

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**Participación de los factores de  
transcripción de la familia HD-Zip I en la  
determinación de la arquitectura radicular  
de *Arabidopsis thaliana***

Lic. María Florencia Perotti

Directora de Tesis: Dra. Raquel L. Chan  
Co-director de Tesis: Dr. Federico D. Ariel

Laboratorio de Biotecnología Vegetal  
Instituto de Agrobiotecnología del Litoral

**-2021-**

## Agradecimientos

*“La Educación Pública es siempre una buena inversión  
que todas las sociedades deben hacer”*

León Max Lederman  
Premio Nobel de Física 1988

*A las Instituciones Públicas que hicieron posible que este trabajo de Tesis se lleve a cabo...*

A la Universidad Nacional del Litoral y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, a todas sus autoridades y profesionales que forman parte de esta prestigiosa Casa de Estudios, por permitir mi formación tanto profesional como personal durante mi carrera de grado y posgrado.

A los organismos que financiaron los proyectos que hicieron posible este trabajo de Tesis: al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

Al Instituto de Agrobiotecnología del Litoral, por brindarme un espacio de trabajo e introducirme en la comunidad científica.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por otorgarme la beca para realizar el doctorado.

Al Centro Argentino-Brasileño de Biotecnología (CABBIO) por otorgarme la beca para realizar un curso de Posgrado en Brasil.

Y especialmente quiero agradecer a mi país y a todas las Instituciones Educativas Públicas que permitieron mi educación desde los inicios hasta mi formación de posgrado.

*A mis formadores durante este trayecto...*

A la Dra. Raquel L. Chan por haber aceptado el compromiso de formarme científicamente, y acompañarme durante este trayecto, por confiar en mí y enseñarme su vocación científica.

Al Dr. Federico D. Ariel por guiarme y allanarme el camino del maravilloso mundo de las raíces, por su entusiasmo contagioso y su apoyo frente a nuevas ideas y desafíos científicos.

Al Dr. Agustín Arce por ayudarme y brindarme todos sus conocimientos de bioinformática, y su buena predisposición para alcanzar el grafico deseado.

Al Dr. Carlos Figueroa por su predisposición para colaborar y encontrarle la vuelta a mi trabajo con las enzimas del universo del almidón.

*A los que forman parte del LBV y del IAL...*

A Virgi, mi primera amiga de la facultad, mi compañera de tesina y de doctorado, por su apoyo y cariño incondicional, por sus consejos y por las charlas de toda índole que tuvimos durante largas jornadas laborales y extralaborales.

A Jesi y Juli, nuestras “hermanas mayores”, por sus consejos y apoyo incondicional, por sus risas y buenas energías durante las largas jornadas laborales.

A Pame, Kari y Javi, por sus aportes científicos diarios y su ayuda cada vez que se me quemaron los papeles en el lab.

A las pibas de la mesada, Cati, Lore, Fio, Vale, y al reciente Juani por los momentos compartidos de charlas científicas y no tan científicas, por la complicidad en el día a día.

A Pablo Ortiz, por su paciencia en cada cambio de luces que le pedí para mis raíces.

*A las amistades de ayer, de hoy y de siempre...*

A mis amigas de la infancia, a mis amigos de la facultad y a los del doctorado, y las nuevas amistades extracurriculares, por cada charla desinteresada de la vida o discusión académica que le dio un carisma diferente a este trayecto...

*Al amor incondicional de mi familia...*

A Daniel y Analía, mis papas, los pilares de mi vida, por confiar en mí y enseñarme que con esfuerzo y dedicación se llega.

A Pablo, el otro pilar, que con su amor incondicional de hermano menor me dio fuerzas en cada momento que lo necesite.

A Mateo, mi compañero de la vida, mi cable a tierra, por su compañía y paciencia infinita, por estar siempre y confiar en mí.

*“Cuando no queda luz, hay estrellas  
que están cubriendo el espacio vacío...”*

*A ellas*

*A los que estuvieron siempre, a los que están  
y siempre estarán, mi familia...*

## Publicaciones

El presente trabajo de Tesis fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL, UNL-CONICET). Los resultados obtenidos dieron lugar a las siguientes publicaciones científicas en revistas internacionales con referato estricto:

**Perotti MF.**, Arce AL., Chan RL. (2021) The underground life of homeodomain-leucine zipper transcription factors. *Journal of Experimental Botany*, 72: 4005 –4021.

**Perotti MF.**, Ariel FD., Chan RL. (2020) Lateral root development differs between main and secondary roots and depends on the ecotype. *Plant Signaling & Behavior*, 15:1755504

**Perotti MF.**, Ribone PA, Cabello JV., Ariel FD., Chan RL. (2019) AtHB23 participates in the gene regulatory network controlling root branching and reveals differences between secondary and tertiary roots. *The Plant Journal*, 100: 1224-1236.

**Perotti MF.**, Ribone PA, Chan RL. (2017) Plant Transcription Factors from the Homeodomain-Leucine Zipper Family I. Role in Development and Stress Responses. *IUBMB Life*, 69:280-289.

# ÍNDICE

<b>Publicaciones</b> .....	<b>4</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>10</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>12</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>14</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>17</b>
1.1 ¿Por qué las plantas? Características generales de la estructura y el crecimiento vegetal	17
1.2 ¿Por qué <i>Arabidopsis thaliana</i> como planta modelo de estudio?.....	20
1.3 El sistema radicular de una planta.....	22
1.4 Organización tisular de una raíz: componentes y funciones .....	24
1.5 Formación y desarrollo de raíces laterales en <i>Arabidopsis</i> .....	26
1.6 Interacciones hormonales durante la formación de raíces laterales.....	29
1.6.1 Las auxinas en la iniciación y desarrollo del primordio de raíz lateral .....	30
1.6.2 Las auxinas activan las células del periciclo en el meristema basal .....	31
1.6.3 Las auxinas controlan las divisiones asimétricas durante el inicio de la raíz lateral .....	33
1.6.4 El papel de las auxinas en la organización tisular del primordio de raíz lateral .....	33
1.6.5 Las auxinas permiten la emergencia del primordio de la raíz lateral .....	34
1.6.6 Las citoquininas regulan negativamente la formación de la raíz lateral.....	35
1.6.7 Los brasinoesteroides promueven la formación de la raíz lateral.....	36
1.6.8 Interacciones entre etileno y auxinas en el desarrollo del primordio de raíz lateral .....	37
1.6.9 El ácido abscísico regula negativamente la emergencia de la raíz lateral.....	38
1.7 Desarrollo de la arquitectura radicular bajo estrés salino.....	40
1.8 El gravitropismo en la raíz involucra las auxinas .....	42
1.9 El gravitropismo de la raíz se afecta por distintos tipos de estrés .....	44
1.10 Regulación de la expresión génica en el desarrollo vegetal.....	45
1.10.1 Los Factores de Transcripción de plantas .....	45

1.10.2 Factores de transcripción de la familia Homeodominio-cierre de leucinas .....	46
1.10.3 Factores de transcripción de la subfamilia HD-Zip I: características y funciones .....	47
1.10.4 Función de los factores de transcripción HD-Zip I en raíces de Arabidopsis.....	50
1.11 Regulación génica específica del desarrollo radicular .....	53
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>54</b>
2.1 Objetivo general .....	54
2.1.1 Objetivos específicos.....	54
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>56</b>
3.1 MATERIALES.....	56
3.1.1 Cepas bacterianas.....	56
3.1.2 Especies vegetales.....	56
3.1.3 Medios de cultivo.....	56
3.1.4 Vectores .....	57
3.1.5 Plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	57
3.1.6 Oligonucleótidos .....	58
3.1.7 Construcciones genéticas para plantas .....	61
3.1.7.1 Construcciones para expresar un promotor específico .....	61
3.1.7.2 Construcciones para expresar un gen de interés bajo su promotor .....	61
3.2 MÉTODOS .....	61
3.2.1 Métodos utilizados para el trabajo con ácidos nucleicos.....	61
3.2.1.1 Transformación de bacterias por electroporación .....	61
3.2.1.2 Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos .....	62
3.2.1.2.1 Minipreparación de ADN plasmídico.....	62
3.2.1.2.2 Minipreparación de ADN genómico de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	63
3.2.1.2.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa .....	63
3.2.1.2.4 Extracción y purificación de ARN total .....	64

3.2.1.2.5 Cuantificación de ácidos nucleicos totales.....	64
3.2.1.3 Reacciones Enzimáticas.....	64
3.2.1.3.1 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.....	64
3.2.1.3.2 Ligación de moléculas de ADN.....	64
3.2.1.3.3 Reacción de recombinación GATEWAY® .....	65
3.2.1.3.4 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa.....	65
3.2.1.3.5 Transcripción reversa de ARN total .....	66
3.2.1.4 Análisis de ácidos nucleicos .....	66
3.2.1.4.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	66
3.2.1.4.2 Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes .....	66
3.2.1.4.3 Cuantificación de transcritos de PCR en tiempo real .....	67
3.2.1.4.4 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN.....	67
3.2.1.4.5 Análisis de las secuencias.....	68
3.2.1.4.6 Inmunoprecipitación de la cromatina seguido de qPCR.....	68
3.2.1.4.7 Análisis del transcriptoma por secuenciación masiva de ARN .....	68
3.2.2 Métodos utilizados para el trabajo con material vegetal.....	69
3.2.2.1 Obtención de material vegetal y condiciones de cultivo .....	69
3.2.2.1.1 Desinfección y cultivo <i>in vitro</i> de semillas de Arabidopsis.....	69
3.2.2.1.2 Cultivo de plantas en macetas.....	70
3.2.2.1.3 Transformación estable de Arabidopsis.....	70
3.2.2.1.4 Selección de transformantes de Arabidopsis .....	71
3.2.2.1.5 Selección de líneas transgénicas homocigotas de Arabidopsis .....	71
3.2.2.2 Análisis de plantas de Arabidopsis .....	72
3.2.2.2.1 Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.....	72
3.2.2.2.2 Cortes histológicos .....	72
3.2.2.2.3 Histología y microscopía electrónica.....	72

3.2.2.2.4 Medición de la longitud de raíces en plántulas.....	73
3.2.2.2.5 Cuantificación de raíces laterales en plántulas .....	73
3.2.2.2.6 Tratamientos con hormonas o salinidad en plántulas .....	74
3.2.2.2.7 Observación de amiloplastos en raíces .....	74
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>76</b>
4.1 El factor de transcripción AtHB23 cumple un papel importante y diferencial en el desarrollo de raíces secundarias y terciarias .....	76
4.1.1 El gen <i>AtHB23</i> reprime la iniciación de raíces secundarias .....	76
4.1.2 El gen <i>AtHB23</i> se regula por auxinas .....	80
4.1.3 Las plantas silenciadas <i>amiR23</i> presentan una distribución alterada de auxinas .....	82
4.1.4 AtHB23 regula la expresión de <i>LBD16</i> y <i>LAX3</i> .....	84
4.1.5 <i>LBD16</i> y <i>LAX3</i> son blancos directos de AtHB23.....	85
4.1.6 AtHB23 es el eslabón faltante entre ARF7 y los genes <i>LBD16</i> y <i>LAX3</i> .....	87
4.1.7 El gen <i>AtHB23</i> presenta patrones de expresión diferentes en raíces secundarias y terciarias .....	89
4.1.8 AtHB23 regula en forma diferencial la emergencia de raíces laterales secundarias y terciarias .....	91
4.1.9 AtHB23 regula positivamente la distribución de auxinas en raíces terciarias .....	92
4.1.10 El patrón de expresión de <i>LBD16</i> , un blanco directo de AtHB23, difiere entre la raíz principal y las raíces laterales.....	93
4.2 El desarrollo de raíces laterales depende del ecotipo.....	94
4.2.1 El desarrollo de las raíces secundarias y terciarias difiere entre los ecotipos Col 0 y Ler94	
4.3 El rol de AtHB23 en la arquitectura radicular en respuesta a la salinidad .....	96
4.3.1 La expresión de <i>AtHB23</i> está regulada por NaCl afectando la arquitectura radicular ....	96
4.3.2 El aumento de la concentración de NaCl y el tiempo de exposición afectan el crecimiento de las plantas silenciadas <i>amiR23</i> .....	98
4.3.3 La expresión de <i>AtHB23</i> se induce en la punta de la raíz en plantas tratadas con NaCl101	
4.3.4 Las plantas <i>amiR23</i> degradan completamente el almidón frente a estrés salino .....	102
4.3.5 AtHB23 regula el metabolismo del almidón frente a estrés salino.....	105

4.3.6 El análisis del transcriptoma apoya el papel de AtHB23 en el metabolismo del almidón	107
4.3.7 Las plantas silenciadas <i>amiR23</i> no pueden recuperarse del tratamiento con NaCl ni con auxinas ni con sacarosa	112
4.3.8 <i>LAX3</i> , el gen blanco de AtHB23, está regulado por NaCl en las puntas de las raíces	113
<b>5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>118</b>
5.1 AtHB23 tiene un papel clave en la determinación de los patrones genéticos que rigen el desarrollo de raíces secundarias y terciarias	118
5.2 El desarrollo de las raíces secundarias y terciarias se rige por diferentes programas génicos dependientes del genotipo	122
5.3 AtHB23 modula el metabolismo del almidón para el desarrollo radicular y la supervivencia de la planta bajo estrés salino	123
<b>6 BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>129</b>

## Abreviaturas

**35S** promotor del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor

**ADG** adenosina difosfato glucosa pirofosforilasa

**ADN** ácido desoxirribonucleico

**AHA** residuos aromáticos e hidrofóbicos de gran tamaño incrustados en un contexto ácido

**ARN** ácido ribonucleico

**ARNm** ARN mensajero

**ChIP** Inmuno-precipitación de la cromatina

**Col** ecotipo columbia

**cm** Centímetros

**dNTP** Desoxinucleótidos trifosfato (mezcla equimolar de dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

**EDTA** Ácido etilen-diamino-tetra-acético

**FTs** Factores de transcripción

**GBSS1** Sintasa 1 de gránulos de almidón unidos

**g** Gramos

**g/l** Gramos de soluto en un litro de solución

**GFP** Proteína fluorescente verde (del inglés, *Green Fluorescence Protein*)

**GUS**  $\beta$ -glucuronidasa

**h** Hora

**HD** Homeodominio

**HD-Zip** Homeodominio asociado a un motivo cierre de leucinas

**IAA** Ácido Indol-3-Acético

**IgG** Inmunoglobulina G

**LB** Luria-Bertani

**Ler** Ecotipo Landsberg erecta

**LZ** Cierre de leucinas, del inglés *Leucine Zipper*

**mg** Miligramo

**mg/l** Miligramo de soluto en un litro de solución

**miliQ** Agua calidad miliQ

**min** Minutos

**ml** Mililitro

**mM** Milimolar (milimoles/litro)

**mm** Milímetros

**mmol** Milimoles

**MS** Medio de cultivo Murashige-Skoog

**ng** Nanogramos

**pb** Pares de bases

**PCR** Reacción en cadena de la polimerasa

**PGM** Fosfoglucomutasa plastidial

**p/v** Gramos de soluto en mililitros de solución

**qPCR** Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

**RNA-Seq** Secuenciación de ARN (del inglés, *RNA Sequencing*)

**RT** Transcripción reversa

**RT-qPCR** RT seguida de PCR cuantitativa en tiempo real

**SDS** Dodecil sulfato de sodio

**SS** Sintetasas de almidón (del inglés, *Starch Synthases*)

**TAE** Tris Acético EDTA

**Tris** Tris (hidroximetil)-aminometano

**v/v** Mililitros de soluto en 100 ml de solución

**µg** Microgramos

**µM** Micromolar

**µL** Microlitros

## Resumen

La plasticidad del desarrollo vegetal, ha sido la clave en la adaptación de las plantas terrestres. Uno de los sistemas altamente plásticos es el sistema radicular, por lo que se puede modular de varias maneras a través de la promoción o inhibición del crecimiento de la raíz principal o de las raíces laterales, por medio de la formación de raíces adventicias o del aumento de los pelos radiculares. Esto hace que las plantas dependan de la modulación de la arquitectura del sistema radicular para responder a las variaciones en la estructura del suelo, la humedad, la disponibilidad de nutrientes, la aireación y la biota, así como también a condiciones ambientales como temperaturas extremas, déficit hídrico, salinidad, e inundación.

La arquitectura radicular es el resultado de la configuración espacial de raíces de diferente edad y orden. A nivel molecular, este desarrollo tisular se rige por mecanismos complejos que involucran factores regulados a diferentes niveles, dentro de los cuales el nivel transcripcional es uno de los más importantes. En *Arabidopsis*, el desarrollo de las raíces laterales está controlado principalmente por factores de transcripción (FT) que se encuentran vinculados principalmente con las auxinas. Por ejemplo, los FTs de la familia de los ARFs y los LBDs, han sido muy caracterizados como actores importantes en estos eventos.

Los miembros de la familia de FTs Homeodominio-cierre de leucinas (HD-Zip) están relacionados con las respuestas a alteraciones en las condiciones ambientales, particularmente a aquellas que generan estrés abiótico. También participan de las respuestas de estrés biótico y en el desarrollo normal. Esta familia se divide en cuatro subfamilias (I-IV), principalmente en función de sus características estructurales, como los motivos adicionales aparte de HD-Zip, su tamaño, estructura genética y patrones de expresión. La mayoría de los miembros de las cuatro subfamilias HD-Zip se expresan en tipos celulares específicos y varios individuos de cada grupo tienen asignadas funciones en el desarrollo de las raíces. En particular, una alta proporción de las proteínas estudiadas forman parte de intrincadas vías de regulación implicadas en el crecimiento y desarrollo primario de las raíces.

En este trabajo de Tesis nos propusimos estudiar la función del FT *AtHB23* miembro de la subfamilia HD-Zip I en el desarrollo radicular tanto en condiciones normales como frente a estrés abiótico.

Con este objetivo, se llevó a cabo el estudio del patrón de expresión de *AtHB23*, donde se demostró que este gen se encuentra activo transcripcionalmente en las primeras etapas de desarrollo del primordio de raíz lateral, desaparece cuando la raíz lateral emerge y se induce por las auxinas en las raíces laterales secundarias. La caracterización de las plantas silenciadas *amiR23* y sobreexpresantes de *AtHB23* indicó que este FT actúa como un regulador negativo de la formación de raíces laterales, al regular negativamente la expresión de *LBD16*, un factor clave en la iniciación de raíces laterales. Al mismo tiempo induce

directamente el gen transportador de auxinas *LAX3*. El conjunto de los resultados indica que *AtHB23* actúa como nexo entre la regulación de *LAX3* por *ARF7/19*.

Por otro lado, se demostró que *AtHB23* desempeña distintas funciones durante la formación de raíces laterales secundarias y terciarias, mostrando patrones de expresión diferenciales. *AtHB23* se expresa en el primordio de raíz lateral terciario y a lo largo de la vasculatura de la raíz lateral terciaria, mientras que se restringe a las primeras etapas del desarrollo de raíces secundarias. La evaluación de plantas silenciadas *amiR23* mostró que *AtHB23* regula diferencialmente la emergencia de raíces laterales secundarias y terciarias. Además, el patrón de distribución de las auxinas presentó diferencias entre las raíces laterales secundarias y terciarias en las plantas silenciadas *amiR23*.

A continuación, se determinó que el gen *LBD16* también se regula de forma diferencial en el sistema radicular, ya que se expresa en la punta de las raíces laterales secundarias y terciarias, pero no en las primarias. Por último, se pudo mostrar que los ecotipos Col 0 y Ler de *Arabidopsis* presentan diferencias significativas en el desarrollo de raíces laterales secundarias y terciarias. En conjunto, podemos concluir que programas genéticos diferentes gobiernan el desarrollo de las raíces secundarias y terciarias y que dichos procesos dependen del genotipo de *Arabidopsis*, conformando así la arquitectura dinámica global del sistema radicular.

El desarrollo de las raíces también se ve afectado por la salinidad, mostrando un comportamiento diferencial dependiendo de la concentración de NaCl. A bajas concentraciones de NaCl existe un mayor crecimiento de raíces laterales mientras que, a altas concentraciones ocurre lo contrario en estrecha relación con el transporte y la distribución de las auxinas. *AtHB23* resultó tener un rol clave en estos eventos regulados. Mostramos que la expresión de *AtHB23* se regula por el NaCl tanto en la raíz principal como en las raíces laterales, afectando el desarrollo radicular. En las plantas silenciadas *amiR23* se observó una severa reducción en la longitud de la raíz principal, un incremento significativo en el inicio de las raíces laterales y una baja tasa de supervivencia en condiciones de salinidad, mientras que las plantas sobreexpresantes de *AtHB23* mostraron el fenotipo opuesto. Estos defectos de desarrollo se explicaron por una alteración del metabolismo del almidón en la punta de la raíz principal de las plantas silenciadas *amiR23*. Por otro lado, se mostró que *LAX3*, el gen blanco de *AtHB23*, bajo estrés salino reprime su expresión sólo en la punta de la raíz principal. En conjunto, se concluye que *AtHB23* es vital para la supervivencia de la planta y su adaptación a las condiciones de estrés salino, y su función estaría relacionada con la respuesta gravitropica mediada por el metabolismo de gránulos de almidón, en la que interviene el transportador de auxinas *LAX3*.

## Abstract

The plasticity of plant development has been the key to explain the adaptation of terrestrial plants. Among plant organs, the roots exhibit one of the most plastic systems. Their architecture is controlled in several ways, by promoting or inhibiting the growth of the primary or the lateral roots, and through the formation of adventitious roots or the increase of root hairs. This modulation enables plants to respond to variations in soil structure, moisture, nutrient availability, aeration, and biota, as well as to environmental changes such as extreme temperatures, water deficit, salinity, and flooding.

Root architecture is the result of the spatial configuration of roots of different ages and orders. At the molecular level, this organ development is governed by complex mechanisms involving various biomolecules regulated at different levels, among which the transcriptional is one of the most important. In *Arabidopsis*, the development of lateral roots is mainly controlled by transcription factors (TFs) linked to auxins. For example, TFs of the ARF family and LBDs have been well characterized as key actors in these events.

Members of the homeodomain-leucine zipper (HD-Zip) family of TFs have been associated with responses to environmental conditions, particularly those that generate abiotic stress. Moreover, they participate in normal development and biotic stress responses. This TF family was divided into four subfamilies (I-IV), mainly based on their structural features, such as additional motifs other than HD-Zip, size, genetic structure, and expression patterns. Most members of the four HD-Zip subfamilies are expressed in specific cell types, and several individuals of each group have assigned roles in root development. In particular, a high proportion of the proteins studied are part of intricate regulatory pathways involved in primary root growth and development.

In this work, we proposed to study the function of the TF *AtHB23*, belonging to the HD-Zip I subfamily, in root development both under normal developmental conditions and in response to abiotic stress.

The study of the expression pattern of *AtHB23* revealed that this gene is transcriptionally active in the early stages of development of the lateral root secondary primordium, disappears when the lateral root emerges and is induced by auxins in the secondary lateral root. The characterization of *amiR23*-silenced and *AtHB23*-overexpressors plants indicated that this TF acts as a negative regulator of lateral root formation by repressing the expression of *LBD16*, a crucial factor in lateral root initiation. At the same time, it directly induces the auxin transporter gene *LAX3*, strongly indicating that this *AtHB23* acts as a link between the regulation of *LAX3* by ARF7/19.

On the other hand, we showed that, *AtHB23* plays distinct roles during secondary and tertiary lateral root formation, showing differential expression patterns. *AtHB23* is expressed in the tertiary lateral root primordium and throughout the tertiary lateral root vasculature, whereas it is

restricted to the early stages of secondary lateral root development. The evaluation of *amiR23*-silenced plants showed that AtHB23 differentially regulates the emergence of secondary and tertiary lateral roots. In addition, the distribution pattern of auxins significantly varies between secondary and tertiary lateral roots in *amiR23*-silenced plants.

Next, it was determined that *LBD16* is also differentially regulated in the root system, since it is expressed at the tip of the secondary and tertiary lateral roots, but not in the primary root. Finally, it could be shown that *Arabidopsis* ecotypes Col 0 and Ler show significant differences in the development of secondary and tertiary lateral roots. Overall, we conclude that different genetic programs govern the development of secondary and tertiary roots and that these processes depend on the *Arabidopsis* genotype, thus shaping the overall dynamic architecture of the root system.

Root development of lateral roots is also affected by salinity, showing differential behaviors depending on NaCl concentration. At low NaCl concentrations lateral roots grow faster while, at high concentrations, the opposite scenario takes place. The effect of NaCl in root growth is closely associated with auxin transport and distribution. AtHB23 has a crucial role in these regulated processes. We demonstrated that the expression pattern of *AtHB23* is regulated by NaCl in both primary and lateral roots, affecting root development. In *amiR23*-silenced plants, a severe reduction of primary root length, a significant increase in lateral root initiation, and a low survival rate under salinity conditions were observed, whereas *AtHB23*-overexpressor plants showed the opposite phenotype. These developmental defects correlated with an altered starch turnover in the primary root tip of *amiR23*-silenced plants. On the other hand, *LAX3*, the target gene of AtHB23, is repressed in the main root tip and not in lateral root of higher-order under salinity stress. Taken together, we concluded that AtHB23 is vital for plant survival and adaptation to salinity stress conditions, and its function would be related to the gravitropic response mediated by starch granule metabolism, in which the auxin transporter *LAX3* is involved.

# INTRODUCCIÓN

*“Una de las grandes conquistas de la ciencia es haber creado un método que actúa casi independientemente de las personas que lo siguen.”*

**Literatura y ciencia. Aldous Huxley**

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 ¿Por qué las plantas? Características generales de la estructura y el crecimiento vegetal

¿Qué son exactamente las plantas? Una planta es un organismo eucariota que depende de la fotosíntesis como medio para adquirir alimentos (también llamados organismos autótrofos) [1]. A pesar de que existen opiniones variadas entre los científicos, los principales grupos de “plantas verdes” son las algas verdes, briófitas, helechos y similares, gimnospermas, angiospermas basales y angiospermas [1]. Las plantas sirven principalmente como fuente de alimentos, de medicamentos, de muebles, de vestimenta y biocombustibles, y también juegan papeles cruciales en el mantenimiento de la salud humana y el ecosistema. Dada la enorme importancia de las plantas en la vida de los animales, incluyendo a los humanos, es fundamental comprender los mecanismos de crecimiento y desarrollo de las mismas tanto a nivel celular como molecular, así como su interacción con el entorno [2].

Durante los 475 millones de años de evolución de las plantas terrestres, las especies de plantas se han diversificado mucho [1]. Hoy en día, más de 380.000 especies habitan el mundo, ya que, a pesar de ser organismos sésiles, las plantas pueden soportar condiciones de crecimiento adversas debido a una gran variedad de mecanismos adaptativos [3]. Para lograr la adaptación, en las plantas se producen cambios morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares que se encuentran finamente regulados.

A pesar de la gran diversidad existente, todas las plantas angiospermas (plantas con flores) presentan una estructura anatómica común compuesta por cuatro órganos principales: raíces, tallos, hojas y flores. Las raíces anclan la planta al suelo y permiten la absorción de agua y minerales. Un extenso sistema vascular conecta las raíces con el resto de los órganos (Figura 1). Las hojas están unidas al tallo en los nudos, y la región del tallo entre dos nodos se denomina entrenudo. Los tallos hacen de soporte a las partes aéreas, permitiendo una máxima absorción de luz y el acceso de polinizadores como el viento, los insectos, los pájaros. Las hojas son los órganos fotosintéticos de la planta y su morfología y anatomía se han adaptado a lo largo del tiempo evolutivo para optimizar la absorción de luz y de dióxido de carbono. El papel de las flores es asegurar una polinización exitosa, al estar expuestas al viento y otros polinizadores; mientras que los frutos son responsables de la dispersión de las semillas y éstas de la perpetuidad de la especie [1].

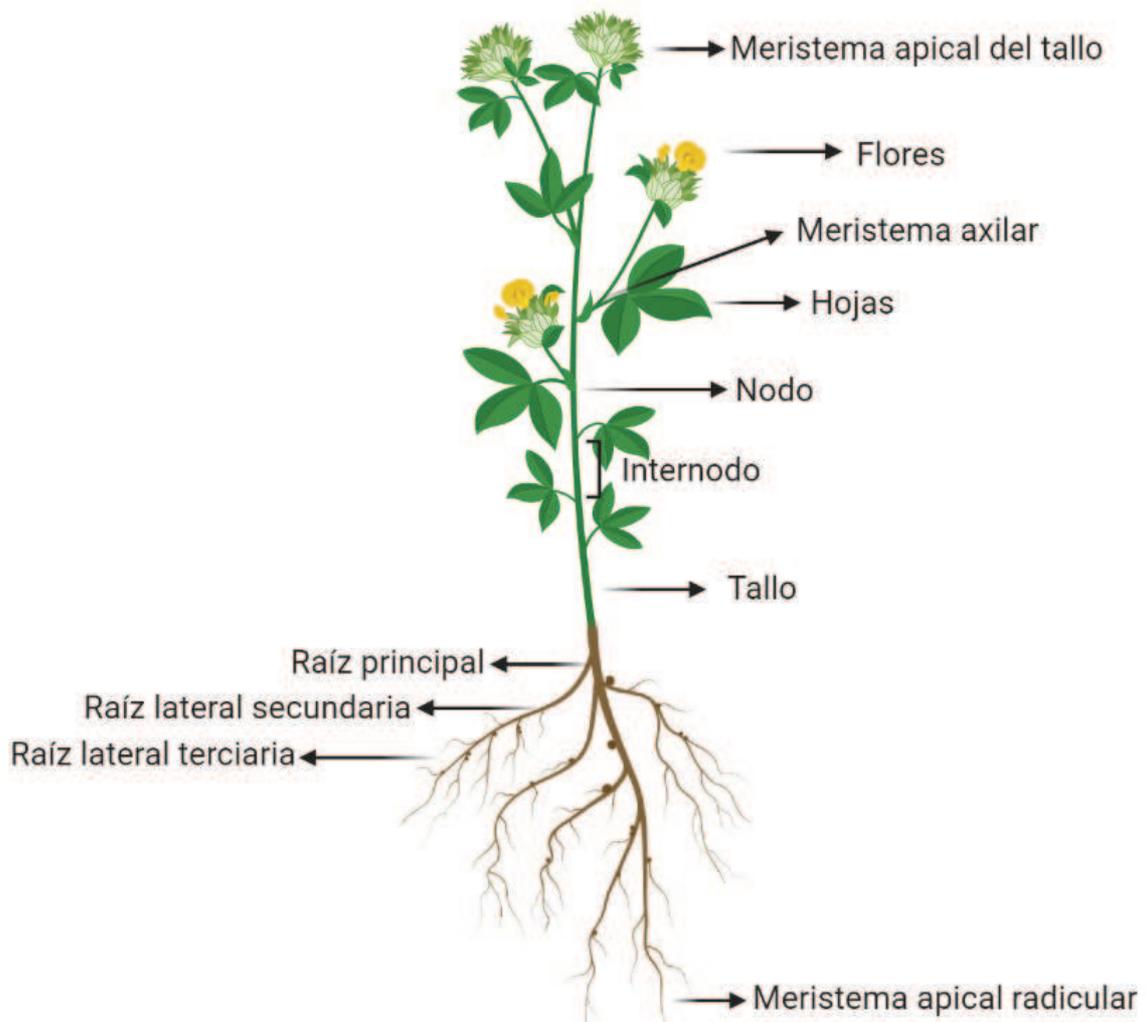
El crecimiento de las plantas es el resultado de la interacción entre distintos procesos como la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la disponibilidad de agua, de nutrientes y de minerales, así como del balance e interacción con las hormonas vegetales. Como tal deriva en un incremento en biomasa, volumen, longitud o en el área que resulta de la división,

expansión o diferenciación celular. Aun así, el crecimiento depende del contexto y del papel de diversos procesos a distintos tiempos. Por ejemplo, aunque las divisiones celulares a menudo inician el crecimiento, este proceso por sí solo es insuficiente para lograr el crecimiento. Además, el crecimiento requiere del alargamiento celular y de la deposición de masa en el citoplasma y las paredes celulares que determinan el incremento en volumen o masa. Al mismo tiempo, la tasa de crecimiento de una planta también depende de su fondo genético y del entorno en el que se encuentra [4]. Una diferencia fundamental entre las plantas y los animales es que cada célula vegetal está rodeada por una pared celular rígida. En los animales, las células embrionarias pueden migrar de un lugar a otro, lo que resulta en el desarrollo de tejidos y órganos conteniendo células que fueron originadas en diferentes partes del organismo. En cambio, en las plantas, tales migraciones celulares no se producen debido a la presencia de una laminilla media y, en consecuencia, el desarrollo de las plantas depende únicamente de patrones de división y agrandamiento celular [5].

Embriogénesis se denomina al inicio del proceso de desarrollo de una planta. Aunque la embriogénesis generalmente comienza con la unión de un espermatozoide con un óvulo, formando un cigoto unicelular; en las angiospermas, este evento se acompaña de un segundo evento de fertilización, en el que otro espermatozoide se une con dos núcleos polares para formar el núcleo del endosperma triploide, a partir del cual se desarrollará el endosperma (el tejido que suministra alimento para el embrión en crecimiento) [5]. Sin embargo, las células somáticas también pueden sufrir embriogénesis en circunstancias especiales. La embriogénesis transforma un cigoto unicelular en una planta multicelular, microscópica y embrionaria. En este sentido las plantas difieren de la mayoría de los animales ya que la embriogénesis en sí no genera directamente los tejidos y órganos del adulto. En otras palabras, un embrión vegetal tiene el plan corporal básico de la planta madura y muchos de los tipos de tejidos del adulto en forma rudimentaria, y suele consistir en un eje embrionario y dos cotiledones. La embriogénesis establece dos patrones básicos del desarrollo: 1) El patrón de desarrollo axial apical-basal; 2) El patrón radial de los tejidos encontrados en tallos y raíces [5].

La embriogénesis también establece los meristemas primarios. La mayoría de las estructuras que componen la planta adulta se genera después de la embriogénesis a través de la actividad de meristemas. Aunque estos meristemas primarios se establecen durante la embriogénesis, sólo se activan después de la germinación y comienzan a generar los órganos y tejidos del adulto [5]. Entonces, los meristemas son regiones localizadas de división celular a partir de las cuales se desarrollan los tejidos vegetales. Casi todas las divisiones nucleares (mitosis) y divisiones celulares (citocinesis) ocurren en estas regiones meristemáticas. En una planta joven, los meristemas más activos se denominan meristemas apicales y están ubicados en la punta del tallo y de la raíz (Figura 1). En los nudos, las yemas axilares

contienen los meristemas apicales para brotes de ramas. Las raíces laterales surgen del periciclo, un tejido meristemático interno. Hay zonas de alargamiento celular, proximales a (es decir, al lado de) y solapando las regiones meristemáticas, en las que las células aumentan dramáticamente en longitud y ancho. Las células generalmente se diferencian en tipos especializados después de que se alargan [5]. En resumen, las células derivadas de los meristemas apicales exhiben patrones de expansión celular específicos, y éstos determinan la forma y el tamaño general de la planta.



**Figura 1. Esquema representativo de los diferentes órganos y zonas meristemáticas presentes en una planta con flores.** Figura creada con BioRender.

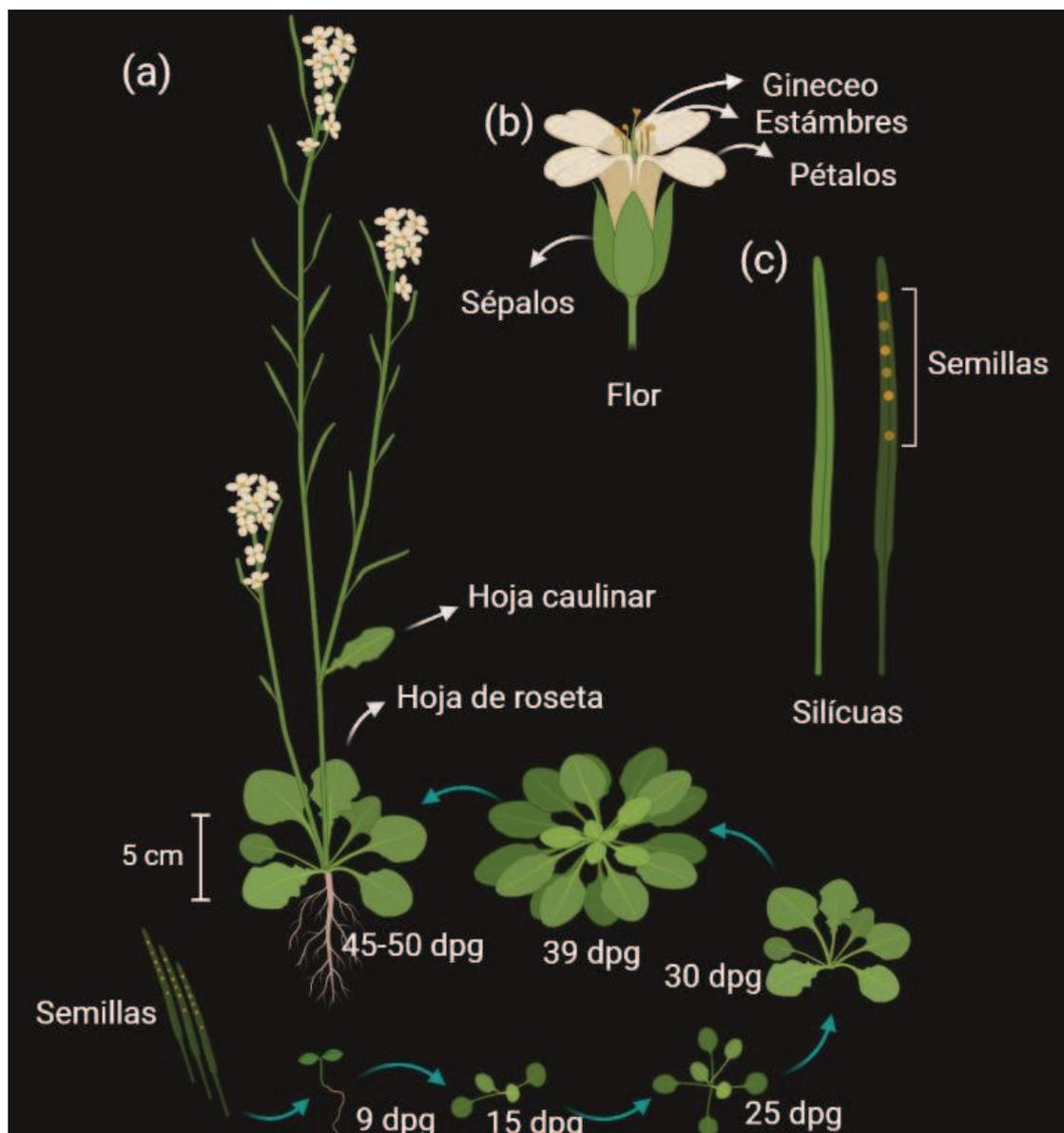
## 1.2 ¿Por qué *Arabidopsis thaliana* como planta modelo de estudio?

La planta vascular *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) constituye un modelo genético central y un organismo de referencia universal para la ciencia de las plantas por presentar muchas ventajas frente a otras especies como tabaco o tomate. Esto se debe en gran parte a su corto ciclo de vida, a su pequeño tamaño, una prolífica producción de semillas y la facilidad con que puede ser cultivada en espacios limitados [6].

*Arabidopsis* es una planta angiosperma pequeña de roseta, que pertenece a la familia taxonómica de las brasicáceas con amplia distribución natural en Europa, Asia y América del Norte. Se han recolectado diferentes ecotipos (accesiones) de poblaciones naturales y éstos se encuentran disponibles para análisis experimental. Los ecotipos más utilizados son Columbia (Col) y Landsberg erecta (Ler). Una planta alcanza su estadio adulto a las seis semanas desde la germinación de las semillas con una altura cercana a los 30 cm. Otra característica que hace de *Arabidopsis* un modelo atractivo es su genoma relativamente pequeño, de 120 Mb, que contiene aproximadamente 25.000 genes organizados en cinco cromosomas. El genoma de *Arabidopsis* fue secuenciado completamente en el año 2000 (*The Arabidopsis Genome Initiative*, 2000). La transformación eficiente por métodos que utilizan *Agrobacterium tumefaciens* y un gran número de líneas mutantes disponibles en centros de germoplasma han consolidado a *Arabidopsis* como modelo en los estudios de biología vegetal [7].

El desarrollo de *Arabidopsis* está definido en cuatro etapas: 1) Embrionaria; 2) Vegetativa juvenil; 3) Vegetativa adulta y 4) Reproductiva (Figura 2). El plan de desarrollo general se establece durante la embriogénesis; sin embargo, gran parte de la arquitectura final de la planta se define durante su crecimiento y es altamente dependiente de las condiciones ambientales: disponibilidad de nutrientes, luz, agua, presencia de patógenos, entre otros. Luego de la germinación y la aparición de los cotiledones en posición opuesta, el meristema apical del tallo da lugar al comienzo de la fase vegetativa juvenil. Durante esta etapa las plántulas desarrollan un par de hojas verdaderas. En la fase vegetativa adulta comienzan a desarrollarse hojas verdaderas en torno al eje central que parecen estar ubicadas en un solo plano [8]. El número de las hojas de roseta está determinado por una serie de factores incluyendo el genotipo, las condiciones ambientales y el tiempo transcurrido desde la germinación hasta el pasaje a floración [9]. El pasaje a estadio reproductivo está determinado por la aparición del botón floral; este pasaje en inglés se denomina "*bolting*" (el término ha sido adoptado aún en laboratorios de habla hispana). La transición del meristema vegetativo a meristema reproductivo está regulada por señales específicas del desarrollo y del medio ambiente como el fotoperíodo, la vernalización y diferentes factores ambientales como la deficiencia nutricional y la disponibilidad de agua. La etapa reproductiva se divide en dos

fases: en la primera denominada “fase reproductiva temprana” se desarrolla la inflorescencia principal y las hojas caulinares (u hojas reproductivas). En la “fase reproductiva tardía” tendrá lugar la aparición de las inflorescencias secundarias a partir de las yemas axilares de las hojas caulinares y de las hojas de rosetas [10]. Las flores maduras de *Arabidopsis* están compuestas por un cáliz de cuatro sépalos verdes, una corola de cuatro pétalos blancos cuyas posiciones alternan con los sépalos, seis estambres que contienen el polen (cuatro medios-largos y dos laterales-menores), y un gineceo central que se compone de un ovario formado por dos carpelos separados por un falso tabique, cada uno con numerosos óvulos, y un estilo corto, limitado por un estigma [5].



**Figura 2. Esquema representativo del ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*.** (a) Etapas del desarrollo de *Arabidopsis* Columbia (Col), desde las semillas (abajo a la izquierda), estableciéndose como plántula (9 dpg: días post germinación), en estadio vegetativo (39 dpg) y en estadio reproductivo

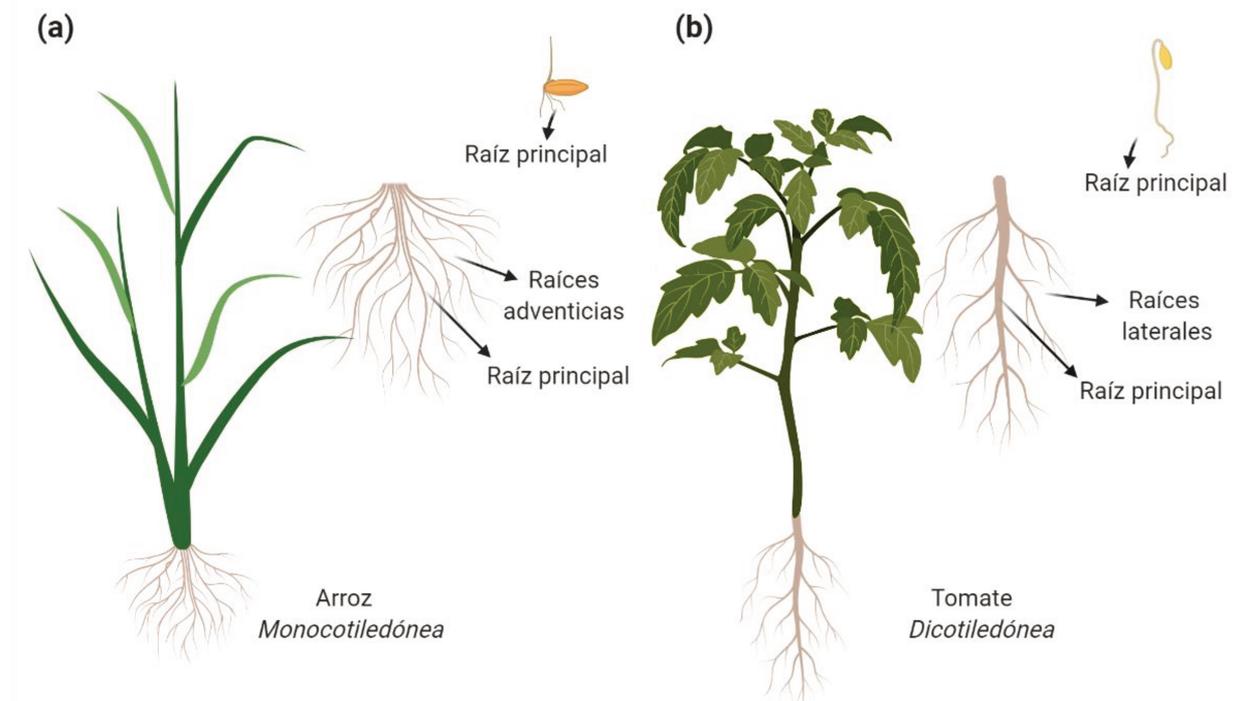
(45-50 dpj). (b) Esquema de una flor. (c) Esquema de silículas maduras y silículas abiertas con semillas adheridas. Figura modificada de Krämer y col., 2015 [6].

### 1.3 El sistema radicular de una planta

Las raíces de las plantas cumplen funciones múltiples, de las cuales, la principal es anclar la planta al suelo, incluso en condiciones desfavorables de crecimiento. Algunas raíces, además tienen un papel en el almacenamiento de distintas sustancias nutritivas, muchas de las cuales sirven como fuente de alimentos para los animales y humanos. Dentro de los cultivos de raíces más conocidos se puede mencionar la remolacha (*Beta vulgaris*), la zanahoria (*Daucus carota*), la papa (*Solanum tuberosum*), el rábano (*Raphanus sativus*) y la batata (*Ipomea batatas*). Un caso particular son las raíces de las plantas suculentas que almacenan grandes cantidades de agua en las células del parénquima, de manera análoga a la que se encuentra en sus hojas. Curiosamente, las plantas que crecen en áreas húmedas o pantanosas, como manglares (*Rhizophora mangle*), generan una gran cantidad de raíces adventicias que contienen una gran cantidad de parénquima interno. Estas raíces sirven de soporte y también ayudan a airear las regiones del sistema radicular que se encuentran sumergidas en suelos de bajo oxígeno [1].

