentra fuertemente reprimida en el cilindro vascular y periciclo del meristema basal (Bielach, et al., 2012).

El hecho de que el tratamiento con CKs exógenas provoque cambios equivalentes en la expresión de ambos genes analizados podría indicar la existencia de un mecanismo regulatorio general mediado por esta hormona. Así, las CKs actuarían en forma antagónica a las auxinas (Péret et al., 2009a) regulando negativamente los niveles de expresión de ERPC durante la emergencia de los PRL.

AZG2 está involucrado en la regulación de la expresión de Expa17 y Xtr6 dependiente de CKs

Debido a la alta similitud observada en los patrones de expresión génica de *Expa17* y *Xtr6* con *Azg2* (Lee & Kim, 2013; Swarup et al., 2008; Tessi, 2013), se llevaron a cabo dos aproximaciones diferentes para determinar la importancia de este transportador en la regulación de la expresión de las ERPC. En primer lugar, se analizó el solapamiento de la expresión de las ERPC y el transportador utilizando las proteínas fluorescentes GFP y RFP respectivamente. En segundo lugar, los reporteros *pExpa17:GUS:GFP* y *pXtr6:GUS:GFP* también se utilizaron para transformar plantas de genotipo *azg2-1*.

En el caso de *Expa17*, se detectó un escaso solapamiento con el patrón de expresión de *Azg2* siendo la localización de *Expa17* notablemente más superficial que la del transportador (Figura 29.A). Por otro lado, se observó que el efecto de AZG2 depende del estadio de desarrollo analizado. Así, la señal de los reporteros observada para estadios tempranos (III-IV; Figura 30.A y 30.B) y en primordios ya emergidos no mostró grandes diferencias con el genotipo salvaje (Figura 31.B y 31.D), e incluso se detectó una disminución en la tinción de GUS en estadios tempranos causada por el tratamiento con CKs (Figura 30.C). Esto indicaría que, aunque las CKs modulan la expresión de *Expa17* desde los primeros estadios de desarrollo y posterior a la emergencia de los PRL, AZG2 no formaría parte importante del mecanismo regulador durante estas etapas.

Sin embargo, se detectó un notable aumento en la expresión de ambos reporteros en TCs a primordios de estadios avanzados (VII-VIII) respecto al genotipo salvaje (30.D-E, 31.A y 31.C), demostrando que AZG2 adquiere importancia como parte del mecanismo regulador de la expresión de esta ERPC en PRL próximos a emergencia. El tratamiento con CKs en plantas *azg2-1* provocó una disminución de la tinción de GUS en estos estadios

respecto al medio control, señalando nuevamente que AZG2 podría no ser el único transportador involucrado en la regulación de la señal de CKs durante este proceso (Figura 30.F).

En cuanto a *Xtr6*, el análisis de co-localización revela el solapamiento en los patrones de expresión de *Xtr6* y *Azg2* aparentemente en células corticales y endodérmicas (Figura 29.B y 29.C). En cuanto a los reporteros GUS y GFP, se observó una mayor expresión de ambos en plantas *azg2-1* respecto al genotipo Col-0 y el tratamiento con CKs no modificó la tinción de GUS en el genotipo mutante (Figura 32.A-C y 33). Además, en estas plantas, la expresión pudo ser detectada incluso en células corticales y epidérmicas (Figura 32.E y 33.D-F). En cuanto a la señal observada en los PRL en sí, los mutantes no mostraron cambios relacionados al avance a través de los diferentes estadios de desarrollo (Figura 32 y 33). Todos estos datos demuestran que AZG2 cumple un rol importante en la regulación de la expresión de *Xtr6* mediada por CKs durante todos los estadios de desarrollo de los PRL.