La morfología del sistema radicular varía ampliamente entre especies, lo que sugiere que está determinada por factores genéticos inherentes. En las plantas angiospermas la arquitectura radicular se puede agrupar en dos grupos. Por un lado, en las plantas monocotiledóneas como maíz (*Zea mays*) y arroz (*Oryza sativa*), la arquitectura radicular se caracteriza por el desarrollo de muchas raíces adventicias en paralelo a la raíz primaria (Figura 3 a). De hecho, varias de esas raíces son postembrionarias y nacen a partir de la base del tallo [11]. Este tipo de raíces no crece tan profundamente en el suelo como la raíz principal, sino que, crecen principalmente en un patrón horizontal y se encuentran donde son más abundantes el agua y los fosfatos. Las raíces adventicias también pueden formar un complejo con partículas del suelo ayudando a prevenir la erosión del mismo [1]. En el caso de las plantas dicotiledóneas, como los modelos *Arabidopsis*, tomate (*Solanum lycopersicum*) y arveja (*Pisum sativum*), el sistema radicular está compuesto principalmente por una raíz principal dominante que crece hacia abajo en el suelo y desarrolla raíces laterales más pequeñas que pueden alcanzar diferentes órdenes de ramificación (Figura 3 b). El eje del crecimiento de éstas es paralelo al de la raíz principal. La aparición de raíces adventicias es muy poco frecuente, pero éstas emergen ocasionalmente del hipocotilo cuando la raíz principal sufre algún daño mecánico. Estos sistemas radiculares se encuentran a menudo en suelos secos y crecen profundamente hacia las fuentes subyacentes de agua y nitrógeno.

Durante la germinación de las plántulas, tanto mono como dicotiledóneas, el primer órgano que se desarrolla a partir de los embriones es la radícula. En las dicotiledóneas, la radícula continúa alargándose, desarrolla el meristema apical de la raíz, y se convierte en la raíz principal de la cual surgen las raíces laterales [1], [11].



**Figura 3. Ilustración representativa de la morfología radicular en plantas monocotiledóneas (a) y dicotiledóneas (b).** Figura creada con BioRender.

La arquitectura del sistema radicular es el resultado de la configuración espacial de raíces de diferente edad y orden. Esta arquitectura define la funcionalidad de las raíces. El sistema radicular es altamente plástico por lo que se puede modular de varias maneras: a través de la promoción o inhibición del crecimiento de la raíz principal o de crecimiento de las raíces laterales, por medio de la formación de raíces adventicias o del aumento de los pelos radiculares. Esto hace que las plantas dependan de la modulación de la arquitectura del sistema radicular para responder a las variaciones en la textura del suelo, la humedad, disponibilidad de nutrientes, la aireación y la biota. Las raíces, cuyos programas de desarrollo están genéticamente determinados, también están sujetas a posibles tensiones abióticas adicionales, como sequías, inundaciones, suelos salinos y temperaturas extremas. Este comportamiento altamente adaptable, denominado plasticidad del desarrollo, ha sido un determinante importante del éxito de las plantas terrestres [12].

## 1.4 Organización tisular de una raíz: componentes y funciones

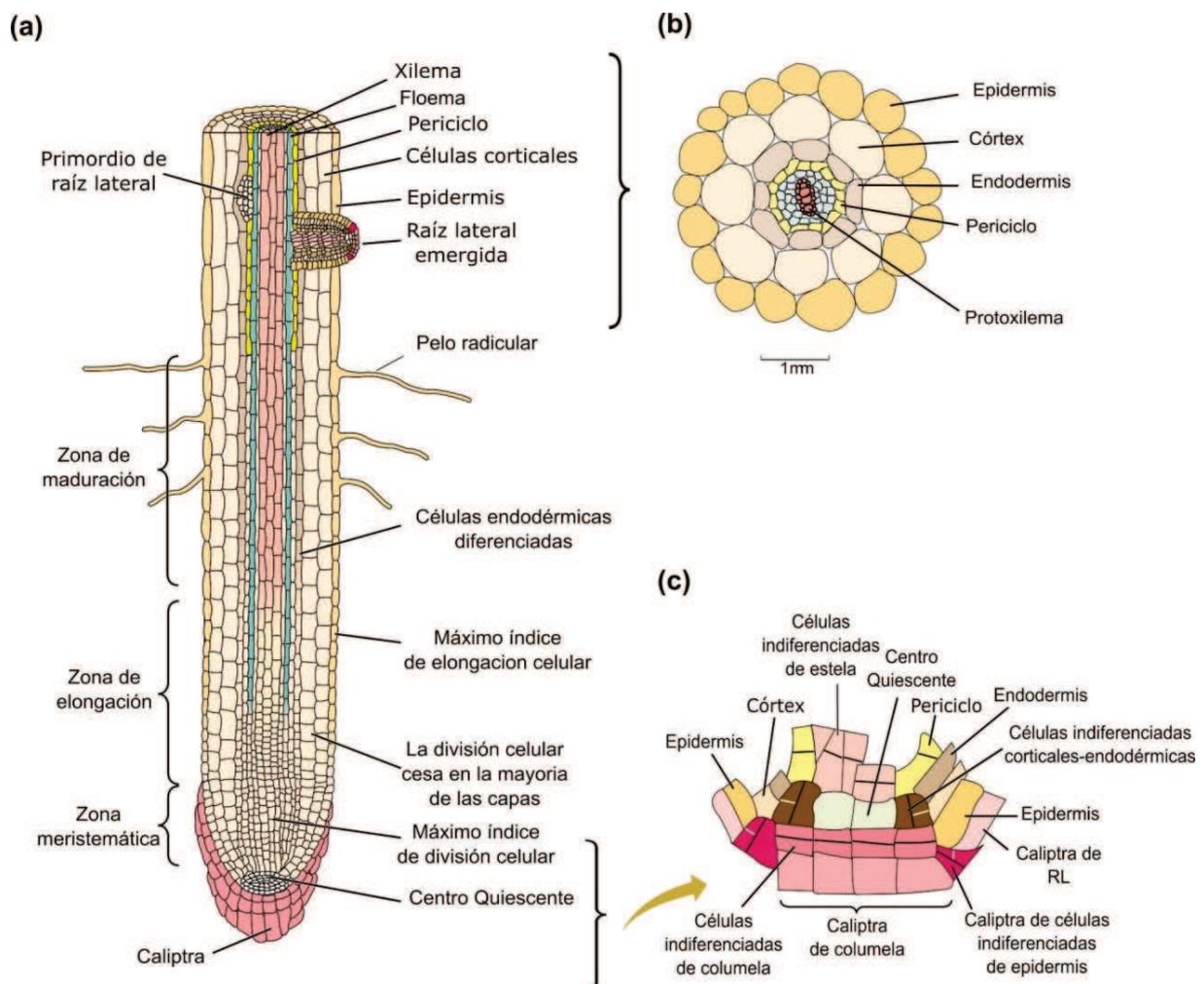
Las raíces crecen y se desarrollan a partir de sus extremos distales. Los tejidos primarios son generados por el meristema apical de la raíz, el cual va a dar lugar a los tres meristemas de raíz. El *procambium* produce los tejidos vasculares del xilema y el floema, mientras que el *protoderma* da lugar a la epidermis y el *meristema apical* produce las células del córtex y endodermis [1].

En el extremo inferior de la raíz de una planta joven, aunque los límites no son nítidos, se pueden distinguir cuatro zonas de desarrollo (Figura 4 a):

1. La **caliptra**, que protege el meristema apical de la lesión mecánica cuando la raíz crece a través de la tierra, y tiene la capacidad de percibir estímulos gravitacionales y de secretar mucopolisacáridos que ayudan en el proceso. Estas células son destruidas por el crecimiento de la raíz y por la fricción con el suelo, pero son rápidamente reemplazadas por células nuevas generadas por división celular en la cara externa del meristema.
2. La **zona meristemática**, compuesta por el meristema apical en el centro de la punta de la raíz, donde se encuentra activa la división celular y las células son considerablemente pequeñas.
3. La **zona de elongación** es el sitio de una rápida y extensa elongación celular por lo que las células aumentan varias veces su tamaño. A pesar de que algunas continúan dividiéndose, la tasa de división disminuye progresivamente hasta llegar a cero a medida que se incrementa la distancia al meristema.
4. La **zona de maduración (o diferenciación)** es la región en la cual las células adquieren características diferenciadas. Éstas entran en la zona de maduración después de que la división y el alargamiento han cesado. El patrón radial de tejidos diferenciados se hace visible; está constituido por anillos o capas concéntricas de células de epidermis, córtex, endodermis y periciclo rodeando al tejido vascular. Además, aparecen, los pelos de raíz, que tienen un papel crítico en la absorción de agua y minerales (Figura 4 a y b), [5].

En la punta de la raíz existe una pequeña cantidad de células indiferenciadas; a partir de las cuales se generan todos los tipos de células por medio de divisiones sucesivas, seguidas de eventos de diferenciación y expansión celular. Debido a que el crecimiento de la raíz es indeterminado, estos procesos son continuos y todas las etapas de desarrollo se dan en forma concomitante. El ápice de la raíz, del meristema apical, está formado por células indiferenciadas de distintos grupos celulares: a) el **centro quiescente (CQ)** que está compuesto por un grupo de cuatro células que no se dividen después de la embriogénesis, conocidas como células centrales del meristema apical de la raíz; b) las **células**

**indiferenciadas corticales-endodérmicas** que forman un anillo de células que rodean el CQ y generan las capas corticales y endodérmicas; c) las **células indiferenciadas de la columela** que son las células inmediatamente superiores (apicales a) de las células centrales. Estas se dividen anticlinalmente y periclinalmente para generar un sector de la capa de raíz conocida como la columela; d) las **células indiferenciadas epidérmicas** de la punta de la raíz que están en el mismo nivel que las células de la columela, pero forman un anillo que las rodea; las divisiones de estas células generan la capa de células epidérmicas y producen la caliptra de raíz lateral; e) las **células indiferenciadas de la estela** que son un nivel de células justo detrás de las células del CQ; estas generan el periciclo y los tejidos vasculares (Figura 4 c), [13].

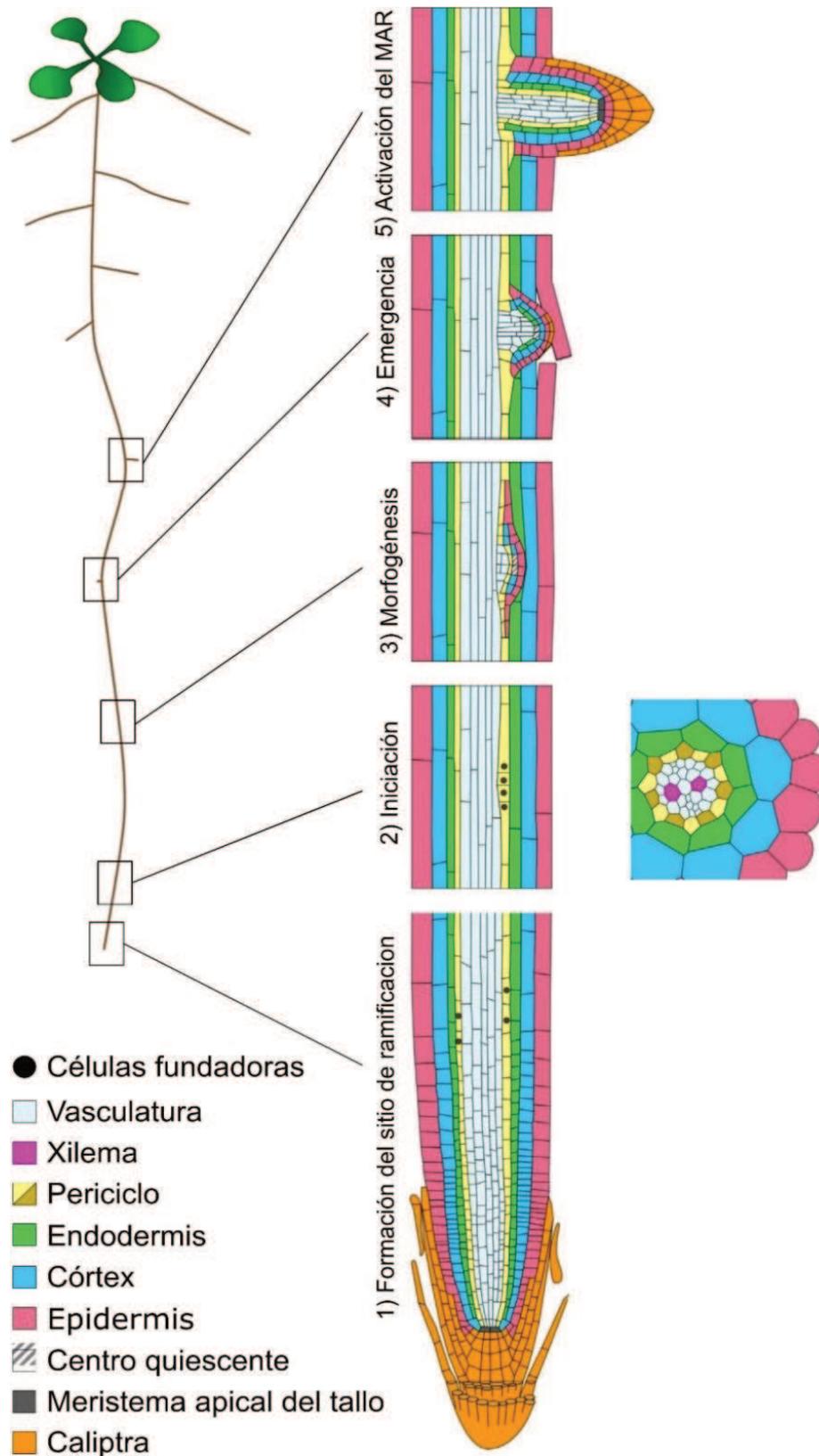


**Figura 4. Ilustración representativa de la organización tisular de la raíz.** (a) Corte longitudinal de la raíz principal en el que se observan las distintas zonas de desarrollo celular; (b) Corte transversal donde se observa la distribución radial de tejidos; (c) Células que conforman el meristema apical de raíz. Figura modificada de Taiz y Zeiger, 2014 [5].

## 1.5 Formación y desarrollo de raíces laterales en Arabidopsis

La ramificación es una de las principales determinantes de la arquitectura del sistema radicular que también se define por el crecimiento de la raíz principal y el ángulo que toman las raíces laterales. Éstas últimas son aquellas que se originan a partir de otra raíz preexistente y pueden derivar tanto de la raíz principal como de otra raíz lateral o incluso de las adventicias. Por lo tanto, constituyen gran parte de la arquitectura radicular de la planta [14], [15]. La raíz principal nace durante la embriogénesis, mientras que las raíces laterales se forman durante toda la vida de la planta y son cruciales para aumentar el área superficial de los sistemas radiculares y así lograr una mejor adaptación a suelos heterogéneos. Debido a que el sistema radicular es altamente plástico, plantas que son genotípicamente idénticas pueden diferir en el desarrollo de raíces laterales, dependiendo del macro y microambiente en el que se encuentren. Los mecanismos moleculares y celulares de formación de las mismas se han estudiado ampliamente en la planta modelo Arabidopsis. En esta especie, se encontró una separación relativamente regular de las raíces laterales, coincidiendo con el borde exterior de las curvas a lo largo de la raíz principal, particularmente cuando las raíces muestran un patrón de crecimiento ondulado o en forma de serpentina [16]. Este espaciamiento de las raíces laterales puede verse afectado por respuestas trópicas y por estímulos mecánicos. Por ejemplo, se ha informado que un estímulo gravitrópico puede inducir la formación de una raíz lateral en el lado externo de la curvatura de las raíces [17].

En todas las angiospermas las raíces laterales se originan principalmente del tejido del periciclo. Específicamente en Arabidopsis, derivan de seis células del periciclo que están adyacentes a los dos polos del xilema (XPP, por sus siglas en inglés *Xylem Pole Pericycle cells*). El desarrollo de raíces laterales se puede dividir en cinco etapas principales: 1) **formación del sitio previo a la ramificación**, que tiene lugar entre la zona meristemática y la de elongación; 2) **iniciación de la raíz lateral**, que implica una migración nuclear en las células del periciclo a una pared celular común entre pares de células precursoras de raíces laterales (LRFC; por sus siglas en inglés *Lateral Root Founder Cells*) seguido de división celular asimétrica en la zona de maduración; 3) **morfogénesis del primordio de raíz lateral** en las que las LRFC se dividen aún más para formar un primordio de raíz lateral que, eventualmente adquiere las características de un meristema de raíz. Este proceso implica divisiones anticlinales (es decir, perpendiculares al eje longitudinal) y periclinales (es decir, paralelas al eje longitudinal); 4) la **emergencia del nuevo órgano de raíz lateral** a través de las capas de tejido subyacente a la raíz principal en la zona de maduración; 5) **activación del meristema de raíz lateral**, que involucra el inicio de las divisiones celulares en este nuevo meristema. (Figura 5), [18].



**Figura 5. Formación y desarrollo de una raíz lateral.** A la izquierda: vista longitudinal de los cinco pasos principales de la formación de una raíz lateral. A la derecha: perspectiva radial de las seis células del periciclo adyacentes a las células del xilema (XPP) que dan lugar al primordio de raíz lateral. La codificación de colores está de acuerdo con el modelo descrito por Malamy y Benfey, 1997 [19]. Figura modificada de Banda y col., 2019 [18].

Asimismo, al proceso de morfogénesis del primordio de raíz lateral se lo divide en 7 estadios de desarrollo (Figura 6), [19]:

**Estadio I:** la primera evidencia de iniciación del primordio de raíz lateral es la aparición de paredes celulares estrechamente espaciadas en la capa del periciclo, en orientación perpendicular al eje de la raíz. Se observa claramente una mayor frecuencia de divisiones anticlinales. En el plano longitudinal, se forman aproximadamente 6-10 células de periciclo "cortas", que se agrandan en dirección radial.

**Estadio II:** se produce una división periclinal que divide al primordio de raíz lateral en dos capas (externa e interna). Por lo tanto, a medida que las células se expanden radialmente, comienza a aparecer la forma de domo.

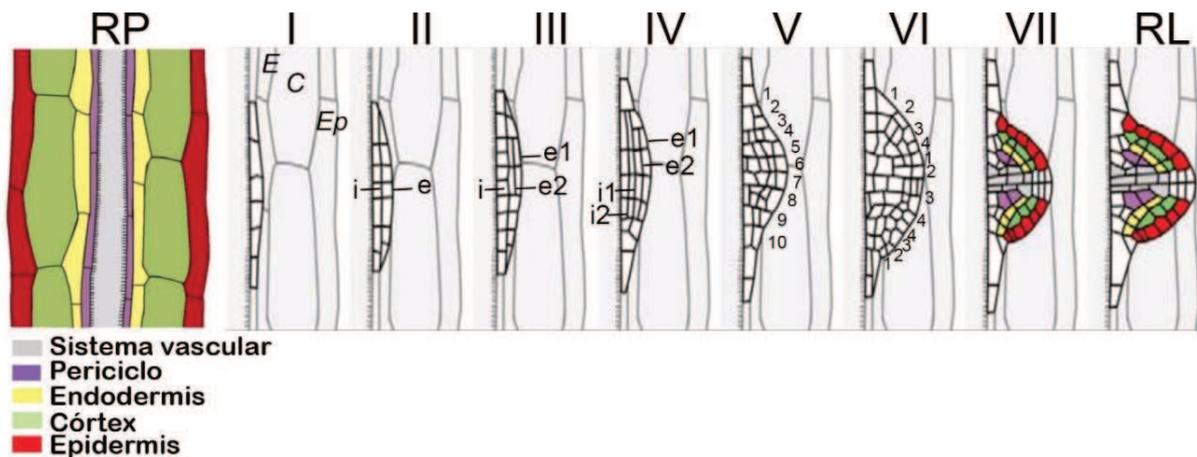
**Estadio III:** la capa externa se divide periclinalmente, generando un primordio de tres capas, dos externas y una interna. Algunas células periféricas no se dividen, creando regiones externas que tienen un espesor de una y dos capas celulares. Esto enfatiza aún más la forma de domo del primordio de raíz lateral.

**Estadio IV:** la capa interna se divide periclinalmente, creando un total de cuatro capas celulares (E1, E2, I1, I2). En esta etapa, el primordio de raíz lateral atraviesa la capa endodérmica de la raíz principal.

**Estadio V:** una célula central se divide anticlinalmente para formar cuatro células pequeñas cuboidales. Las células adyacentes a estas dos células también se dividen, creando una capa externa que contiene 10-12 células. Además, las células en I2 se agrandan radialmente y se dividen empujando hacia arriba las capas suprayacentes y, aparentemente comprimiendo las células en I1 y E2. El primordio de raíz lateral se encuentra en la mitad del córtex de la raíz principal.

**Estadio VI:** se caracteriza por varios eventos que parecen ocurrir al mismo tiempo. Por un lado, las células de E2 experimentan una división periclinal, creando una nueva capa interna. Y, por otro lado, las cuatro células centrales se dividen periclinalmente. El primordio de raíz lateral ha pasado a través del córtex y ha penetrado en la epidermis de la raíz principal. En esta etapa el primordio de raíz lateral comienza a parecerse a la punta de una raíz madura, ya que contiene 3 capas que podrían corresponder a la endodermis, el córtex y la epidermis.

**Estadio VII:** a medida que el primordio se agranda, se hace más difícil caracterizar las divisiones, particularmente en las capas internas. Parece que muchas de las células continúan experimentando divisiones anticlinales. El primordio de raíz lateral resulta en 8-10 células a cada lado y 8-10 células centrales. A este patrón celular se lo llama 8-8-8. El primordio parece estar a punto de emerger de la raíz principal.



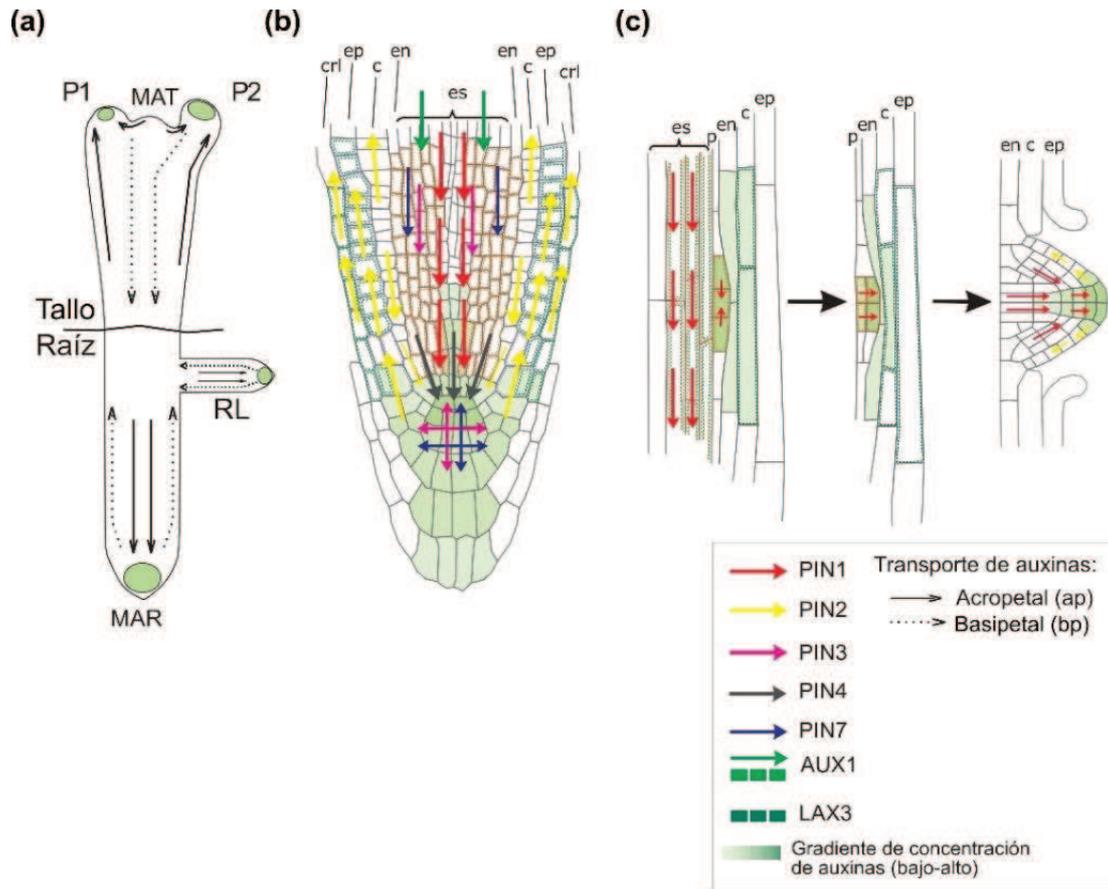
**Figura 6. Estadios de desarrollo de un Primordio de Raíz Lateral en Arabidopsis.** Secciones longitudinales de una raíz principal en la que se observan los distintos estadios de un primordio de raíz lateral en desarrollo a partir de células del periciclo, según Malamy y Benfey, 1997. En escala de colores se describen los tipos celulares que forman una raíz principal y la punta de una raíz lateral en crecimiento. Abreviaturas: RP: raíz principal; RL: raíz lateral; E: endodermis; C: córtex; Ep: epidermis; e: capa externa; i: capa interna. Los números indican las nuevas células producto de divisiones anticlinales o periclinales. Figura modificada de Porco y col., 2016 [20].

## 1.6 Interacciones hormonales durante la formación de raíces laterales

La arquitectura radicular se encuentra modulada tanto por vías intrínsecas, es decir, propias de la organogénesis y crecimiento de una planta, como por vías de respuesta, que son las que determinan cómo responden las plantas a señales externas regulando a las primeras. La mayoría de las hormonas vegetales presentan un nivel basal en las plantas bajo una situación de crecimiento. Por lo tanto, los efectos hormonales en la arquitectura del sistema radicular pueden considerarse intrínsecos. Los niveles hormonales cambian durante el transcurso del desarrollo normal, y estos cambios probablemente determinan patrones intrínsecos de crecimiento y desarrollo. Sin embargo, las hormonas vegetales también son componentes claves de las vías de respuesta, ya que se sabe que sus niveles cambian en respuesta a las señales ambientales. Estos roles no son mutuamente excluyentes: se espera que la señalización hormonal participe en las vías de respuesta ambiental y de desarrollo [21]. Por otro lado, las interacciones hormonales en las vías de síntesis, metabolismo, transporte y la señalización entre hormonas son muy importantes para lograr un correcto desarrollo radicular. Estudios recientes utilizando distintas mutantes de Arabidopsis y otras especies de plantas han demostrado que distintas hormonas vegetales son necesarias tanto para el inicio de la raíz lateral como el desarrollo del primordio de raíz lateral, mientras que otras permiten la emergencia y la activación de las raíces laterales (Figura 13).

### 1.6.1 Las auxinas en la iniciación y desarrollo del primordio de raíz lateral

El Ácido Indol-3-Acético (IAA) es la molécula más abundante de las auxinas, y la más relevante, fisiológicamente, para el desarrollo vegetal. En la raíz, el IAA se transporta hacia la punta de la raíz a través de los tejidos vasculares (transporte acropetal), y luego se redirige hacia el ápice de la raíz a través de las capas celulares externas (transporte basipetal) (Figura 7), [22]. La familia de genes *AUXIN (AUX) / LIKE-AUXIN (LAX)* codifican los principales transportadores de entrada de auxinas y comprenden cuatro genes altamente conservados: *AUX1*, *LAX1*, *LAX2* y *LAX3* [23]. Mientras que los transportadores de salida de auxinas están codificados por los genes *PIN* [24]. Además, se demostró que en el primordio de raíz lateral y en los tejidos próximos, la regulación coordinada de los transportadores de entrada y de salida de auxinas (como *AUX1* y *PIN* respectivamente) optimiza el flujo de auxinas permitiendo la iniciación del proceso (Figura 7), [25], [22], [26], [27]. Muchos estudios fisiológicos y genéticos realizados en *Arabidopsis* han demostrado que las auxinas actúan como integradores comunes de señales endógenas y ambientales que regulan la formación de raíces laterales, tanto en el inicio como en el posterior desarrollo del primordio de raíz lateral. De hecho, se ha descubierto que en el desarrollo de las raíces laterales muchas hormonas o nutrientes interfieren en el mismo a través de la homeostasis de las auxinas (síntesis, conjugación y degradación), transporte o respuesta (Figura 13), [14], [18], [22], [27]. En términos generales, la aplicación de auxinas exógenas aumenta el número de raíces laterales mientras que la inhibición del transporte de auxinas disminuye su número, indicando que esta hormona es una reguladora positiva de la formación de raíces laterales [27].

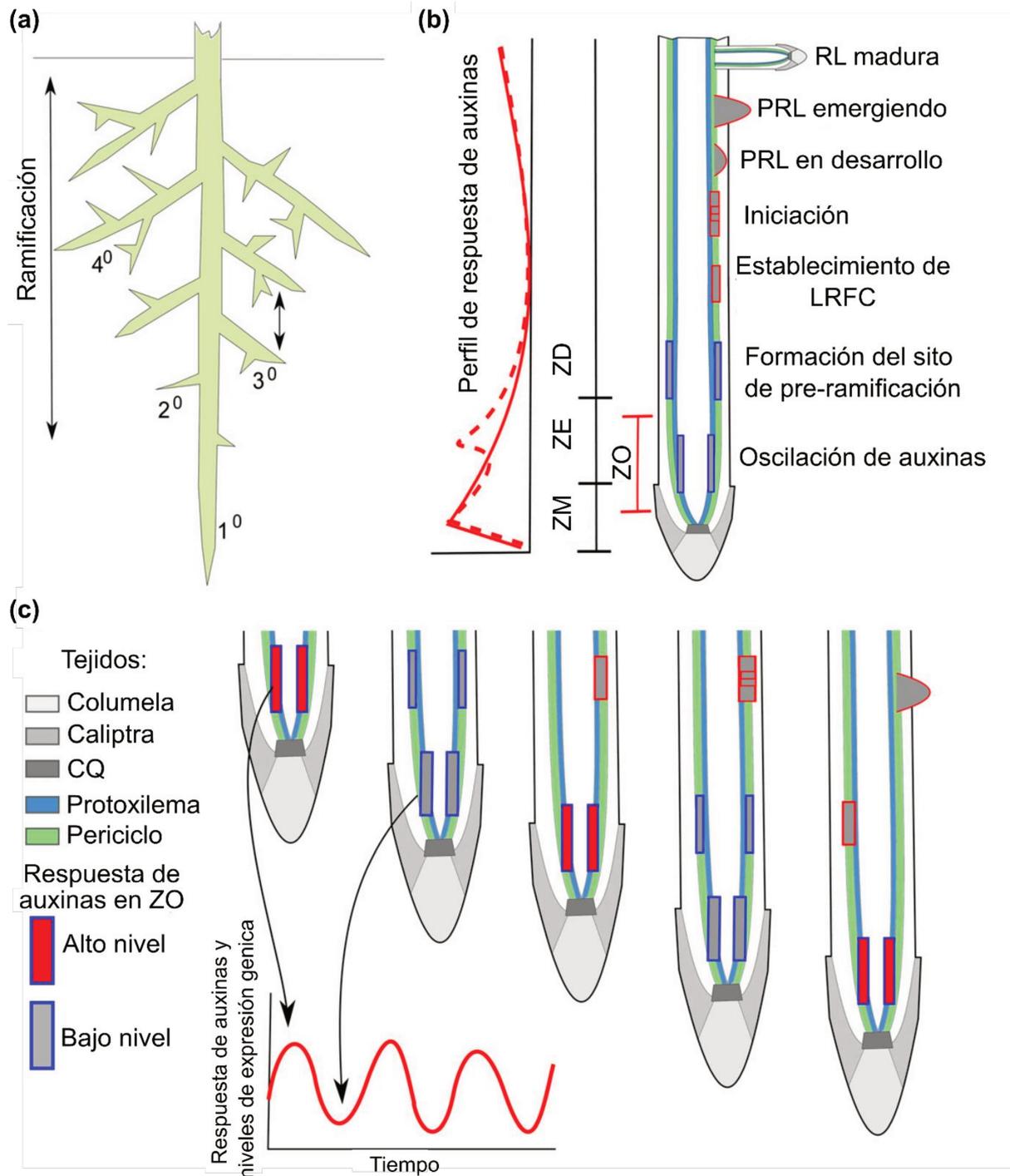


**Figura 7. El transporte de auxinas en la raíz.** (a) Esquema representativo del flujo de auxinas a través del tallo y de la raíz en *Arabidopsis*. Los picos máximos de auxinas en el tallo provienen de los primordios (P1 y P2) y en la raíz del meristema apical radicular. En la raíz principal y en la raíz lateral las auxinas se transportan hacia la punta de la raíz por los tejidos internos vasculares (acropetal) y refluye a través de la epidermis (basipetal). (b) Transportadores de auxinas en la punta de la raíz. (c) Transportadores de auxinas en un primordio de raíz lateral en desarrollo. Abreviaturas: crl: caliptra de raíz lateral; ep: epidermis; c: córtex; en: endodermis; es: estela; p: periciclo. Figura modificada de Petrášek y Friml., 2009 [24].

### 1.6.2 Las auxinas activan las células del periciclo en el meristema basal

Como se mencionó anteriormente, cuando las plantas de *Arabidopsis* se cultivan *in vitro* en condiciones estándar, las raíces laterales se distribuyen de manera bastante uniforme a lo largo de la raíz principal siguiendo un patrón alterno derecha-izquierda (Figura 8 a). Esta distribución regular está controlada por un mecanismo endógeno "similar a un reloj" que genera oscilaciones de la respuesta de auxinas (se ha analizado utilizando un promotor artificial sensible a la presencia de la hormona denominado *DR5*) en las células del protoxilema dentro de la zona de oscilación (ZO) (Figura 8 b y c). Después de un pico de respuesta de las auxinas en las células del protoxilema, las células del periciclo XPP vecinas están "activadas" y forman sitios de pre-ramificación (Figura 8 b y c), [27], [28]. La formación del sitio previo a la ramificación depende tanto de las auxinas sintetizadas localmente como

de las auxinas transportadas al ápice de la raíz a través del floema [29]. En el ápice de la raíz, los transportadores de auxinas PIN transportan las auxinas siguiendo "la vía inversa de la fuente" de regreso a la región basal del meristema justo por encima del meristema apical de la raíz. Este reflujó de auxinas es responsable tanto del gravitropismo de la raíz como del "activado" de las células precursoras de raíces laterales (LRFC) [17], [27], [29].



**Figura 8. Los niveles de auxinas oscilan activando las células del protoxilema.** (a) Patrón de distribución "derecha-izquierda" de raíces laterales a lo largo de una raíz principal. (b) Panel izquierdo: perfil de respuesta de auxinas en la punta de la raíz con elevaciones transitorias inducidas por

oscilaciones indicadas con líneas discontinúas. Panel derecho: secuencia de formación de una raíz lateral a medida que se avanza en las distintas zonas de la raíz. ZM: zona meristemática; ZE: zona de elongación; ZD: zona de diferenciación; ZO: zona de oscilación; RL: raíz lateral; PRL: primordio de raíz lateral; LRFC: células precursoras de raíz lateral. (c) En el meristema basal, las células del protoxilema experimentan oscilaciones temporales de las concentraciones de auxinas y/o en los niveles de respuesta a auxinas, así como oscilaciones en la expresión de muchos otros genes que permiten que estas células transmitan una señal de “*priming*” a las células del periciclo adyacentes. Figura modificada de Laskowski y Tusscher., 2017[29].

### **1.6.3 Las auxinas controlan las divisiones asimétricas durante el inicio de la raíz lateral**

A continuación, las auxinas regulan y coordinan tanto las divisiones celulares de las células precursoras LRFC como la polaridad de estas células y/o la adquisición de identidad durante el inicio de la formación de la raíz lateral. Debido a que unas pocas horas antes de la iniciación de una raíz lateral, la respuesta a auxinas aumenta en los pares de células precursoras LRFC; esto se observó utilizando el reportero *DR5* de respuesta a auxinas [29], [30]. Alterar la respuesta de las auxinas en las células precursoras LRFC utilizando inhibidores del transporte polar de auxinas como NPA (Inhibidor Ácido N-1-naftilftalámico) es suficiente para bloquear la iniciación de la formación de raíz lateral [14], mientras que el tratamiento con auxinas exógenas promueve las divisiones celulares en las células del periciclo XPP, lo que indica que la acumulación de auxinas en estas células es necesaria y suficiente para dar comienzo al inicio de raíz lateral.

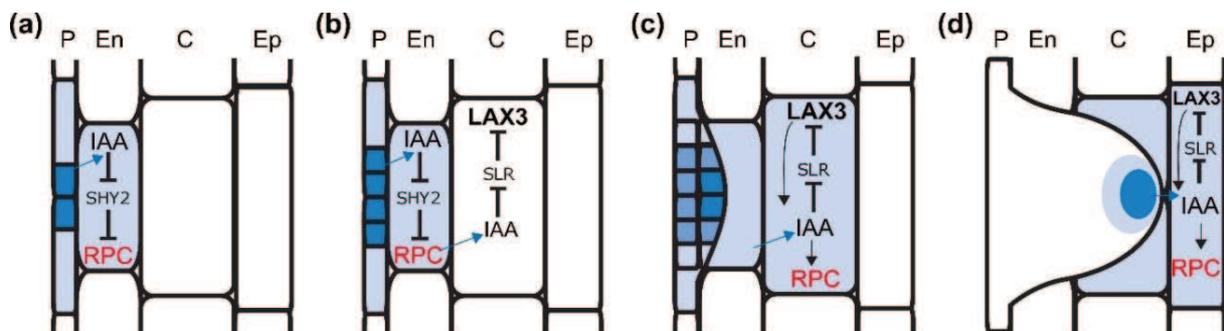
### **1.6.4 El papel de las auxinas en la organización tisular del primordio de raíz lateral**

A partir del inicio de la formación de una raíz lateral, tienen lugar una serie divisiones anticlinales y periclinales de las células del primordio de raíz lateral que dan lugar a un domo que empuja a través de los tejidos subyacentes de la raíz principal [31]. El patrón anatómico del nuevo meristema apical de la raíz lateral se configura progresivamente y, luego del estadio VI, el ápice del primordio de raíz lateral presenta una organización característica similar a la del ápice de la raíz principal. En varios trabajos experimentales se ha demostrado que las auxinas participan en el diseño estructural y funcional del primordio de raíz lateral, tal como sucede en los meristemas apicales del tallo y de la raíz. Especialmente, los transportadores de auxinas son los responsables de la formación de un gradiente de concentración de la hormona desde la base del primordio hasta su punta, el cual es necesario

para la organización tisular adecuada del primordio de raíz lateral (Figura 13), [22], [27]. Por otro lado, los distintos genes regulados por las auxinas que se expresan en los márgenes del primordio de raíz lateral podrían estar involucrados en la definición de los límites del mismo [18], [27], [28].

### 1.6.5 Las auxinas permiten la emergencia del primordio de la raíz lateral

Para poder emerger de la raíz principal, un primordio de raíz lateral debe atravesar tres capas celulares: endodermis, corteza y epidermis. Este proceso está finamente regulado por las auxinas que se producen en el tallo y se transportan a la raíz a través del floema. Además de AUX1, LAX3 fue descrito como otro transportador de entrada de auxinas que regula la emergencia de la raíz lateral [25]. De esta forma las auxinas inducen la expresión de *LAX3* en las células corticales y epidérmicas subyacentes al primordio de raíz lateral en formación (Figura 9). En las plantas mutantes *lax3*, el número de raíces laterales emergidas se reduce, pero el inicio *per se* no se ve afectado. La mutación *lax3* produce la inhibición de la expresión de varias clases de enzimas de remodelación de la pared celular en las células subyacentes a los nuevos primordios de raíces laterales. Estas observaciones sugieren que el flujo de auxinas, dependiente de *LAX3* en las células corticales y epidérmicas, provoca la inducción de varias clases de enzimas de remodelación de la pared celular, lo que permite la emergencia de la raíz lateral (Figura 9), [18], [20].

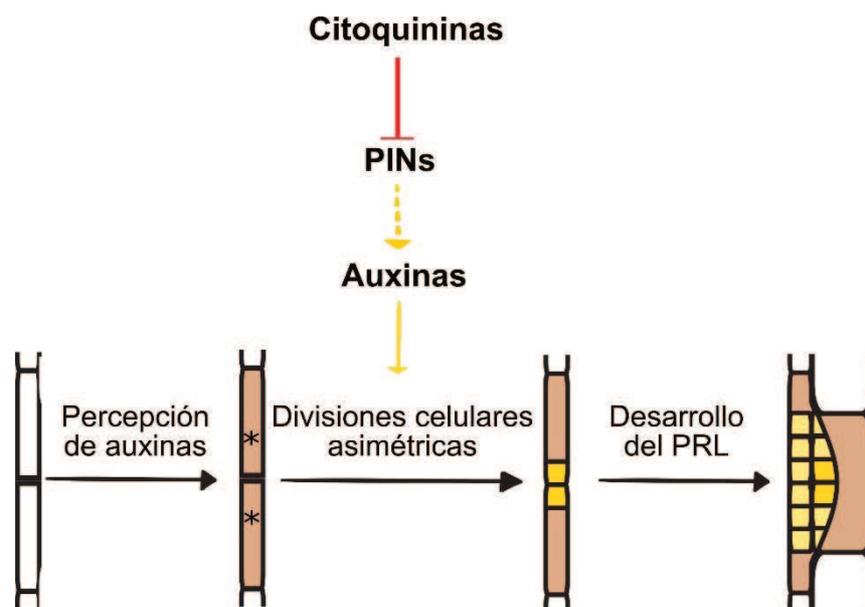


**Figura 9. Las auxinas regulan la emergencia del primordio de la raíz lateral.** (a) Las auxinas (IAA) originadas en las células en división del periciclo (P) inducen la expresión de enzimas de remodelación de la pared celular (RPC) en las células endodérmicas (En) adyacentes al permitir la degradación del represor SHY2. (b) Las auxinas derivadas del primordio de raíz lateral también inducen la expresión del transportador de entrada de auxinas *LAX3* en las células corticales (C) adyacentes al permitir la degradación del represor SLR. (c) La expresión de *LAX3* aumenta la permeabilidad celular a las auxinas, creando un ciclo de retroalimentación positiva. El aumento de la acumulación de auxinas induce la expresión de RPC. (d) En una etapa posterior del desarrollo del primordio de raíz lateral, las auxinas inducen la expresión de *LAX3* en células epidérmicas (Ep) adyacentes. La expresión de RPC en unas pocas células de las diferentes capas facilita la aparición del primordio. La respuesta celular de las auxinas se representa con un gradiente de color azul. Figura modificada de Swarup y col., 2008 [25].

### 1.6.6 Las citoquininas regulan negativamente la formación de la raíz lateral

Las citoquininas (CK) son un tipo de hormonas vegetales que generalmente presentan un papel antagónico con las auxinas en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo la dominancia apical del tallo y la regeneración de los tejidos. Algunas funciones de las CK se producen principalmente a través del control de la actividad del ciclo celular. Las CK naturales más prevalentes son las derivadas de adenina con una sustitución en su N<sup>6</sup> con una cadena lateral de isoprenoide insaturado (por ejemplo, zeatina [Z] e isopenteniladenina [iP]). Su homeostasis está regulada por la tasa de síntesis *de novo*, la tasa de importación, la formación y descomposición de los conjugados de CK (que son principalmente glucósidos) y la tasa de exportación y catabolismo [32].

Estudios recientes, en los que se utilizaron diferentes plantas mutantes de *Arabidopsis* que tienen negativamente afectados tanto el contenido de CK como la percepción o la transducción de señales, muestran que estas mutantes tienen una mayor densidad de raíces laterales. Estos análisis sugieren fuertemente que las CK tienen un papel importante en la configuración del sistema de raíces, actuando como reguladores negativos endógenos de la formación de raíces laterales [22], [33], [34]. Las CK actúan directamente sobre las células del periciclo XPP inhibiendo la iniciación de raíces laterales al bloquear el ciclo celular en la transición de fase G2 a M. En consecuencia, la respuesta a CK se reprime durante el desarrollo temprano de raíces laterales y, por el contrario, se induce en células del periciclo XPP ubicadas entre primordios de raíz lateral en desarrollo [35], [36]. Las mutantes en la biosíntesis y en la señalización de CK muestran un mayor número de primordios de raíz lateral más cercanos entre sí en comparación con la distribución normal de éstos en la raíz principal de plantas salvajes [36]. En su conjunto, estas evidencias experimentales sugieren que las CK endógenas estarían involucradas en el control del espaciado de primordios de raíz lateral al evitar que se inicien nuevos cerca de los ya existentes. Las CK reprimen varios transportadores de salida de auxinas de la familia de los PIN, perturbando el establecimiento del gradiente de auxinas y evitando así la acumulación de éstas en las células precursoras de raíz lateral, LRFC, durante el inicio de la formación de raíces laterales (Figura 10), [37]. Por otro lado, en plántulas de *Arabidopsis*, el agregado de auxinas exógenas inhibe rápidamente la síntesis de CK, lo que indica que ésta hormona y las auxinas pueden interactuar también a nivel metabólico [22]. Aunque se desconoce si esta inhibición de la síntesis de CK regulada por auxinas afecta directamente la formación de raíces laterales, estas observaciones indican que existe algún tipo de interacción reguladora entre CK y auxinas durante el desarrollo de primordios de raíz lateral (Figura 13), [27].



**Figura 10. Interacción entre las auxinas y las citoquininas durante la formación de la raíz lateral.** El inicio de una raíz lateral se desencadena por la percepción de auxinas en algunas células del periciclo lo que conduce a una división celular asimétrica. Las citoquininas no bloquean la percepción o la respuesta de las auxinas en las células precursoras de la raíz lateral LRFC, sino que actúan aguas abajo para perturbar la división celular asimétrica. Las citoquininas inhiben este paso al regular negativamente la expresión de transportadores de salida de auxinas del tipo PIN. Figura modificada de Laplace y col., 2007 [37].

### 1.6.7 Los brasinoesteroides promueven la formación de la raíz lateral

Los brasinoesteroides (BR) son también hormonas vegetales esenciales para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, ya que plantas mutantes que no pueden sintetizar o percibir los BR presentan defectos de crecimiento, como fenotipos enanos, fotomorfogénesis en la oscuridad, desarrollo estomático alterado y fertilidad masculina reducida. [38]. Se ha demostrado que las bajas concentraciones de BR promueven el crecimiento de la raíz principal en *Arabidopsis* [39], mientras que niveles más altos de BR exógenos inhiben el alargamiento en diferentes sistemas radiculares.

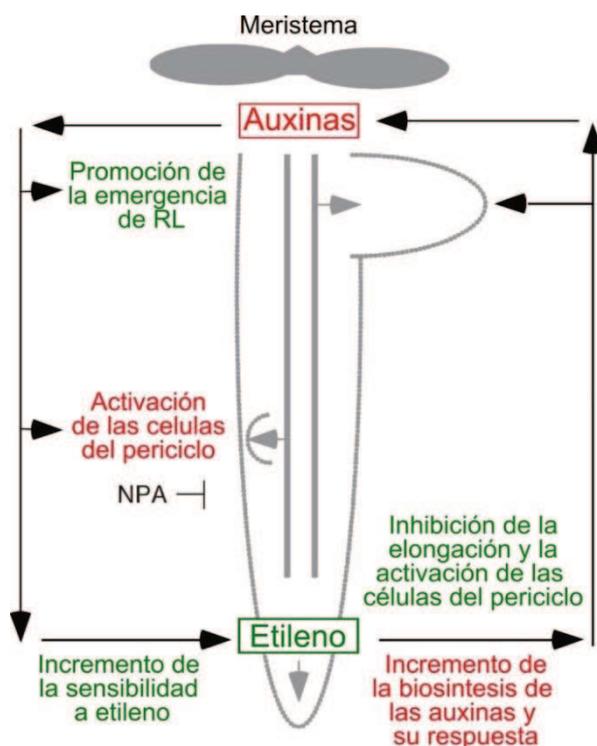
Recientemente se demostró que los BR regulan el tamaño del meristema apical de la raíz, ya que son necesarios para mantener la actividad normal del ciclo celular y la expansión celular [40]. Además, se encontró señalización de BR en las células de la epidermis de la raíz y no en las células de la endodermis, por lo que las células del CQ o las células de la estela son suficientes para controlar el tamaño del meristema apical de la raíz principal. Estas evidencias indicaron que existe una fuerte comunicación entre las células de la epidermis y las células meristemáticas internas [40]. Por otro lado, existen regulaciones cruzadas entre las vías que involucran BR y auxinas para varios procesos de desarrollo [22]. Bao y colaboradores (2004) [41] demostraron que las auxinas y los BR promueven la formación de raíces laterales en

forma sinérgica ya que los BR inducen el transporte acropetal de auxinas (Figura 13). En forma similar, mutantes insensibles a BR por defectos en el receptor BRI1, tienen menos raíces laterales que plantas salvajes. Además, la mutación *bri1* reduce la expresión del reportero de *DR5* mientras que el tratamiento con BR exógenos promueve su expresión. Recientemente, se informó que el regulador negativo de la señalización de BR BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 regula la organogénesis de raíces laterales fosforilando factores de transcripción de respuesta a auxinas como ARF7 y ARF19 [42].

### **1.6.8 Interacciones entre etileno y auxinas en el desarrollo del primordio de raíz lateral**

El etileno es una fitohormona gaseosa simple y muy importante que modula múltiples procesos de crecimiento y desarrollo en las plantas, desde la germinación de las semillas hasta la senescencia. En la industria alimenticia se utiliza al etileno como inductor de la maduración de las frutas. Esta hormona vegetal se sintetiza a partir de la metionina por una vía muy simple. En muchas especies vegetales se señaló que el etileno promueve la formación de raíces adventicias [5]. Por otro lado, se ha demostrado que el etileno regula negativamente la formación de raíces laterales en *Arabidopsis* alterando el transporte de auxinas (Figura 13), [43]. Tanto un aumento de la síntesis como de la señalización de etileno disminuyen la formación de raíces laterales y este efecto se revierte al tratar las plantas con el antagonista de etileno, nitrato de plata. El aumento se puede producir por la aplicación exógena del precursor ACC o por la mutación *eto1* que causa la sobreproducción del mismo y el aumento en la señalización por la mutación *ctr*. Por el contrario, las plantas con mutaciones que bloquean las respuestas de etileno, *etr1-3* y *ein2-5*, aumentan la formación de raíces laterales y son insensibles al efecto de ACC. El tratamiento con ACC o las mutaciones *eto1* que causan la sobreproducción, mejoran el transporte de auxinas en ambas direcciones (acropetal y basipetal). Este transporte de IAA mejorado con etileno depende de AUX1, el transportador de entrada de IAA, ya que la mutante *aux1-7* es insensible al etileno como potenciador del transporte de IAA en ambos sentidos [43]. Por otro lado, se demostró que la interacción etileno-auxinas en el inicio de las raíces laterales y el desarrollo del primordio de raíz lateral depende de las concentraciones del primero (Figura 13), [44]. Por lo que, la aplicación de bajas concentraciones de ACC, promueve el inicio de primordios de raíces laterales. Mientras que, como se mencionó anteriormente, la aplicación de altas concentraciones de ACC inhibe fuertemente el inicio de la formación de nuevas raíces laterales, pero promueven la aparición de primordios de raíces laterales existentes (Figura 13). Estos efectos se correlacionan con la disminución de la longitud de las células del

periciclo y el aumento en el ancho de las células que forman el primordio de raíz lateral. Sin embargo, cuando se aplican simultáneamente auxinas y ACC, el ACC es incapaz de evitar la formación de raíces laterales en los tejidos de primordios de raíces laterales formados antes de la exposición al mismo. En cambio, en los tejidos radiculares formados después del tratamiento con ACC, en los que se reduce el alargamiento celular, las auxinas no logran rescatar la inhibición por etileno del inicio de los primordios de raíces laterales, sino que la amplifican varias veces (Figura 11), [22], [44].

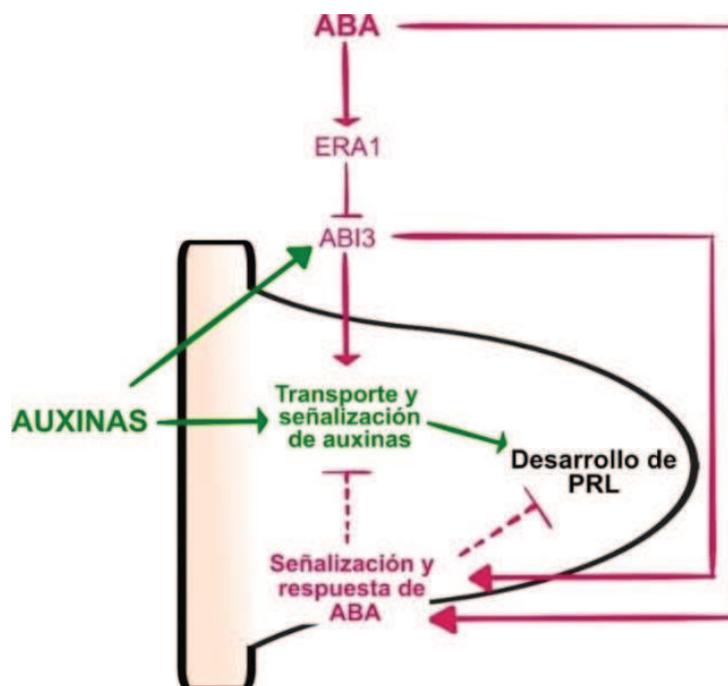


**Figura 11. Participación del etileno en la formación de raíces laterales en Arabidopsis.** Bajos niveles de etileno promueven la biosíntesis y/o la respuesta de las auxinas, y favorecen la iniciación de las raíces laterales en porciones de raíces jóvenes. Tras un aumento en el nivel de etileno, éste interactúa con las auxinas en la punta de la raíz primaria y suprime el crecimiento de la misma. Esto inhibe la iniciación de raíces laterales en las regiones con crecimiento inhibido. Simultáneamente, el etileno promueve la emergencia de primordios de raíces laterales existentes. Figura modificada de Ivanchenko y col., 2008 [44]

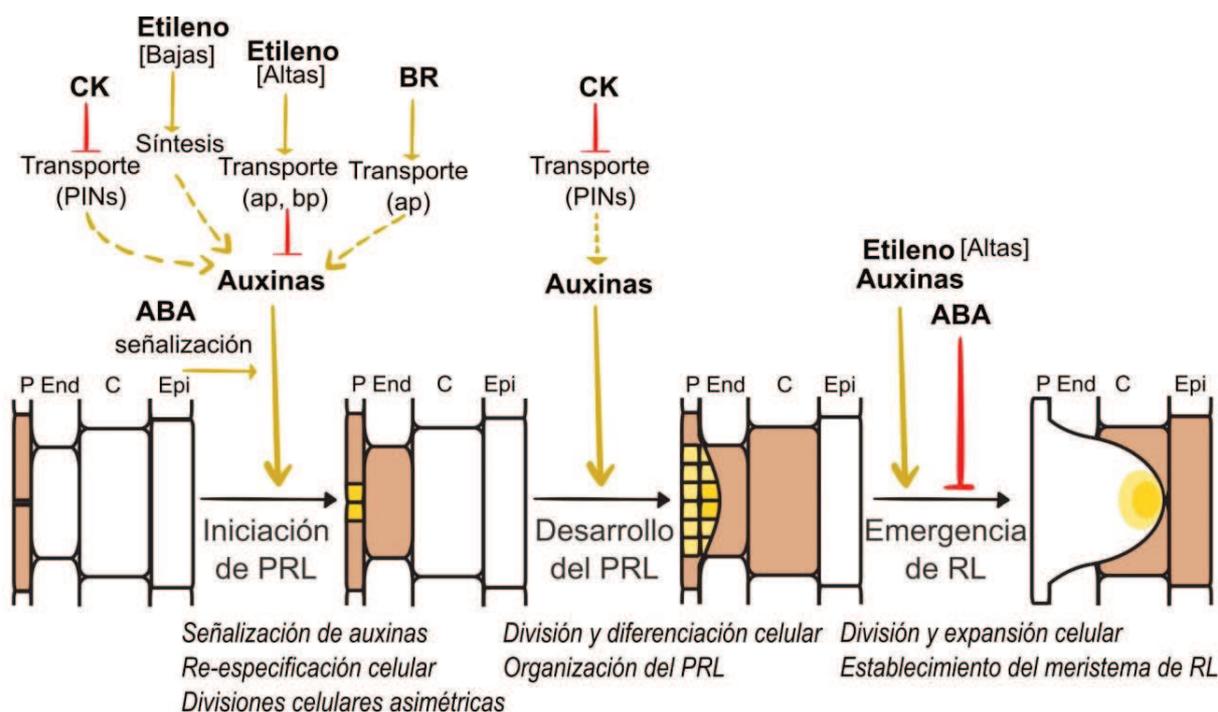
### 1.6.9 El ácido abscísico regula negativamente la emergencia de la raíz lateral

El ácido abscísico (ABA), es considerado la hormona del estrés de las plantas superiores y tiene un papel central en plasticidad del desarrollo [5]. Su función ha sido estudiada principalmente en tallos y semillas. Con respecto a las raíces, el ABA actúa como una señal que viaja desde la raíz hacia el tallo controlando el cierre estomático y estimulando el alargamiento de la raíz principal en respuesta a la sequía [45]. Sin embargo, en los últimos años, se han publicado excelentes trabajos que sugieren que el ABA también tiene un papel propio en el desarrollo de la ramificación radicular. La participación del ABA en la formación de raíces laterales se ha estudiado principalmente utilizando mutantes de señalización de ABA en Arabidopsis. Varios trabajos mostraron que el ABA actúa como regulador negativo de la emergencia de una raíz lateral (Figura 13), [22]. Esto es porque el agregado de ABA

exógeno inhibe la aparición del primordio de raíz lateral de la raíz principal antes de la activación del meristema de la nueva raíz lateral. Esta inhibición por ABA no puede ser rescatada con el tratamiento con auxinas exógenas, lo que indica que existe un control, en la etapa posterior a la emergencia, independiente de las auxinas en el que está involucrado el ABA [46]. Además, existe evidencia genética de la interacción ABA-auxinas en la formación de raíces laterales (Figura 13). La expresión del gen *ABI3* (*ABA INSENSITIVE3*), involucrado en la señalización de ABA, es inducible por auxinas en el primordio de raíz lateral (Figura 12), [47]. Las mutantes *abi3* tienen atenuada la capacidad de respuesta a la formación de raíces laterales frente al tratamiento con auxinas exógenas o con inhibidores del transporte de auxinas. Mientras que, las plantas con mutaciones en *era1* (aumenta la respuesta a ABA), aumentan el número de raíces laterales. Por lo tanto, mientras que el ABA exógeno regula negativamente la emergencia de una raíz lateral como se mencionó anteriormente, la señalización de ABA mediada por *ERA1* y *ABI3* es necesaria para la formación de raíces laterales mediada por auxinas, probablemente al inicio del desarrollo de raíces laterales, lo que indica una regulación cruzada entre la señalización de ABA y la acción de las auxinas (Figura 12 y Figura 13), [22], [45].



**Figura 12. ABA en el desarrollo del Primordio de Raíz Lateral.** Representación de la interconexión entre la señalización ABA (fucsia) y las auxinas (verde) durante el desarrollo del primordio de raíz lateral (PRL). El transporte y la señalización de las auxinas regulan directamente el desarrollo de un PRL. La señalización y la respuesta de ABA podrían regular negativamente este proceso, ya sea directa o indirectamente, afectando el transporte y la señalización de las auxinas a través de reguladores principalmente desconocidos. Un posible regulador de la interconexión ABA-auxinas es *ABI3*, que es inducido por las auxinas y reprimido por la actividad de *ERA1*, que a su vez es inducido por ABA. Figura modificada de De Smet y col., 2006 [48]



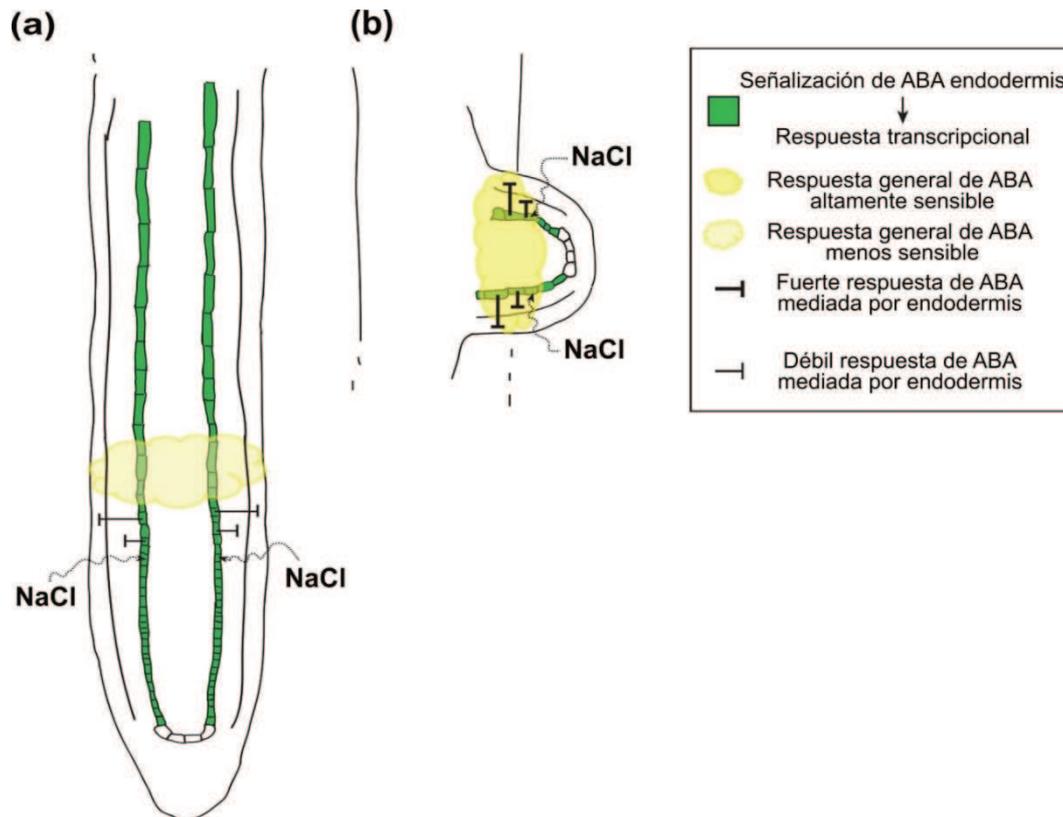
**Figura 13. Interacciones hormonales durante la formación de una raíz lateral.** El inicio de la formación de raíces laterales está regulado positivamente por las auxinas, pero negativamente por citoquininas (CK) y altas concentraciones de etileno. El transporte polar de auxinas, en ambas las direcciones acropetal (ap) y basipetal (bp), es necesario para el inicio de raíces laterales y para dar lugar al gradiente de auxinas en la organización del primordio de raíz lateral (color amarillo en el sitio de iniciación RL y el PRL). Las CK inhiben los picos de auxinas al alterar la expresión de los transportadores PIN, inhibiendo así el gradiente de auxinas para el inicio de una raíz lateral. Las altas concentraciones de etileno aumentan tanto el transporte de auxinas ap como bp, inhibiendo el inicio de una raíz lateral. Los brasinoesteroides (BR) promueven la iniciación de raíces laterales aumentando el transporte ap de auxinas. Las bajas concentraciones de etileno promueven el inicio de RL al aumentar la síntesis de auxinas. La señalización de ABA mediada por ABI3 es necesaria para una respuesta de auxinas adecuada para el inicio de RL. Las auxinas también promueven el desarrollo del PRL, pero las CK inhiben el desarrollo del PRL y afectan la cantidad máxima de auxinas al alterar la expresión de los transportadores PIN. El ABA inhibe la emergencia de RL mientras que las auxinas y el etileno promueven la emergencia de la RL. Abreviaturas: PRL: Primordio de Raíz Lateral; RL: raíz lateral; P: periciclo; End: endodermis; C: córtex; Epi: epidermis. Las flechas indican regulación positiva (amarilla) o negativa (roja). Figura modificada de Fukaki y col., 2009 [22] y Swarup y col., 2008 [25].

## 1.7 Desarrollo de la arquitectura radicular bajo estrés salino

En la naturaleza, la arquitectura del sistema radicular se encuentra bajo la influencia de numerosos factores abióticos y bióticos que generan la composición heterogénea del suelo. Esto implica una constante adaptación del sistema radicular a las condiciones abióticas de su entorno como la disponibilidad de agua, la alta salinidad, el bajo pH, y la disponibilidad de nutrientes como nitrógeno y fósforo, aunque el bajo contenido de hierro y azufre también son importantes [11], [49].

Entre la gran diversidad de factores abióticos que una planta puede enfrentar durante todo su ciclo de vida, la sequía y la salinidad representan los desafíos más difíciles para el crecimiento y desarrollo de las raíces. La alta salinidad puede ser causada por cantidades excesivas de sales disueltas como el cloruro de sodio (NaCl) en el suelo. Aunque, la acumulación de otros iones como  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$  también puede contribuir a la salinidad de las superficies. El depósito de NaCl en las células conduce a tensiones osmóticas e iónicas, lo que resulta en toxicidad y muerte celular [50], [51]. Es decir, que el estrés osmótico puede afectar el equilibrio hídrico celular e interrumpir diversas actividades celulares y, en casos graves, provocar la muerte de las plantas. Un entorno hiperosmótico puede hacer que la célula vegetal pierda agua, lo que reduce su presión de turgencia y afecta su capacidad de alargarse [52]. Una respuesta de desarrollo de las raíces frente a la sequía implica una regulación espacial de su crecimiento. En *Arabidopsis*, bajo un déficit hídrico severo, la raíz principal reprime el crecimiento al suprimir la división y el alargamiento celular. Esta detención en el desarrollo de la raíz está mediada por las especies reactivas de oxígeno que dan lugar a una muerte celular programada en la región meristemática [52]. Las ciclinas, un grupo de proteínas que controlan el progreso del ciclo celular son suprimidas temporalmente por el estrés salino en el meristema apical de la raíz. Estos cambios en los niveles de ciclinas están asociados con un tamaño reducido del meristema y el crecimiento de la raíz [53], [54]. Por otro lado, la elasticidad de la célula y la dirección de expansión celular pueden controlarse modificando la composición de la pared celular y sintetizando nuevos materiales de pared. En alta salinidad, la expansión celular aumenta a lo largo del eje radial en la epidermis y la corteza [53].

La sequía desencadena principalmente la acumulación de ABA que regula la respuesta del sistema radicular frente a estrés salino. Duan y colaboradores (2013) [52] demostraron que las raíces principales y las raíces laterales tienen programas de respuesta a la salinidad intrínsecamente diferentes, ya que las últimas muestran una supresión más fuerte que las raíces principales después del tratamiento con sal. Esto se dedujo de la caracterización de plantas mutantes con defectos en la biosíntesis de ABA, la transducción de señales y/o la transcripción génica regulada por ABA que, en condiciones de salinidad, mostraron un crecimiento de raíz lateral fuertemente reducido. Estos estudios demostraron que la señalización de ABA es crucial para la supresión del crecimiento de raíces laterales frente al estrés salino (Figura 14), [55].



**Figura 14. Regulación de la arquitectura radicular por sal (NaCl) a través de la respuesta endodermis-específica del ácido abscísico (ABA).** Comportamiento de una raíz principal (a) y una raíz lateral (b) frente al estrés salino. Verde: endodermis. Figura modificada de Ding y col., 2013 [55].

## 1.8 El gravitropismo en la raíz involucra las auxinas

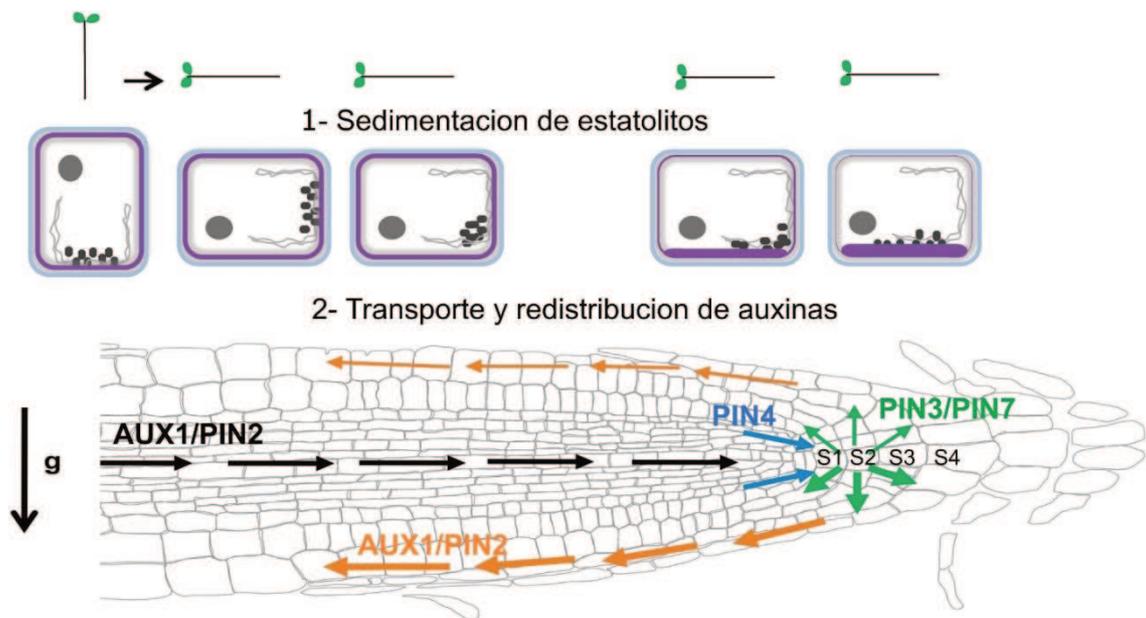
Las plantas poseen la capacidad de dirigir su crecimiento hacia estímulos externos como la luz, el agua, la temperatura y la gravedad. Estas respuestas de crecimiento direccional se denominan tropismos que comprenden, entre otros, el fototropismo, el hidrotropismo, el gravitropismo y el tigmotropismo. El gravitropismo involucra al crecimiento en respuesta a la gravedad, lo que permite que las raíces crezcan hacia abajo del suelo (gravitropismo positivo) y que los tallos lo hagan hacia arriba alejándose del mismo (gravitropismo negativo) [5], [56].

El gravitropismo de la raíz se puede dividir en tres fases principales: percepción de la gravedad, transmisión de la señal gravitrópica y, en última instancia, la respuesta de crecimiento. Además, algunos autores incluyen una cuarta fase denominada atenuación de la señal gravitrópica que sirve para evitar una futura curvatura de la raíz [57]. En las plantas superiores, la punta de la raíz es el sitio de percepción de la gravedad, ya que la remoción de la caliptra de la raíz resulta en raíces agravitrópicas [58]. Como se mencionó anteriormente, la caliptra de la raíz comprende las células centrales de la columela y las células que las rodean. La columela consiste de cuatro capas celulares denominadas S1, S2, S3, y S4 de las cuales,

las dos primeras (S1 y S2) son las más importantes para la percepción de la gravedad [59]. Esa capacidad de percepción está dada por la acumulación de amiloplastos de alta densidad (plástidos rellenos de almidón o estatolitos) dentro de las células S1 y S2, los cuales pueden cambiar su posición y reubicarse de acuerdo a la dirección de la gravedad cuando la raíz se reorienta espacialmente (Figura 15), [60]. La síntesis de almidón comienza con la conversión de glucosa-6-fosfato en glucosa-1 fosfato catalizada por la fosfoglucomutasa plastídica (PGM). La adenosina difosfato glucosa pirofosforilasa (ADG) convierte posteriormente la glucosa-1-fosfato y una molécula de ATP en ADP-glucosa, que luego se convierte en almidón mediante la sintasa 1 de gránulos de almidón unidos (GBSS1) y una serie de sintasas de almidón (SS1, SS2, SS3 y SS4) [5].

La sedimentación de amiloplastos densos, llenos de almidón, desencadena una cascada de transducción de la señal gravitrópica que da lugar a la respuesta gravitacional en la zona de elongación de la raíz y finalmente permite alcanzar la curvatura gravitrópica (Figura 15), [61], [62]. Recientemente, distintos estudios genéticos han demostrado que las señales que median la percepción y la respuesta gravitrópica son las auxinas. En primer lugar, la percepción de la gravedad está dada por la regulación de la acumulación de los gránulos de almidón en el ápice de la raíz, balanceada entre la síntesis y la degradación de los mismos. Las auxinas regulan la formación de gránulos de almidón a través del par TIR1-AXR3, que regula los genes que codifican enzimas claves en la vía de síntesis de gránulos de almidón como PGM, ADG1 y SS4 [63].

Luego de la percepción de la gravedad, los transportadores de auxina PIN3 y PIN7 se reubican en el lado inferior de las células de la columela y median la redistribución de las auxinas. Una vez que se establece la asimetría de auxinas por PIN3/7, éstas son transportadas por AUX1 y PIN2 a través de las células de la caliptra de la raíz lateral a las células epidérmicas de la zona de elongación (Figura 15). Se cree que las células epidérmicas son las principales mediadoras de la respuesta gravitrópica, desencadenada por esta distribución asimétrica de auxinas, ya que el bloqueo de la respuesta a auxinas específicamente en estas células da como resultado la pérdida de la curvatura gravitrópica. Además, mutaciones en varios componentes de la señalización de las auxinas dan lugar a raíces agravitrópicas. De acuerdo con esto, distintos estudios de expresión génica mostraron que luego de sólo 15 minutos de graviestimulación, se observan niveles máximos de transcripción de varios genes inducibles por auxinas como *IAA1*, *IAA2* y *ARF19* [57], [61], [63].



**Figura 15. Percepción y transducción de señales de gravedad en Arabidopsis.** Después de que las raíces sufren un giro de 90°, tiene lugar una serie de eventos: (1) luego de unos 5 minutos los estalolitos se mueven hacia el fondo de la célula y se distribuyen uniformemente. (2) Transporte y redistribución de auxinas. AUX1 y PIN2 distribuyen las auxinas desde el tallo hacia la punta de la raíz (flechas negras). PIN4 distribuye el flujo de auxinas desde el tejido vascular hacia las células de la columela (flechas celestes). PIN3 y PIN7 expanden hacia arriba el flujo de auxinas, permitiendo una mayor acumulación en la parte inferior del ápice de la raíz (flechas verdes). PIN2 y AUX1 transportan las auxinas desde la caliptra de la raíz lateral hacia las células epidérmicas en la zona de elongación donde se producirá la respuesta de crecimiento (flechas naranjas). Abreviaturas: g (flecha negra) indica vector de la gravedad; S1-S4 células de la columela. Figura modificada de Sato y col., 2015 [61].

## 1.9 El gravitropismo de la raíz se afecta por distintos tipos de estrés

Las raíces de las plantas pueden presentar gravitropismo negativo y alejarse de la dirección del vector gravedad. En muchas ocasiones, las raíces muestran hidrotropismo en respuesta a gradientes de humedad, presentando una regulación cruzada entre una señal gravitacional y otra señal ambiental. El hidrotropismo juega un papel muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas para tolerar el estrés por déficit hídrico, permitiendo que la raíz crezca en una dirección tal que maximice la captura de agua. Se ha demostrado que el estrés hídrico causa la degradación inmediata de los amiloplastos en las células de la columela, lo que reduce la capacidad de respuesta a la gravedad y el hidrotropismo posterior [64]. Como se mencionó anteriormente, otra limitación importante para el desarrollo del sistema de raíces es la salinidad del suelo, que limita la productividad de los cultivos agrícolas y la distribución de especies. Sun y colaboradores (2008) [65] observaron que las raíces de Arabidopsis exhiben un gravitropismo reducido y negativo frente al estrés salino. En otras palabras, un estrés salino severo (>150 mM NaCl) causa una degradación rápida (horas) de los

amiloplastos en las células de la columela de la raíz de *Arabidopsis*. Por otro lado, se demostró que la dirección alterada del crecimiento de la raíz, en respuesta a la salinidad, se correlaciona con el transportador de auxinas PIN2. El hecho de que la capacidad de respuesta a la gravedad de los mutantes *sos* (por sus siglas en inglés; *salt overly sensitive*) se reduce sustancialmente, indica que el gravitropismo alterado inducido por la salinidad está mediado por el desequilibrio iónico. La mutación de los genes *SOS* también conduce a una reducción de la degradación de amiloplastos en las células de la columela y causa defectos en la expresión del gen *PIN2* en respuesta al estrés salino. Estas evidencias indican que la vía *SOS* puede mediar la disminución de *PIN2* en la respuesta gravitropica inducida por sal en las raíces de *Arabidopsis* [65]. El conjunto de observaciones descritas en la literatura indica que las raíces responden a la salinidad con un cambio en la dirección de su crecimiento de forma tal que representa un compromiso adaptativo aparente entre la estimulación gravitropica y la estimulación salina.

## **1.10 Regulación de la expresión génica en el desarrollo vegetal**

Como se mencionó, las plantas son organismos sésiles con un extraordinario grado de plasticidad y una gran capacidad de percepción de señales del ambiente, lo que en su conjunto les permite ajustar el patrón de crecimiento y desarrollo a las condiciones en las que se encuentran [66]. Esto se sustenta en que un mismo genotipo puede mostrar diferentes fenotipos dependiendo del contexto de crecimiento, ya que la expresión fenotípica es el resultado de interacciones complejas entre la actividad de los genes del organismo y el medioambiente. Luego de que las plantas captan las señales del entorno, se desencadenan una serie de procesos a nivel molecular que culminan en la acumulación o degradación de proteínas específicas en determinados tejidos. Por esta razón, las cascadas de señalización están finamente reguladas, dado que de ellas depende que las plantas respondan al entorno y sobrevivan. La regulación de la expresión génica comprende controles a distintos niveles entre los que contamos el transcripcional, el postranscripcional y el postraducciona. El control a nivel transcripcional es uno de los mecanismos principales de la regulación de la expresión génica en plantas [67]. En este proceso tienen un papel fundamental las proteínas denominadas Factores de Transcripción (FTs).

### **1.10.1 Los Factores de Transcripción de plantas**

La regulación a nivel transcripcional requiere de elementos en *cis*, secuencias cortas de ADN presentes en las regiones reguladoras de los genes que actúan como sitios de

reconocimiento, y de elementos en *trans*, proteínas reguladoras codificadas en otra región del genoma, que reconocen y se unen específicamente a los elementos en *cis*, inhibiendo o activando la expresión de un determinado gen. Estas son las proteínas llamadas FTs. En plantas, los FTs son especialmente abundantes representando aproximadamente el 5 % de los genomas de *Arabidopsis* y arroz [68]–[70].

Los FTs exhiben al menos dos tipos de dominios: un dominio conservado de reconocimiento y unión a ADN y otro de interacción proteína-proteína que media, directa o indirectamente, la activación o represión de la transcripción. De esta forma los FTs, son capaces de formar homo- o hetero-oligómeros, así como también pueden interaccionar directamente con diferentes componentes de la maquinaria transcripcional basal, con coactivadores y con complejos modificadores de la cromatina [71], [72]. La clasificación en familias está dada principalmente según sus dominios de unión al ADN. Mientras que, la presencia de otros dominios conservados, rasgos estructurales, su función, los procesos biológicos en los que están involucrados y las vías de transducción de señales a las cuales participan dieron lugar a la división en subfamilias [67].

### **1.10.2 Factores de transcripción de la familia Homeodominio-cierre de leucinas**

Una de las familias de FTs de plantas se conoce como la familia homeodominio (HD). El HD es el dominio de unión al ADN mejor caracterizado y más extendido en todos los organismos eucariotas y está codificado por una caja homeótica (en inglés, *HomeoBox* o HB). Los genes HB fueron identificados por primera vez en *Drosophila melanogaster* y recibieron el nombre de homeóticos debido a que una mutación puntual o su expresión ectópica generaba el fenómeno de homeosis: cambio de un segmento corporal por otro [73]. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en animales, los genes HB de plantas estudiados hasta el momento no provocan un efecto homeótico canónico al ser mutados o expresados ectópicamente [74]. El HD consiste en un motivo conservado de 60 aminoácidos que se pliega en una estructura terciaria compuesta por tres hélices  $\alpha$  conectadas entre sí por dos vueltas y un rulo, además de un brazo amino terminal flexible. La elevada conservación de este dominio proteico entre diferentes reinos indica que la estructura terciaria descrita es crucial para mantener su funcionalidad [75].

En plantas con flores y musgos, los FTs con HD fueron clasificados en diez familias de acuerdo a la similitud de las secuencias del HD, al tamaño de la proteína, a la posición del HD dentro de la proteína, la asociación con otros dominios o motivos conservados [76], [77]. De acuerdo a esa clasificación las familias son: PHD finger, ZD-HD, WOX, la superfamilia TALE

(que incluye las familias BELL y KNOX), DDT, NDX, LD, PINTOX, SAWADEE, y la superfamilia HD-Zip (compuesta por cuatro subfamilias denominadas I, II, III y IV) [78].

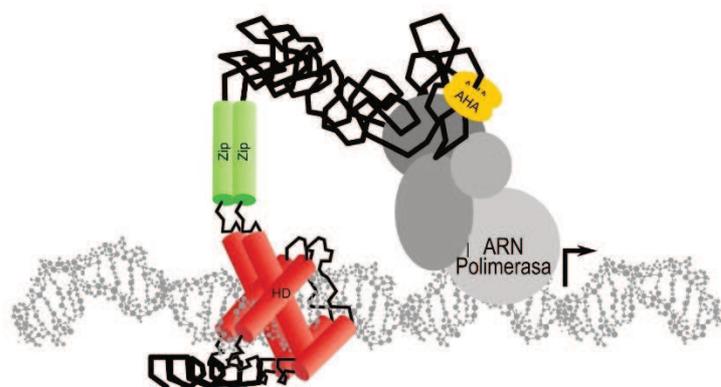
Los miembros de la superfamilia HD-Zip presentan en su estructura proteica un dominio de cierre de leucinas (LZ, del inglés *Leucine Zipper*), localizado inmediatamente después del HD, que actúa como un motivo de dimerización. El LZ se pliega en una hélice  $\alpha$  que tiene un residuo de lisina en cada séptima posición sobre el mismo lado de la hélice. Esta estructura tridimensional permite la formación de dímeros a través de interacciones hidrófobas; la dimerización es requisito *sine qua non* para que el FT una ADN. La orientación relativa de los monómeros es crucial para un reconocimiento eficiente del ADN [79]. Los dominios HD y LZ pueden ser encontrados en FTs de otros reinos eucariotas pero su combinación en una sola proteína es única de plantas [80], [81]. La división de la familia HD-Zip en cuatro subfamilias (I a IV) es de acuerdo a: a) la conservación de la secuencia del dominio HD-Zip que determina la especificidad de unión al ADN; b) los patrones intrón/exón en los genes que las codifican; c) los motivos conservados adicionales por fuera del dominio HD-Zip; y d) las vías de señalización en las que participan [74], [78].

### 1.10.3 Factores de transcripción de la subfamilia HD-Zip I: características y funciones

En Arabidopsis, la subfamilia I de proteínas HD-Zip está compuesta por 17 miembros denominados (*Arabidopsis thaliana* HomeoBox) AtHB1/HAT5, AtHB3/HAT7, AtHB5, AtHB6, AtHB7, AtHB12, AtHB13, AtHB16, AtHB20-AtHB23, AtHB40, AtHB51-AtHB54 [74]. Las proteínas codificadas poseen un tamaño de aproximadamente 35 kDa y presentan un alto grado de conservación dentro del HD, una conservación moderada en el LZ y baja similitud en el resto de la secuencia. Recientemente, el alineamiento de las secuencias completas de proteínas HD-Zip I de varias especies permitió la identificación de otros motivos conservados localizados en las regiones amino y carboxilo terminales con respecto al dominio HD-Zip. A la mayoría de estos motivos no se les ha asignado una función aún [82]. Sin embargo, uno de éstos, ubicado en la región C-terminal se caracterizó como un motivo de transactivación que contiene residuos aromáticos. Este tipo de motivos, denominados AHA había sido caracterizado en otros FTs y forman una hélice anfipática que está cargada negativamente capaz de interactuar con los componentes con la maquinaria de transcripción basal (Figura 16), [83].

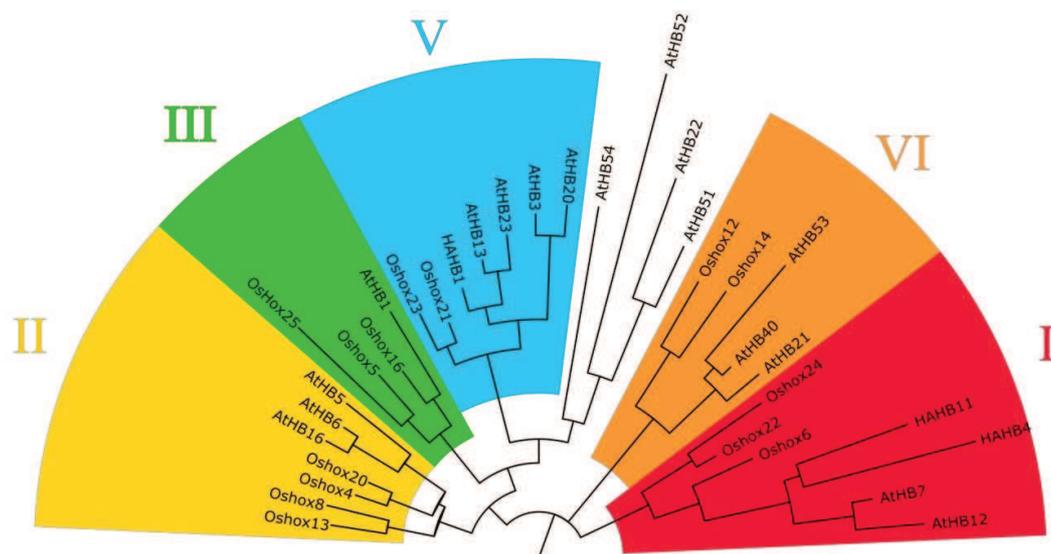
Los HD-Zip I reconocen *in vitro* la secuencia pseudopalindrómica CAAT(A/T)ATTG formando hetero- u homodímeros. Son capaces de homo- o heterodimerizar a través del dominio LZ; sin embargo, la interacción es selectiva. La afinidad de la proteína por una determinada

secuencia de ADN, pero no así su especificidad, se ve afectada por los aminoácidos del brazo N-terminal del HD [84]–[86].



**Figura 16. Representación esquemática de la estructura de un factor de transcripción HD-Zip I.** Las proteínas HD-Zip I reconocen el ADN a través del motivo HD (rojo), formando homo o heterodímeros a través del motivo Zip (verde). La transcripción de los blancos se activa mediante la interacción del motivo AHA (amarillo) con la maquinaria de transcripción basal (gris). Figura modificada de Perotti y col., 2017 [87].

Los 17 miembros de la subfamilia HD-Zip I han sido clasificados en seis grupos (llamados  $\alpha$  a  $\phi$ ) de acuerdo a su relación filogenética y a la estructura de los genes codificantes, considerando particularmente el número y la posición de los intrones [88]. Además, se realizó una nueva reconstrucción filogenética considerando proteínas HD-Zip I de otras especies, considerando los motivos conservados en las regiones amino y carboxilo terminales, que resolvió a estos FTs en seis grupos denominados I a VI (Figura 17), [82],[89].

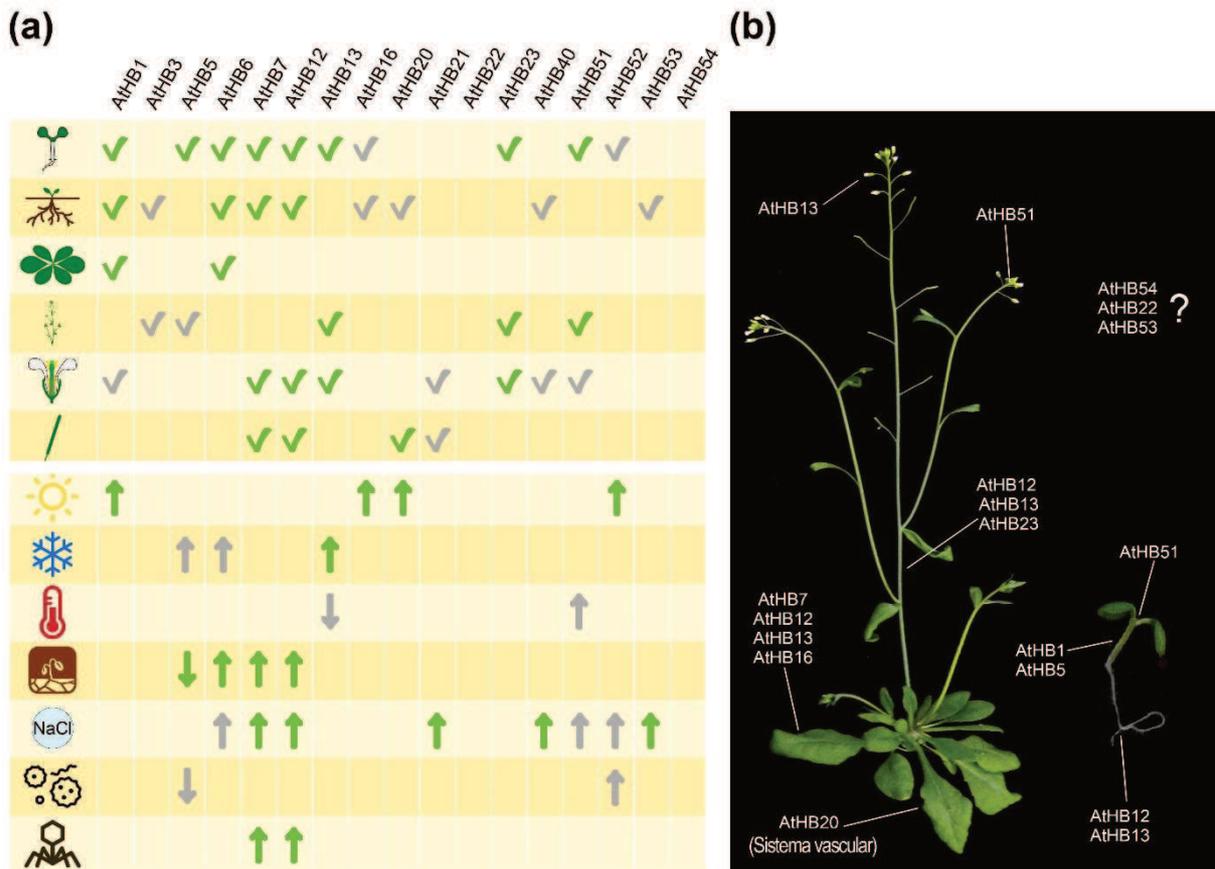


**Figura 17. Árbol filogenético de los factores de transcripción HD-Zip I de *Arabidopsis thaliana*, *Oriza sativa* y *Helianthus annuus*.** El árbol se construyó utilizando la secuencia aminoacídica completa de cada una de las proteínas mostradas. Se señalan los distintos grupos determinados por Arce y col., 2011 [82]. Figura modificada de Ribone y col., 2016 [89].

Según diferentes estudios funcionales, la expresión de los genes de la subfamilia HD-Zip I está regulada fuertemente por factores ambientales como el déficit hídrico, las temperaturas

extremas, el estrés osmótico y las condiciones lumínicas (Figura 18 a). En forma general, sus funciones están ligadas al desarrollo en respuesta a alteraciones en las condiciones ambientales, particularmente a aquellas que generan estrés abiótico (Figura 18 a). Estudios posteriores indicaron que los HD-Zip I también tienen un papel importante en otros procesos de las plantas, como las respuestas de estrés biótico o el desarrollo normal (Figura 18 b) [74], [90]–[92]. A modo de ejemplo, la expresión de los genes parálogos *AtHB7* y *AtHB12* se induce por ABA y estrés hídrico [88], [91]. Ahora bien, en condiciones normales de desarrollo estos genes presentan un patrón de expresión particular: *AtHB12* se expresa durante etapas tempranas, mientras que *AtHB7* se detecta en etapas avanzadas. Re y colaboradores 2014 [93] informaron que existe un complejo mecanismo por el cual la expresión de cada uno de estos genes se regula por el otro. Al sobreexpresarlos en Arabidopsis, se destacan fenotipos de hipersensibilidad al ABA en ensayos de elongación de raíz, un retraso en la elongación del tallo de la inflorescencia, hojas de la roseta con una forma más redondeada, pecíolos más cortos y un aumento en el número de ramificaciones del tallo [91], [93], [94].

Por otro lado, cuando las plantas se cultivan en condiciones óptimas, el desarrollo de las hojas se modula por la acción de varios HD-Zip I: *AtHB1*, *AtHB7*, *AtHB12*, *AtHB13* y *AtHB16*. Por ejemplo, *AtHB16* actúa como un regulador negativo de la expansión celular, ya que las plantas sobreexpresantes de este gen exhiben hojas más pequeñas que las plantas defectuosas en *AtHB16* o controles salvajes [95]. Así como también, en etapas tempranas de desarrollo, *AtHB13* tiene una función en los cotiledones y hojas en respuesta a la disponibilidad de carbono [96]. Otros miembros de la familia que participan del desarrollo normal son *AtHB13* y su gen parálogo, *AtHB23*. Estos FTs regulan negativamente la elongación del tallo de la inflorescencia mediante el control de la proliferación celular. Además, *AtHB13* participa del proceso de hidratación del polen induciendo la expresión de las proteínas críticas de la capa del polen [97]. Otro ejemplo es *AtHB1*; la caracterización de plantas de tabaco transformadas de forma de sobreexpresar *AtHB1* indicó que este FT es un regulador de las respuestas de luz y desarrollo de la hoja [98].



**Figura 18. Los genes HD-Zip I de Arabidopsis se expresan en distintos órganos y tejidos vegetales y se regulan por diferentes condiciones abióticas y bióticas.** (a) Panel superior: las tildes indican evidencia de expresión (en verde: de un artículo citado; en gris: de una base de datos). Panel inferior: las flechas indican represión (↓) o inducción (↑) de la expresión por factores externos. Cuando los datos se obtuvieron de la literatura, las flechas son verdes; mientras que de las bases de datos en gris. (b) Fotografía ilustrativa de una planta de Arabidopsis mostrando las funciones de los genes HD-Zip I en el desarrollo vegetal. Figura modificada de Perotti y col., 2017 [87]

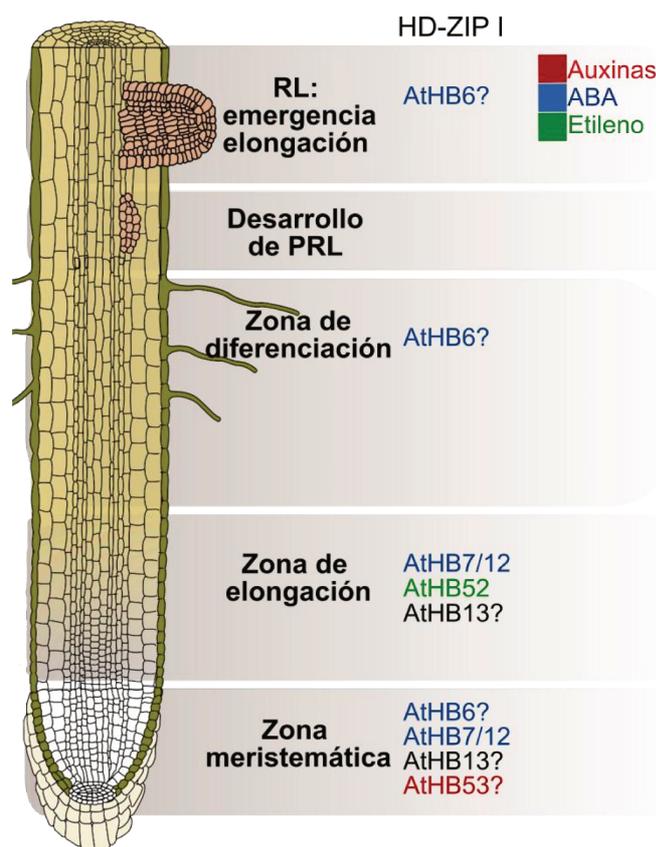
#### 1.10.4 Función de los factores de transcripción HD-Zip I en raíces de Arabidopsis

Los estudios funcionales de los factores de transcripción HD-Zip I en raíces son escasos, no obstante, durante los últimos años varios artículos han revelado funciones cruciales de estos FTs en las raíces de Arabidopsis. Por ejemplo, el análisis de la expresión del gen *AtHB6*, por reacción histoquímica, en plantas transgénicas transformadas con el promotor de *AtHB6* seguido del gen reportero  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*), muestran expresión del gen en la punta de la raíz de plántulas de tres días de edad. Específicamente, se detectó actividad *GUS*, en la zona de división celular y en la zona de diferenciación celular tanto en la raíz principal como en las raíces laterales (Figura 19), [99].