Tomados en conjunto, los datos de expresión de ambos genes en mutantes *azg2-1* indican la participación de AZG2 en el mecanismo regulador de la expresión de ERPC mediado por CKs durante la emergencia de RLs. Se podría comparar entonces la actividad de AZG2 con la del transportador de auxinas LAX3. Mientras que LAX3 transporta auxinas hacia los TCs induciendo una cascada de señalización que culmina con el aumento de la expresión de genes de ERPC (Lee et al., 2015; Swarup et al., 2008), AZG2 actuaría como la contracara de este proceso. Así, AZG2 intervendría transportando CKs hacia estos tejidos, donde su percepción provoca un efecto inhibitor sobre la remodelación de las paredes celulares.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuyen a profundizar los conocimientos sobre los mecanismos de regulación hormonal a los cuales está sujeto el desarrollo de RLs. Específicamente, los aportes están dirigidos a la comprensión de los mecanismos regulatorios ligados al transporte de hormonas en los TCs y al efecto sobre las propiedades de sus paredes celulares.

7. CONCLUSIÓN

En el presente trabajo se logró determinar un rol adicional para las CKs durante la formación de RL, demostrando su importancia durante la etapa de emergencia de los PRL. Concretamente, esta hormona actuaría como contraparte de las auxinas, modulando el remodelado de pared celular mediante la regulación la expresión de *Expa17* y *Xtr6* en los TCs.

Adicionalmente, se determinó la participación de AZG2 durante este proceso, actuando como modulador de la señal de CKs. Específicamente, el transportador formaría parte importante del mecanismo regulador de la expresión de *Xtr6* durante todas las etapas del desarrollo y la emergencia de los PRL, mientras que su acción en la regulación de *Expa17* cobraría importancia en estadios próximos a la emergencia de los mismos.

Finalmente, se concluye que podría existir un mecanismo general mediante el cual las CKs regulan la expresión de distintas ERPC durante la emergencia de RLs, con AZG2 actuando como modulador de la señal de esta hormona en los TCs.



8. AGRADECIMIENTOS

La realización de este trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración de los integrantes de la Cátedra de Fisiología Vegetal, Dr. Marcelo Desimone, Dr. Claudio A. Gonzalez, Dr. Ramiro Lascano, Dra. Laura Saavedra, Dr. Santiago Otaiza, los doctorandos Biol. Carolina Martini y Biol. Alejandro Enet, y el Dr. Ignacio Lescano (CIQUIBIC). Se agradece especialmente al doctorando Biol. Tomás Tessi por su tutela, seguimiento y colaboración durante todo el proceso. También se agradece al Instituto de Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV) y en especial a la Dra. Alejandra Trenchi, al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y la ayuda del Dr. Leonardo Ortega y el Dr. Germán Robert. Finalmente se agradece al Consejo Interuniversitario Nacional por el otorgamiento de la beca EVC durante el período 2017-2018.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Atkinson, J. A., Rasmussen, A., Traini, R., Voß, U., Sturrock, C., Mooney, S. J., . . . Bennett, M. J. (2014). Branching out in roots: uncovering form, function, and regulation. *Plant Physiology*, *166*, 538–550.
- Bellini, C., Pacurar, D. I., & Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, *65*, 639–666.
- Berckmans, B., Vassileva, V., Schmid, S. P., Maes, S., Parizot, B., Naramoto, S., . . . De Veylder, L. (2011). Auxin-Dependent Cell Cycle Reactivation through Transcriptional Regulation of Arabidopsis E2Fa by Lateral Organ Boundary Proteins. *The Plant Cell*, tpc-111.
- Berg, G. (2009). Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Applied microbiology and biotechnology*, *84*(1), 11-18.
- Bielach, A., Podlešáková, K., Marhavý, P., Cuclercq, J., Cuesta, C., Müller, B., . . . Benková, E. (2012). Spatiotemporal Regulation of Lateral Root Organogenesis in Arabidopsis by Cytokini. *The Plant Cell*, *24*, 1-15.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., . . . Bennet, M. J. (2003). Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in plant science*, *8*(4), 165-171.
- Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., . . . Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell*, *13*(4), 843-852.
- Chandler, J. W., & Werr, W. (2015). Cytokinin-auxin crosstalk in cell type specification. *Trends in Plant Science*, *20*(5), 291-300.
- De Rybel, B., Vassilleva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., . . . Beeckman, T. (2010). A Novel Aux/IAA28 Signaling Cascade Activates GATA23-Dependent Specification of Lateral Root Founder Cell Identity. *Current Biology*, *20*(19), 1697-1706.