Por otro lado, se detectó expresión de *AtHB12* en raíces de plántulas de 14 y 23 días de edad, pero no en plantas de 45 días de edad [93], mientras que su parólogo *AtHB7* no fue detectado en etapas tempranas de crecimiento. Notablemente, las plantas dobles mutantes *athb7/athb12*, presentan raíces más cortas que el control salvaje mientras que las plantas que sobreexpresan *AtHB7* presentan un fenotipo diferencial de la raíz, posiblemente como resultado de la expresión ectópica o de la regulación por *AtHB12* [93]. Ambos genes son inducidos en raíces por estrés abiótico, como déficit de agua y salinidad, así como también por la hormona ABA. Recientemente se ha mostrado que estos genes parálogos se inducen por estrés causado por aluminio, particularmente en la zona de transición de la raíz principal [100]. Liu y colaboradores (2020) [100] mostraron que las raíces de plantas mutantes simples en *athb7* presentan una zona meristemática más pequeña que en plantas control. Esto se debe a una menor cantidad de células en esta zona, así como en la zona de elongación en la que las células corticales son más cortas que las de una planta salvaje (Figura 19). Por otro lado, bajo estrés por aluminio estos genes presentan un papel antagónico en la elongación de la raíz: *AtHB7* promueve la resistencia al estrés, mientras que *AtHB12* muestra el efecto opuesto [100].

Otro miembro estudiado en raíces es *AtHB13*, que se encuentra involucrado en el establecimiento del desarrollo tardío. Las plantas mutantes *athb13* exhiben una raíz principal más larga en comparación con los controles, lo que indica que *AtHB13* es un regulador negativo del crecimiento temprano de la raíz, probablemente a través de la inhibición de la división celular o elongación celular (Figura 19) [101].

*AtHB52*, se describe como un miembro clave en la interconexión entre las auxinas y la señalización por etileno, modulando el transporte de las auxinas corriente debajo de *EIN3* [102]. La expresión de este gen está regulada por etileno, y las mutantes *athb52* son insensibles a esta hormona. Por otro lado, tanto las plantas mutantes como sobreexpresantes para este gen, presentan una alteración en la distribución de las auxinas y la percepción del gravitropismo (Figura 19) [102]. Finalmente, se demostró que *AtHB53*, se expresa en el meristema radicular y tiene una función particular en las raíces que involucra las vías de señalización de auxinas/citoquininas (Figura 19) [103].



**Figura 19. Los genes HD-Zip I de Arabidopsis tienen funciones específicas en la raíz principal y las laterales dependiendo del patrón de expresión.** Representación esquemática de la raíz principal, el PRL, y raíz lateral, y las diferentes zonas: meristemática, de elongación y diferenciación. Los genes se agrupan a la derecha según su función en una zona particular. La regulación hormonal se indica con diferentes colores: auxinas (rojo), ABA (azul), etileno (verde). Los signos de interrogación denotan genes que actúan putativamente en la zona indicada. Figura modificada de Perotti y col., 2021 [104].

Por otro lado, en la especie modelo *Medicago truncatula*, *MtHB1* presenta una elevada homología de secuencia con el par *AtHB7/AtHB12*. *MtHB1* se expresa en los primordios de raíz lateral y en las raíces laterales emergidas en condiciones normales de desarrollo. Entre otros ensayos, un experimento de ChIP-PCR, permitió revelar que *MtHB1* reconoce directamente el elemento *cis* CAA/TAATTG presente en el promotor del gen *LBD1* (LOB-like, *Lateral Organ Boundaries*), que transcripcionalmente se encuentra regulado por auxinas y participa en la formación de las raíces laterales. Cuando las plantas de *Medicago truncatula* se exponen a estrés salino o a altas concentraciones de ABA, se induce *MtHB1* controlando la aparición de raíces laterales, al reprimir a *LBD1* [105], [106]. *MtHB1* media una respuesta de plasticidad del desarrollo radicular para adaptar la arquitectura raíz a las condiciones ambientales.

Otro miembro HD-Zip I, es el gen divergente de girasol *HaHB4* que se expresa débilmente en raíces, pero es fuertemente inducido en este órgano por sequía [107]. El promotor de este gen se caracterizó transformando plantas de Arabidopsis con una construcción en la que su promotor dirigió la expresión del gen reportero *GUS*. La expresión, observada por histoquímica, se encontró a lo largo de toda la raíz principal y las raíces laterales. Una mutación específica en un elemento *cis* limita la expresión del gen a los primordios de raíz lateral, lo que indica la presencia de elementos radiculares específicos en el promotor [108]. Sin embargo, su función en las raíces no se ha estudiado aún. *HaHB11*, otro miembro

divergente de la subfamilia I, se expresa tanto a lo largo de la raíz principal como en los primordios de raíz lateral, y en las raíces laterales. Cuando se sobreexpresa en *Arabidopsis*, las plantas transgénicas tienen raíces primarias perceptiblemente más largas [109][110].

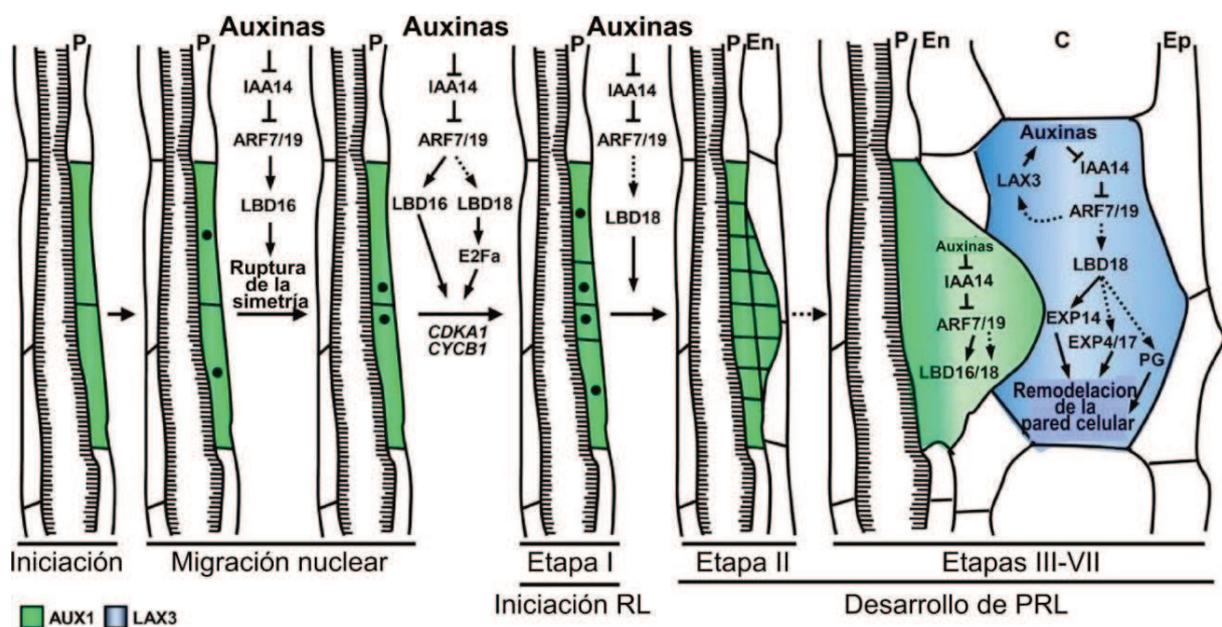
### 1.11 Regulación génica específica del desarrollo radicular

Cómo ya se mencionó en secciones anteriores, las auxinas funcionan como señales reguladoras claves durante el desarrollo de raíces laterales [27]. En *Arabidopsis*, las auxinas alteran la expresión de una gran cantidad de genes (> 2000) durante la morfogénesis de raíces laterales a través de FTs como ARFs (por sus siglas en inglés, *Auxin Response Factors*) y Aux/IAA (por sus siglas en inglés, *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACIDS*). Los ARF se unen a los elementos *cis* AuxRE (por sus siglas en inglés, *Auxin Response Elements*) en la región promotora de los genes de respuesta temprana de auxinas y activan o reprimen su transcripción. De los 23 genes ARFs en el genoma de *Arabidopsis*, cinco funcionan como activadores transcripcionales de genes sensibles a auxina: *ARF5 / MONOPTEROS (MP)*, *ARF6*, *ARF7 / NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL4 (NPH4)*, *ARF8* y *ARF19* [111]. Diferentes estudios genéticos permitieron identificar a *ARF7* y *ARF19* como genes reguladores clave en las vías de formación de raíces laterales. La doble mutante *arf7/arf19* exhibe un fenotipo de formación de raíces laterales severamente reducidas que no se observa en las mutantes simples *arf7* o *arf19*, lo que indica que la formación de raíces laterales está regulada en forma redundante y positiva por estos dos FTs de la familia ARFs [112], [113]. Otros estudios han demostrado que *ARF7* y *ARF19* regulan el desarrollo de raíces laterales activando la expresión de varios miembros de la familia LBD inducibles por auxinas (Figura 20).

La familia de genes *LBD* (del inglés, *Lateral Organ Boundaries*) contiene 43 miembros, de los cuales el gen *LOB* es el miembro principal. *LOB* codifica un FT que desempeña un papel en la separación de órganos y el desarrollo de órganos laterales y se expresa en los límites dentro de los tejidos del tallo [114]. En raíces, los miembros *LBD16*, *LBD18* y *LBD29* juegan papeles importantes durante el desarrollo de raíces laterales [111], [115], [116]. Durante el inicio de la formación de raíces laterales, se ha demostrado que *LBD16* promueve la división celular asimétrica de las células precursoras de raíces laterales LRFC, controlando la migración nuclear polarizada al polo celular común entre el par de LRFC (Figura 20) [117]. *LBD18* se expresa en el primordio de raíz lateral y los tejidos suprayacentes, y regula las divisiones anticlinales y periclinales durante la iniciación del desarrollo del primordio en las células periciclo-xilema y por otro lado participa en la progresión del desarrollo de primordio de raíz lateral a través de la regulación transcripcional de *E2Fa* y los genes como *CDKA1;1* y *CYCB1;1* (Figura 20) [118]. La función tanto de *LBD16* como de *LBD18* en la regulación del

desarrollo del primordio de raíz lateral está dada por el transportador de auxinas AUX1 (Figura 20). También se ha informado que LBD29 está involucrado en la regulación de la progresión del ciclo celular durante la formación de raíces laterales [119]. Más recientemente, se ha demostrado que tanto LBD18 como LBD29 participan en la emergencia de raíz lateral, al regular las enzimas de remodelación de la pared celular que promueven la aparición de raíces laterales (Figura 20). Esto sucede ya que ambos genes *LBD18/29* participan antes o después de regulación del transportador de auxinas LAX3, respectivamente. Mientras que LBD29 se une directamente a LAX3, LBD18 es inducido por este transportador que activa el módulo de señalización *SLR/IAA14-ARF7-ARF19*, y desencadena la activación por LBD18 de las distintas enzimas del tipo expansinas como *EXP14*, *EXP4/17* (Figura 20), [20], [25].

Otro miembro estudiado recientemente es *LBD14*, el cual se expresa en el primordio de raíz lateral y en la vasculatura de la raíz principal, y actúa promoviendo la emergencia de la raíz lateral. Además, se ha informado que la represión de la expresión de *LBD14* por ABA se correlacionaría con los efectos inhibitorios de ABA en la emergencia de raíces laterales [120].



**Figura 20. Esquema representativo de la red de señalización molecular de *LBD16* y *LBD18* y los transportadores de auxinas *AUX1* y *LAX3* durante el desarrollo de raíz lateral.** La columna sombreada con líneas indica el xilema. La flecha gruesa y la flecha punteada indican activación directa e indirecta de los genes blanco, respectivamente. Abreviaturas: RL, raíz lateral; P, Periciclo; En, endodermis; C, corteza; Ep, epidermis. Figura modificada de Lee y col., 2015 [116].

# OBJETIVOS

*“Aprender implica descubrirse fallando, no  
sabiendo, aceptando.  
También implica crecer”*

**Arde la Vida. Magalí Tajés.**

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Contribuir a la comprensión de la función y vías de señalización reguladas por el factor de transcripción *AtHB23* en el establecimiento de la arquitectura radicular en condiciones normales de crecimiento y en respuesta a diferentes factores ambientales y/o hormonales.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- ♣ Identificar y aislar diferentes versiones de la región promotora del FT *AtHB23* de *Arabidopsis* y clonaras en un vector que permita la fusión a genes reporteros como *GUS* y/o *GFP*.
- ♣ Analizar el patrón de expresión de *AtHB23* en raíces, de diferentes estadios de desarrollo y orden de ramificación, de plantas crecidas en condiciones normales. Asimismo, evaluaremos la expresión del gen frente a diferentes condiciones estresantes y/o medios suplementados con hormonas.
- ♣ Obtener líneas independientes de plantas silenciadas y sobreexpresantes de *AtHB23* y evaluar en detalle la fisiología y el desarrollo radicular de estas plantas en condiciones óptimas de crecimiento y frente a diferentes estímulos ambientales y/o hormonales.
- ♣ Complementar las plantas silenciadas con las construcciones sobreexpresantes correspondientes para confirmar la función de este gen en los fenotipos que se encuentren.
- ♣ Evaluar los genes y vías hormonales implicados en el desarrollo radicular, y su posible regulación por *AtHB23*.
- ♣ Realizar construcciones genéticas capaces de expresar el gen *AtHB23* bajo el control de su propio promotor y llevar a cabo ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina seguido de qPCR para poder determinar blancos directos del FT de estudio.
- ♣ Identificar las vías involucradas en el desarrollo radicular frente a estrés salino a partir de los fenotipos diferenciales observados en las plantas mutantes en el gen en estudio.
- ♣ Comparar los transcriptomas de las plantas salvajes y de plantas silenciadas en *AtHB23* en condiciones normales y frente a estrés abiótico, utilizando secuenciación masiva de ARNs.

# MATERIALES Y MÉTODOS

*“...Somos una especie en viaje  
No tenemos pertenencias, sino equipaje  
Vamos con el polen en el viento  
Estamos vivos porque estamos en movimiento...”*

**Movimiento. Jorge Drexler**

## 3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 MATERIALES

#### 3.1.1 Cepas bacterianas

En la Tabla 1 se detallan los genotipos de las cepas de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas en este trabajo de tesis.

**Tabla 1. Cepas bacterianas**

Microorganismo	Cepa	Genotipo	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK-, mK+) phoA supE44 $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1	[121]
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	LBA4404	Posee el plásmido Ti desarmado pAL4404, con resistencia a estreptomicina, que se obtiene al reemplazar la región del ADN-T del plásmido pTiAch5 de la cepa salvaje Ach5 por el plásmido pBR322. Presenta resistencia cromosomal a rifampicina.	[122]

#### 3.1.2 Especies vegetales

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* tanto de ecotipo Columbia 0 (Col-0) como ecotipo Landsberg erecta (Ler) para los experimentos realizado en este trabajo de tesis. Además, se usaron plantas de *Nicotiana benthamiana* para los ensayos de transformación transitoria de hojas.

#### 3.1.3 Medios de cultivo

Los medios de cultivos utilizados para el crecimiento de bacterias y plantas se especifican en la Tabla 2.

**Tabla 2. Medios de cultivo**

Medio de cultivo	Organismo	Composición	Referencia
<b>Luria Bertani (LB)</b>	<i>E. coli</i>	Peptona de carne 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l; pH 7.	[123]
	<i>A. tumefaciens</i>	Para medios sólidos, se añadieron 15 g/l de agar.	
<b>Murashige &amp; Skoog</b>	<i>Arabidopsis</i>	Murashige & Skoog Basal Medium con Gamborg's Vitamins (Sigma-Aldrich) KNO <sub>3</sub> 1,9 g/l; NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 1,65 g/l; CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,44 g/l; MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 0,37 g/l; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,17 g/l; Na <sub>2</sub> EDTA 37,3 mg/l; FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 27,8 mg/l; MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O 22,3 mg/l; H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 6,2 mg/l; ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O 8,6 mg/l; KI 0,83 mg/l; Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O 0,25 mg/l; CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O 0,025 mg/l; CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 0,025 mg/l; pH 5,8. Para medios sólidos, se añadieron 9 g/l de agar.	[124]

El medio MS se utilizó con un suplemento de vitaminas de Gamborg 1 µl/ml (Gamborg y col., 1968). La solución de vitaminas de Gamborg incluyó: m-inositol 100 mg/l, tiamina-HCl 10 mg/l, ácido nicotínico 1 mg/l, piridoxina-HCl 1 mg/l.

### 3.1.4 Vectores

El plásmido **pGEM T-easy** (Promega), se utilizó para el clonado de productos provenientes de reacciones de amplificación con la enzima Taq ADN polimerasa. El vector se provee digerido, con el agregado de un nucleótido de timina en los extremos 5', para permitir la ligación con los fragmentos de PCR obtenidos. Este plásmido presenta un gen de resistencia a ampicilina.

Los plásmidos **pENTR3C** y **pENTR D-Topo** fueron desarrollados por Invitrogen® y actualmente son comercializados por ThermoScientific®. El primero permite el clonado de fragmentos amplificados por PCR mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas, para luego introducir estos fragmentos mediante tecnología GATEWAY® en un vector de destino. El segundo también se utiliza para generar un vector de entrada GATEWAY®, pero utilizando el sistema de clonado direccional con topoisomerasas. Algunos componentes importantes de estos vectores son los sitios *attL1* y *attL2* flanqueando el sitio de inserción de la secuencia deseada para permitir la recombinación específica y el gen *ccdB* para selección negativa de no transformantes. Este vector contiene un gen de resistencia a kanamicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *pUC*.

El plásmido **pKGWFS7** [125] es un derivado del vector binario *pPZP200*. Este plásmido fue diseñado para clonados utilizando la tecnología GATEWAY®, particularmente para el análisis de secuencias promotoras. El promotor clonado permite controlar la expresión de la proteína de fusión GFP (proteína fluorescente verde; del inglés, *Green Fluorescence Protein*) – GUS ( $\beta$ -glucuronidasa). Dentro de la región de movilización de ADN, necesaria para la transformación de plantas, contiene además el gen *NPTII* que confiere resistencia a kanamicina en plantas. Otras secuencias relevantes dentro del vector incluyen el gen de resistencia a espectinomicina en bacterias y un origen de replicación bacteriano *ColE1*.

### 3.1.5 Plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

En la Tabla 3 se muestran las diferentes plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas en esta Tesis Doctoral.

**Tabla 3. Líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* adquiridas por otros medios.**

Nombre	ID	ID del locus	Gen	Referencia
<i>promotorAUX1:GUS:</i>		AT2G38120	<i>AUX1</i>	[126]
<i>promotorLAX1:GUS</i>		AT5G01240	<i>LAX1</i>	[127]
<i>promotorLAX3:GUS</i>		AT1G77690	<i>LAX3</i>	[127]
<i>DR5:GUS</i>				[128]
<i>promotorLBD16:GUS</i>	CS68141 (ABRC)	AT2G42430	<i>LBD16</i>	[111]
<i>promotorARF7:ARF7:GR</i> <i>en arf7/19</i>		AT5G20730	<i>ARF7</i>	[111]
<i>arf7/19</i>	CS24625 (ABRC)	AT5G20730 AT1G19220	<i>ARF7/19</i>	[112]
<i>pK2GW7-amiR23</i>				[97]
<i>lax3</i>		AT1G77690	<i>LAX3</i>	[127]

### 3.1.6 Oligonucleótidos

En la Tabla 4 se enumeran los oligonucleótidos utilizados para clonado. Se detalla el nombre, la secuencia y el clonado en el que se utilizaron.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para clonado**

Nombre	Secuencia 5'→3'	Clonado
AtHB23prF	gggggATCCACATTAACAATACTCAAgtTTgTC	<i>promotorAtHB23:GUS:GFP</i>
AtHB23prR	ggggAATTCgTCTCTTgTTggTTgTTTTCTTC	<i>promotorAtHB23:GUS:GFP</i>
AtHB23prF100	gggggATCCgTgATACCATgTAaggCCTC	<i>promotorAtHB23Δ1000:GUS:GFP</i>
AtHB23prF124	gggggATCCAgAAAgtTgATAAgTgggggAC	<i>promotorAtHB23Δ1274:GUS:GFP</i>
AtHB23CDSF	gCggCCgCATgTCTTgTAATAATAATggCTTAgC	<i>promotorAtHB23:AtHB23:GUS</i>
AtHB23CDSR	gggCTCgAgTCCTgAATTgTATTgTTgCTggTC	<i>promotorAtHB23:AtHB23:GUS</i>

En la Tabla 5 se detallan el nombre, la secuencia de los oligonucleótidos y el ensayo de RT-qPCR para el cual fueron utilizados los siguientes oligonucleótidos.

**Tabla 5. Oligonucleótidos usados para determinaciones de RT-qPCR.**

Nombre	Secuencia 5'→3'	RT-qPCR (niveles de transcritos de)
AtHB23qPCR-2F	gCTTCAAgtCTCAggTAATggCA	<i>AtHB23</i>
AtHB23qPCR-2R	ggATggCCTAaggCgAATTg	<i>AtHB23</i>
LAX3qPCR-FP	AATCAATTCCgCggTCggAT	<i>LAX3</i>
LAX3qPCR-RP	TCCTCCTACCACTCTCggTg	<i>LAX3</i>
LAX1qPCR-FP	gCTCTgCTTCggAgAgTgTAg	<i>LAX1</i>
LAX1qPCR-RP	CATCCTCCCggAgACTACT	<i>LAX1</i>
AUX1qPCR-FP	ATTgCCTCCATCATCCACgg	<i>AUX1</i>
AUX1qPCR-RP	TAACCgCgTgACCTCCAAAg	<i>AUX1</i>
LBD16qPCR-F	TgACCCTgTTTATggATgTgTC	<i>LBD16</i>

LBD16qPCR-R	TgATTgCAAgAAAgCCACCT	<i>LBD16</i>
LBD29qPCR-F	gCTAggCTTCAAgATCCCATC	<i>LBD29</i>
LBD29qPCR-R	TgTgCTgCTTgTTgCTTTAgA	<i>LBD29</i>
LBD14-CDNA-F	TCGAGAAGGTTCCCTCAAGATGA	<i>LBD14</i>
LBD14-CDNA-R	CATGGACCGCTCATTGTCGC	<i>LBD14</i>
ACT-qPCR-F	ggTAACATTgTgCTCAGTggTgg	Normalizador ACT qPCR
ACT-qPCR-R	AACgACCTTAATCTTCATgCTgC	Normalizador ACT qPCR
SS1F	CTTgATTACCAgAAgggCATTg	SS1
SS1R	CgTTTTCCCAgAgTAgTTTCg	SS1
SS2F	AgATAAAgCACggggATggg	SS2
SS2R	CCAACCAAgACCCgTTTCAC	SS2
SS3F	CTggggCTgACTTTATTCTTgT	SS3
SS3R	AgTCTTgCTCCATCACCGTCT	SS3
SS4F	ACACgCCCTTAgAAgCAgC	SS4
SS4R	ACAAATCggAggCTgCgTAA	SS4
GBSS F	ATAgggAgATTggAggAgCAgA	GBSS
GBSS R	CAATgTggAAACCTgTgTAgC	GBSS
ADG1 F	CACCgTCTAAgATgCTTgATgC	ADG1
ADG1 R	gATgTgCgAgTTTTTCCCAAT	ADG1
ADG2 F	ATCAAggAgAAACCTgCCACCA	ADG2
ADG2 R	TCgTAgTAATCTgCCCCAAgC	ADG2
PGM F	gTgAAAgAgTATTgggCgACA	PGM
PGM R	CCgTgAACACAAACCgAACA	PGM
GWD F	AACgAgAgAgCATACTTCAGC	GWD
GWD R	CAATCggTTTgCTTgggTAg	GWD
BAM1 F	ACACgAgCAgATTCTCAAaggC	BAM1
BAM1 R	TCCCTTCACCCATTTTCTTCA	BAM1
BAM3 F	CATTcggACAAgTggTAgCAA	BAM3
BAM3 R	CAGCCTCCTCCACATTCTCA	BAM3
AMY3 F	ATTATCATTCCgAgATTgCTgC	AMY3
AMY3 R	CggCTACAgACCAgTTTTgC	AMY3

En la Tabla 6 se detallan el nombre, la secuencia de los oligonucleótidos y el ensayo de Inmuno-precipitación de la cromatina (ChIP) para el cual fueron utilizados los siguientes oligonucleótidos.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en ensayos de ChIP-qPCR

Nombre	Secuencia 5'→3'	ChIP-qPCR (del gen)
FPLBD29-HD	GGTAGATAGGAGCAGGTCCACAA	AtHB23
RPLBD29-HD	GGTATAGTGGTTGGAGCGCCT	AtHB23
FPLBD29-D	CTCGCAGCTTGTAAACCTCA	AtHB23
RPLBD29-D	CCGCCACTCATAACGAAAATAGC	AtHB23
FPLBD29-CDNA	AGCTCTGGCTCTCCTTGTGG	AtHB23
RPLBD29-CDNA	GCATTGCTAGCTCCAAAGACC	AtHB23
FPLBD16-HD	AGTGATAGAAGACCTAAGACTACCTCA	AtHB23
RPLBD16-HD	GGAGACTGCAACATGAGACTTC	AtHB23
FPLBD16-D	GGGATGTTTTGTGGTTTTCCCA	AtHB23
RPLBD16-D	AGGGAAGAATTGAAGGGAACGTAG	AtHB23
FPLBD16-CDNA	TgACCCTgTTTATggATgTgTC	AtHB23
RPLBD16-CDNA	AATATCATACGAGTCAACCACCACA	AtHB23
FPLBD14-HD	AATCTCCACTAAACCAACATTAAGTCA	AtHB23
RPLBD14-HD	CCCATGATTATCCAGCCAC	AtHB23
FPLBD14-D	GCTACTGGTCGGATGGTTTTGG	AtHB23
RPLBD14-D	GCCGTGCCCATCAGTCAAAT	AtHB23
FPLBD14-CDNA	TCGAGAAGGTTCCCTCAAGATGA	AtHB23
RPLBD14-CDNA	CATGGACCGCTCATTGTGCGC	AtHB23
FPLAX3-HD1	TCCCCGACACTCGTTACT	AtHB23
RPLAX3-HD1	GCCATTTTTCTCTTCTTCTCAGT	AtHB23
FPLAX3-HD2	ATCATCCTCATCACAAGAAGGAGG	AtHB23
RPLAX3-HD2	ATTGAAAATAGAAGTGATGACAATGATGT	AtHB23
FPLAX3-D3	GTTCGTCCCCAAATTCTGCCT	AtHB23
RPLAX3-D3	CCAGGAGAAAACCTCAACGGAGG	AtHB23
FPLBD16ARF	AGAAGTCTCATGTTGCAGTCTCC	ARF7
RPLBD16ARF	TTATCGAGTGAGCCAAAGGGTG	ARF7
FPA <sub>t</sub> HB235UTR	TTTCCAAAACATACAAAAGCCCAT	ARF7
RPA <sub>t</sub> HB235UTR	AATAGGAGACAAGACTCAAAGCCG	ARF7
FPA <sub>t</sub> HB23ARFD	ACTAGTGAGAGTTACCATGTAGGAC	ARF7
RPA <sub>t</sub> HB23ARFD	GCAAGCAAACCTTTAGAGGCC	ARF7
FPA <sub>t</sub> HB23D	AACGTGGAGAAGTTGTGTCTGAAT	ARF7
RPA <sub>t</sub> HB23D	TGGCACGACCATACCATATACTACA	ARF7
FPA <sub>t</sub> HB23CDNA	CTCGATCCAAAACCAAGCAGC	ARF7
RPA <sub>t</sub> HB23CDNA	ATGAAGTTTCTGCTTTTACCTGAGC	ARF7

### 3.1.7 Construcciones genéticas para plantas

#### 3.1.7.1 Construcciones para expresar un promotor específico

***promotorAtHB23::GUS::GFP***: Un fragmento de 1793 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *AtHB23* se amplificó con oligonucleótidos específicos (Tabla 4) a partir de ADN genómico de plantas salvajes. El producto de PCR se clonó en *pGEM-Teasy* y luego se subclonó en los sitios *Sall* y *XbaI* del plásmido *pENTR3C*. Posteriormente se realizó una recombinación Gateway® (Invitrogen) utilizando como vector de destino el plásmido *pKGWFS7*.

***promotorAtHB23Δ1000::GUS::GFP***: Un fragmento de 1000 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *AtHB23* se amplificó con oligonucleótidos específicos (Tabla 4) a partir de ADN genómico de plantas salvajes. El producto de PCR se clonó entre los sitios *BamHI* y *EcoRI* del plásmido *pENTR3C*. Posteriormente se realizó una recombinación Gateway® (Invitrogen) utilizando como vector de destino el plásmido *pKGWFS7*.

***promotorAtHB23Δ1273::GUS::GFP***: Un fragmento de 1273 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *AtHB23* se amplificó con oligonucleótidos específicos (Tabla 4) a partir de ADN genómico de plantas salvajes. El producto de PCR se clonó entre los sitios *BamHI* y *EcoRI* del plásmido *pENTR3C*. Posteriormente se realizó una recombinación Gateway® (Invitrogen) utilizando como vector de destino el plásmido *pKGWFS7*.

#### 3.1.7.2 Construcciones para expresar un gen de interés bajo su promotor

***promotorAtHB23:AtHB23::GUS::GFP***: se amplificó con oligonucleótidos específicos la región codificante de *AtHB23* (778 pb) y el producto de amplificación se clonó en un vector *pGEM T-easy*. Para luego ser subclonado en un vector *pENTR3C-PromAtHB23:GUS* entre los sitios *NotI* y *XhoI*. Posteriormente se realizó una recombinación Gateway® (Invitrogen) utilizando como vector de destino el plásmido *pKGWFS7*.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Métodos utilizados para el trabajo con ácidos nucleicos

#### 3.2.1.1 Transformación de bacterias por electroporación

La preparación de células competentes de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, y las condiciones de electroporación utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante del equipo (*Gene Pulser™*, Bio-Rad Laboratorios Inc., USA). El choque eléctrico se realizó en

cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) aplicando una diferencia de potencial de 2,5 kV. Inmediatamente después del pulso eléctrico se agregó 1 ml de medio LB fresco y se incubó la suspensión durante 1 h a 37 °C para *Escherichia coli* y 1 h 30 min a 28 °C para *A. tumefaciens*. Finalmente, el cultivo se centrifugó a 4500 rpm durante 5 min, el sedimento celular se resuspendió en 200 µl de medio y se sembró sobre LB sólido suplementado con los antibióticos correspondientes en placas de Petri. Estas placas se incubaron a 37 °C o a 28 °C hasta la aparición de colonias (aproximadamente 16 y 48 h para *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, respectivamente).

### 3.2.1.2 Obtención y cuantificación de ácidos nucleicos

#### 3.2.1.2.1 Minipreparación de ADN plasmídico

Para la preparación de ADN plasmídico a partir de células de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó el método de lisis alcalina [129]. Las células transformadas de *Escherichia coli* se cultivaron a 37 °C con agitación y hasta saturación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente; mientras que las células transformadas de *Agrobacterium tumefaciens* se cultivaron a 28 °C, con agitación hasta saturación en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente al vector (kanamicina 50 µg/ml; espectinomicina 100 µg/ml; cloranfenicol 35 µg/ml). Cuando las bacterias transformadas fueron *Agrobacterium tumefaciens*, se agregaron asimismo estreptomina 50 µg/ml y rifampicina 50 µg/ml para seleccionar la cepa LBA4404 utilizada. Luego se tomaron 1,5 ml de cada cultivo y se centrifugó durante 5 min a 5000 rpm. Cada sedimento celular se resuspendió en 100 µl de Solución I y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se agregaron 200 µl de Solución II, se mezcló por inversión y se incubó durante 5 min en hielo. Se prosiguió con la preparación, agregando 150 µl de Solución III y la mezcla se incubó nuevamente 5 min en hielo, antes de ser centrifugada durante 15 min a 12000 rpm y 4 °C. Se recuperó el sobrenadante, se le practicó una extracción fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y se centrifugó 10 min a 8000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN plasmídico mediante el agregado de 2 volúmenes de etanol absoluto. Esta mezcla se incubó 60 min a -20 °C y se centrifugó 15 min a 12000 rpm y a 4 °C. El precipitado se lavó con etanol 70 % (v/v) y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN plasmídico fue resuspendido en 30-50 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

Para las preparaciones de ADN plasmídico utilizado en reacciones de secuenciación y en otros casos en los que se precisaron muestras de alta calidad, se utilizó el kit comercial *Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System* (Promega) siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

### **3.2.1.2.2 Minipreparación de ADN genómico de *Arabidopsis thaliana***

Para analizar la presencia de los transgenes en las plantas de *Arabidopsis thaliana*, se realizaron preparaciones de ADN genómico empleando un método rápido descrito por Li y Chory (1998)[130] con algunas modificaciones. Se cortó una hoja joven y se colocó en un tubo, para ser macerada durante 15 s. Luego se agregaron 700 µl de solución de extracción de ADN genómico, se agitó vigorosamente durante 15 s, se dejó reposar en hielo, y se realizó una extracción con 700 µl de la mezcla fenol:cloroformo 1:1 (v/v). Luego de centrifugar 10 min a 12000 rpm, se recuperó el sobrenadante y se hizo otra extracción sólo con cloroformo (1 volumen). Posteriormente, se centrifugó 10 min a 12000 rpm, y se precipitó el ADN agregando al sobrenadante 1 volumen de isopropanol y 1/10 volúmenes de NaAc 3 M (pH 5,2), para luego incubar 1 h a -20 °C. La mezcla alcohólica se centrifugó 20 min a 12000 rpm, el precipitado se lavó con 500 µl de etanol 70 % (v/v) y se secó a temperatura ambiente. Finalmente, el ADN genómico se resuspendió en 100 µl de H<sub>2</sub>O destilada estéril.

### **3.2.1.2.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa**

La purificación de fragmentos de ADN se realizó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión (Promega), empleándose solución TAE 1 x tanto para la preparación del gel como para la solución de corrida. Una vez identificadas mediante visualización sobre transiluminador UV, las bandas correspondientes a los fragmentos esperados se escindieron utilizando un bisturí estéril y se incubaron con 2 volúmenes de agua milliQ en un baño de agua a 65 °C hasta observar la completa disolución de la agarosa. Posteriormente, se llevaron a cabo 2 extracciones sucesivas con 1 volumen de fenol y a continuación una extracción con cloroformo, todas seguidas de una centrifugación de 10 min a 10.000 rpm a temperatura ambiente, a fin de separar las fases. El ADN presente en la fase acuosa fue precipitado mediante el agregado de 1/10 volúmenes de NaAc 3 M (pH 5,2) y 1 volumen de isopropanol. Para facilitar la precipitación de fragmentos de muy bajo peso molecular o en baja cantidad, se adicionaron 2,5 µg de ARNt (Sigma) a la solución alcohólica. Tras la precipitación y su posterior lavado con etanol 70 %, el fragmento purificado fue solubilizado en 12 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril.

#### **3.2.1.2.4 Extracción y purificación de ARN total**

Las extracciones de ARN fueron realizadas con un reactivo símil Trizol (Invitrogen™) preparado en el laboratorio, [131]. Para estas extracciones, se pulverizaron 50 – 100 µg de tejido vegetal con N<sub>2</sub> líquido en un mortero u Eppendorf estéril (dependiendo del tipo de tejido vegetal), y luego se transfirió el polvo fino a un tubo de tipo Eppendorf en el cual se agregó 1 ml del reactivo de extracción. Tras mezclar varias veces por inversión, la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min antes de agregar 200 µl de cloroformo y centrifugar por 20 min a 11800 rpm a 4 °C. La fase acuosa se precipitó posteriormente con 1 volumen de isopropanol, incubando 10 min a temperatura ambiente. Tras dos lavados con etanol 70 % v/v y secado, el precipitado se resuspendió en 30 µl de H<sub>2</sub>O milliQ estéril.

#### **3.2.1.2.5 Cuantificación de ácidos nucleicos totales**

La calidad y cantidad del ARN o ADN fueron evaluadas con el equipo Nanodrop NanoPhotometer™ (IMPLEN) midiendo la absorbancia a 260 nm ( $A_{260}$ ; [123]) - Se consideró que un valor de  $A_{260}$  de 1 corresponde aproximadamente a 40 µg/ml de ARN o a 50 µg/ml de ADN. Para cada medición se utilizó un volumen de 3 µl por muestra. La contaminación de las purificaciones con proteínas fue evaluada mediante el cociente  $A_{260}/A_{280}$ , y la de carbohidratos y compuestos fenólicos mediante el cociente  $A_{260}/A_{230}$ . El valor para dichas relaciones cuando las muestras presentan una calidad aceptable debe estar comprendido entre 1,8 y 2.

#### **3.2.1.3 Reacciones Enzimáticas**

##### **3.2.1.3.1 Digestión de ADN con endonucleasas de restricción**

Las digestiones de fragmentos de ADN se realizaron con las enzimas de restricción y las soluciones reguladoras correspondientes, según las condiciones recomendadas por los fabricantes. En todos los casos fueron utilizadas de 1 a 5 U de enzima por cada microgramo de ADN a digerir.

##### **3.2.1.3.2 Ligación de moléculas de ADN**

La ligación de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 U de T4 ADN ligasa (Promega) en un volumen de reacción de 10 µl empleando la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima. Se utilizaron cantidades de inserto y vector

tales que la relación molar entre ambos fuera 5:1. La incubación se realizó durante toda una noche a 4 °C.

### 3.2.1.3.3 Reacción de recombinación GATEWAY®

En el caso de reacciones LR, la recombinación *in vitro* de fragmentos de ADN se llevó a cabo utilizando 1 µl de GATEWAY® LR Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen®), 1 µl del vector de destino (150 ng/µl), 1 µl de solución amortiguadora TE pH 8, y 2 µl del vector de entrada (150 ng/µl). La incubación se realizó durante 3 horas a temperatura ambiente, y los 5 µl fueron utilizados para transformar células competentes.

Para las reacciones BP, se utilizó 1 µl de GATEWAY® BP Clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen®), 1 µl del vector de entrada (150 ng/µl), 1 µl de solución amortiguadora TE pH 8 y 2 µl del producto de PCR (150 ng/µl) o vector de destino (150 ng/µl - Hartley y col., 2000[132]).

### 3.2.1.3.4 Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa

Se utilizó la solución amortiguadora de reacción provista por el fabricante de la enzima, a la cual se le agregaron los siguientes reactivos: MgCl<sub>2</sub> 2 mM; dNTPs 0,2 mM cada uno y 0,4 µM de cada oligonucleótido específico. Posteriormente, a esta mezcla de reacción se le añadieron entre 6 y 10 ng de ADN molde y la enzima *Taq* ADN polimerasa o *Pfu* ADN polimerasa (PB-L, Universidad de Quilmes, Bs. As.), en una concentración de 1,5 U de enzima por reacción. En los casos en los cuales se utilizó *Pfu*, el MgCl<sub>2</sub> fue reemplazado por MgSO<sub>4</sub> a la misma concentración. Los volúmenes de reacción fueron de 20 o 50 µl. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en el termociclador *PTC-100® Peltier Thermal Cycler* (MJ Research), y en general se utilizó el siguiente programa, en el que la temperatura de hibridización (Ta) se estableció de acuerdo a la composición de bases de los oligonucleótidos utilizados, aplicando la siguiente relación para su cálculo:

$$T_a = 2 \times (A + T) + 4 \times (G + C) - 5^\circ\text{C}.$$

Programa: (1 minuto a 94 °C, 1 minuto a Ta, 1-2 minutos a 72 °C\*) 30 ciclos + 10 minutos a 72 °C. \* El tiempo de extensión varió dependiendo del largo del fragmento a amplificar. En el caso de *Taq* ADN polimerasa el tiempo se estimó en 1 min cada 1000 pb a amplificar. Cuando la polimerasa utilizada fue *Pfu* el tiempo fue de 1 min cada 500 pb.

### **3.2.1.3.5 Transcripción reversa de ARN total**

Las reacciones de transcripción reversa se llevaron a cabo cursando el siguiente protocolo en dos etapas: 1. En un volumen final de 10  $\mu$ l, se colocó 1  $\mu$ g de ARN con oligonucleótidos polidTV 0,1  $\mu$ M (poli-dTV consiste en 1 nucleótido variable, ubicado en el extremo 5', seguido de 24 nucleótidos de timina). Esta mezcla se incubó durante 5 min a 70 °C, para luego ser colocada inmediatamente en hielo (este tratamiento permite desarmar las estructuras secundarias del ARN). Terminado este proceso, se le adicionaron a la mezcla 6  $\mu$ l de solución amortiguadora de la enzima, 2  $\mu$ l de dNTP (20 mM), 200 U de transcriptasa reversa M-MLV (Promega) y se completó el volumen hasta 30  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O milliQ estéril. Dicha mezcla se incubó 1,5 h a 42 °C y luego se procedió a inactivar la enzima calentando la reacción 5 min a 80 °C más 30 s adicionales a 94 °C.

### **3.2.1.4 Análisis de ácidos nucleicos**

#### **3.2.1.4.1 Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

Para el análisis de fragmentos de ADN en geles de agarosa se utilizó el sistema de tipo submarino (Ausubel y col., 2003[133]). La concentración de agarosa varió entre 1,5 y 0,8 % (p/v), dependiendo del tamaño del fragmento analizado. Los geles fueron preparados en solución TAE 1x y la muestra, antes de ser sembrada, fue mezclada con solución de siembra adicionada con GelRed® (Biotium) en una relación 1/10 (v/v). La separación electroforética se realizó en solución TAE 1x, a voltaje constante entre 1 y 5 V por cm de gel. La visualización del ADN en el gel se llevó a cabo mediante un transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA. En todos los casos en los que fue necesario estimar la longitud de los fragmentos de ADN separados electroforéticamente, se empleó como marcador el ladder 100 pb (Productos Bio-Lógicos) o una muestra de ADN del bacteriófago  $\lambda$ , digerido previamente con la enzima *Hind*III. Esta digestión genera fragmentos de ADN de 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 y 125 pb.

#### **3.2.1.4.2 Electroforesis de ARN en condiciones desnaturalizantes**

La separación electroforética de moléculas de ARN se realizó en geles de agarosa en condiciones desnaturalizantes. Esta técnica se utilizó para analizar la integridad de las muestras de ARN a utilizar en diversos ensayos. La concentración de agarosa utilizada fue de 1 % (p/v) y los geles fueron preparados en solución HEPES 1x y formaldehído 6 %. Antes de la corrida electroforética, a cada muestra (entre 5 y 10  $\mu$ g

de ARN total) se le agregaron 3 volúmenes de solución de desnaturalización y la mezcla se incubó 5 min a 65 °C. Después del calentamiento, se agregó 1/10 del volumen de solución de siembra adicionada con GelRed® (Biotium). La separación electroforética se llevó a cabo en solución HEPES 1x, empleando un voltaje constante de 3 V por cm de gel. La visualización del ARN se realizó en un transiluminador de luz UV (310 nm) Fotodyne, USA. Esta técnica analítica se utilizó con el ARN aislado para los estudios de transcriptómica.

#### **3.2.1.4.3 Cuantificación de transcritos de PCR en tiempo real**

La PCR cuantitativa en tiempo real fue llevada a cabo usando el instrumento StepOne o StepOnePlus Real-Time Systems de Applied Biosystems™. Las reacciones se realizaron en volúmenes finales de 10 µl que contenían: 5 µl de iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix; 0,2 µl de cada oligonucleótido específico (10 pmol/µl) y 1 µl de una dilución 1/20 del producto de la transcripción reversa. La fluorescencia emitida se registró en forma continua durante 40 ciclos. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 5. Los niveles de expresión de los genes *ACTINA2* y *ACTINA8* fueron cuantificados conjuntamente para normalizar los niveles de expresión de los genes de interés. Estos genes han sido reconocidos previamente como genes normalizadores [134] y son utilizados de acuerdo al método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  [135]. Todas las cuantificaciones fueron realizadas con triplicados biológicos. Las diferencias obtenidas fueron consideradas significativas para un valor estadístico p inferior a 0,05 (Prueba t de Student). Los valores de cuantificación se expresaron en forma relativa a un control al cual le fue asignado arbitrariamente el valor uno (1).

#### **3.2.1.4.4 Determinación de la secuencia de moléculas de ADN**

Para determinar la secuencia de ADN de los distintos fragmentos clonados se utilizó el servicio de MacroGen Sequencing System en Seúl, Corea. Para usar este servicio se enviaron 10 µl de cada plásmido 100 ng/µl y 10 µl de un oligonucleótido específico (5 µM); esto último cuando la construcción no permitía la realización de la secuencia con oligonucleótidos universales. Las muestras fueron procesadas en un secuenciador automático ABI3730XL. Los datos de las secuencias y sus respectivos cromatogramas nos fueron enviados en forma electrónica.

### 3.2.1.4.5 Análisis de las secuencias

Para la identificación general de secuencias se consultaron las bases de datos del EMBL, GenBank y SwissProt utilizando el programa BLAST [136] a través del servidor del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

### 3.2.1.4.6 Inmunoprecipitación de la cromatina seguido de qPCR

Para los ensayos de CHIP-qPCR que se describen en este trabajo de tesis se utilizaron plantas transformadas con las siguientes construcciones: *PromAtHB23: AtHB23: GFP: GUS*, y *PromARF7: ARF7: GR*. En el primer caso se tomaron plántulas de diez de edad, mientras que en el último caso plántulas de 15 días fueron tratadas durante 4 y 12 h con 1  $\mu$ M de IAA y 2  $\mu$ M de dexametasona. En todos los casos se realizó un preparado como se describe en Lucero y col. (2017)[137]h. Para las Inmuno-Precipitaciones (IPs) se utilizaron proteína A Dynabeads (Thermo, <https://www.thermofisher.com/ar/>) y los anticuerpos antiGFP ab6556 o anti-GR ab3580 (Abcam). En todos los experimentos, el anticuerpo anti-IgG ab6702 (Abcam, <https://www.abcam.com/>) se utilizó como control negativo. La cromatina se cortó usando el sonicador Picoruptor (Diagenode, <https://www.diagenode.com/>; 10 ciclos 30 " ON, 30 " OFF). Se realizó qPCR con oligonucleótidos específicos (Tabla 6) utilizando se describe en Lucero y col. 2017la mezcla Sso Advanced Universal (BioRad, <https://www.biorad.com/>) en un dispositivo StepOne (Applied Biosystems, <https://www.thermofisher.com/ar/>).

### 3.2.1.4.7 Análisis del transcriptoma por secuenciación masiva de ARN

Para el análisis del transcriptoma, las semillas de plantas salvajes Col 0 y de plantas silenciadas *amiR23* fueron cultivadas por tres días en condiciones normales y luego, la mitad de las mismas, se transfirieron a nuevas placas MS complementadas con 75 mM NaCl. Las muestras se cosecharon a los seis días de tratamiento. El ARN total fue aislado de raíces totales según el apartado "3.2.1.2.4. Extracción y purificación de ARN total". El ARN aislado fue liofilizado antes del envío. El experimento se realizó con réplicas biológicas de cada genotipo/tratamiento.

La secuenciación fue realizada por el servicio *BGI Genomics Sequencing Service* (<https://www.bgi.com/global/>), utilizando la plataforma DNBseq, y obteniendo 100 lecturas de nucleótidos largos de extremo emparejado. Las lecturas crudas fueron primero recortadas por calidad y filtradas con Trimmomatic (versión 0.36; Bolger y col., 2014[138]) y luego alineados con el genoma de *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) utilizando STAR (versión 2.5.2b, [139]), que

fue guiada por la anotación de genes y exones de Araport (V11 201606, [140]). La herramienta Samtools (versión 1.8; [141]) se utilizó para mantener sólo alineaciones primarias con un mínimo de 3 MAPQ. La calidad de lectura antes y después del recorte se analizó con FastQC (versión 0.11.5) y, junto con la eficiencia cartográfica, se resumió con MultiQC (versión 1.7). Las cuentas leídas en cada gen fueron calculadas con featureCounts (versión 1.6.2). Este flujo de trabajo se ejecutó con la ayuda del motor Snakemake, [142]. Los genes expresados diferencialmente se determinaron con DESeq2 ([143]; R Core Team, 2020) filtrando genes con recuentos inferiores a 10 en todas las muestras, y combinando factores (es decir, genotipo, Col 0 o *amiR23* y tratamiento, control o salinidad) en un solo factor que se utilizó en una fórmula de diseño simple (como recomienda la viñeta del paquete como alternativa a modelos más complejos). El conjunto de genes obtenidos del filtrado anterior con un valor de  $p$  inferior a 0.05, se sometieron a un posterior análisis con el software MapMan 3.6.0RC1 donde se pudieron identificar diferentes genes correspondientes a distintas vías de señalización y/o procesos de desarrollo que se evaluaron a posteriori. Estos experimentos fueron llevados adelante con la ayuda del Dr. Agustín Arce.

### **3.2.2 Métodos utilizados para el trabajo con material vegetal**

#### **3.2.2.1 Obtención de material vegetal y condiciones de cultivo**

##### **3.2.2.1.1 Desinfección y cultivo *in vitro* de semillas de Arabidopsis**

Las semillas de Arabidopsis fueron desinfectadas mediante lavados con etanol 70 % (v/v) (5 minutos), lavandina 25 % (ocho minutos) y tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas fueron resuspendidas en 1 ml de agar 0,1 % y sembradas en placas de Petri de 150 mm de diámetro conteniendo medio de cultivo 0.5x MS- 0.9% agar [124] y el antibiótico u hormona correspondiente al ensayo. Las placas se colocaron a 4 °C durante tres días a fin de romper la dormancia de las semillas para luego ser pasadas a cámara de cultivo con luz y temperatura controladas (16 horas de luz a 24 °C y 8 horas de oscuridad a 22 °C). Todo el proceso fue realizado en condiciones de esterilidad utilizando una cabina de flujo de aire horizontal. Las pinzas y los bisturíes fueron esterilizados mediante calor por fuego directo mientras que el agua, el agar 0,1 % y el medio de cultivo MS fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera de presión.

### 3.2.2.1.2 Cultivo de plantas en macetas

El cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* y de *Nicotiana benthamiana* se realizó en una cámara de cultivo, con iluminación y temperatura controladas (16 h de luz a 24 °C y 8 h de oscuridad a 21 °C). Las condiciones de iluminación requeridas (100  $\mu\text{E}/\text{m}^2$ ) fueron obtenidas en forma artificial manteniendo las plantas bajo 6 tubos de luces LED. Las plantas se sembraron en macetas de 10 cm de diámetro con sustrato Klasmann TS1 (Klasmann-Deilmann GmbH). Se sembraron entre 5 y 10 semillas por maceta, se colocaron en una bandeja con solución Hoagland 0.5 x y se cubrieron con papel de nylon transparente. Las plantas se mantuvieron en cámara de cultivo, con condiciones de luz y temperatura controladas. Luego de una semana, cuando se observó la aparición del primer par de hojas, se retiró el papel de nylon.

### 3.2.2.1.3 Transformación estable de *Arabidopsis*

El método que se utilizó para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* fue el de inmersión floral (*floral dip*), [144]. Se prepararon 8 macetas de 10 cm de diámetro según se especificó en la sección anterior. Las plantas se cultivaron, aproximadamente cuatro semanas, hasta la floración y cuando los pedúnculos florales estaban emergiendo, se cortaron las inflorescencias sin dañar las hojas caulinares. Dos o tres días después del corte, surgieron nuevas inflorescencias de las yemas laterales; las cuales volvieron a cortarse. Esta operación se repitió dos veces más, hasta que en todas las inflorescencias existieran al menos cuatro flores no abiertas. La transformación se realizó dos días después del último corte.

Para preparar la suspensión de transformación, se cultivaron con agitación por 24 h a 28 °C células de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con la construcción adecuada, en 10 ml de medio LB suplementado con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rifampicina, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  estreptomicina y el antibiótico correspondiente al vector de transformación. Este cultivo se utilizó para inocular 300 ml del mismo medio y se dejó crecer hasta que alcanzó la fase estacionaria, entre 12 y 16 h. Las células se cosecharon por centrifugación a 4500 g durante 20 min y los sedimentos celulares se resuspendieron en 800 ml de solución de sacarosa al 5 % conteniendo 300  $\mu\text{l}$  del detergente *Silwet L-77* (OSI Specialties, Inc.). Las plantas se sumergieron 60 s en esta solución, evitando que el líquido entrara en contacto con la tierra. Luego, las macetas se colocaron en posición horizontal dentro de una bandeja, se taparon con papel de nylon y se trasladaron a la cámara de cultivo. Al día siguiente, se retiró el papel de nylon y las macetas se ubicaron en posición vertical. Se regaron por subirrigación y las plantas se dejaron crecer hasta que las semillas estuvieran maduras, entre 4 y 5 semanas. Finalmente, se recolectaron

las semillas de cada maceta por separado, se limpiaron manualmente de los restos de vainas y tierra y se conservaron a 4 °C hasta el momento de su análisis.

#### **3.2.2.1.4 Selección de transformantes de Arabidopsis**

Las semillas recolectadas del experimento de transformación fueron esterilizadas mediante un lavado en etanol 70 % (v/v) durante 5 min, un lavado en lavandina 25 % durante ocho min y tres enjuagues con agua destilada estéril.

En el caso de plantas transformadas con alguno de los vectores *pKGWFS7*, *pK2GW7*, *pNB47* las semillas se sembraron en placas de Petri conteniendo medio MS suplementado con kanamicina 25 µg/ml. En los primeros días en la cámara de cultivo, la mayoría de las semillas germinaron (95–99 %). Aproximadamente a los 10 días, los cotiledones de las plantas sensibles se tornaron amarillos, mientras que los de las transformantes permanecieron verdes. Las placas se mantuvieron en la cámara de cultivo durante siete días más, hasta observar que las plantas transformadas desarrollaban hojas verdaderas, mientras que las no transformadas perecían. Mientras que en, para el caso de plantas transformadas con alguno de los vectores *pFK210/247/248* las semillas recolectadas de la transformación fueron esterilizadas superficialmente según se describe anteriormente y sembradas en macetas (400 semillas/maceta) y regadas con una solución conteniendo el herbicida BASTA (1ml/1l). Luego de diez días de germinadas, las plántulas transgénicas lucían sanas y continuaban su crecimiento mientras que la gran mayoría era sensible al herbicida. En ambos casos, las plantas transformadas se pasaron a macetas con sustrato Klassman TS1 (Klasmann-Deilmann GmbH) regadas con solución Hoagland 0.5 x, y así se cultivaron hasta que las vainas estuvieron maduras. Luego se embolsó en sobres de papel cada planta en forma individual para recolectar las semillas y conservarlas a 4 °C, hasta el momento de su análisis.

#### **3.2.2.1.5 Selección de líneas transgénicas homocigotas de Arabidopsis**

La identificación de líneas transgénicas homocigotas se realizó en medio de cultivo MS suplementado con el antibiótico o herbicida correspondiente. Unas 40 semillas T2 de cada línea fueron sembradas en un medio selectivo. El análisis de segregación del marcador de selección permitió identificar aquellas líneas transgénicas con una sola copia de T-ADN por presentar un 75% de individuos resistentes a la selección. A partir de estas líneas T2 escogidas, se sembraron y seleccionaron las semillas T3 pero en este caso se identificaron líneas homocigotas por presentar el 100 % de sus individuos resistentes en la selección.

### 3.2.2.2 Análisis de plantas de *Arabidopsis*

#### 3.2.2.2.1 Análisis histoquímico de la actividad $\beta$ -glucuronidasa

Las plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con construcciones portando el gen reportero *GUS* se sometieron a pruebas histoquímicas de actividad  $\beta$ -glucuronidasa. Para ello, las plántulas se transfirieron a una solución Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM (pH 7,0), Tritón X-100 0,1 %, X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-inolil  $\beta$ -D-glucurónido) 2 mM, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 100 mM, C<sub>6</sub>FeK<sub>4</sub>N<sub>6</sub>·3 H<sub>2</sub>O 100 mM y se sometieron a vacío durante 5 min y se incubaron a 37 °C en luz durante 12 h. Luego de la incubación se agregó etanol 70 % para decolorar los tejidos y se guardaron en solución etanólica a 4 °C hasta ser fotografiadas. Las imágenes digitalizadas se tomaron con una cámara digital Nikon D5300 sobre microscopio óptico y/o lupa.

#### 3.2.2.2.2 Cortes histológicos

Las muestras se fijaron en una solución de formaldehído 3,7 % v/v, etanol 50 % v/v y ácido acético 5 % v/v durante 16 h, se pasaron a etanol 70 % (v/v) y se deshidrataron por pasajes a través de una serie etanólica (80 %, 90 %, 95 % y 100 % v/v). Luego, se hicieron sucesivos pasajes a soluciones en concentraciones crecientes de xilol hasta llegar a xilol puro y finalmente se incluyeron en Histoplast (Biopack). Por medio de un micrótopo de rotación (Leica), se obtuvieron cortes transversales de 10  $\mu$ m. Finalmente, los cortes se montaron en portaobjetos, se desparafinaron y se tiñeron con los colorantes que se indican en las figuras. Las fotografías se tomaron con una cámara digital Nikon D5300 montada sobre un microscopio óptico Eclipse E200 (Nikon).

#### 3.2.2.2.3 Histología y microscopía electrónica

Las raíces se fijaron en glutaraldehído al 2% (v / v) en buffer de fosfato de potasio 0,2 mM (pH 7,4) y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 2 h (bajo vacío) y luego se llevaron a 4 ° C durante la noche. Los segmentos se enjuagaron con el mismo buffer y posteriormente se fijaron en OsO<sub>4</sub> al 2% (p/v) en tampón (pH 7,0) a temperatura ambiente durante 2 h (al vacío), y luego se deshidrataron en una serie de acetonas y se incrustaron en resina Durcupan (con aplicación de vacío en cada paso). Para la microscopía óptica, se tiñeron secciones de unos 0,5  $\mu$ m de grosor con azul de toluidina al 0,05% (p/v) en agua bidestilada. Para la microscopía electrónica de transmisión, las secciones ultrafinas (70-90 nm de grosor) se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (TEM) Philips EM201 a una tensión de aceleración de 60-80 kV.

Este experimento se llevó a cabo con asistencia técnica de las Dras. Carolina Leimgruber, y Virginia Juárez (UNC) y del Dr. Cesar González (IBB-UNER)

#### **3.2.2.2.4 Medición de la longitud de raíces en plántulas**

Las semillas de los genotipos indicados se sembraron en placas de Petri cuadradas de 12 cm x 12 cm conteniendo medio MS agar. Se sembraron sobre una única línea, espaciadas entre sí por 1 cm (cinco semillas/genotipo) y luego del período de estratificación de tres días a 4 °C y oscuridad, las placas se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo indicadas anteriormente durante el período de tiempo necesario. Posteriormente se tomaron fotografías utilizando una cámara digital Nikon D5300 y se cuantificó el largo de las raíces utilizando el software libre RootNav.

#### **3.2.2.2.5 Cuantificación de raíces laterales en plántulas**

Las semillas de los genotipos correspondientes se sembraron en placas de Petri cuadradas de 12 cm x 12 cm conteniendo medio MS agar. Se sembraron sobre una única línea, espaciadas entre sí por 1 cm (cinco semillas/genotipo) y luego del período de estratificación de 3 días a 4 °C y oscuridad, las placas se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo indicadas anteriormente. En el caso de cuantificación de raíces secundarias, luego de ocho días de crecimiento, las plántulas fueron fotografiadas y sometidas a una tinción con Lugol por 30 min. A continuación, se observó la raíz principal de cada plántula en un microscopio Eclipse E200 a 40x de aumento. La identificación de los primordios de raíces laterales (PRL) y de las raíces laterales emergidas (RL) se hizo según lo descrito en [19]. Finalmente, se cuantificó la longitud de cada raíz principal, utilizando el software libre RootNav para la posterior relativización del número de primordios de raíces laterales y el número de raíces laterales emergidas a dicha longitud expresados como: Densidad de PRL (Número de PRL/longitud de raíz principal) y Densidad de RL (Número de RL/longitud de raíz principal).

Para el caso de cuantificación de raíces laterales terciarias (RLT), se llevó a cabo el mismo procedimiento que el descrito anteriormente, pero a los 15 días de edad y la observación se realizó sobre cada una de las raíces laterales secundarias de cada plántula. Luego, utilizando el software libre RootNav, se cuantificó la longitud de cada raíz lateral secundaria y se realizó la sumatoria de todas las longitudes de todas las raíces laterales secundarias. Para la posterior relativización del número de primordios de raíces laterales terciarios (PRLT) y el número de raíces laterales terciarias emergidas a la longitud total de raíces laterales expresados como: Densidad de PRLT (Número de PRLT/longitud total de raíces laterales

secundarias) y Densidad de RLT (Número de RLT/ longitud total de raíces laterales secundarias).

#### **3.2.2.2.6 Tratamientos con hormonas o salinidad en plántulas**

Las semillas de los genotipos especificados se sembraron en placas de Petri cuadradas de 12 cm x 12 cm conteniendo medio MS agar sobre una única línea, espaciadas entre sí por 1 cm (cinco semillas/genotipo) y luego del período de estratificación de tres días a 4 °C y oscuridad, las placas se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo por tres días. A continuación, cada plántula fue traspasada a la correspondiente placa de Petri conteniendo el medio MS agar suplementado con una concentración específica de la hormona correspondiente o NaCl durante un tiempo particular, según se indica en cada figura.

#### **3.2.2.2.7 Observación de amiloplastos en raíces**

Las semillas de los genotipos especificados se sembraron sobre mallas dispuestas en las placas de Petri cuadradas de 12 cm x 12 cm que contienen el medio MS agar. Se sembraron sobre una única línea recta (20 semillas/genotipo) y luego del período de estratificación de tres días a 4 °C y oscuridad, las placas se colocaron en posición vertical en las condiciones de cultivo por 5-10 días. Luego, las mallas conteniendo las plántulas fueron traspasadas a placas de Petri que contenían el medio MS agar suplementado o no con 150 mM NaCl por 8 h. Posteriormente, cada plántula fue sometida a tinción con Lugol por 10 min y luego de montada en el portaobjeto, se colocó por 3 min en forma vertical. A continuación, se realizó la observación de los amiloplastos en la punta de la raíz utilizando un microscopio óptico Eclipse E200.

# RESULTADOS

*“No debemos olvidar que cuando se descubrió la Radio nadie sabía que sería útil en los hospitales. El trabajo era ciencia pura. Esta es una prueba de que el trabajo científico no debe ser considerado desde el punto de vista de la utilidad directa. Debe hacerse por sí mismo, por la belleza de la ciencia, y recién entonces porque existe la posibilidad de que un descubrimiento científico se convierta en un beneficio para la humanidad”*

**Marie Curie**

## 4 RESULTADOS

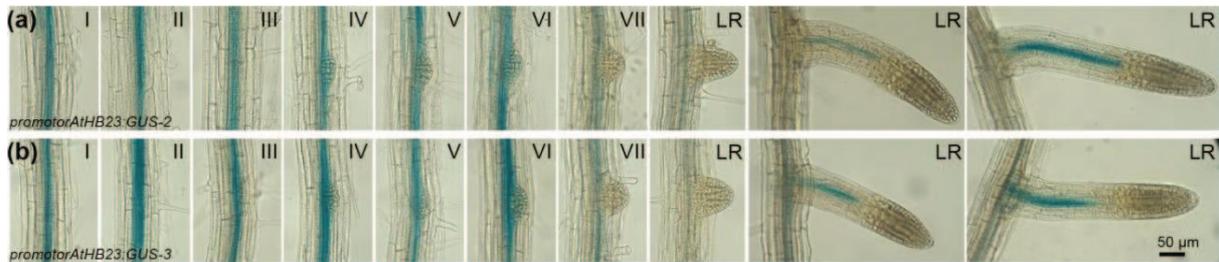
### 4.1 El factor de transcripción *AtHB23* cumple un papel importante y diferencial en el desarrollo de raíces secundarias y terciarias

#### 4.1.1 El gen *AtHB23* reprime la iniciación de raíces secundarias

Los primeros indicios del rol de *AtHB23* en el desarrollo radicular se obtuvieron al realizar un análisis histoquímico de la región promotora del gen dirigiendo la expresión del reportero *GUS* (*promotorAtHB23:GUS:GFP*). A lo largo de la raíz principal, la actividad del promotor *AtHB23* se detectó en las zonas circundantes a las primeras divisiones del desarrollo de las raíces laterales (Figura 21 a). Hasta la etapa IV del desarrollo de raíces laterales [19], la actividad del promotor de *AtHB23* se restringió a la base del primordio de raíz lateral (definido por Malamy y Benfey, 1997[19]). Sin embargo, desde la etapa IV hasta la emergencia, no se detectó expresión en la raíz lateral recién formada. Luego, la tinción del reportero *GUS* fue claramente visible en el sistema vascular de la raíz secundaria, desapareciendo de la raíz principal (Figura 21 b y Figura 22). Los cortes histológicos, tomados de la raíz primaria, mostraron que la expresión de *AtHB23* se limita a la base del primordio de raíz lateral (Figura 21 c). En este sentido se observó actividad del promotor de *AtHB23* en las etapas tempranas del desarrollo del primordio de raíz lateral, por ejemplo, entre las etapas II a IV, sugiriendo que el rol de *AtHB23* estaría circunscripto a la iniciación de raíces laterales (Figura 21 b).

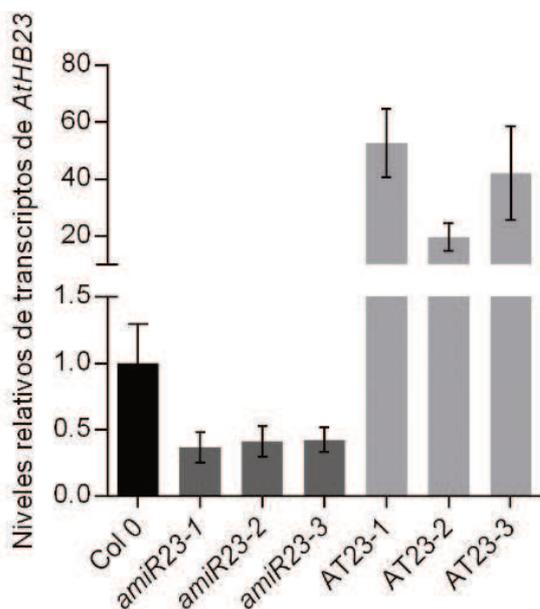


**Figura 21. *AtHB23* se expresa en las zonas de iniciación de las raíces laterales.** (a) Histoquímica GUS del promotor de *AtHB23* en la raíz principal de plántulas de 8 días de edad. Las flechas negras indican las zonas de iniciación de la raíz lateral (RL). (b) I-VII representan las distintas etapas del desarrollo de un primordio de raíz lateral (PRL) y RL hace referencia a raíces emergidas según Malamy y Benfey (1997) [19]. La barra negra representa 50  $\mu$ m. (c) Corte histológico longitudinal de la raíz principal luego de la tinción histoquímica GUS.



**Figura 22. Patrón de expresión de *AtHB23* en el desarrollo PRL y RL en líneas independientes transformadas con la construcción *promotorAtHB23:GUS*.** Histoquímica GUS del promotor de *AtHB23* en la raíz principal de plántulas de 8 días de edad (a) Línea independiente *promotorAtHB23:GUS-2*; (b) Línea independiente *promotorAtHB23:GUS-3*. I-VII representan las distintas etapas del desarrollo de un primordio de raíz lateral (PRL) y RL hace referencia a raíces emergidas según Malamy y Benfey (1997) [19]. La barra negra representa 50 µm.

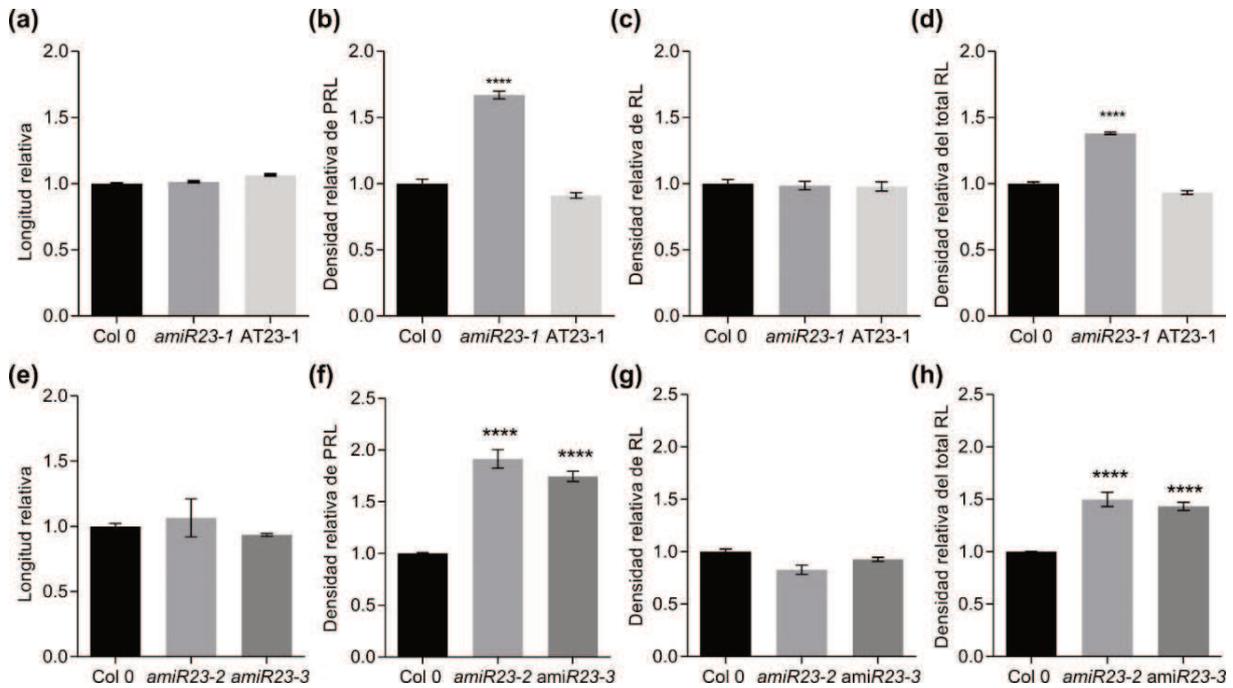
Con el objetivo de investigar el papel de *AtHB23* en la formación de raíces laterales, se obtuvieron plantas transgénicas silenciadas y sobreexpresantes, transformando con las construcciones *35S:amiR-AtHB23* (o *amiR23*, microRNA artificial contra la región 3'UTR de *AtHB23*, la cual difiere completamente de la secuencia de su homólogo cercano *AtHB13*) y *35S:AtHB23* (AT23), respectivamente. Para ambos genotipos transgénicos se eligieron tres líneas independientes en las que se evaluaron los niveles de transcripción de *AtHB23* y se los comparó con los de las plantas control Col 0 (Figura 23).



**Figura 23. Niveles de expresión de *AtHB23* en raíces de plántulas *amiR23* y AT23.** Niveles de transcritos relativos medidos por RT-qPCR en muestras de ARN de raíces de tres líneas independientes silenciadas para *AtHB23* (*amiR23-1*, *amiR23-2*, *amiR23-3*) y líneas que sobreexpresan *AtHB23* (AT23-1, AT23-2, AT23-3). Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas Col 0 aplicando el método  $\Delta\Delta Ct$ . Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como normalizadores. Las barras de error representan SEM (SEM=SE/ $\sqrt{N}$ ; donde SE como Desviación Estándar y N = cantidad de muestras).

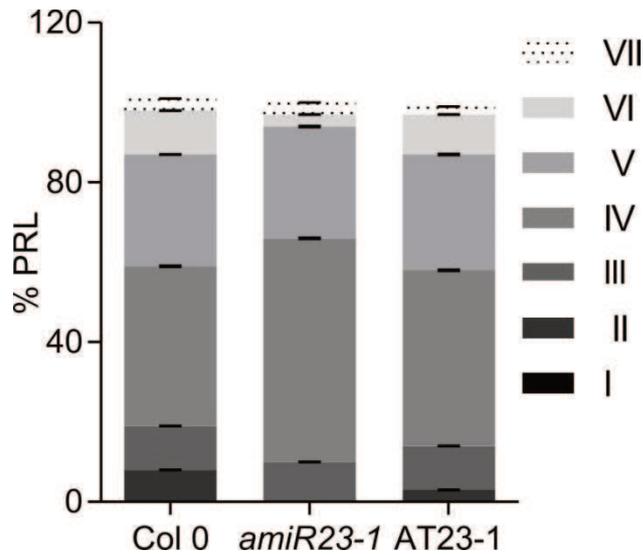
A continuación, se evaluó el fenotipo de estas tres líneas transgénicas de cada genotipo. Se cuantificó la longitud de la raíz primaria, así como la densidad de las raíces iniciadas y emergidas. En plántulas de 8 días de edad, no se detectaron diferencias significativas entre los genotipos en la longitud de la raíz primaria o en la densidad de raíces laterales emergidas

(RLs) (Figura 24 a y 24 e). Sin embargo, la densidad de las raíces laterales iniciadas (PRL) fue significativamente mayor en las plantas silenciadas *amiR23* respecto de las plantas Col 0 o sobreexpresantes AT23 (Figura 24 b y 24 f), influyendo en el número total de raíces laterales (Figura 24 d y 24 h).



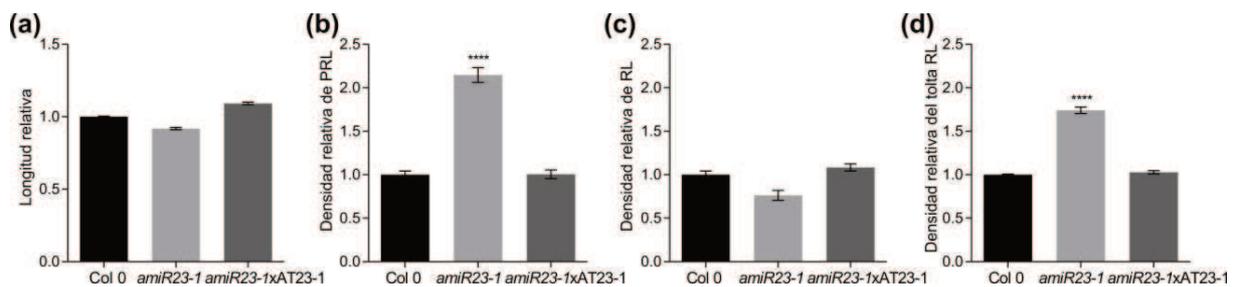
**Figura 24. AtHB23 actúa como represor de la iniciación de raíces laterales.** Longitud relativa de la raíz principal de plantas de 8 días de edad: Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 (a); Col 0, *amiR23-2*, *amiR23-3* (e). Densidad relativa de PRL calculada como el número de PRL/mm de la raíz principal en plantas de 8 días de edad: Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 (b); Col 0, *amiR23-2*, *amiR23-3* (f). Densidad relativa de RL calculada como el número de LR/mm de la raíz principal en plantas de 8 días de edad: Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 (c); Col 0, *amiR23-2*, *amiR23-3* (g). Densidad relativa del total RL (PRL + RL), calculada como número total de RL/mm de la raíz principal en plantas de 8 días de edad: Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 (d); Col 0, *amiR23-2*, *amiR23-3* (h). Los valores se relativizaron a los medidos en el control Col 0, tomados como 1 (uno). Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. Las barras de error representan SEM ( $SEM=SE/\sqrt{N}$ ; donde SE como Desviación Estándar y N = cantidad de muestras). Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba- t de Student entre Col 0 y cada línea transgénica (\*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001, \*\*\*\* P <0,0001).

Durante la caracterización detallada de los primordios de raíz lateral en los distintos genotipos hicimos una observación interesante. Este estudio reveló que la mayor densidad de raíces laterales iniciadas en las plantas *amiR23* se corresponde con una mayor proporción de raíces iniciadas en etapa IV cuando se las compara con sus controles o con plantas sobreexpresantes AT23 (Figura 25).



**Figura 25. Las plantas silenciadas *amiR23* presentan sus PRL arrestados en la etapa IV.** Proporción de PRL en cada etapa de desarrollo (I-VII según lo definido por Malamy y Benfey 1997[19]) en plantas Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 de 7 días de edad. Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. Las barras de error representan SEM (SEM=SE/ $\sqrt{N}$ ).

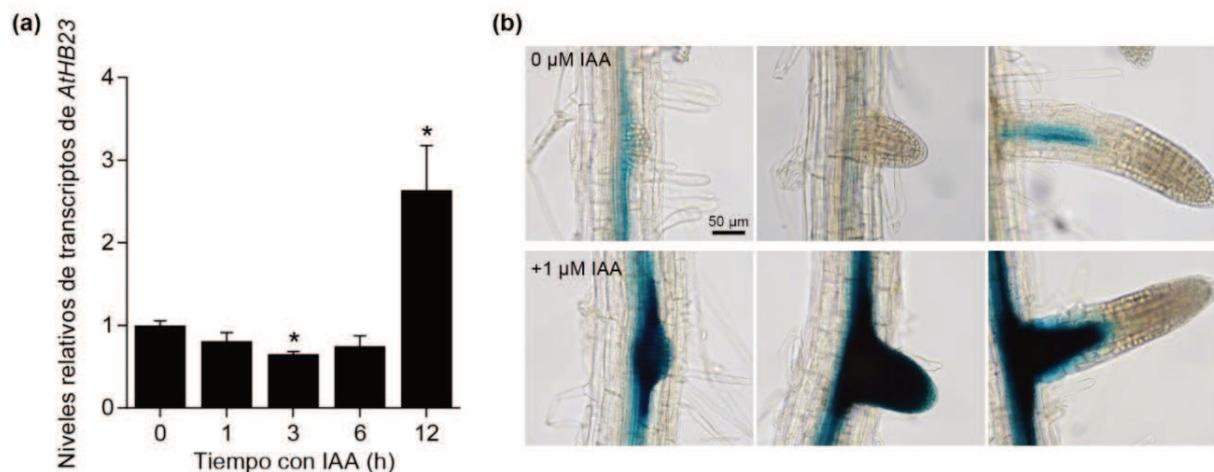
El fenotipo diferencial de las plantas *amiR23* fue rescatado cruzándolas con plantas AT23, lo que corrobora la función asignada a este FT (Figura 26). El conjunto de estos resultados permitió concluir que AtHB23, efectivamente, participa en la iniciación de raíces laterales.



**Figura 26. *AtHB23* es capaz de rescatar el fenotipo diferencial de las plantas silenciadas *amiR23*.** (a) Longitud relativa de la raíz principal de plantas Col 0, *amiR23-1* y *amiR23-1xAT23-1* de 8 días de edad. (b) Densidad relativa de PRL calculada como el número de PRL/mm de la raíz principal en plantas Col 0, *amiR23-1* y *amiR23-1xAT23-1* de 8 días de edad. (c) Densidad relativa de RL calculada como el número de LR/mm de la raíz principal en plantas Col 0, *amiR23-1* y *amiR23-1xAT23-1* de 8 días de edad. (d) Densidad relativa del total RL (PRL + RL), calculada como número total de RL/mm de la raíz principal en plantas Col 0, *amiR23-1* y *amiR23-1xAT23-1* de 8 días de edad. Los valores se relativizaron a los medidos en el control Col 0, tomados como 1 (uno). Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. Las barras de error representan SEM (SEM=SE/ $\sqrt{N}$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba- t de Student entre Col 0 y cada línea transgénica (\*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001, \*\*\*\* P <0,0001).

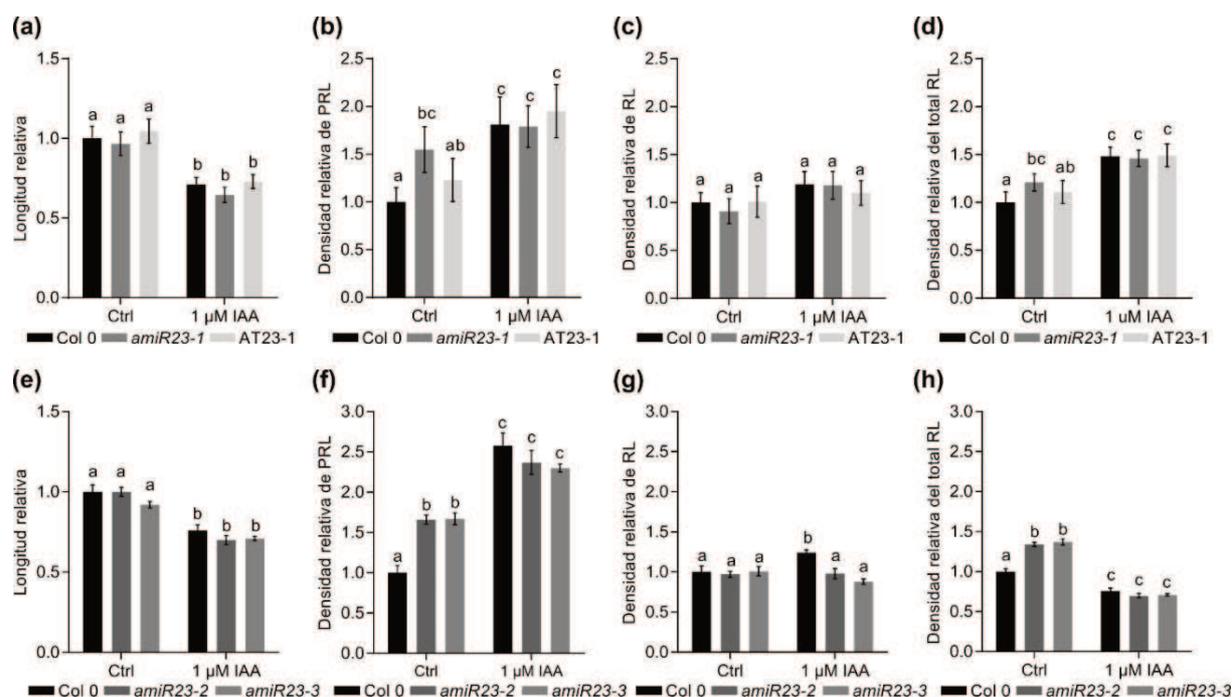
#### 4.1.2 El gen *AtHB23* se regula por auxinas

Considerando el papel integrador de las auxinas en el desarrollo radicular, se planteó si estas hormonas estarían regulando la expresión de *AtHB23*. Se trataron plántulas de 7 días de edad con 1  $\mu\text{M}$  IAA (auxinas exógenas) y se observó una respuesta clara al tratamiento. Los niveles de transcritos de *AtHB23* disminuyeron a las 3 h mientras que, por lo contrario, a las 12 h los niveles aumentaron significativamente (Figura 27 a). La inducción de 12 h se corroboró adicionalmente por análisis histoquímico del reportero *GUS* en plantas transgénicas *promotorAtHB23:GUS:GFP* (Figura 27 b).



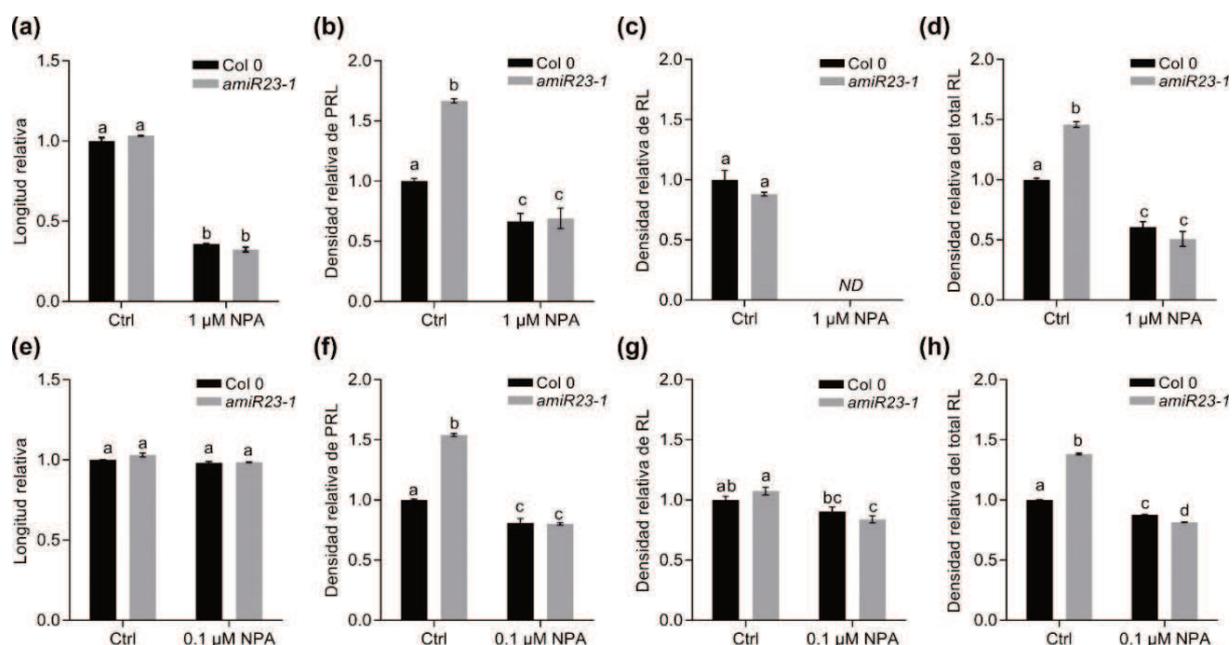
**Figura 27. *AtHB23* es un gen de respuesta a auxinas.** (a) Niveles relativos de transcritos de *AtHB23* en raíces de plántulas de 7 días de edad cultivadas en condiciones estándar o con 1  $\mu\text{M}$  de IAA agregado durante 1, 3, 6 o 12 h. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas Col 0 aplicando el método  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como normalizadores. Las barras de error representan SEM ( $\text{SEM}=\text{SE}/\sqrt{N}$ ) (b) Histoquímica de plantas *promotorAtHB23:GUS* de 8 días de edad: raíces cultivadas en condiciones control (panel superior) o tratadas con 1  $\mu\text{M}$  de IAA (panel inferior) durante 12 h. La barra negra indica 50  $\mu\text{m}$ .

Además, se evaluó el efecto del tratamiento con auxinas exógenas en plántulas *amiR23*, *AT23* y Col 0. Una observación muy interesante fue que las plantas *amiR23* resultaron ser menos sensibles a las auxinas, formando un número similar de primordios de raíz lateral que los genotipos *AT23* y Col 0 luego del tratamiento. Estos resultados indican que las auxinas compensarían la caída de los niveles de *AtHB23* (Figura 28).



**Figura 28. Las plantas silenciadas *amiR23* son menos sensibles a las auxinas que sus controles.** Longitud relativa de la raíz principal de plantas de 8 días de edad cultivadas en condiciones de control o tratadas con 1  $\mu$ M IAA: Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 (a); Col 0, *amiR23-2*, *amiR23-3* (e). Densidad relativa de PRL calculada como el número de PRL/mm de la raíz principal en plantas de 8 días de edad cultivadas en condiciones control o tratadas con 1  $\mu$ M IAA: Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 (b); Col 0, *amiR23-2*, *amiR23-3* (f). Densidad relativa de RL calculada como el número de LR/mm de la raíz principal en plantas de 8 días de edad cultivadas en condiciones de control o tratadas con IAA 1  $\mu$ M: Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 (c); Col 0, *amiR23-2*, *amiR23-3* (g). Densidad relativa del total RL (PRL + RL), calculada como número total de RL/mm de la raíz principal en plantas de 8 días de edad cultivadas en condiciones de control o tratadas con 1  $\mu$ M IAA: Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 (d); Col 0, *amiR23-2*, *amiR23-3* (h). Los valores se normalizaron con los medidos en el control Col 0, tomados como 1 (uno). Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. Las barras de error representan SEM (SEM=SE/ $\sqrt{N}$ ). Las letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey, P < 0.01).

En forma concordante, la diferencia significativa en la densidad de raíces laterales entre las plantas *amiR23* y Col 0 desapareció en presencia de NPA (un inhibidor del transporte polar de auxinas, [145] (Figura 29), vinculando así el rol de AtHB23 con la presencia de auxinas en las raíces de las plantas.

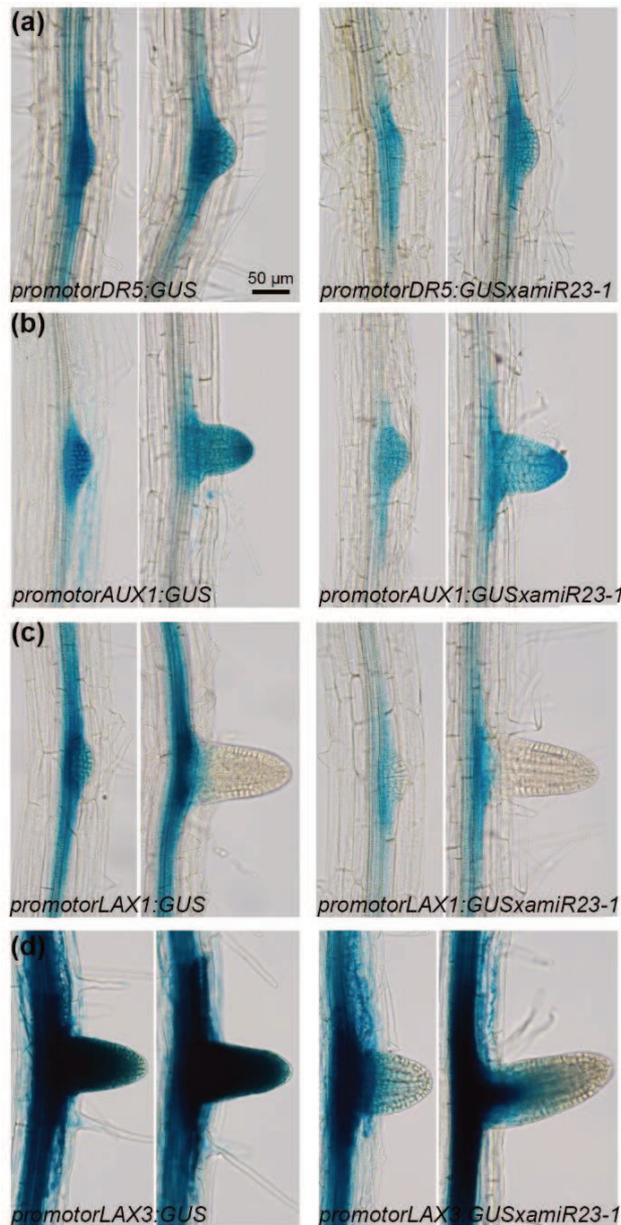


**Figura 29. El tratamiento con el inhibidor del transporte polar de auxinas (NPA) confirmó que las plantas silenciadas *amiR23* son menos sensibles a las auxinas.** Longitud relativa de la raíz principal de plantas Col 0 y *amiR23-1* de 8 días de edad cultivadas en condiciones de control y tratadas con 1 µM NPA (a) o con 0.1 µM NPA (e). Densidad relativa de PRL calculada como el número de PRL/mm de la raíz principal en plantas Col 0 y *amiR23-1* de 8 días de edad cultivadas en condiciones de control y tratadas con 1 µM NPA (b) o con 0.1 µM NPA (f). Densidad relativa de RL calculada como el número de LR/mm de la raíz principal en plantas Col 0 y *amiR23-1* de 8 días de edad cultivadas en condiciones control y tratadas con 1 µM NPA (c) o con 0.1 µM NPA (g). Densidad relativa del total RL (PRL + RL), calculada como número total de RL/mm de la raíz principal en plantas Col 0 y *amiR23-1* de 8 días de edad cultivadas en condiciones control y tratadas con 1 µM NPA (d) o con 0.1 µM NPA (h). Los valores se normalizaron con los medidos en el control Col 0, tomados como 1 (uno). Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. Las barras de error representan SEM (SEM=SE/√N; donde SE como Desviación Estándar y N = cantidad de muestras). Las letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey, P <0.01).

### 4.1.3 Las plantas silenciadas *amiR23* presentan una distribución alterada de auxinas

Teniendo presente la relación entre *AtHB23* y las auxinas, se decidió investigar la expresión de transportadores específicos de auxinas como *AUX1*, *LAX1* y *LAX3* en las plantas *amiR23*, así como el pico de respuesta a auxinas por medio del reportero sintético *DR5*. La selección de dichos transportadores se realizó en función de sus patrones de expresión en raíces, informados previamente [23]. Los resultados obtenidos fueron muy interesantes; el análisis histoquímico de cada cruce indicó una reducción de la tinción en comparación con la de las plantas parentales correspondientes a las mismas condiciones (Figura 30). En particular, el patrón de expresión del promotor *LAX3* fue el más alterado; permaneció activo en el sistema vascular de la raíz principal, mientras que no se observó tinción en las raíces laterales

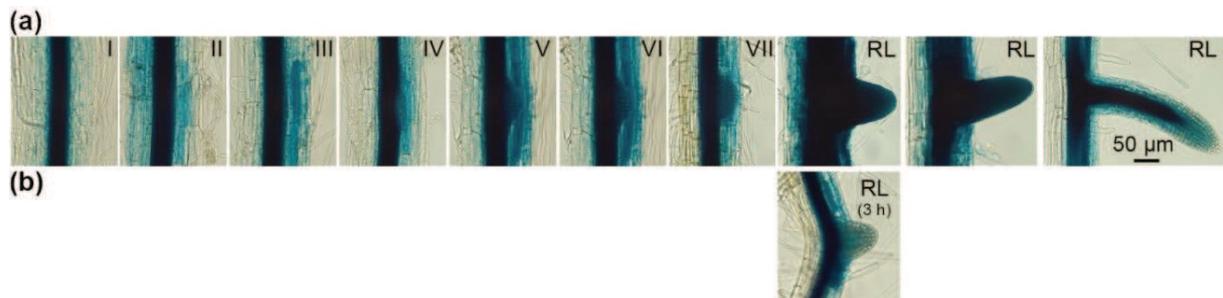
emergidas, aún luego de permanecer un tiempo prolongado en la solución de tinción (16 h) (Figura 30 d).