- De Smet, I., Tetsumura, T., De Ryel, B., Frei dit Frey, N., Laplace, L., Casimiro, I., . . . Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, *134*(4), 681-690.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., & Scheres, B. (1993). Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development*, *119*(1), 71-84.
- Du, Y., & Scheres, B. (2017). Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *Journal of Experimental Botany*.
- Dubrovsky, J. G., Doerner, P. W., Colón-Carmona, A., & Rost, T. L. (2000). Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. . *Plant physiology*, *124*(4), 1648-1657.
- 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. . *Annals of botany*, *97*(5), 903-915.
- 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), 30-36.
- Eklöf, J. M., & Brumer, H. (2010). The XTH Gene Family: An Update on Enzyme Structure, Function, and Phylogeny in Xyloglucan Remodeling. *Plant Physiology*, *153*, 456-466.
- Flores, H. E., Vivanco, J. M., & Loyola-Vargas, V. M. (1999). 'Radicle'biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends in plant science*, *4*(6), 220-226.
- Fukaki, H., & Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, *69*, 437-449.
- Gautam, V., Singh, A., Verma, S., Kumar, A., Kumar, P., Mahima, . . . Sarkar, A. K. (2017). Role of miRNAs in root development of model plant *Arabidopsis thaliana*. *Indian Journal of Plant Physiology*, 1.11.

- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., & Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development*, *139*, 883-893.
- Grossman, J. D., & Rice, K. J. (2012). Evolution of root plasticity responses to variation in soil nutrient distribution and concentration. *Evolutionary Applications*, *5*(8), 850-857.
- Hodge, A. (2006). Plastic plants and patchy soils. *Journal of Experimental Botany*, *57*, 401-411.
- Jung, J. K., & McCouch, S. R. (2013). Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 186.
- Kang, J., Lee, Y., Sakakibara, H., & Martinoia, E. (2017). Cytokinin transporters: GO and STOP in signaling. *Trends in plant science*, *22*(6), 455-461.
- Kumpf, R. P., Shi, C.-L., Larrieu, A., Stø, I. M., Butenko, M. A., Péret, B., . . . Aalen, R. B. (2013). Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*, 5235-5240.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., . . . Bennett, M. (2007). Cytokinins Act Directly on Lateral Root Founder Cells to Inhibit Root Initiation. *The Plant Cell*, *19*, 3889-3900.
- Laskowski, M. J., 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 biology*, *6*(12), e307.
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M., De Smet, I., . . . Laplaze, L. (2013). Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science*, *18*(8), 450-458.
- Lee, D. J., Park, J.-Y., Ku, S.-J., Ha, Y.-M., Kim, S., Kim, M. D., . . . Kim, J. (2006). Genome-wide expression profiling of ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR 7 (ARR7)

- overexpression in cytokinin response. *Molecular Genetics and Genomics*, 277(2), 115-137.
- Lee, H. W., & Kim, J. (2013). EXPANSINA17 Up-Regulated by LBD18/ASL20 Promotes Lateral Root Formation During the Auxin Response. *Plant Cell Physiology*, 54(10), 1600-1611.
- Lee, H. W., Cho, C., & Kim, J. (2015). Lateral Organ Boundaries Domain16 and 18 Act Downstream of the AUXIN1 and LIKE-AUXIN3 Auxin Influx Carriers to Control Lateral Root Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 168, 1792-1806.
- Li, X., Mo, X., Shou, H., & Wu, P. (2006). Cytokinin-Mediated Cell Cycling Arrest of Pericycle Founder Cells in Lateral Root Initiation of Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, 47(8), 1112-1123.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., & Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 280–287.
- Lucas, M., Kenobi, K., Von Wangenheim, D., Voß, U. S., De Smet, I., Van Damme, D., . . . Bennett, M. J. (2013). Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(13), 5229–5234.
- Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment*, 28, 67-77.
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development*, 124, 33-44.
- Marhavý, P., Vanstraelen, M., De Rybel, B., Zhaojun, D., Bennett, M. J., Beeckman, T., & Benková, E. (2013). Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *The EMBO Journal* 32, 149–158.
- Marowa, P., Ding, A., & Kong, Y. (2016). Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Rep.* 35, 949-965.