**Figura 30. La expresión de *LAX3* está reprimida en plantas silenciadas *amiR23*.** Panel izquierdo: (a), (b), (c), (d): histoquímica de GUS en plantas transgénicas (*promotorDR5:GUS*, *promotorAUX1:GUS*, *promotorLAX1:GUS* y *promotorLAX3:GUS*) de 8 días. Panel derecho: las plantas descritas en el panel izquierdo se cruzaron con las plantas *amiR23-1*. La barra negra indica 50 µm.

En la Figura 31 b se puede observar que luego de 3 h de reacción histoquímica, el *promotorLAX3:GUS* mostró un patrón de expresión más restringido, comparado con el observado luego de 16 h, de acuerdo con lo informado previamente [25]. La regulación de transportadores de auxinas mediada por AtHB23 parece ser específica para *LAX3*, debido a que las otras cruas, *promotorAUX1:GUSxamiR23-1* y *promotorLAX1:GUSxamiR23-1* no mostraron ningún cambio en el patrón de expresión del reportero, aunque sí una leve variación en la intensidad (Figura 10 b y c). Estos resultados indicaron fuertemente que existe

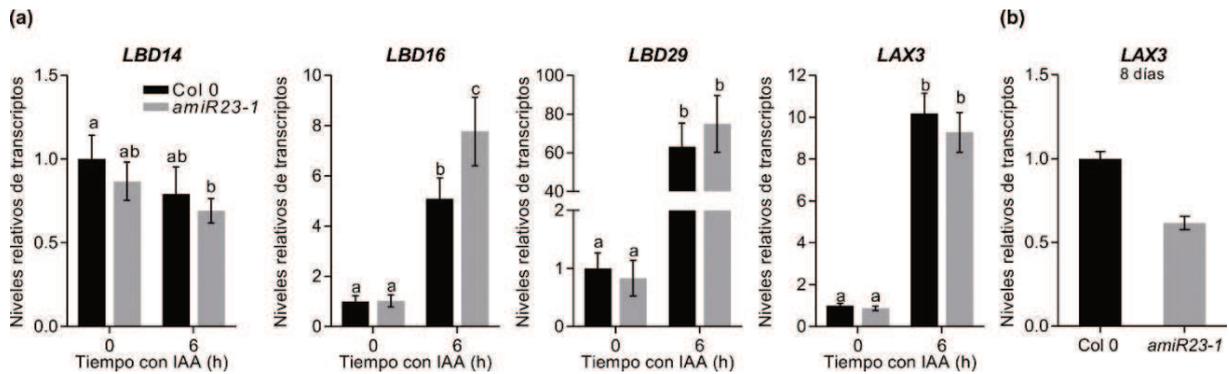
una regulación tejido-específica positiva de *LAX3* por AtHB23, así como una ligera modulación de los otros dos transportadores y la actividad *DR5*.



**Figura 31. *LAX3* se expresa a lo largo del desarrollo de raíces laterales.** Histoquímica GUS del promotor *LAX3* en la raíz principal de plántulas de 8 días de edad. I-VII representan las distintas etapas de desarrollo de un primordio de raíz lateral (PRL) y raíz lateral emergida (RL) hace referencia a raíces emergidas según Malamy y Benfey (1997)[19]. La tinción de GUS se realizó durante 16 h (a) o 3 h (b). La barra negra representa 50 µm.

#### 4.1.4 AtHB23 regula la expresión de *LBD16* y *LAX3*

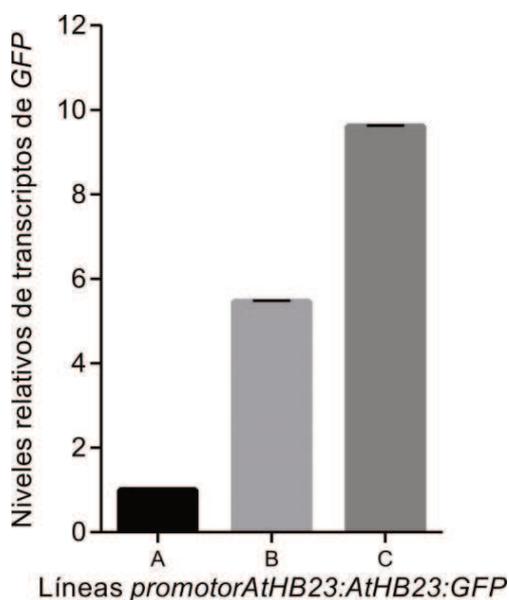
Los genes *LBD* fueron asociados con eventos de iniciación y emergencia de raíces laterales. En particular, la expresión de *LBD16* y *LBD29* se induce por auxinas, y *LBD29* regula la expresión de *LAX3* en las etapas tempranas del desarrollo del primordio de raíz lateral [20]. Recientemente se vinculó también a *LBD14* con la emergencia de raíces laterales [146]. Se analizaron los promotores de estos genes en busca de secuencias que pueden unir los FTs HD-Zip I. Todos presentaron al menos un pseudopalíndromo putativo perfecto CAAT(A/T)ATTG, informado previamente como secuencia diana de las proteínas HD-Zip I tanto *in vitro* como *in vivo* [85], [105], [147]. Con el objetivo de comprender aún más el mecanismo molecular subyacente mediado por AtHB23 en el desarrollo de raíces laterales dependiente de las auxinas, se evaluaron los niveles de transcritos de los mencionados genes *LBD* en raíces de plantas silenciadas *amiR23* de 7 días, tratadas o no con 1 µM IAA. La expresión de *LBD16* se indujo significativamente por el tratamiento con auxinas en las plantas *amiR23*, lo que indicó que AtHB23 reprime a *LBD16* durante la formación de raíces laterales (Figura 32 a). Por otro lado, *LBD14*, *LBD29* y *LAX3* no mostraron ninguna diferencia entre las raíces de plantas Col 0 o *amiR23* en respuesta a la hormona (Figura 32 a). En plántulas de 8 días de edad se observó un escenario diferente; *LAX3* resultó reprimido en las plantas *amiR23* (Figura 32 b), siendo éste el momento en el cual emergen las raíces laterales. Considerando los distintos efectos transcripcionales de AtHB23 sobre *LBD16* y *LAX3*, los resultados señalan que este FT HD-Zip I participa en diferentes mecanismos que modulan genes de respuesta a auxinas en el desarrollo radicular.



**Figura 32. *LBD16* y *LAX3* son regulados por *AtHB23*.** (a) Niveles de expresión de *LBD14*, *LBD16*, *LBD29* y *LAX3* en raíces de plantas Col 0 y *amiR23-1* de 7 días de edad, tratadas o no con 1  $\mu$ M IAA. (b) Niveles de expresión de *LAX3* en raíces de plantas Col 0 y *amiR23-1* de 8 días de edad crecidas en condiciones control. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas Col 0 en condiciones control aplicando el método  $\Delta\Delta$ Ct. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como normalizadores. Las barras de error representan SEM (SEM=SE/ $\sqrt{N}$ ). Letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey, P < 0.01).

#### 4.1.5 *LBD16* y *LAX3* son blancos directos de *AtHB23*

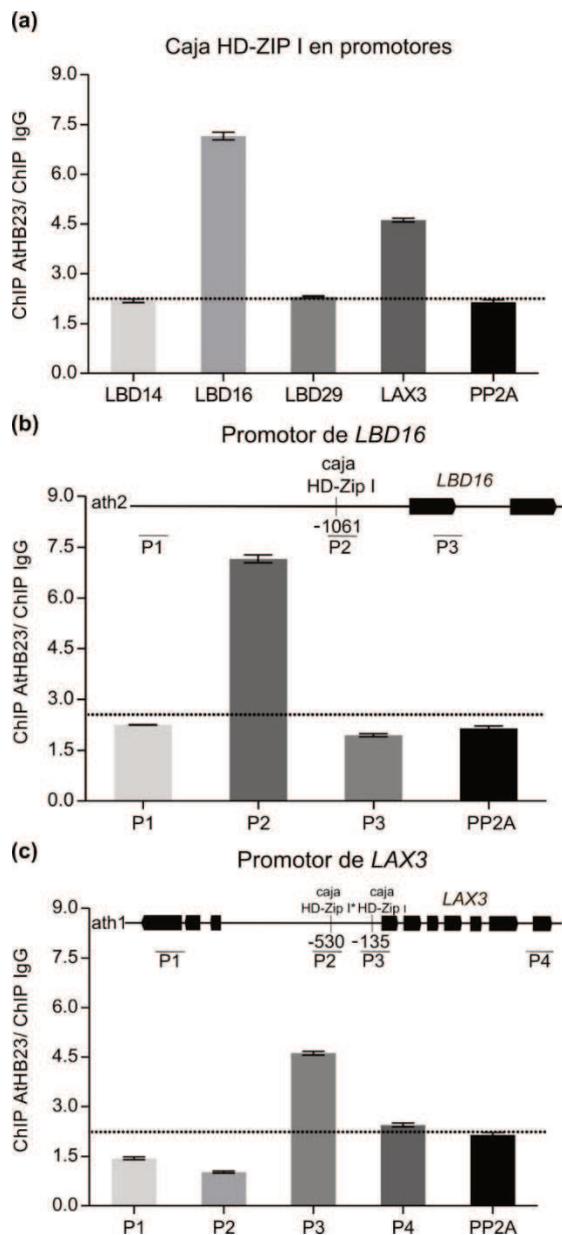
A partir de los resultados obtenidos, se consideró si *AtHB23* podría regular directamente los factores centrales en el desarrollo de raíces laterales. Para responder esta pregunta, se realizaron ensayos de Inmunoprecipitación de Cromatina seguidos de qPCR (ChIP-qPCR) utilizando plántulas transformadas con la construcción *promotorAtHB23:AtHB23:GFP:GUS*. Los niveles de transcripción del transgén se pueden observar en la Figura 33.



**Figura 33. Niveles relativos de transcritos de GFP en plantas transformadas con la construcción *promotorAtHB23:AtHB23:GFP*.** Las muestras de ARN se aislaron de plantas *promotorAtHB23:AtHB23:GFP* (líneas A, B, C) de 10 días de edad. Los niveles de transcritos de GFP se relativizaron a la línea de menor expresión aplicando el método  $\Delta\Delta$ Ct. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como normalizadores. Las barras de error representan SEM (SEM=SE/ $\sqrt{N}$ ).

Se evaluó la unión directa de *AtHB23* al pseudopalíndromo perfecto HD-Zip I CAAT(A/T)ATTG, presente en los promotores de *LBD14*, *LBD16*, *LBD29* y *LAX3* (Figura 34 a). La hipótesis de unión directa de estos promotores por *AtHB23* se corroboró para los genes

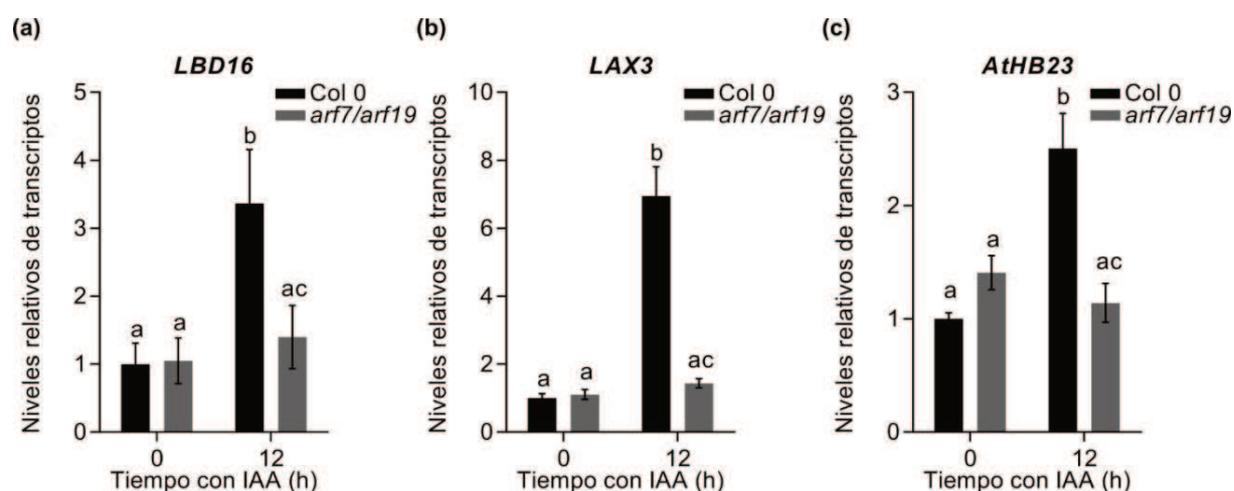
*LBD16* y *LAX3*, mientras que fue negativa para *LBD14* y *LBD29*. Esto nos llevó a analizar en más detalle las regiones promotoras de *LBD16* y *LAX3*. AtHB23 mostró una unión concreta al elemento *cis* HD-Zip I en la región promotora de *LBD16* (-1100 pb, P2) (Figura 34 b). Para el caso de *LAX3*, AtHB23 se unió específicamente al elemento *cis* predicho como HD-Zip perfecto (-135 pb, P3), mientras que no se unió a ninguna de las otras regiones adicionales analizadas, incluida una caja HD-Zip imperfecta (P2) (Figura 34 c). En conjunto, estos resultados indicaron que AtHB23 es capaz de regular directamente tanto a *LBD16* como a *LAX3*.



**Figura 34. AtHB23 regula directamente *LBD16* y *LAX3*.** Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP-PCR) utilizando núcleos obtenidos de plántulas de 8 días *promotorAtHB23:AtHB23:GUS:GFP-C*. (a) Las secuencias diana consenso reconocidas por FT de tipo HD-Zip I presentes en los promotores de *LBD14*, *LBD16*, *LBD29* y *LAX3* se evaluaron para determinar la unión de AtHB23 *in vivo*. (b) Se evaluaron diferentes secuencias reguladoras putativas en el gen *LBD16*. (c) Secuencias reguladoras putativas evaluadas en el gen *LAX3*. En (b) y (c), representación esquemática de los genes *LBD16* y *LAX3* que indican dónde coinciden los oligonucleótidos diseñados para cada uno (P1, P2, P3 y P4). En todos los casos se usó PP2A como control negativo, determinando el nivel de fondo. Los valores se expresan como la relación entre AtHB23:GFP IP e IgG IP utilizada como control negativo. Las barras representan la desviación estándar (SE).

#### 4.1.6 AtHB23 es el eslabón faltante entre ARF7 y los genes *LBD16* y *LAX3*

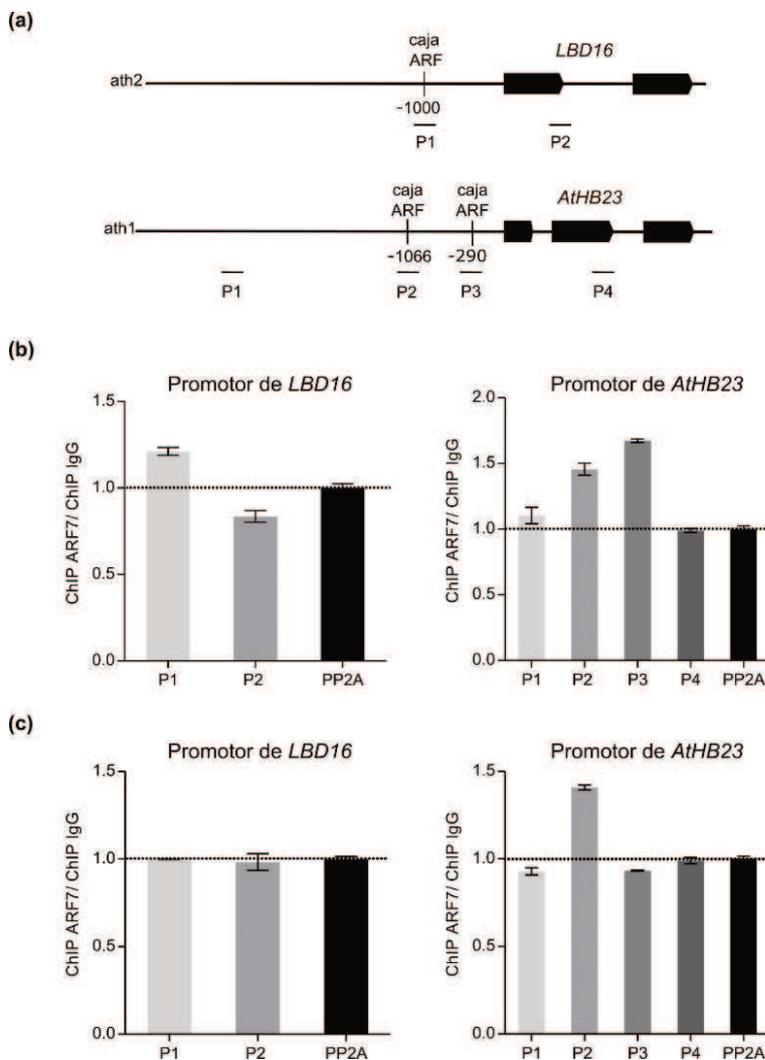
En el complejo modelo de FTs que participan en el desarrollo de raíces laterales, junto con los genes *LBD* participan otros genes claves, como los *ARFs*. La actuación de éstos se observa en distintos módulos (Lavenus y col 2015[115]). Por ejemplo, en las células precursoras de raíces laterales LRFC, *LBD16* y *LBD29* son blancos del par de FTs ARF7/ARF19, mientras que, en la corteza y epidermis, el mismo par regula a *LBD18* [116], y al transportador de auxinas *LAX3* [25]. Recientemente, se demostró el reconocimiento directo de *LBD16* por ARF7 [56]; mientras que aún se desconoce el intermediario molecular entre *LAX3* y ARF7/19. Entonces, con la finalidad de resolver en más detalle la posición de AtHB23 en esta intrincada red de FTs, se midieron los niveles de transcritos de *AtHB23*, *LBD16* y *LAX3* en plantas mutantes *arf7/arf19* en condiciones control y luego de un tratamiento de 12 h con auxinas (Figura 35 a). Como se esperaba, en plantas Col 0 los niveles de transcritos de *LBD16*, *LAX3* y *AtHB23* fueron inducidos por el tratamiento. En forma contrastante, no se observaron cambios transcripcionales de estos genes en las plantas mutantes *arf7/arf19* luego del tratamiento.



**Figura 35. La activación transcripcional por auxinas de *LBD16*, *LAX3* y *AtHB23* es dependiente de ARF7/19.** Niveles relativos de transcripción de *LBD16* (a), *LAX3* (b) y *AtHB23* (c) en plantas Col 0 y mutantes *arf7/arf19* de 7 días de edad crecidas en condiciones control o con 1  $\mu$ M de IAA. Los niveles de transcritos se relativizaron a los de plantas Col 0 en condiciones control aplicando el método  $\Delta\Delta$ Ct. Los transcritos de actinas (*ACTINA2* y *ACTINA8*) se utilizaron como normalizadores. Las barras de error representan SEM (SEM=SE/ $\sqrt{N}$ ; donde SE como Desviación Estándar y N = cantidad de muestras). Las letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey, P < 0.01).

A partir de estos resultados, se realizó un experimento de ChIP-qPCR para dilucidar si *AtHB23* era el blanco directo de los FT ARFs. Para el mismo, se utilizaron plantas mutantes *arf7/arf19* transformadas con la construcción *promotorARF7:ARF7:GR*, que presenta un receptor de glucocorticoide inducible por dexametasona [115]. Para promover la activación de

*ARF7* las plantas se trataron con 1  $\mu\text{M}$  IAA durante 4 y 12 h, y luego se tomaron las muestras. En la región promotora de *AtHB23* se identificaron dos sitios de unión putativos para los FTs ARF (Figura 36 a). Notablemente, ambos elementos *cis* fueron unidos directamente por ARF7, utilizando el promotor de *LBD16* como control positivo [56], [115], a diferencia de otros sitios utilizados como controles negativos (Figura 36 b y 36 c). Por otro lado, el promotor de *LBD16* dio positivo luego de 4 h de tratamiento, pero no a las 12 h, de acuerdo con lo informado anteriormente [56]. Por otro lado, uno de los sitios en el promotor de *AtHB23* presentó unión en ambas muestras, la de 4 y la de 12 h de tratamiento, mientras que el otro sitio sólo dio positivo sólo a las 4 h, indicando cinéticas de unión dinámicas para estos dos blancos de ARF7. Estos resultados corroboraron que ARF7 controla directamente la expresión de *AtHB23* durante el desarrollo radicular.

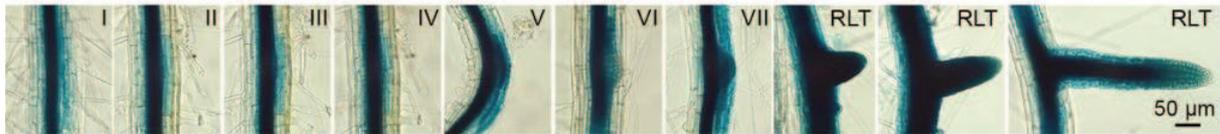


**Figura 36. *AtHB23* sería el eslabón perdido entre *LBD16* y *ARF7*.**

(a) Esquema representativo de los promotores de *AtHB23* y *LBD16* indicando las regiones en las que se diseñaron los oligonucleótidos usados en (b, c). (b) y (c) Diferentes secuencias reguladoras putativas que fueron evaluadas en los promotores de *LBD16* y *AtHB23* con plantas *promotorARF7:ARF7:GR* de 15 días de edad tratadas durante 4 h (b) o 12 h (c) con 1  $\mu\text{M}$  IAA + 2  $\mu\text{M}$  de dexametasona. PP2A fue usado como control negativo. Los valores están expresados como la relación entre ARF7:GR IP e IgG, usados como controles negativos. Las barras representan la desviación estándar (SE).

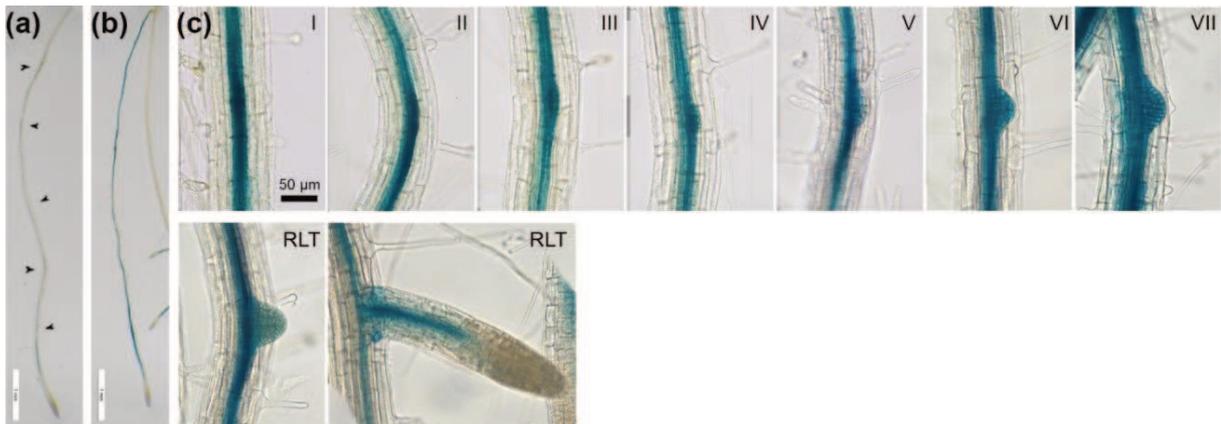
#### 4.1.7 El gen *AtHB23* presenta patrones de expresión diferentes en raíces secundarias y terciarias

Como se mencionó anteriormente la regulación transcripcional de *LAX3* por *AtHB23* ocurre específicamente en las raíces laterales emergidas, si bien este gen también se expresa durante el desarrollo de raíces secundarias (Figura 31 a) y terciarias (Figura 37).

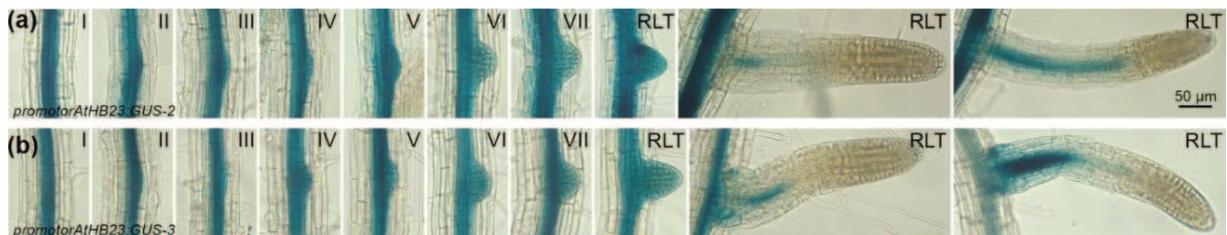


**Figura 37. *LAX3* se expresa a lo largo del desarrollo de raíces laterales terciarias.** Histoquímica GUS del promotor *LAX3* en raíces secundarias de plántulas de 15 días de edad. I-VII representan las distintas etapas del desarrollo de un primordio de raíz lateral terciaria (PRLT) y RLT hace referencia a raíces emergidas terciarias según Malamy y Benfey (1997)[19]. La tinción de GUS se realizó durante 16 h. La barra negra representa 50  $\mu$ m.

Se decidió explorar más detalladamente cómo se expresa *AtHB23* en este órgano lateral en los distintos órdenes de ramificación radicular. Resultó interesante observar que la expresión del reportero *GUS* dirigida por el promotor *AtHB23* a lo largo de las raíces secundarias presentó una actividad fuerte y extendida en los primordios de raíces laterales, de las denominadas raíces terciarias (Primordios de Raíces Laterales Terciarias, PRLT) (Figura 38 b y 38 c). Este patrón de expresión se distinguió claramente del de un primordio de raíz lateral secundario, formado a partir de una raíz primaria (Figura 38 a, Figura 21 a). Más aún, la expresión de *GUS* continuó siendo estable y fuerte durante la emergencia de las raíces terciarias (Raíces Laterales Terciarias, RLT) (Figura 38 c, Figura 39). Cabe destacar que desde la etapa V hasta la emergencia de una raíz terciaria, el patrón de expresión de *AtHB23* es realmente diferente de las raíces laterales, en las que la expresión de *AtHB23* se disipó repentinamente (Figura 21 b). Además, la raíz secundaria permaneció teñida al aparecer la raíz terciaria, mientras que la raíz primaria en la etapa equivalente no mostró tinción GUS.

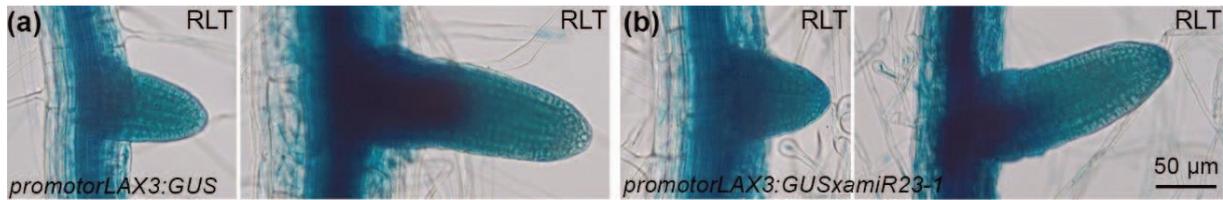


**Figura 38. El patrón de expresión de *AtHB23* es diferente en las raíces primarias y secundarias.** Expresión de *AtHB23* en raíces primarias (a) y secundarias (b) de plántulas *promotorAtHB23:GUS* de 15 días de edad. Las flechas indican la zona de iniciación de una raíz lateral secundaria. (c) Patrón de expresión de *AtHB23* durante la formación de raíces laterales terciarias. I-VII representan diferentes etapas (siguiendo la clasificación realizada para PRL por Malamy y Benfey, 1997 [19]) de primordio de la raíz lateral terciaria (PRLT) y raíces emergentes terciarias (RLT). La barra negra indica 50 µm.



**Figura 39. Patrón de expresión de *AtHB23* en el desarrollo de un primordio de raíz lateral terciaria y raíces emergentes terciarias en líneas independientes con la construcción *promotorAtHB23:GUS*.** Histoquímica GUS del promotor *AtHB23* en raíces secundarias de plántulas de 15 días de edad (a) Línea independiente *promotorAtHB23:GUS-2*; (b) Línea independiente *promotorAtHB23:GUS-3*. I-VII representan las distintas etapas del desarrollo de un primordio de raíz lateral terciaria (PRLT) y LRT hace referencia a raíces emergidas terciarias según Malamy y Benfey (1997) [19]. La barra negra representa 50 µm.

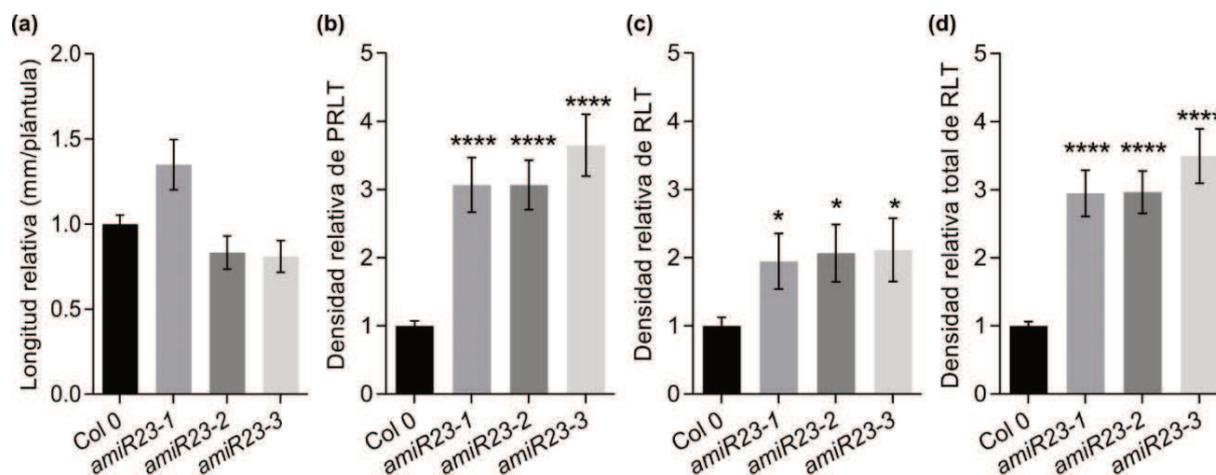
Por otra parte, la tinción GUS reveló que la actividad *promotorLAX3:GUS* se extiende a lo largo del primordio de raíces secundarias y terciarias emergentes (Figura 38 y Figura 39). Sin embargo, el promotor de *LAX3* siguió activo en raíces terciarias en el fondo *amiR23-1* (pero no en raíces secundarias), lo que sugirió que la activación del promotor de *LAX3* no está regulada por *AtHB23* en raíces terciarias (Figura 40). En conjunto, estos resultados indicaron que existe un programa genético diferencial mediado por *AtHB23* en la formación de raíces secundarias y terciarias.



**Figura 40. *LAX3* no es regulado por *AtHB23* en raíces laterales terciarias.** Histoquímica de GUS de raíces laterales terciarias (RTL) de plantas transgénicas *promotorLAX3:GUS* (a) y plantas *promotorLAX3:GUSxamiR23-1* de 15 días. La barra negra indica 50 µm.

#### 4.1.8 *AtHB23* regula en forma diferencial la emergencia de raíces laterales secundarias y terciarias

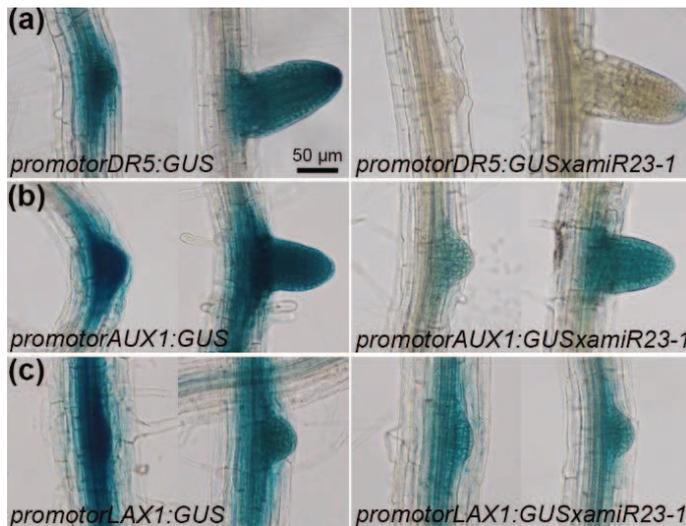
Las observaciones anteriores condujeron a explorar con más detalles el desarrollo de raíces terciarias y compararlas con raíces secundarias. Cabe señalar que prácticamente no se encontró bibliografía sobre la caracterización de raíces de mayor orden que primarias/secundarias en plantas dicotiledóneas. Es notorio que el sistema de raíz primaria dando lugar a las secundarias haya sido estudiado con tanto detalle y no se haya puesto atención en qué ocurría a nivel molecular en los procesos subsiguientes. Considerando esto, se evaluó la formación de raíces laterales terciarias en plantas silenciadas *amiR23* y plantas Col 0. Notablemente, 10 días luego de la germinación, el silenciamiento de *AtHB23* repercutió en una mayor densidad de primordios de raíces laterales terciarias y raíces laterales terciarias, en comparación con plantas control Col 0 (Figura 41), indicando que *AtHB23* participa en el inicio de primordios de raíces secundarias y primordios de raíces terciarias, mientras que sólo participa en la emergencia de raíces laterales terciarias. Considerados conjuntamente, estos resultados indicaron que el inicio y el desarrollo de raíces secundarias y terciarias están regulados por complejos transcripcionales alternativos que involucran a *AtHB23*, modulando la arquitectura tridimensional del sistema radicular.



**Figura 41. *AtHB23* reprime tanto la iniciación como la emergencia de raíces laterales terciarias.** (a) Longitud relativa como la suma de la longitud total de raíces laterales (RL), (b) Densidad relativa de primordios de raíz lateral terciarias (PRLT), (c) Densidad relativa de raíces laterales terciarias (RLT), (d) Densidad relativa total de RLT (PRLT + RLT) en plántulas Col 0, *amiR23-1*, *amiR23-2* y *amiR23-3* de 10 días de edad crecidas en condiciones control. Los valores se normalizaron con los medidos en el control Col 0 tomados como 1 (uno). Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15 / genotipo. Las barras de error representan SEM (SEM=SE/ $\sqrt{N}$ ). Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba- t de Student entre Col 0 y cada línea transgénica (\*\* P <0.01, \*\*\* P <0.001, \*\*\*\* P <0,0001).

#### 4.1.9 *AtHB23* regula positivamente la distribución de auxinas en raíces terciarias

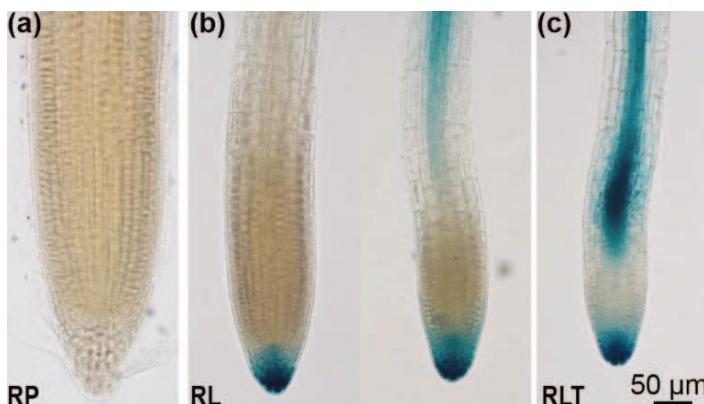
Como se señaló anteriormente una raíz de tercer orden no sigue las mismas vías moleculares de desarrollo que una raíz secundaria que crece desde de la raíz principal. Particularmente, se demostró que el patrón de expresión del gen HD-Zip I *AtHB23* difiere convincentemente entre un primordio de raíz lateral secundaria y un primordio de raíz terciaria. Siguiendo la línea de investigación sobre el desarrollo de raíces laterales a partir de raíces primarias y secundarias, se analizó la expresión de los promotores de los transportadores de auxinas *AUX1* y *LAX1*, y la respuesta a auxinas (con el reportero sintético *DR5*) en raíces terciarias. Se utilizaron las plantas transgénicas transformadas con las construcciones *promotorAUX1:GUS*, *promotorLAX1:GUS* y *promotorDR5:GUS*, tanto en fondo genético Col 0 como en las cruza con las plantas silenciadas *amiR23*. El análisis histoquímico del reportero *GUS* no mostró diferencias significativas entre raíces secundarias y terciarias para el caso de los promotores de los transportadores de auxinas (*AUX1* y *LAX1*) en plantas *promotorAUX1:GUSxamiR23-1* y *promotorLAX1:GUSxamiR23-1* (Figura 42 b y 42 c). Por el contrario, en las plantas cruzadas *promotorDR5:GUSxamiR23-1* desapareció el pico de auxinas tanto en los primordios de raíces laterales terciarias como en las raíces laterales terciarias (Figura 42 a), lo que corrobora que el FT *AtHB23* sería un factor importante, pero con roles diferentes en el desarrollo de raíces laterales secundarias y terciarias.



**Figura 42. La actividad del reportero DR5 es reprimida en raíces laterales terciarias de plantas silenciadas *amiR23*.** Panel izquierdo: (a), (b), (c): histoquímica de GUS en plantas transgénicas (*promotorDR5:GUS*, *promotorAUX1:GUS*, *promotorLAX1:GUS*) de 15 días. Panel derecho: las plantas descritas en el panel izquierdo se cruzaron con las plantas *amiR23-1*. La barra negra indica 50 µm.

#### 4.1.10 El patrón de expresión de *LBD16*, un blanco directo de *AtHB23*, difiere entre la raíz principal y las raíces laterales

Además de *LAX3*, otro de los blancos directos identificados para *AtHB23* fue *LBD16*. Las plantas transgénicas que contienen la secuencia del promotor de *LBD16* dirigiendo la expresión del reportero *GUS* fueron descritas previamente [111]. Utilizando las plantas transformadas con la construcción *promotorLBD16:GUS*, se investigó por análisis histoquímico la expresión de *LBD16* en todos los órdenes de raíces: primarias, secundarias y terciarias. Una observación muy interesante fue la tinción de GUS, tanto en el tejido vascular como en la punta de las raíces secundarias y de las raíces terciarias, mientras que, de acuerdo a lo descrito en la literatura, no se observó expresión en la punta de la raíz principal (Figura 43). Esta evidencia experimental sustenta aún más la idea de que las raíces secundarias y terciarias siguen diferentes programas moleculares de desarrollo.

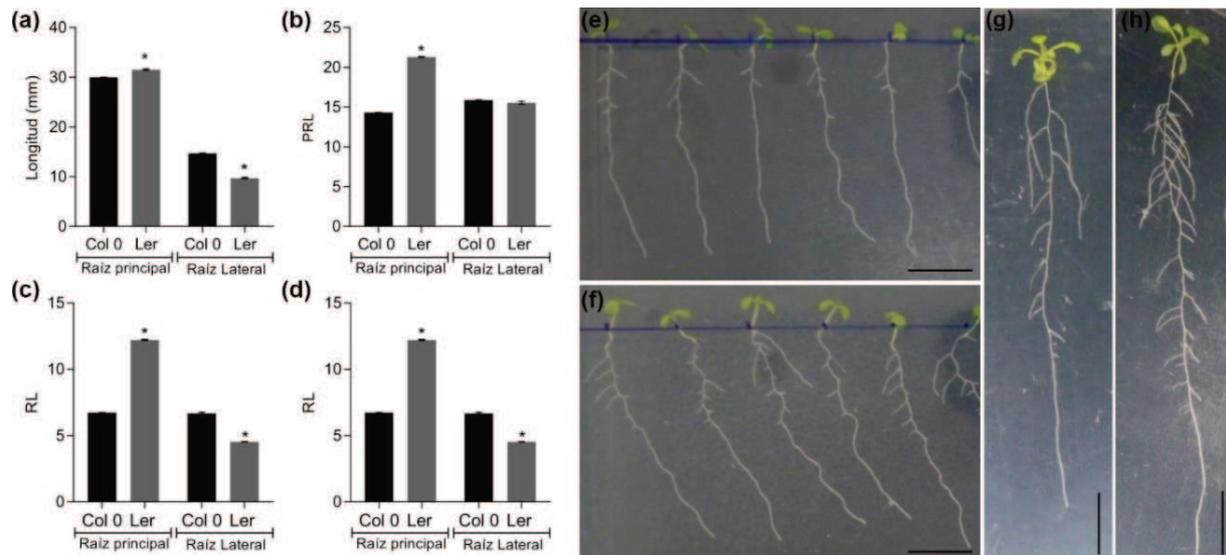


**Figura 43. La expresión de *LBD16* en la punta de la raíz difiere dependiendo del orden de ramificación radicular.** Histoquímica GUS de plantas *promotorLBD16:GUS* de 15 días. (a) Punta de raíz principal (RP); (b) Puntas de dos raíces laterales (RL) representado distintas etapas de emergencia y desarrollo radicular; (c) Punta de raíz lateral terciaria (RLT). La barra negra indica 50 µm.

## 4.2 El desarrollo de raíces laterales depende del ecotipo

### 4.2.1 El desarrollo de las raíces secundarias y terciarias difiere entre los ecotipos Col 0 y Ler

Considerando la complejidad del proceso de desarrollo de raíces laterales y teniendo presente que en muchas ocasiones las líneas mutantes que se requieren para llevar a cabo el estudio particular de un gen no presentan el mismo fondo genético, se decidió evaluar el desarrollo de raíces laterales a partir de las raíces primarias y secundarias en los genotipos Col 0 y Ler. A partir de un fenotipado exhaustivo se pudieron detectar claras diferencias entre ambos genotipos. A los 8 días de crecimiento, las plantas Ler presentaron raíces primarias más largas que las plantas Col 0, mientras que en las raíces secundarias se observó lo opuesto, es decir, la sumatoria de la longitud de todas las raíces secundarias fue mayor en plantas Col 0 que en plantas Ler (Figura 44 a). Por otro lado, las plantas Ler exhibieron un mayor número de primordios de raíces laterales en comparación con plantas Col 0; sin embargo, no se observaron diferencias significativas para este estadio en plantas de 14 días de edad (Figura 44 b). De manera similar, el número de raíces laterales en la raíz principal fue mayor el genotipo Ler que en el Col 0 en plantas de 8 días de edad, y se observó lo contrario en las raíces secundarias de plantas de 14 días (Figura 44 c). De acuerdo con estas observaciones, se desarrolló un mayor número de raíces laterales totales a partir de raíces principales en plantas Ler que en Col 0, mientras que las raíces laterales totales en raíces secundarias fueron ligeramente menos en genotipo Ler respecto de Col 0 (Figura 44 d). Este análisis se puede visualizar directamente en las fotografías ilustrativas de las plántulas Col 0 y Ler de 8 y 14 días de edad que se muestran en las Figura 44 e-h, respectivamente. En base a estos resultados se desprende que el desarrollo de raíces laterales, tanto a partir de las raíces principales como de las raíces secundarias, se modula de forma diferencial en los genotipos Col 0 y Ler.

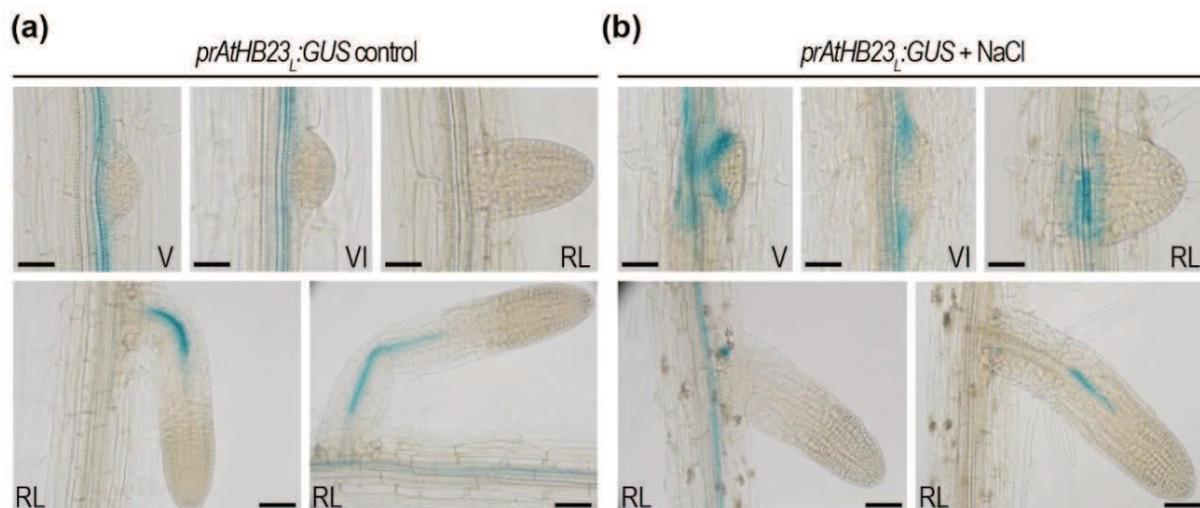


**Figura 44. El desarrollo de las raíces secundarias y terciarias difiere entre los ecotipos Col 0 y Ler.** (a) Longitud de la raíz principal de plantas de 8 días edad y longitud total de las raíces secundarias laterales de las de 14 días de edad. (b) Número de primordios de raíces laterales (PRLs) en la raíz principal de plantas de 8 días de edad y en las raíces secundarias de plantas de 14 días de edad. (c) Raíces laterales (RL) a lo largo de la raíz principal de plantas de 8 días de edad y a lo largo de las raíces secundarias de plantas de 14 días de edad. (d) Raíces laterales totales (PRL + RL) a la raíz principal de plantas de 8 días de edad y en raíces secundarias de plantas de 14 días de edad. (e) Plántulas de ecotipo Col 0 de 8 días de edad. (f) Plántulas de ecotipo Ler de 8 días de edad. (g) Plántula de ecotipo Col 0 de 14 días de edad. (h) Plántula ecotipo Ler de 8 días de edad. Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. Las barras de error representan SEM ( $SEM = SE/\sqrt{N}$ ; donde SE como Desviación Estándar y N = cantidad de muestras). Los asteriscos indican diferencias significativas al hacer una prueba Sindak-Bonferroni  $\alpha = 5\%$  (\*  $P < 0,0001$ ).

### 4.3 El rol de *AtHB23* en la arquitectura radicular en respuesta a la salinidad

#### 4.3.1 La expresión de *AtHB23* está regulada por NaCl afectando la arquitectura radicular

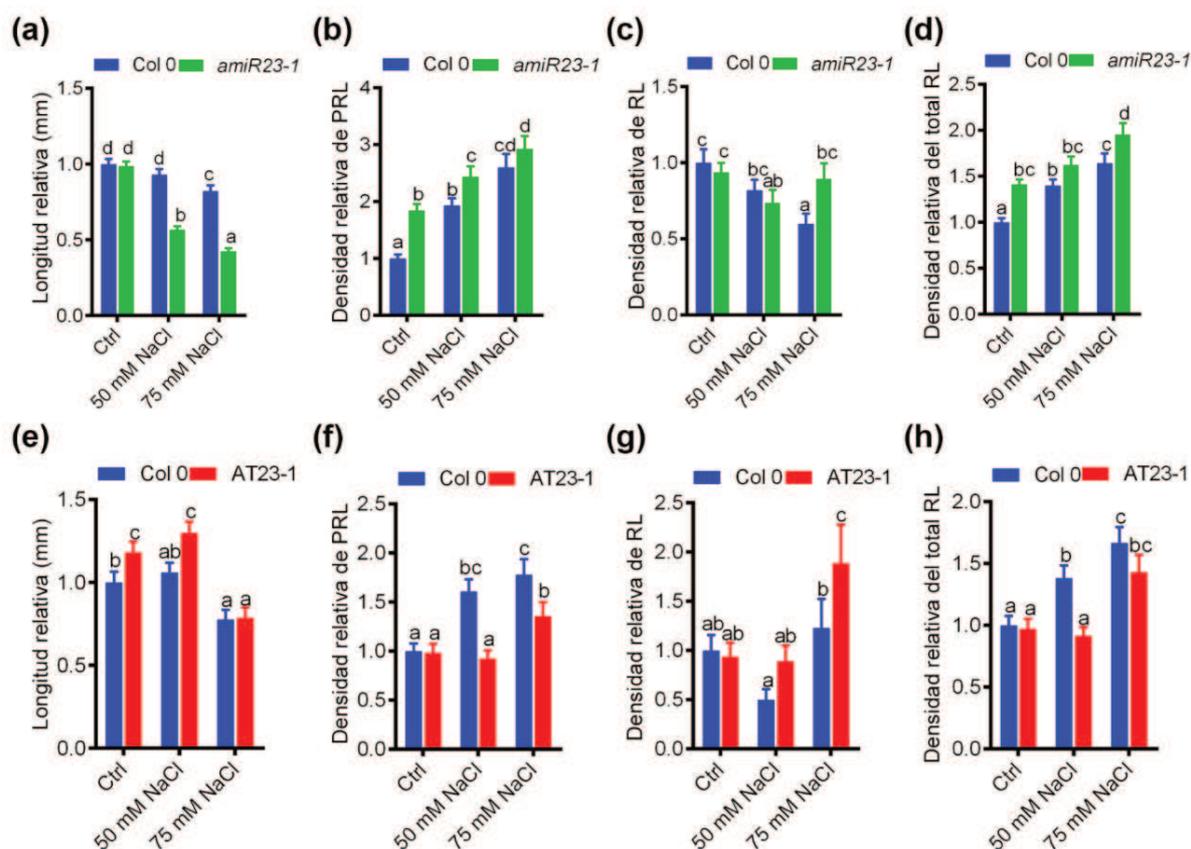
Algunos miembros de la familia HD-Zip I tienen funciones asociadas a las respuestas a estrés abiótico, por lo que se decidió investigar si la expresión de *AtHB23* está regulada por factores externos. Para esto, se sometieron plantas transformadas con la construcción *promotorAtHB23<sub>L</sub>:GUS:GFP* (1793 pb corriente arriba del codón de inicio) a distintas concentraciones de NaCl y se analizó por histoquímica la actividad del reportero *GUS*. En condiciones normales, la actividad *GUS* se restringe a la base de los primordios de raíz lateral en desarrollo y desaparece cuando la raíz lateral emerge; aun así, la señal aparece nuevamente en el sistema vascular de las raíces emergidas más elongadas (Figura 45 a). Luego del tratamiento, tanto con 75 mM como con 100 mM NaCl, se observó que la expresión del gen reportero aumenta en la base de los primordios de raíz lateral (Figura 45 b) mientras que en la vasculatura de raíces laterales se observó una clara represión de la expresión (Figura 25 b).



**Figura 45. La expresión de *AtHB23* en raíces está regulada por salinidad.** Expresión de *AtHB23* durante la formación de raíces laterales (RL) en condiciones control (a) y en presencia de NaCl (b) en plantas de 8 días de edad. (V-VI) y RL representan diferentes etapas (siguiendo la clasificación realizada por Malamy y Benfey, 1997[19]). La barra indica 50  $\mu$ m.

Con el fin de evaluar la función de este FT en el desarrollo radicular frente condiciones salinas, se realizó un estudio fenotípico de plantas silenciadas *amiR23* y sobreexpresantes AT23 en dichas condiciones. Los parámetros de desarrollo radicular se evaluaron en plántulas

de tres días edad sometidas por cinco días adicionales a diferentes concentraciones de NaCl. Las diferencias observadas fueron más pronunciadas concomitantemente con el aumento de la concentración de NaCl. Las plantas silenciadas *amiR23*, tanto a 50 como a 75 mM NaCl, presentaron una raíz primaria significativamente menor que las plantas control (Figura 46 a), mientras que las plantas sobreexpresantes AT23 mostraron el fenotipo contrario en condiciones control y frente a 50 mM NaCl; aun así, cuando la concentración de NaCl fue de 75 mM las plantas AT23 no presentaron diferencias significativas respecto a plantas salvajes (Figura 46 e). Por otro lado, la densidad de primordios de raíz lateral fue significativamente mayor en las plántulas *amiR23* comparado con plántulas control, pero esta diferencia disminuyó a medida que aumentó la concentración de NaCl (Figura 46 b). Las plantas AT23 crecidas en condiciones control no exhibieron ninguna diferencia en la densidad de primordios de raíz lateral respecto a plantas salvajes, mientras que, en condiciones de NaCl, dicha densidad fue significativamente menor en las plantas AT23 en comparación con las plantas control (Figura 46 f). La densidad de raíces laterales fue significativamente mayor sólo a 75 mM NaCl, tanto para las plántulas *amiR23* como para las plántulas AT23 respecto de las plantas control (Figura 46 c y 46 g). La densidad de raíces laterales totales siguió el patrón de densidad de primordios de raíz lateral, lo que sugiere una mayor influencia por parte del número de primordios de raíz lateral que del número de raíces laterales (Figura 46 d y 46 h). Estos resultados sugieren fuertemente un papel para AtHB23 de modulación de la arquitectura de la raíz en respuesta a las condiciones de salinidad.

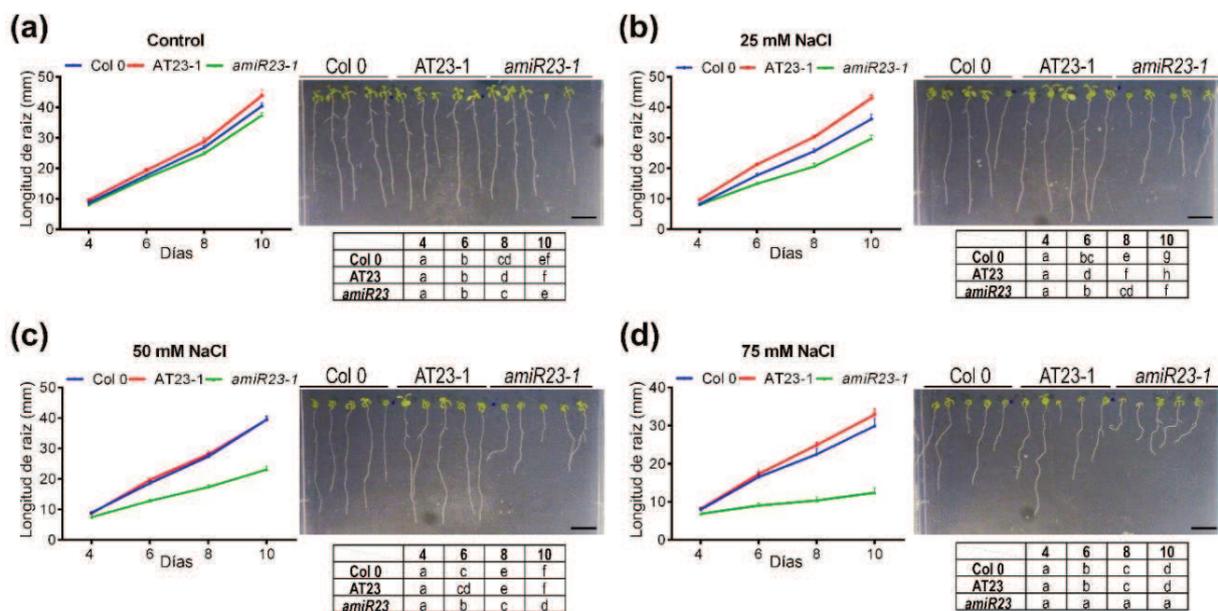


**Figura 46. La arquitectura radicular de plantas *amiR23* y *AT23* se ve afectada por salinidad.** Evaluación fenotípica de plantas Col 0, *amiR23-1* y *AT23* de tres días de edad tratadas con 50 mM y 75 mM NaCl por cinco días adicionales. Longitud relativa de la raíz principal de plantas de 8 días de edad de los genotipos Col 0, *amiR23-1* (a) y *AT23-1* (e). Densidad relativa de PRL calculada como el número de PRL/mm de la raíz principal en plantas de 8 días de edad de los genotipos Col 0, *amiR23-1* (b) y *AT23-1* (f). Densidad relativa de RL calculada como el número de LR/mm de la raíz principal en plantas de 8 días de edad de los genotipos Col 0, *amiR23-1* (c) y *AT23-1* (g). Densidad relativa del total RL (PRL + RL), calculada como número total de RL/mm de la raíz principal en plantas de 8 días de edad de los genotipos Col 0, *amiR23-1* (d) y *AT23-1* (h). Los valores se normalizaron con los medidos en la condición control en plantas Col 0, tomados como 1 (uno). Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. Las barras de error representan SEM ( $SEM=SE/\sqrt{N}$ ; donde SE como Desviación Estándar y N = cantidad de muestras). Las letras diferentes indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $P < 0.01$ ).

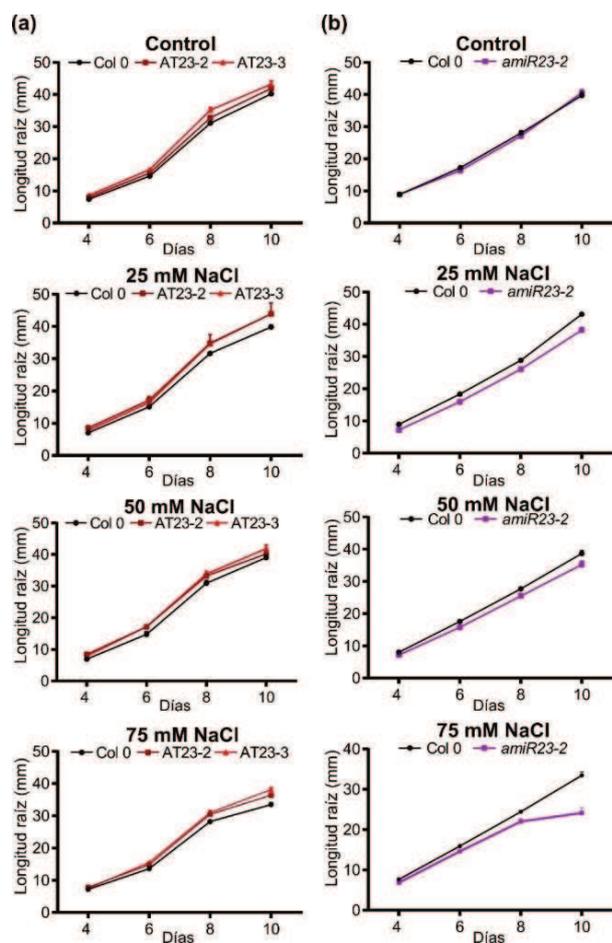
#### 4.3.2 El aumento de la concentración de NaCl y el tiempo de exposición afectan el crecimiento de las plantas silenciadas *amiR23*

Teniendo en cuenta que la raíz principal de las plantas *amiR23* se afecta considerablemente en presencia de NaCl, se realizó un experimento de cinética de crecimiento. Se crecieron plantas Col 0, *amiR23* y *AT23* en condiciones control durante tres días y luego se pasaron a las placas de tratamiento con 25 mM, 50 mM y 75 mM NaCl por diez días adicionales. Se tomaron fotos a partir de los 4 días, cada dos días. En condiciones control a partir de los ocho

días las plantas *amiR23* y AT23 presentan un fenotipo significativamente opuesto (Figura 47 a). Mientras que, a partir de los seis días y en presencia de NaCl (25 mM, 50 mM y 75 mM) las plantas silenciadas *amiR23* presentaron raíces considerablemente más cortas respecto de las plantas Col 0 y AT23 (Figura 47 b-d). Por otra parte, las plantas AT23 mostraron raíces más largas que las plantas Col 0 aunque sólo a bajas concentraciones de NaCl (Figura 47 b). Lo que indicaría que AtHB23 actuaría como regulador positivo en el crecimiento radicular en respuesta a la salinidad. Por otra parte, las plántulas *amiR23* desarrollaron una raíz principal con una forma curva particular frente a la exposición de NaCl, lo que sugiere que la respuesta gravitrópica se encuentra afectada. El mismo fenotipo fue demostrado por las líneas silenciadas independientes de cada genotipo del mutante, apoyando las observaciones descritas (Figura 48).

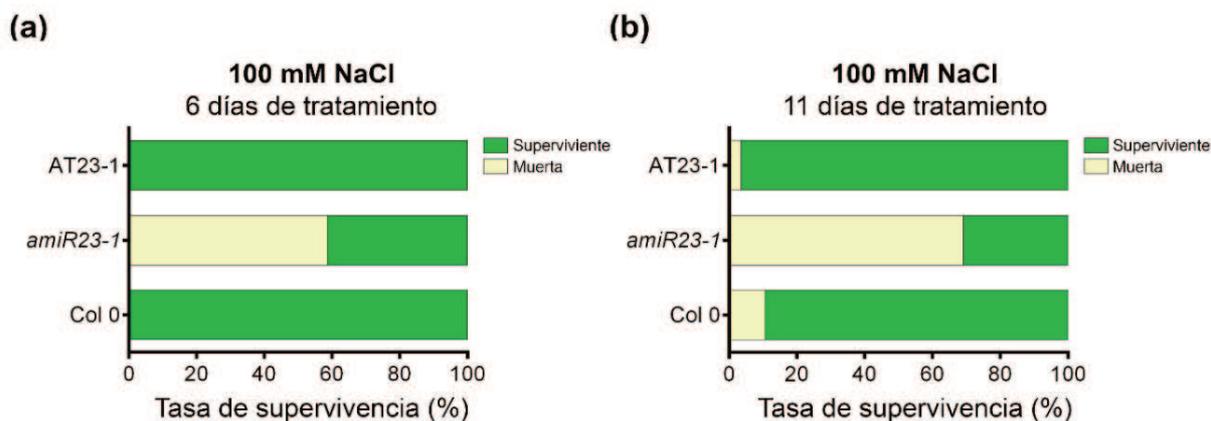


**Figura 47. AtHB23 promueve la elongación de la raíz principal frente a estrés salino.** (a) Longitud de la raíz principal evaluada en plántulas Col 0, AT23-1 y *amiR23-1* crecidas en condiciones control. Las mismas plántulas de (a) se transfirieron 3 días después de la siembra a placas complementadas con 25 mM (b), 50 mM (c) o 75 mM NaCl (d). Panel izquierdo: cinética de crecimiento desde el día 4 post siembra hasta el día 10; panel derecho: imagen ilustrativa de las mismas raíces a los 10 días (arriba); recuadro estadístico, las diferentes letras indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $P < 0,01$ ). Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. La barra negra representa 1 cm.



**Figura 48. Fenotipo diferencial provocado por el silenciamiento y sobreexpresión de la expresión de *AtHB23* en condiciones de salinidad.** Cinética de crecimiento de la raíz principal desde el día 4 post siembra hasta el día 10 en condiciones control, 25 mM NaCl, 50 mM NaCl y 75 mM NaCl, en plántulas sobreexpresantes (*AT23-2* y *AT23-3*) (a) y una línea silenciada adicional *amiR23-2* (b) con sus respectivas plantas control *Col 0*. Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo.

A partir de los resultados anteriores, se decidió realizar un ensayo de supervivencia en presencia de 100 mM NaCl con plantas *Col*, *AT23-1* y *amiR23-1*. Para el mismo se hicieron germinar y crecer por 3 días las plantas en condiciones control. Luego fueron pasadas a placas tratamiento de 100 mM NaCl y se observaron a distintos tiempos. Después de 6 días de tratamiento, el 58% de las plantas *amiR23-1* no sobrevivió mientras que no se observaron cambios aparentes para los otros dos genotipos (Figura 49 a). Más tarde, a los 15 días de tratamiento el 96% de las plantas *AT23-1* y el 89% de las plantas *Col 0* sobrevivieron mientras que sólo el 31% de las plantas *amiR23-1* estaba en esa condición (Figura 49 b). Estos resultados indican que las plantas *amiR23-1* presentan una hipersensibilidad al NaCl y refuerzan la idea de que *AtHB23* sería un regulador positivo de la respuesta a salinidad.

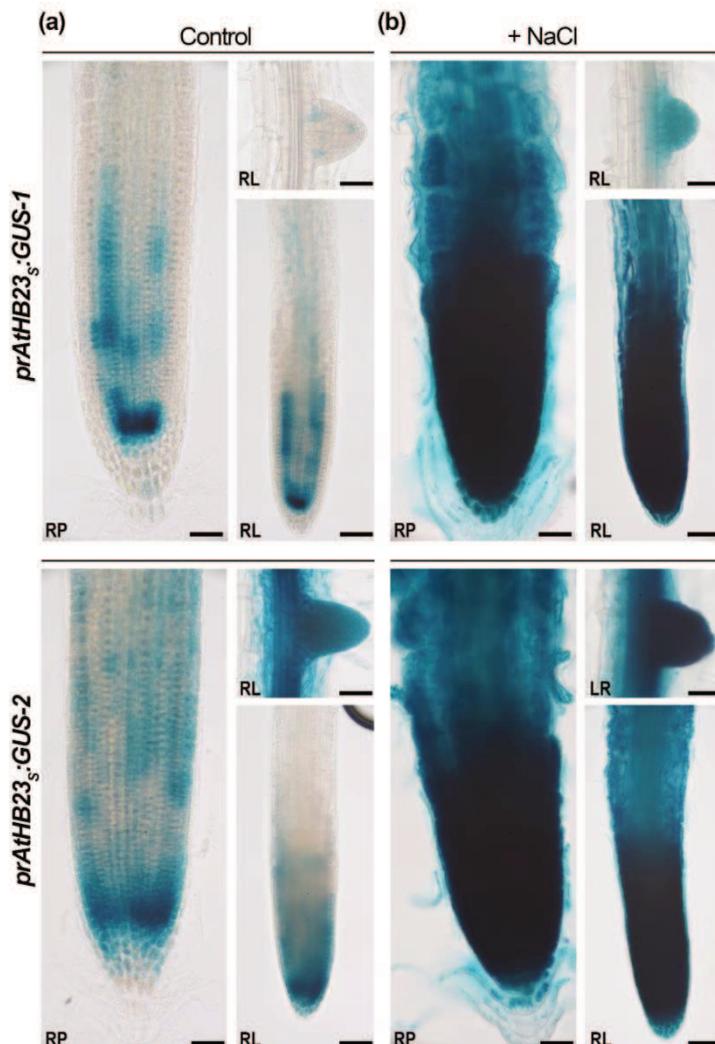


**Figura 49. Las plantas silenciadas en *AtHB23* presentan una sensibilidad agravada al NaCl.** Tasa de supervivencia de las plantas (Col 0, AT23-1 y *amiR23-1* en 100 mM de NaCl luego de 6 días (a) y 15 días (b) de tratamiento. Las columnas amarillas indican el % de plantas muertas, mientras que las verdes el % de supervivientes. Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo.

### 4.3.3 La expresión de *AtHB23* se induce en la punta de la raíz en plantas tratadas con NaCl

Dado el fenotipo alterado observado en plántulas con niveles reducidos (*amiR23*) o aumentados (AT23) de *AtHB23*, nos preguntamos cómo este FT estaba afectando el desarrollo de la raíz principal cuando su expresión no era detectada en la punta de la raíz principal con la construcción *promotorAtHB23::GUS::GFP* mediante reacción histoquímica GUS. En un principio, esa región promotora aislada de 1793 kb corriente arriba del codón de inicio, fue definida arbitrariamente dentro de la región intergénica, sin embargo, se desconoce la longitud exacta del promotor del gen en estudio *AtHB23*. Por otro lado, se pueden localizar diversas secuencias reguladoras en distintas regiones más o menos cerca del sitio de inicio de la transcripción. Por lo cual, con la hipótesis de que dicho segmento clonado puede carecer o tener elementos en *cis* adicionales, se clonaron segmentos más cortos del promotor, se fusionaron al gen reportero GUS y luego se transformaron plantas con esas construcciones. El más interesante fue un segmento de 1273 pb corriente arriba del sitio de inicio, ya que las plantas transgénicas transformadas con dicha construcción mostraron una fuerte tinción en las puntas de las raíces principales y secundarias, así como en puntos restringidos a la base de la raíz lateral emergida (línea de baja expresión) y en la raíz lateral emergida (línea de alta expresión) (Figura 50 a). Dado que este segmento es 520 pb más corto que el utilizado anteriormente (Figura 1 y Figura 45), la región eliminada podría contener una caja de represores. Curiosamente, cuando estas plantas fueron sometidas a tratamientos con NaCl, la tinción de GUS se incrementó significativamente en la punta de la raíz principal, en la raíz lateral recientemente emergida, y también en la punta de la raíz lateral secundaria

(Figura 50 b). Estos resultados concuerdan con el fenotipo diferencial en de la raíz principal de las plantas *amiR23*.



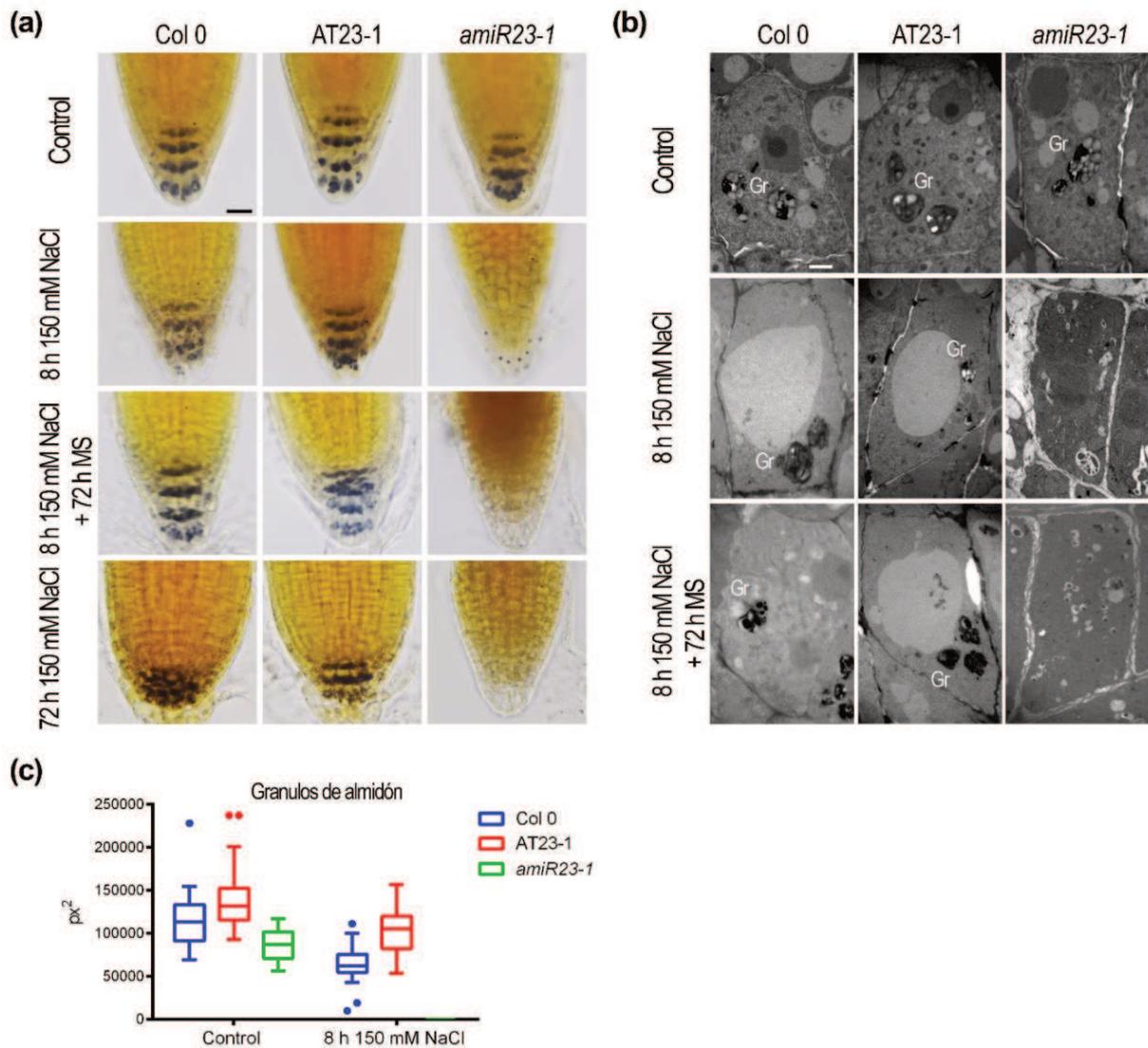
**Figura 50.** La expresión de *AtHB23* es inducida por NaCl en las puntas de las raíces principales y raíces laterales. Imágenes ilustrativas que muestran expresión de GUS guiada por el promotor de *AtHB23* en las puntas de las raíces principales (RP) y raíces laterales (RL) en las plántulas de 8 días de edad crecidas en condiciones control (a) y luego colocadas durante 5 días adicionales en 75 mM NaCl (b). La barra negra representa 50  $\mu$ m.

#### 4.3.4 Las plantas *amiR23* degradan completamente el almidón frente a estrés salino

La literatura científica indica que la sal modula la dirección del crecimiento de la raíz al reducir la respuesta a la gravedad y en este sentido la exposición al estrés salino provoca una degradación rápida de los gránulos de almidón en las células de la columela de la raíz de *Arabidopsis* [65]. Teniendo este precedente, se procedió a evaluar el estado de los gránulos de almidón en plantas Col 0, *amiR23*, AT23 sometidas a tratamiento salino. Siguiendo lo informado en Sun y colaboradores (2018) [65], se crecieron las plantas en condiciones control durante 5 días y luego se pasaron a las placas tratamiento con 150 mM NaCl por 8 h. El corto tiempo de durabilidad del tratamiento se debe a que los gránulos de almidón comienzan a

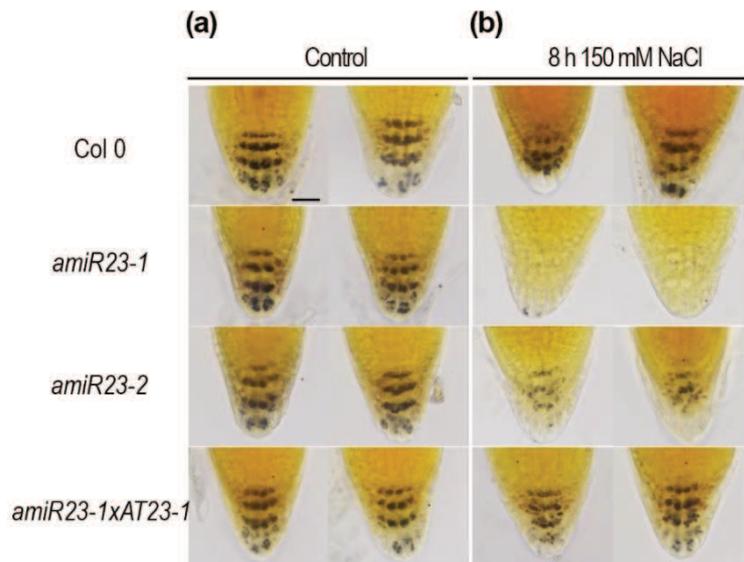
degradarse alcanzando un pico máximo a las 8 h y luego la raíz logra (o no) readaptarse a la condición del medio, sintetizando almidón nuevamente. Por lo cual, luego del tratamiento de 8 h, un grupo de las plantas se transfirió a medio MS para que se recuperen y otra parte permaneció en el medio salino para evaluar su capacidad de adaptación al mismo por 72 h, en ambos casos la recuperación o la adaptación, respectivamente, se logra al restaurar la síntesis de almidón. Finalmente se tiñó el almidón con una solución de Lugol por 10 minutos, y las puntas de las raíces principales se observaron al microscopio óptico. Tal como se esperaba, luego de 8 h con 150 mM NaCl, las plantas Col 0 presentaron menor cantidad de gránulos respecto al control sin agregado de sal, mientras que las plantas *amiR23-1* perdieron por completo el contenido de almidón. Notoriamente, las plantas AT23-1 parecieron no afectarse demasiado por el tratamiento (Figura 51 a). Cabe destacar que en condiciones control, las plantas AT23-1 muestran una tendencia a tener una mayor cantidad de gránulos de almidón respecto a las plantas Col 0, mientras que, en contraposición, las plantas *amiR23-1* presentan una menor cantidad de amiloplastos (Figura 50 a y 50 c). Efectivamente las plantas Col 0 así como las plantas AT23-1, mantenidas en NaCl, se adaptaron y las transferidas al medio sin NaCl se recuperaron. Por otro lado, las plantas *amiR23-1* murieron ya que no lograron sintetizar nuevamente almidón (Figura 50 a).

Por otra parte, para dilucidar si la dificultad de crecimiento frente a NaCl, de las plantas silenciadas *amiR23*, es generada por la pérdida del contenido de almidón o directamente por degradación del orgánulo amiloplasto, se utilizó microscopía electrónica de transmisión (TEM) para observar las puntas de las raíces tratadas. Las imágenes obtenidas por TEM indicaron que las plantas *amiR23* no tenían amiloplastos ni almidón diseminado después del tratamiento con NaCl (Figura 51 b), y tampoco reaparecieron luego de colocar las plantas en un medio MS control (Figura 51 b).



**Figura 51. En las plantas silenciadas *amiR23* se degradan los amiloplastos en medio salino y no logran recuperarse y/o adaptarse.** (a) Desde arriba hacia abajo, imágenes ilustrativas de puntas de raíces (5 días de edad) teñidas con solución de Lugol de plántulas Col 0, AT23 y *amiR23* cultivadas en condiciones normales, después de 8 h 150 mM NaCl, 8 h 150 mM NaCl y luego transferidas a condiciones normales para 72 h adicionales y 72 h con 150 mM NaCl. La barra negra representa 50  $\mu$ m. (b) Imágenes ilustrativas tomadas con microscopía electrónica de transmisión (TEM) de puntas radiculares de plántulas de 8 días de edad cultivadas en condiciones normales (arriba), tratadas durante 8 h con NaCl (medio) y colocadas de nuevo en condiciones normales durante 72 h horas adicionales (abajo). Las barras blancas representan 2  $\mu$ m. Gr: gránulos de almidón. (c) Cuantificación de los gránulos de almidón por el programa informático ImageJ en las raíces tratadas o no con 150 mM.

El mismo experimento de tratamiento con 150 mM NaCl por 8 h se llevó a cabo con líneas independientes de plantas silenciadas *amiR23* y plantas rescatadas (genotipo *amiR23-1* x *AT23-1*) con resultados similares (Figura 52).



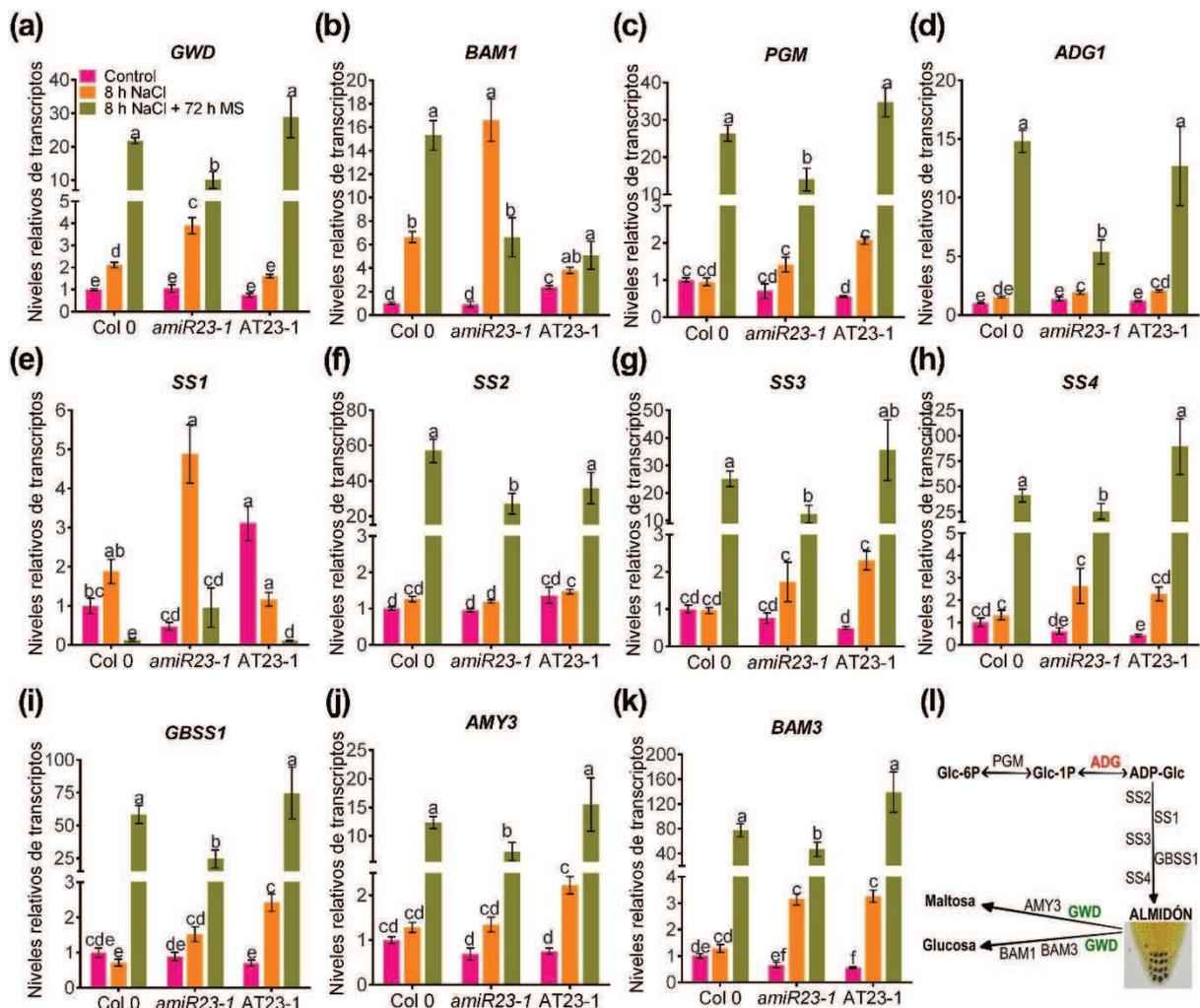
**Figura 52. La degradación de gránulos de almidón en plantas silenciadas *amiR23* se revierte en las plantas *amiR23-1xAT23-1*.** Imágenes ilustrativas de puntas de raíces de los genotipos Col 0, *amiR23-1*, *amiR23-2* y *amiR23-1xAT23-1* en condición control (a) y luego del tratamiento con 150 mM NaCl por 8 h (b). La barra negra representa 50  $\mu$ m.

Estas observaciones nos permitieron concluir que *AtHB23* es esencial para que las plantas de *Arabidopsis* sobrevivan en condiciones de salinidad porque cuando este gen es silenciado, las plantas no pueden llenar sus amiloplastos para responder a la gravedad y sobrevivir a la salinidad.

#### 4.3.5 *AtHB23* regula el metabolismo del almidón frente a estrés salino

Dados los resultados descritos anteriormente, se decidió evaluar si las vías de biosíntesis y/o las vías de degradación de almidón (Figura 53 I) se encontraban afectadas por *AtHB23* frente a estrés salino. Se sometieron plantas de 5 días de edad de los genotipos Col 0, *AT23-1* y *amiR23-1* a 150 mM NaCl por 8 h y luego, una porción de estas se transfirió a un medio MS control para recuperación por 72 h adicionales. A continuación, se tomaron muestras de raíces de las plantas tratadas y se evaluaron los niveles de transcritos de los distintos genes involucrados en ambas vías (Figura 53 I). En su conjunto, el análisis permitió observar genes inducidos que participan en la degradación y, por otro lado, genes no inducidos necesarios para la síntesis del almidón luego del tratamiento con NaCl. Por ejemplo, los genes *GWD* y *BAM1* que codifican para las enzimas que degradan el almidón a maltosa y glucosa, respectivamente, se indujeron significativamente en las raíces *amiR23-1* sometidas a estrés salino por 8 h (Figura 53 a y 53 b) mientras que los transcritos de los genes *PGM* y *ADG1* involucrados en la biosíntesis de almidón aumentaron más en los genotipos Col 0 y *AT23-1* después de la recuperación y mucho menos en las plantas silenciadas *amiR23-1* (Figura 53 c y 53 d). Otros genes, también implicados en la síntesis de almidón y en las vías de degradación, mostraron cambios significativos dependiendo de los niveles de *AtHB23*. Por

ejemplo, *SS2*, *SS3*, *SS4* y *GBSS1*, partícipes de la vía de síntesis, se indujeron significativamente después de la recuperación del tratamiento con NaCl en medio MS, pero ese aumento fue menor en las plantas silenciadas *amiR23-1* (Figura 53 f-h). De manera diferente, los niveles de *SS1* aumentaron en los tres genotipos después del tratamiento con NaCl (Figura 53 e). Finalmente, *AMY3* y *BAM3*, implicados en la degradación del almidón, se indujeron luego de la recuperación en todos los genotipos, pero en menor medida en las plantas silenciadas (Figura 53 i-j). En conjunto, estos resultados indican que el metabolismo síntesis-degradación del almidón frente a estrés salino, se encuentra significativamente alterado dependiendo de los niveles de *AtHB23*. Aun así, este hecho aislado no puede explicar la absoluta falta de almidón observada en las plantas *amiR23*, lo que indica que otros mecanismos deben estar modulando este proceso.

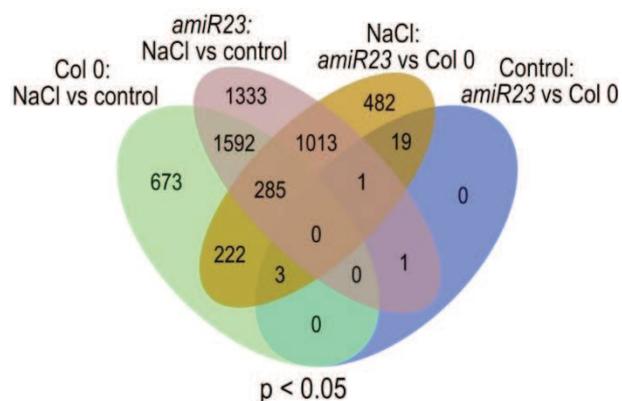


**Figura 53. *AtHB23* altera los niveles transcritos de los genes involucrados en el metabolismo del almidón.** (a) *GWD*, (AT1G10760); (b) *BAM1*, (AT3G23920); (c) *PGM*, (AT5G51820); (d) *ADPG* (AT5G48300); (e) *SS1*, (AT5G24300); (f) *SS2*, (AT3G01180); (g) *SS3*, (AT1G11720); (h) *SS4*, (AT4G18240); (i) *GBSS1*, (AT1G32900); (j) *AMY3*, (AT1G69830); (k) *BAM3*, (AT4G17090). Se midieron en plantas Col 0, *amiR23-1* y AT23-1 crecidas en condiciones control durante 5 días, tratadas 8 h con 150 mM NaCl y transferidas para recuperación en medio MS por 72 h. Todos los valores se

normalizaron con los medidos en las plantas Col 0 en condición control. Las barras representan SEM. Los datos se analizaron utilizando un ANOVA bidireccional teniendo en cuenta el genotipo y el tratamiento. Las letras indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $p < 0.01$ ). (I) Representación esquemática de las vías metabólicas en las que participan los genes evaluados.

#### 4.3.6 El análisis del transcriptoma apoya el papel de AtHB23 en el metabolismo del almidón

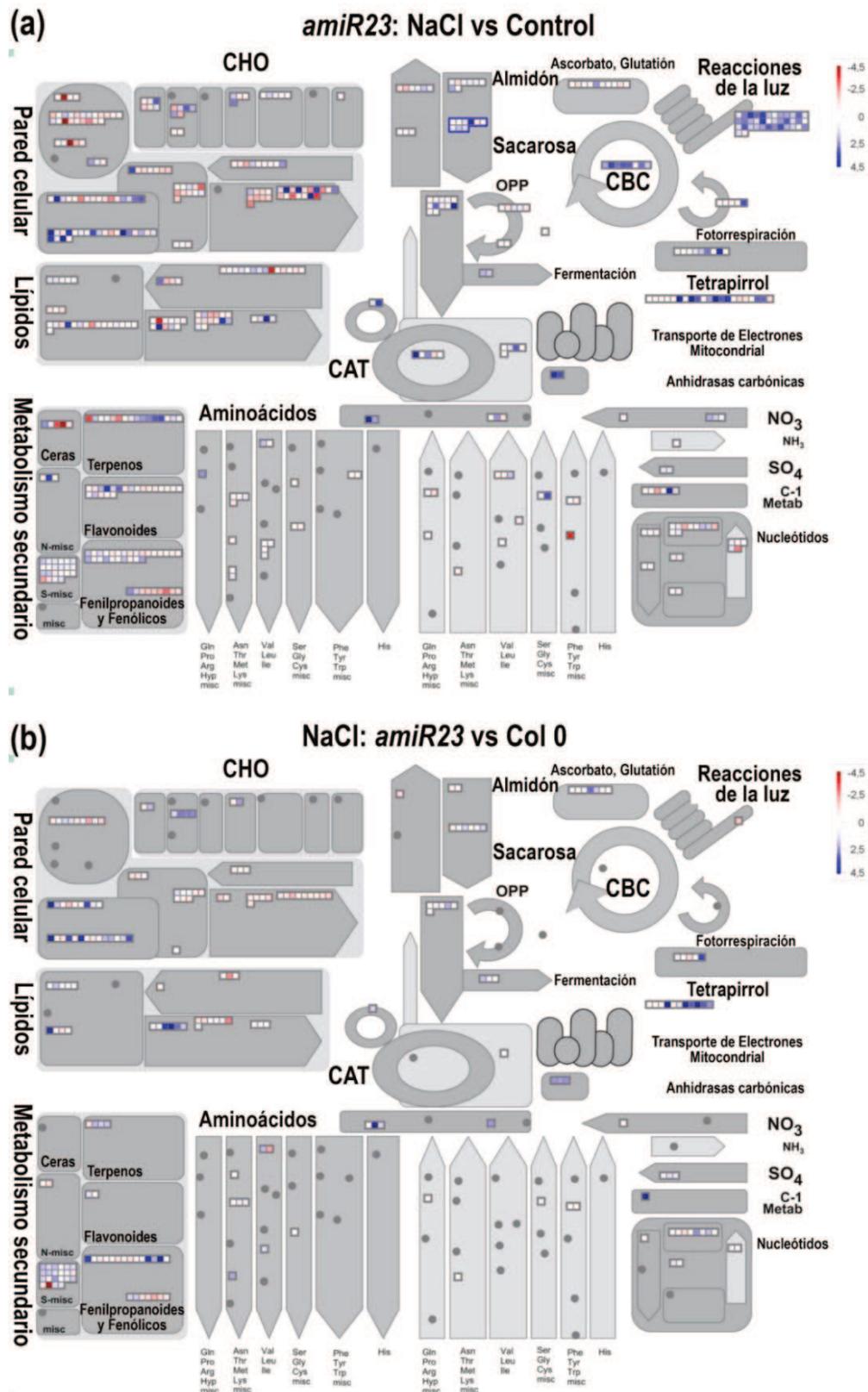
Debido al papel crucial desempeñado por AtHB23 en condiciones de salinidad, nos preguntamos qué otras vías de transducción de señales, aparte del metabolismo del almidón, podrían ser moduladas por este FT. Para investigar con mayor profundidad, se llevó a cabo un experimento de transcriptómica usando plantas salvajes Col 0 y silenciadas *amiR23* de 9 días crecidas en condiciones del control y tratadas con 75 mM NaCl. En condiciones de control, sólo 24 genes cambiaron significativamente su expresión entre las plantas *amiR23* frente al control (Figura 54). Mientras que, el número de genes expresados diferencialmente (DEGs, por sus siglas en inglés *Differentially Expressed Genes*), entre genotipos aumentó hasta 2025 en la condición de salinidad comparando con la condición control; por otro lado, el tratamiento de salinidad dio lugar a 2775 DEGs en las plantas salvajes Col 0 y 4225 DEGs en las plantas silenciadas *amiR23*.



**Figura 54. El análisis del transcriptoma indica una regulación diferencial en las raíces *amiR23* en salinidad.** Diagrama de Venn que muestra la superposición de un conjunto de genes expresados diferencialmente (valor  $p$  ajustado por FDR  $< 0,05$ ) entre las cuatro situaciones analizadas, en los que se fija el nivel de un factor y se comparan los dos niveles del otro factor, por ejemplo, el genotipo Col 0 y la comparación se realiza entre NaCl y la condición control.

Un análisis realizado con el software Mapman permitió identificar las vías en las que estaban involucrados los DEGs (Figura 55). En general, en el análisis de las plantas *amiR23* tratadas con NaCl en comparación con las cultivadas en condiciones control, se observan un gran número de DEGs relacionados con el metabolismo de la pared celular, de los lípidos y del metabolismo secundario. Además, se observa un considerable aumento de los transcritos que codifican componentes de las reacciones relacionadas a la percepción de la luz, el metabolismo del tetrapirrol, el ciclo de ácidos tricarboxílicos y el ciclo de Calvin-Benson. Varían también otras vías, incluyendo la del metabolismo hormonal, la respuesta al estrés

abiótico, el ciclo celular y la degradación de proteínas (Figura 55 a). A continuación, se analizaron los DEGs obtenidos de la comparación entre las plantas *amiR23* y Col 0 tratadas con NaCl (Figura 55 b). En este caso, los cambios fueron menos prominentes que en el análisis anterior. Estos resultados indican que algunas respuestas al NaCl que ocurren en las plantas Col 0 se conservan en las plantas *amiR23* y son consistentes con los resultados obtenidos en el análisis por qPCR de los transcritos individuales (Figura 53). En general, se detectaron DEGs involucrados en múltiples procesos celulares, incluyendo respuesta al estrés abiótico, desarrollo, metabolismo hormonal y degradación de proteínas (Figura 55 b).

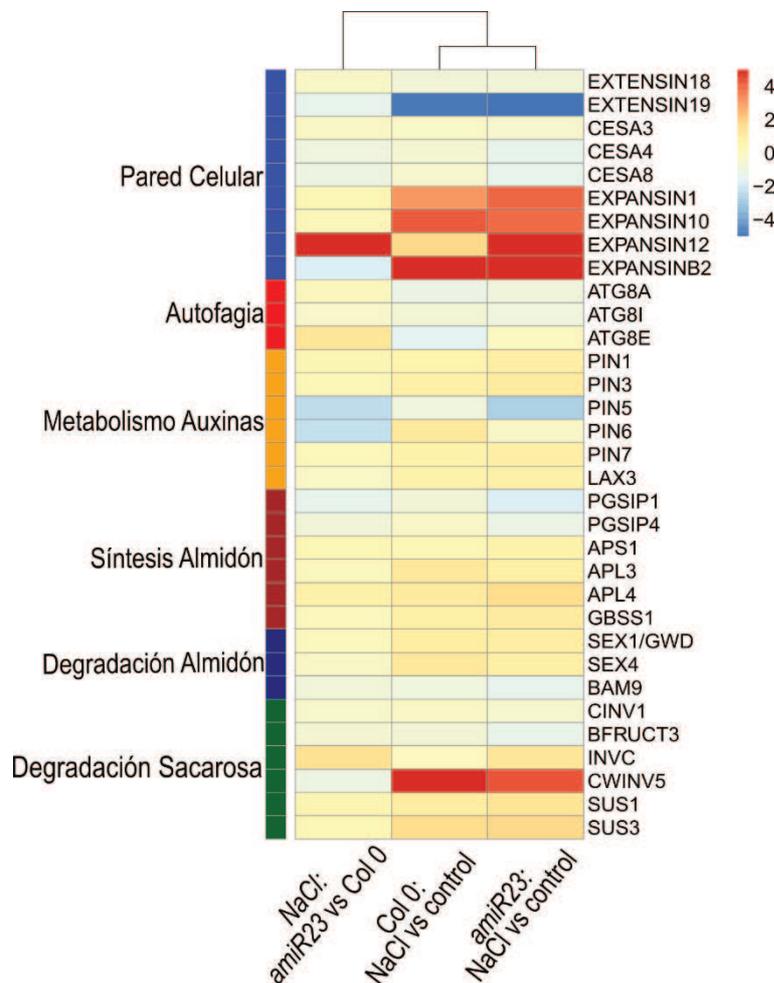


**Figura 55. Enfoque general de metabolismo por el software Mapman en dos situaciones.** (a) transcritos de raíces de plantas silenciadas *amiR23* en NaCl vs condición control, (b) transcritos de raíces de plantas silencias *amiR23* vs raíces de plantas Col 0 en condiciones de salinidad. Los cuadrados coloreados indican los niveles de expresión de los genes expresados diferencialmente en (a) o (b). Su ubicación indica el proceso en la vía en la que están involucrados. Abreviaturas: CHO (carbohidratos); CBC (Ciclo de Calvin-Benson), CAT (Ciclo de ácidos tricarbóxilicos), OPP (por sus siglas en inglés Oxidative Pentose Phosphate).