- Osmont, K. S., Sibout, R., & Hardtke, C. S. (2007). Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology*, *58*, 93–113.
- Pacheco-Villalobos, D., & Hardtke, C. S. (2012). Natural genetic variation of root system architecture from *Arabidopsis* to *Brachypodium*: towards adaptive value. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1595), 1552-1558.
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplace, L., . . . Bennett, M. J. (2009b). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, *14*, 399-408.
- Péret, B., Larrieu, A., & Bennet, M. J. (2009a). Lateral root emergence: a difficult birth. *Journal of Experimental Botany*, *60*(13), 3637-3643.
- Péret, B., Middleton, A. M., French, A. P., Larrieu, A., Bishopp, A., Njo, M., . . . Bennett, M. J. (2013). Sequential induction of auxin efflux and influx carriers regulates lateral root emergence. *Molecular systems biology*, *9*(1), 699.
- Philippot, L., Raaijmakers, J., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 789–799.
- Pires, N. D., & Dolan, L. (2012). Morphological evolution in land plants: new designs with old genes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *367*(1588), 508-518.
- Raven, J. A., & Edwards, D. (2001). Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance. *Journal of Experimental Botany*, *52*(suppl_1), 381-401.
- Roberts, I., Smith, S., Stes, E., De Rybel, B., Staes, A., Van De Cotte, B., . . . Audenaert, D. (2016). CEP5 and XIP1/CEPR1 regulate lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, *67*(16), 4889-4899.
- Roberts, J. A., Elliott, K. A., & Gonzalez-Carranza, Z. H. (2002). Abscission, dehiscence, and other cell separation processes. *Annual Review of Plant Biology*, *53*(1), 131-158.

- Rose, J. K., Braam, J., Fry, S., & Nishitani, K. (2002). The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature. *Plant Cell Physiology*, *43*(12), 1421-1435.
- Rounds, C. M., Lubeck, E., Hepler, P. K., & Lawrence, J. W. (2011). Propidium Iodide competes with Ca²⁺ to label pectin in pollen tubes and Arabidopsis root hairs. *Plant Physiology*, *157*, 175-187.
- Sampedro, J., & Cosgrove, D. J. (2005). The expansin superfamily. *Genome Biology*, *6*(12), 242.
- Shing Yiing, T. S., Wei Seng, H., Shek Ling, P., & Jusoh, I. (2014). Bioinformatics Analysis of Xyloglucan Endotransglycosylase/Hydrolase (XTH) Gene from Developing Xylem of a Tropical Timber Tree Neolamarckia Cadamba. *American Journal of Bioinformatics*, *3*(1), 1-16.
- Singh, A., Kumar, P., Gautam, V., Rengasamy, B., Adhikari, B., Udayakumar, M., & Sarkar, A. K. (2016). Root transcriptome of two contrasting indica rice cultivars uncovers regulators of root development and physiological responses. *Scientific reports*, *6*, 39266.
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol*, *11*, 118-130.
- Stoeckle, D., Thellmann, M., & Vermeer, J. E. (2018). Breakout - lateral root emergence in Arabidopsis thaliana. *Current Opinion in Plant Biology*, *41*, 67-72.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., . . . Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, *10*, 946–954.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal, Tercer edición (Vol II)*. Castelló de la Plana: Publicaciones de la Universitat Jaume I.
- Tessi, T. M (2013) Rol del transportador AtAZG2 en la señalización por citocininas durante el desarrollo del sistema radical de Arabidopsis thaliana. *Tesina de grado*. FCEFYN, Universidad Nacional de Córdoba.



- Vermeer, J. E., von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, E. H., Maizel, A., & Geldner, N. (2014). A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in Arabidopsis. *Science*, *343*, 178-183.
- Vilches-Barro, A., & Maizel, A. (2015). Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in Arabidopsis thaliana. *Current Opinion in Plant Biology*, *23*, 31-38.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G. V., & Provart, N. J. (2007). An “Electronic Fluorescent Pictograph” Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PloS one*, *2(8)*, e718.
- Yokoyama, R., & Nishitani, K. (2001). A comprehensive expression analysis of all members of a gene family encoding cell-wall enzymes allowed us to predict cis-regulatory regions involved in cell-wall construction in specific organs of Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, *42(10)*, 1025-1033.