En la comparación de las plantas *amiR23* tratadas con NaCl con las cultivadas en condiciones control, los DEGs de metabolismo de pared celular que se detectaron como severamente reducidos fueron, *EXTENSIN18* y *EXTENSIN19*, que codifican proteínas ricas en hidroxiprolina involucradas en el ensamblaje de la pared celular. Además, se redujeron los niveles de varios transcritos que codifican diferentes isoformas de celulosa sintasa (*CESA3*, *CESA4* y *CESA8*) (Figura 56). Por el contrario, algunos transcritos que codifican extensinas (que median la ruptura de la pared celular) aumentaron considerablemente, incluidas *EXPANSIN1*, *EXPANSIN10*, *EXPANSIN12* y *EXPANSINB2* (Figura 56). Notoriamente, varios transcritos relacionados con la autofagia disminuyeron, particularmente *ATG8A* y *ATG8I*, que codifican componentes de la vía de conjugación de la autofagia (Figura 56). Igualmente, se alteraron varios transcritos relacionadas con el metabolismo de las auxinas. En particular, disminuyó *PIN5* (codifica un transportador de auxinas que controla los niveles de auxinas en la punta de la raíz lateral), mientras otros transportadores de auxinas como *PIN1*, *PIN3* y *PIN7* aumentaron; curiosamente, los niveles del blanco directo de AtHB23, *LAX3* también se incrementaron (Figura 56).

Teniendo en cuenta la falta de almidón observada en las plantas *amiR23* tratadas con NaCl, se prestó atención en los DEGs relacionados con el metabolismo del almidón y la sacarosa. En primer lugar, se analizaron los transcritos relacionados con las proteínas involucradas en la síntesis de almidón. En este sentido, los transcritos de *PGSIP1* y *PGSIP4*, que codifican proteínas similares a la glucogenina involucradas en la iniciación del gránulo de almidón, se redujeron. Por el contrario, aumentaron los transcritos de diferentes subunidades de ADP-glucosa pirofosforilasa (*APS1*, *APL3* y *APL4*) y los transcritos de *GBSS1* (Figura 56). Por otro lado, varios de los DEGs relacionados con la degradación del almidón aumentaron, como *SEX1/GWD* (que codifica un glucano, diquinasa de agua) y *SEX4* (que codifica una fosfatasa glucano), mientras que sólo una disminuyó (*BAM9*, que codifica para una beta-amilasa; Figura 56). Por otro lado, los transcritos relacionados con la degradación de la sacarosa mostraron diferentes patrones. Por ejemplo, los transcritos de *CINV1* y *BFRUCT3*, que codifican las invertasas citosólicas y vacuolares, respectivamente, se redujeron. Por el contrario, se incrementaron los niveles de los transcritos que codifican la invertasa C alcalina/neutra mitocondrial y la invertasa 5 de la pared celular (*CWINV5*), así como los que codifican las sacarosas sintasas 1 y 3 (*SUS1* y *SUS3*, respectivamente; Figura 56). En el mismo sentido, varios de estos transcritos se detectaron también en la comparación plantas *amiR23* y Col 0 tratadas con NaCl. Por ejemplo, se observaron niveles reducidos de transcritos que codifican transportadores de auxinas (*PIN5* y *PIN6*) y mayores niveles de *ATG8E* (un componente de la vía de la autofagia; Figura 56). Un dato interesante fue que los transcritos implicados en el metabolismo de la sacarosa mostraron la misma

tendencia: *CINV1*, *BFRUCT3* y *BAM9* se redujeron, mientras que la codificación de la invertasa mitocondrial alcalina/neutra C aumentó (Figura 56).



**Figura 56. El análisis detallado del transcriptoma indicó una regulación diferencial en las raíces *amiR23* de los genes implicados en el metabolismo del almidón y la pared celular frente a la salinidad.** Mapa de calor que muestra el patrón de expresión de los genes más relevantes (filas) que se seleccionaron en base a los resultados del análisis Mapman de DEGs (Figura 55), y la inspección del transcriptoma completo. La anotación funcional de los genes está resaltada a la izquierda. Sólo se incluyeron los tres contrastes con un número relevante de DEGs (columnas).

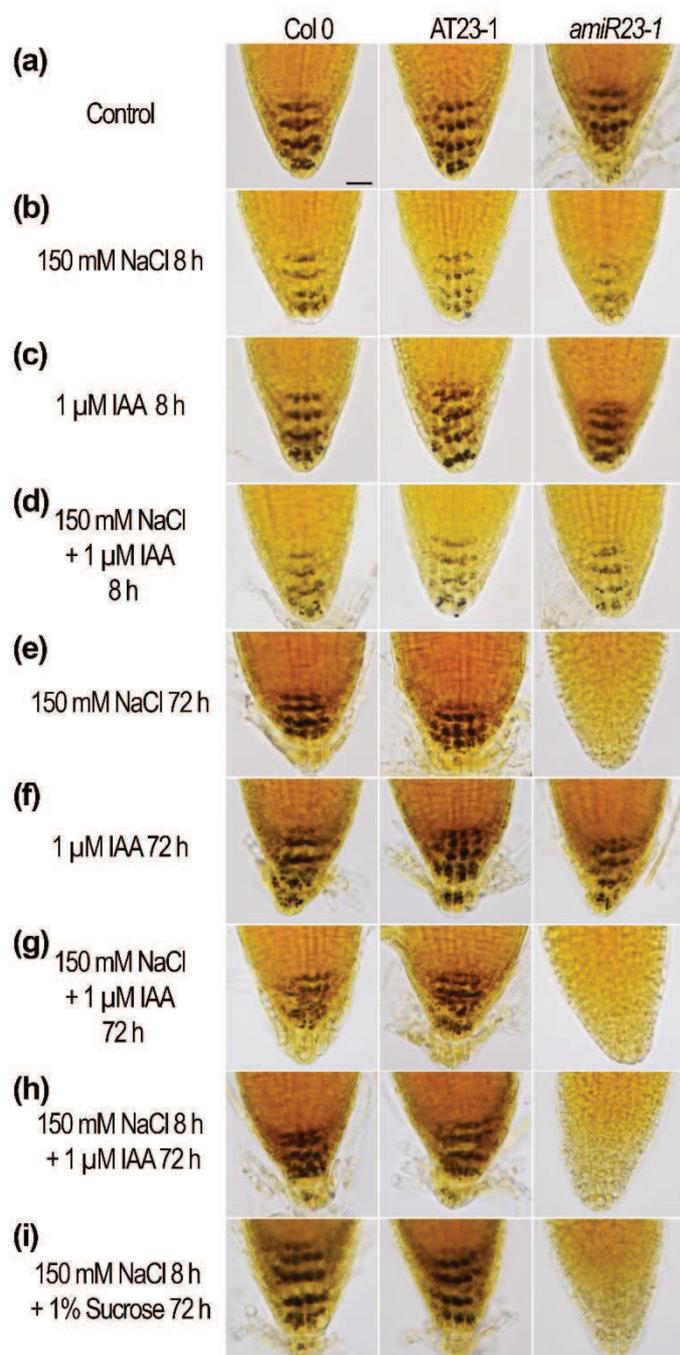
Finalmente, teniendo presente el fenotipo relacionado de las plantas *amiR23* crecidas en salinidad, en las que se observó el arresto de la elongación de la raíz principal sumado a una raíz principal curvada con crecimiento en dirección opuesta al vector gravedad (Figura 47), se decidió evaluar los DEGs del transcriptoma relacionados a los términos respuesta a la gravedad y patrones de ondulación. Particularmente en la comparación de las plantas *amiR23* tratadas con NaCl con las cultivadas en condición control, se detectaron alterados varios de los transcritos de los genes agrupados como *HPSGC* (por su denominación en inglés: *Highly Probable Skew Gene Candidates*; Tabla 7). Se trata de 11 genes candidatos que estarían potencialmente implicados en la curvatura/torcimiento de la raíz frente a condiciones específicas que afectan diferencialmente la ondulación y la inclinación de la raíz [148]. Y esto podría explicar el fenotipo observado en las plantas *amiR23*.

Tabla 7. Genes diferencialmente expresados en las plantas *amiR23*: NaCl vs Control.

Gen	<i>amiR23</i> : NaCl vs Control (log <sub>2</sub> FC)
<i>DIN2</i>	-3,46
<i>SEN1</i>	-2,26
<i>HKT1</i>	1,46
<i>SWEET11</i>	7,07
<i>AT5G66780</i>	1,79

#### 4.3.7 Las plantas silenciadas *amiR23* no pueden recuperarse del tratamiento con NaCl ni con auxinas ni con sacarosa

Las auxinas son hormonas claves tanto en la respuesta a la gravedad como en la percepción de la misma. La respuesta a la gravedad se da por medio de la síntesis de gránulos de almidón en la punta de la raíz [63]. Como *AtHB23* se regula por dicha hormona en el tejido radicular y habiendo observado el fenotipo diferencial en las plantas *amiR23* frente a tratamiento salino, se decidió evaluar si el efecto del NaCl se puede equilibrar por el efecto de las auxinas. Las raíces de los tres genotipos se cultivaron en condiciones control durante 5 días y luego se realizaron diferentes combinaciones de tratamiento. En primer lugar, se colocaron en NaCl durante 8 h y como se ha mostrado anteriormente, este tratamiento redujo la acumulación de gránulos de almidón en los tres genotipos (Figura 57 b). Por otro lado, el tratamiento con 1  $\mu$ M IAA durante 8 h no afectó al escenario observado en condiciones control (Figura 57 c), mientras que la adición conjunta de 1  $\mu$ M IAA y 150 mM de NaCl fue ineficaz para evitar el efecto de NaCl (Figura 57 d). Cuando el tratamiento con 150 mM NaCl se prolongó por 72 h, las plantas Col 0 y AT23 recuperaron sus amiloplastos al adaptarse al medio, mientras que las plantas *amiR23* continuaron afectadas. El tratamiento con 1  $\mu$ M IAA durante 72 h no afectó significativamente las plantas de todos los genotipos (Figura 57 e), mientras que, cuando se sumaron ambos reactivos por 72 h, las plantas control y AT23 presentaron gránulos de amiloplastos mientras que las plantas *amiR23* los perdieron irreversiblemente (Figura 57 g). La misma situación y diferencia entre los genotipos se observó cuando luego del tratamiento con 150 mM NaCl por 8 h, se colocaron 1  $\mu$ M IAA o sacarosa al 1% durante 72 h adicionales (Figuras 57 h y 57 i). Estos resultados indicaron la incapacidad de las plantas *amiR23* para recuperarse del tratamiento de salinidad y el papel crucial desempeñado por *AtHB23*.



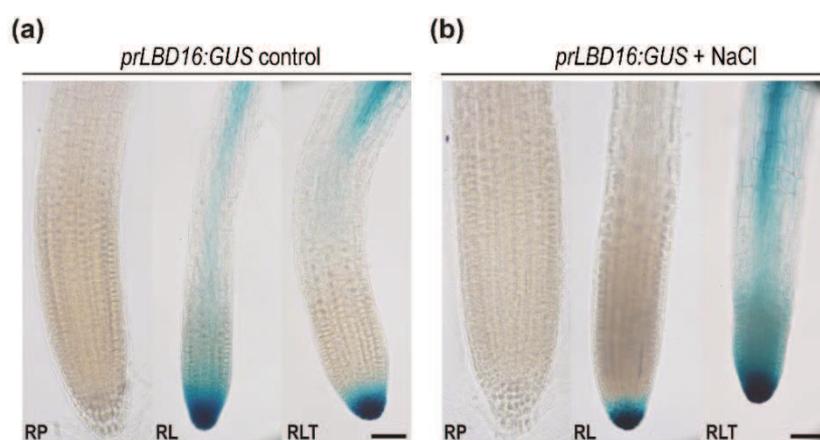
**Figura 57. La degradación de los amiloplastos es irreversible en las plantas silenciadas *amiR23*.** Desde arriba hacia abajo, imágenes ilustrativas de puntas de raíz (5 días de edad) teñidas con solución de Lugol de plántulas Col 0, AT23 y *amiR23* cultivadas en condiciones control (a), luego de 8 h con: 150 mM NaCl (b), 1  $\mu$ M IAA (c), 150 mM NaCl + 1  $\mu$ M IAA (d). Raíces de 5 días tratadas durante 72 h con: 150 mM NaCl (e), 1  $\mu$ M IAA (f), 150 mM NaCl + 1  $\mu$ M IAA (g), o tratadas durante 8 h con NaCl de 150 mM y luego transferidas por 72 h a un medio control MS complementado con 1  $\mu$ M IAA (h) o sacarosa al 1% (i). Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. Las barras negras representan 50  $\mu$ m.

#### 4.3.8 *LAX3*, el gen blanco de *AtHB23*, está regulado por NaCl en las puntas de las raíces

Los experimentos descritos hasta ahora indicaron que, en presencia de NaCl, *AtHB23* altera la capacidad de supervivencia y la respuesta gravitrópica. Frente a estrés salino, las plantas silenciadas *amiR23* muestran una estructura radicular curva por lo que no es posible medir ángulos de respuesta gravitrópica (Figura 47). Este fenotipo se observó incluso en concentraciones relativamente bajas de NaCl y las plantas silenciadas no fueron capaces de

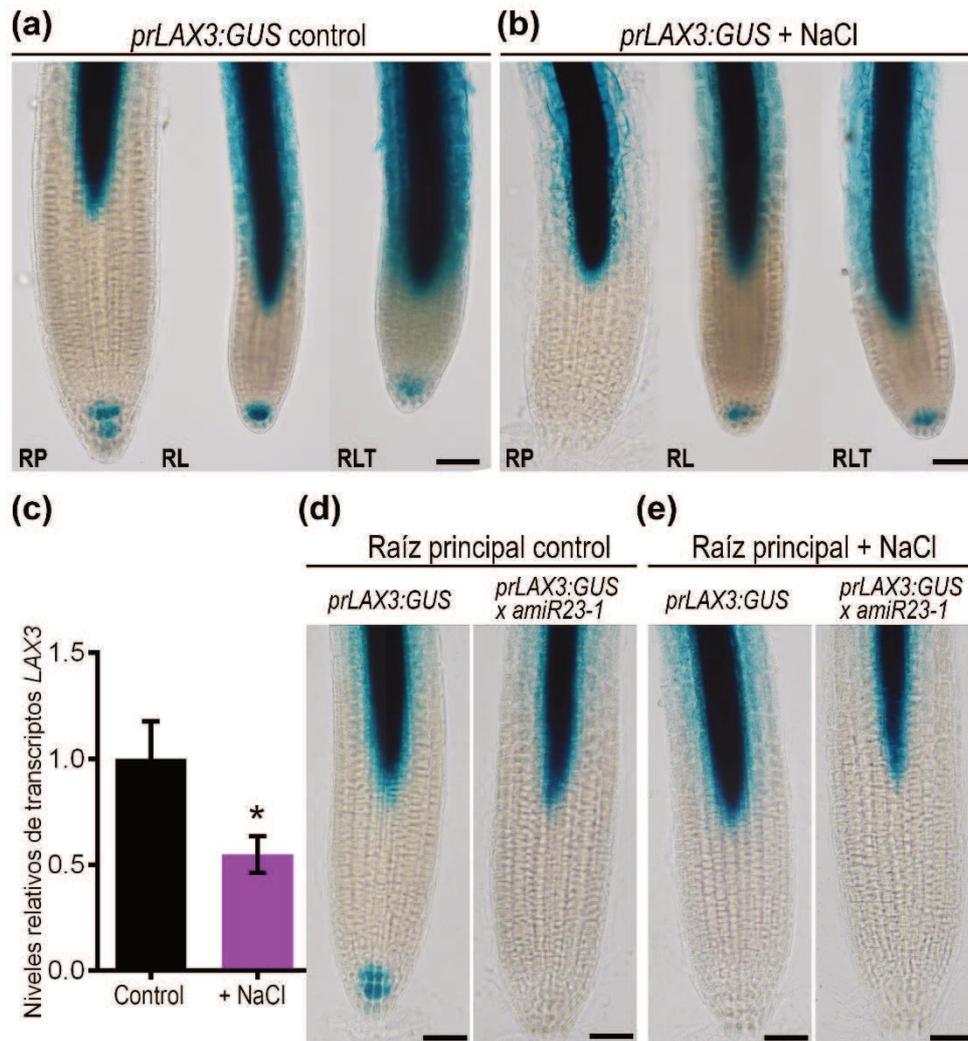
recuperar sus gránulos de almidón (Figura 51). A continuación, nos preguntamos si los genes *LAX3* y *LBD16*, descritos como genes blancos directos de *AtHB23*, estaban involucrados en la respuesta frente a estrés salino. Se evaluaron las plantas transgénicas con las construcciones *promotorLAX3:GUS* y *promotorLBD16:GUS*, en condición control y luego del tratamiento con 75 mM NaCl. Específicamente se analizaron las raíces de distinto orden de ramificación (primaria, secundaria y terciaria) de dichas plantas, debido a que se mostraron evidencias de que la modulación de estos genes es dependiente del orden de ramificación.

El gen *LBD16*, se observó en la punta de las raíces de segundo y tercer orden, pero no en la raíz principal (Figura 58 a). Aun así, esa expresión se mantuvo luego del tratamiento con distintas concentraciones de NaCl (Figura 58 b). Por lo que este gen no estaría siendo regulado por estrés salino, al menos en las condiciones evaluadas.



**Figura 58. La expresión de *LBD16* no se afecta por estrés salino.** Imágenes ilustrativas de raíz principal (RP), raíces laterales (RL) y raíces laterales terciarias (RLT) de plántulas que expresan *promotorLBD16:GUS* en condición control (a), y luego del tratamiento con 75 mM NaCl (b). Las barras negras representan 100  $\mu$ m.

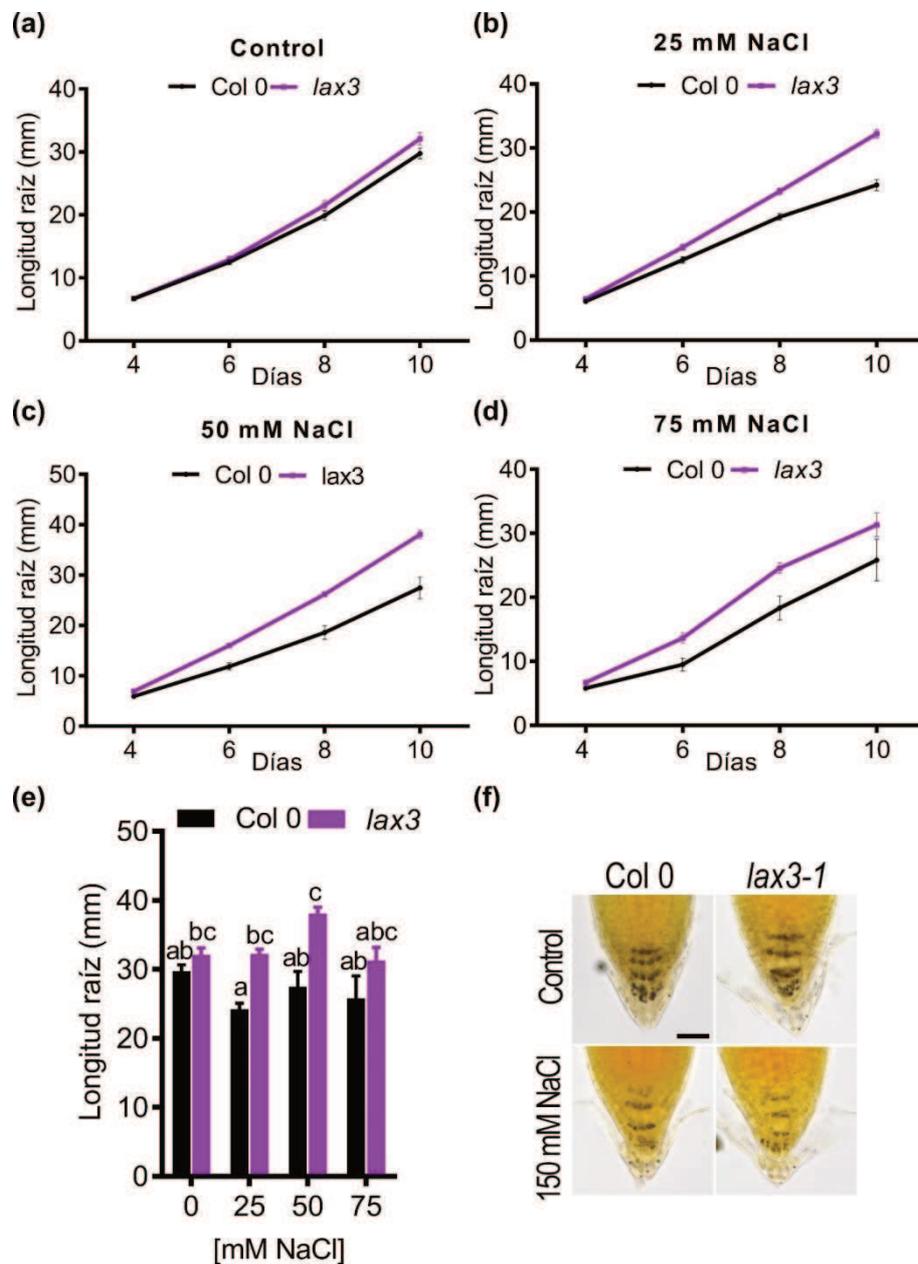
Para el caso del gen *LAX3*, se observó expresión en la punta de raíces de los tres órdenes en plántulas de 14 días de edad (Figura 59 a). Sorprendentemente, después del tratamiento con NaCl, la señal correspondiente a *LAX3* desapareció, pero sólo de la punta de la raíz principal, permaneciendo sin cambios en las puntas de las raíces secundarias y terciarias (Figura 59 b). Por otra parte, se midieron los niveles de transcritos de *LAX3* después del tratamiento y se observó una marcada reducción de los mismos, en concordancia con las observaciones histológicas (Figura 59 c). Para investigar con mayor detalle la modulación de *LAX3* por salinidad, también se trataron con NaCl las plántulas de 10 días de edad *promotorLAX3:GUS* y *promotorLAX3:GUSxamiR23-1*. *LAX3* se observó en la punta de la raíz principal pero la señal desapareció en las plantas cruzadas, tanto tratadas como no tratadas (Figuras 59 d y 59 e). Estos resultados sugirieron fuertemente que *LAX3* tiene un papel en la respuesta de la salinidad, gobernada por *AtHB23* en una etapa de desarrollo específica.



**Figura 59. La expresión del transportador de auxinas *LAX3* es reprimida por salinidad y *AtHB23* en la raíz principal.** Imágenes ilustrativas de la expresión del *prLAX3:GUS* en plántulas de 14 días de edad crecidas en condición control (a) o complementadas con 75 mM NaCl (b) en raíz principal (RP), raíces laterales (RL) y raíces laterales terciarias (RLT). (c) Niveles de transcritos de *LAX3* medidos en plantas Col 0 crecidas en condición control y luego tratadas 8 h con 150 mM NaCl. Las barras de error representan el SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas al realizar una prueba de Tukey (\*  $P < 0.05$ ). Imágenes ilustrativas de raíces principales de plantas de los genotipos *promotorLAX3:GUSxamiR23* y *promotorLAX3:GUS x amiR23* de 10 días de edad cultivadas en condición control (d) y sometidas a estrés salino (e). Las barras negras representan 100  $\mu$ m.

Dada la regulación de los niveles de transcritos de *LAX3* por salinidad, nos preguntamos si este gen podría alterar el fenotipo de la raíz principal frente a NaCl. Para responder a esta pregunta, se evaluó la cinética de crecimiento de las plantas mutantes *lax3* con diferentes concentraciones de NaCl, de 0 a 75 mM. En condiciones normales, las plantas mutantes *lax3* tenían raíz principal ligeramente más largas que los controles, y esta diferencia aumentó en 25 y 50 mM de NaCl, al menos hasta los 10 días (Figura 60 a-e). Por otra parte, después del tratamiento con NaCl, se observaron los amiloplastos en estas plántulas mutantes *lax3*, pero no se detectaron diferencias significativas (Figura 60 f). En conjunto, estas observaciones

sugieren que la alta sensibilidad causada por el silenciamiento de *AtHB23* frente a la salinidad, involucra de alguna manera la represión de *LAX3* en la punta de la raíz.



**Figura 60. Frente a estrés salino la arquitectura radicular se ve alterada por los niveles de expresión de *LAX3*.** Cinética de crecimiento de la raíz principal desde el día 4 post siembra hasta el día 10 en condiciones control (a), 25 mM NaCl (b), 50 mM NaCl (c) y 75 mM NaCl (d). (e) Cuantificación de la longitud de la raíz principal a los 10 días post siembra a distintas concentraciones de NaCl. En todos los casos se usaron plántulas mutantes *lax3-1* con sus respectivos controles Col 0. Los ensayos se repitieron al menos tres veces con N: 15/genotipo. Los datos se analizaron utilizando un ANOVA bidireccional teniendo en cuenta el genotipo y el tratamiento. Las letras indican diferencias significativas (prueba de Tukey,  $P < 0.01$ ). (f) Imágenes ilustrativas de puntas de raíz (5 días de edad) teñidas con solución de Lugol de plántulas Col 0, *lax3-1* cultivadas en condiciones control (panel superior) y luego de 8 h con 150 mM de NaCl (panel inferior). Las barras negras representan 50  $\mu$ .

# DISCUSION Y CONCLUSIONES

*“¿Por qué los árboles esconden el  
esplendor de sus raíces?”*

**Libro de las preguntas. Pablo Neruda**

## 5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### 5.1 AtHB23 tiene un papel clave en la determinación de los patrones genéticos que rigen el desarrollo de raíces secundarias y terciarias

Las raíces principales y laterales crecen en el suelo en tres dimensiones percibiendo, captando agua y micronutrientes, y respondiendo a las señales bióticas y abióticas del ambiente. Es de hacer notar que la comunidad científica exploró el sistema radicular de las especies modelos principalmente en dos dimensiones, enfocándose en la formación de raíces secundarias, en lugar de raíces laterales de orden superior.

Es importante destacar que un conocimiento más profundo de los genes, vías, interacciones y relaciones que están involucradas en el desarrollo de la arquitectura radicular podría impactar en el mejoramiento de cultivos agrícolas [149]. La formación de raíces laterales sigue un complejo mecanismo por el cual cada tipo celular tiene funciones específicas y determinadas, según una fina regulación en la que participan varios FTs y hormonas, además de otras biomoléculas. Las raíces laterales se diferencian principalmente de la raíz principal debido a su origen postembrionario a partir de células del periciclo de ésta [19]. Se han descrito otras diferencias en el desarrollo radicular; sin embargo, el principio mecanicista que subyace en tales distinciones no está del todo claro [52]. La respuesta a la gravedad también difiere entre la raíz principal y las raíces laterales [150],[151]. En contraste con la respuesta inmediata de la raíz principal a la gravedad, incluso antes de la germinación [152], las recientes raíces laterales emergidas en *Arabidopsis* se vuelven gradualmente más gravitrópicas con el tiempo. Estas diferencias tienen efectos importantes sobre la arquitectura final del sistema radicular y permite a la planta explorar dominios más extensos en el entorno del suelo. Por otro lado, las distintas capacidades de ramificación de las raíces primarias y secundarias permanecen poco exploradas.

En plantas, los FTs de varias familias se duplicaron y triplicaron durante la evolución y muchas veces parecieran ser redundantes. Sin embargo, en muchos estudios se ha demostrado que cada miembro de una dupla o trío, aparentemente redundante, presenta un patrón de expresión y una función particular. Por ejemplo, ARF7 y ARF19 parecieran estar involucrados en los mismos mecanismos; sin embargo, a pesar de que ambas mutantes simples de *arf7* y *arf19* presentan fenotipos de resistencia a auxinas, la doble mutante *arf7/arf19* tiene un comportamiento diferencial más marcado, indicando que estos genes no son totalmente redundantes [113]. Sus patrones de expresión diferenciales revelan que sus contribuciones a la señalización de auxinas en el desarrollo de raíces laterales son únicas, a pesar de que cada miembro de este par es capaz de rescatar el fenotipo de la otra mutante y comparten los mismos genes blancos [113]. La iniciación de raíces laterales y los eventos

post-iniciación requieren acumulación de auxinas [153], [154], la cual se produce en los órganos aéreos durante los primeros 4 a 7 días post-germinación [155]. Las raíces también son una fuente de auxinas, pero sólo en la etapa posterior a la emergencia de raíces laterales (a partir de los 7-10 días post-germinación). Por esta razón, es que las auxinas producidas en la raíz no estarían asociadas a la emergencia de raíces laterales [155].

Muchos grupos de investigación han estudiado el desarrollo de raíces laterales desde diferentes puntos de vista y en una variedad de especies de plantas; sin embargo, muchos aspectos todavía siguen sin ser comprendidos. En este trabajo de tesis, se identificó un miembro de la familia HD-Zip I como actor clave en el complejo escenario de desarrollo de raíces laterales. Se determinó que *AtHB23* es un gen de respuesta a auxinas que se expresa en etapas tempranas del desarrollo de raíces laterales, en forma restringida a la base de un primordio de raíz lateral (Figura 21). La caracterización fenotípica de plantas silenciadas en *AtHB23* (*amiR23*) indicó que este FT actúa como regulador negativo de la iniciación de raíces laterales reprimiendo directamente a *LBD16*, un factor crucial en el desarrollo de raíces secundarias (Figura 21 y Figura 34). De acuerdo con la relación entre los FTs LBD y HD-Zip I, existen informes previos que indicaron que en *M. truncatula*, *MtHB1* reprime a *MtLBD1* en respuesta a estrés salino [105]. La comparación de estas dos relaciones HD-Zip/LBD destaca rasgos críticos comunes y también diferentes entre la especie modelo de dicotiledóneas y la de leguminosas. Filogenéticamente, *AtHB23* no es el miembro de *Arabidopsis* más cercano a *MtHB1*, sino que lo son el par *AtHB7/12*. Sin embargo, no existen hasta ahora estudios que relacionen a este par con el desarrollo de raíces laterales. La función de *MtHB1* está relacionada a la emergencia de raíces laterales y a la elongación de la raíz principal en el modelo de leguminosas [105], [106], mientras que *AtHB23* está involucrado en la iniciación de raíces secundarias, así como la iniciación y emergencia de raíces terciarias. Estas observaciones indican una relación fuerte entre los miembros de las familias HD-Zip I y LBD que habrá que explorar en profundidad en el futuro. *AtHB23* resultó ser un activador directo de *LAX3* (Figura 30 y Figura 34), aportando evidencias adicionales a que los FTs HD-Zip podrían actuar tanto como activadores o como represores de la transcripción, dependiendo con qué proteínas interactúan [130], [170]. En base a ensayos EMSA *in vitro*, se propuso inicialmente que ARF7 y ARF19 regulan directamente a *LBD16* [111], [116]. Es más, la regulación directa de *LBD16* por ARF7 fue demostrada más tarde *in vivo* [56], [115]. Previamente, se informó que *LBD16* era un inductor de la formación de raíces laterales, actuando junto con *LBD18* corriente debajo de ARF7 y ARF19. Esto fue sugerido porque la doble mutante *lbd16/lbd18* presentaba menor densidad de raíces laterales emergidas y raíces laterales totales que las mutantes simples *lbd16* y *lbd18*, lo que llevó a la conclusión que *LBD16* y *LBD18* participan en la iniciación y emergencia de raíces laterales mediante vías diferentes [156]. Debido a que la iniciación de raíces laterales está finamente establecida por

una compleja red de FTs y *AtHB23* presenta en su promotor secuencias putativas de unión a los FTs ARF (TgTCTC), presentamos la hipótesis que *AtHB23* podría ser un conector adicional entre ARFs y *LBD16* (Figuras 34 y 61). Hay que considerar que *AtHB23* no fue identificado como un gen de respuesta a las auxinas dependiente de ARF luego de 4 h de tratamiento con 1  $\mu$ M NAA [115]. En vistas que *AtHB23* muestra una respuesta transcripcional tardía a las auxinas (Figura 27), se evaluó su comportamiento en respuesta a esta hormona en plántulas *arf7/19* (y su respectivo control Col 0) luego de 12 h con 1  $\mu$ M IAA. Resultó muy interesante observar que la inducción de *AtHB23* fue deficiente en las doble mutante *arf7/19*, así como la de sus blancos *LBD16* y *LAX3* (Figura 32). Estos resultados indicaron que *AtHB23* actúa corriente abajo de ARF7 (Figura 35), aunque más tarde que otros genes de respuesta a auxinas. Esta observación concuerda con el hecho de que *AtHB23* es un regulador negativo de *LBD16* y el desarrollo de raíces laterales, y probablemente participa en un circuito de retroalimentación negativa inducido por auxinas, afinando así la formación de raíces laterales en respuesta a estímulos internos y externos, como ya ha sido propuesto para otros FTs de respuesta a auxinas [157]. Anteriormente se demostró que *LBD16* está regulado dinámicamente por ARF7; concretamente alcanza un pico máximo a los 10 min de tratamiento con NAA y disminuye gradualmente después [56]. En este trabajo, se evaluó la unión de ARF7 con tratamientos más largos de IAA (4 y 12 h), considerando la activación retrasada de *AtHB23* por auxinas. Los ensayos de ChIP-qPCR confirmaron que *AtHB23* es un blanco directo de ARF7 (Figura 36), lo que sugiere fuertemente que el FT HD-Zip sería un intermediario molecular directo entre ARF7 y *LAX3* (Figura 61) En las etapas tempranas del desarrollo de raíces laterales, ARF7 activa la transcripción de *LBD29* y *LBD29* promueve directamente la expresión de *LAX3* sólo en las capas celulares adyacentes a un primordio naciente (Figura 24) [20]. En este trabajo se demostró que la expresión de *AtHB23* está inducida directamente por ARF7 en etapas tardías del desarrollo de raíces laterales. Notablemente, el silenciamiento de *AtHB23* altera la actividad del promotor de *LAX3* sólo en raíces laterales emergidas, indicando que otros FTs alternativos regularían la expresión de los transportadores de auxina en etapas sucesivas del desarrollo de raíces laterales. Es de hacer notar que luego de 4 h de tratamiento, todavía se detectó unión de ARF al promotor de *LBD16*, aunque en menor medida en comparación con la que se observó para *AtHB23*. Luego de 12 h de tratamiento con IAA, una vez que la expresión de *AtHB23* se induce por auxinas exógenas, el reconocimiento de ARF7 sobre *LBD16* resultó indetectable, mientras que la unión al promotor de *AtHB23* disminuyó sólo parcialmente. En su conjunto, estos resultados sustentan la hipótesis de que los ARFs median la expresión coordinada y dinámica de distintos FTs durante el desarrollo radicular.

*LAX3* se expresa normalmente en las células corticales y de la epidermis que rodean la raíz lateral, pero no en el primordio en sí, y además su expresión se induce por auxinas en los

mismos tipos celulares [25]. Este patrón de expresión fue visualizado en reacciones histoquímicas hechas a tiempos cortos (3 h); sin embargo, la tinción por períodos prolongados (16 h) generó una extensión de la expresión al resto del primordio (Figura 37). Este transportador de auxina promueve la emergencia de raíces laterales por un incremento del contenido de auxina en las células corticales y de la epidermis afectando directamente al primordio [31]. En esta Tesis se demostró que la respuesta dependiente de *AtHB23* modula el transporte de auxinas al regular directamente a *LAX3* en la emergencia de raíces secundarias.

Es interesante hacer notar que, durante la formación de raíces laterales secundarias y terciarias, la actividad del promotor de *LAX3* parece no responder diferencialmente al silenciamiento de *AtHB23*. Mientras que, el patrón de expresión de *AtHB23* difiere entre el desarrollo de raíces secundarias y terciarias. En consecuencia, los fenotipos de raíz lateral que resultan de la regulación de *AtHB23* difieren entre el primer y el segundo orden de ramificación radicular. Por otro lado, el análisis de la distribución de auxinas utilizando plantas transgénicas que contienen el promotor del reportero *DR5* cruzadas con plantas silenciadas *amiR23* (*promotorDR5:GUSxamiR23-1*) mostró que el pico de auxinas está regulado por *AtHB23* dependiendo del orden de raíces laterales, ya que no se ven cambios aparentes en raíces secundarias de las cruces, mientras que en los primordios de raíz lateral terciarias y raíces laterales terciarias el pico de auxinas desaparece por completo (Figuras 30 y 42). Por lo tanto, este estudio sobre *AtHB23* nos permitió mostrar que existen programas genéticos claramente diferentes que conducen a la formación y desarrollo de raíces secundarias y terciarias, ampliando así el conocimiento sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la complejidad del sistema radicular. Otra evidencia experimental que sustenta lo dicho fue el resultado del análisis exhaustivo del patrón de expresión de *LBD16*, que permitió dilucidar una expresión diferencial de este gen respecto al orden de ramificación radicular. Esto es porque *LBD16* mostró una clara expresión en las puntas de raíz de mayor orden, mientras que no se observó tinción de GUS en la punta de la raíz principal. Estas nuevas evidencias, sustentan aún más la idea de que los mecanismos moleculares y transcripcionales difieren entre los distintos órdenes de ramificación radicular. Asimismo, el comportamiento fisiológico de las raíces secundarias y terciarias difiere en respuesta al ambiente y a hormonas como auxinas y ABA [52], [155]. Así es como, estos hallazgos contribuyen a la comprensión de los mecanismos moleculares que gobiernan las diferencias en el desarrollo entre raíces secundarias y terciarias.

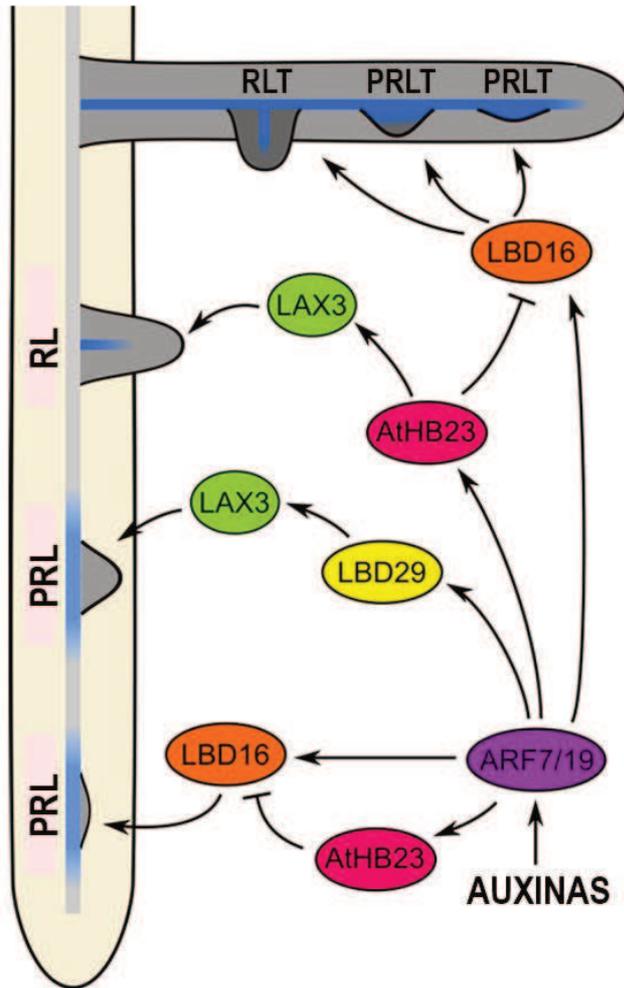


Figura 61. Modelo ilustrativo de la red de regulación génica en el desarrollo radicular con las auxinas como hormonas integradoras de las regulaciones por parte de los FTs ARF7/19, LBD16, LBD29, LAX3 y AtHB23.

## 5.2 El desarrollo de las raíces secundarias y terciarias se rige por diferentes programas génicos dependientes del genotipo

La mayoría del conocimiento sobre el desarrollo de raíces laterales se ha adquirido en el modelo dicotiledónea *Arabidopsis* ecotipo Col 0. Existen evidencias experimentales de que distintos eventos de desarrollo ocurren a través de diferentes vías cuando se comparan dos genotipos de *Arabidopsis*. Por ejemplo, el desarrollo de pétalos en mutantes *kin13A* difiere significativamente entre los genotipos Columbia (Col 0) y Landsberg erecta (Ler) [158]. Un segundo ejemplo es la respuesta desigual a la carencia de fósforo (Reymond y col 2006) y la gran diferencia en los transcriptomas de la punta de raíz de dichos genotipos incluyendo ARN mensajeros, ARN largos no codificantes y pequeños ARN [159]. En cuanto a las raíces particularmente, el tamaño de estos órganos exhibe una variación natural entre los ecotipos Col 0 y Ler cuando son sometidos a estrés osmótico. En estas condiciones, el total de raíces laterales en plantas Ler fue significativamente mayor que en plántulas Col 0 [160]. En este

trabajo de Tesis se observó que existe otro nivel de complejidad, es decir en el desarrollo de raíces laterales, tanto en las raíces principales como secundarias, se modula diferencialmente entre los genotipos Col 0 y Ler. En plantas Ler se observa un mayor número total de raíces laterales en comparación con plantas Col 0 a los 8 días de edad, mientras que ocurre lo contrario a los 14 días de edad para el número total de raíces laterales terciarias (Figura 44). Los resultados en su conjunto permiten concluir que el desarrollo de raíces secundarias y terciarias sigue diferentes programas genéticos dependiendo del genotipo para el caso de *Arabidopsis thaliana*.

### **5.3 AtHB23 modula el metabolismo del almidón para el desarrollo radicular y la supervivencia de la planta bajo estrés salino**

La capacidad de las plantas para adaptarse a diferentes tipos de suelo está determinada por la plasticidad del desarrollo de las raíces. Entre otras, una de las características más importantes que definen la calidad del suelo es la salinidad, ya que afecta considerablemente el crecimiento de las plantas. Además, la salinidad depende de la disponibilidad de agua, lo que desafía continuamente a las raíces a mejorar sus habilidades para captarla. Por ejemplo, cuando se somete a un déficit hídrico, la raíz principal crece más profundamente para alcanzar el agua, y las raíces laterales detienen su desarrollo [161]. Aun así, se ha demostrado que una baja salinidad mejora el crecimiento de la raíz principal y de las raíces laterales, mientras que mayores concentraciones de NaCl son perjudiciales para ambas, lo que indica una dependencia de la concentración de sal en el crecimiento de las raíces [162], [163]. Sin embargo, en el ecotipo Col 0 de *Arabidopsis*, el desarrollo de la raíz principal se ve más afectado por la salinidad que el de las raíces laterales y depende del tiempo de exposición [164]. Asimismo, parece que la mejor estrategia para que las raíces sobrevivan a la salinidad es tener pocas raíces laterales pero más largas para excluir el Na<sup>+</sup> [161].

En este trabajo de tesis, a través del estudio del factor de transcripción AtHB23, ejemplificamos cambios significativos que tienen lugar tanto en la arquitectura radicular como en el programa genético de *Arabidopsis* para hacer frente al estrés por salinidad. En este sentido, en un entorno de salinidad, las plantas con niveles alterados de *AtHB23* exhibieron cambios significativos en la arquitectura de las raíces. Las plantas silenciadas *amiR23* arrestaron el crecimiento de la raíz principal, y, por otro lado, incrementaron la densidad de primordios de raíz lateral. Los fenotipos opuestos se observaron en las plantas sobreexpresantes AT23 (Figura 46 y Figura 47). Especialmente, la raíz principal de las plantas *amiR23* se afectó en mayor medida que el de las raíces laterales, y el arresto del crecimiento de la raíz principal se correlaciona con una supervivencia comprometida bajo

condiciones de alta salinidad (Figura 49). En concordancia, el análisis de las plantas transformadas con un segmento más corto de la región promotora fusionada a *GUS* reveló una fuerte expresión en las células de la columela y una inducción por NaCl tanto en la raíz principal como en las raíces laterales, explicando el fenotipo diferencial bajo este tipo de estrés abiótico (Figura 50).

En forma concomitantes con el arresto del crecimiento de la raíz principal en las plantas *amiR23*, las mismas mostraron un desarrollo curvilíneo insinuando una pérdida de la respuesta gravitropica. El gravitropismo es un proceso crucial que permite a las raíces crecer hacia abajo y captar potencialmente más agua. Este fenómeno implica la acumulación de estatolitos, gránulos de almidón, que perciben la gravedad. Esta vía está mediada por las auxinas y se encuentra afectada por las condiciones de salinidad [63]. En condiciones normales de crecimiento, los transportadores de auxinas PIN generan un gradiente de auxinas dentro del ápice de la raíz, alterando la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la síntesis de gránulos de almidón como *SS4*, *PGM* y *ADG1*, [63]. Aunque algunos pasos de este proceso ya fueron descritos [165], la relación entre la salinidad, las auxinas, el metabolismo del almidón y la percepción de la gravedad sigue siendo en gran medida desconocida.

La plasticidad de las raíces incluye otros eventos, aparte de los cambios en la respuesta gravitatoria. Cuando las plantas se cultivan en sustratos duros, muestran patrones de inclinación y ondulación. Los programas genéticos que gobiernan estos patrones difieren entre los distintos ecotipos de *Arabidopsis*; en Col 0 la ondulación es más relevante que la inclinación [148]. Los genes implicados en estos eventos se identificaron en el transcriptoma como DEGs en las plantas *amiR23* tratadas con NaCl, que presentan un fenotipo de raíz principal curvada. En particular, estos genes candidatos, que participan en la percepción y la señalización vinculada a la inclinación, están implicados en el transporte de azúcares, la señalización de la sal, la organización de la pared celular y la señalización hormonal [148]. Lo que podría estar sugiriendo a *AtHB23* como un FT central entre todas estas vías implicadas.

Por otro lado, el estrés hídrico, por sorbitol o manitol, da lugar a la degradación de los amiloplastos en las células de la columela [64]. En el mismo sentido, bajo estrés salino, el silenciamiento de *AtHB23* provocó la pérdida irreversible de gránulos de almidón en las células de la columela de la raíz principal, indicando un papel crucial de este FT en la respuesta a la salinidad (Figura 51).

El análisis de los datos del experimento de RNA-Seq de las plantas silenciadas *amiR23* tratadas con NaCl mostró una reducción de los niveles de los transcriptos que codifican diferentes isoformas de extensinas y componentes del complejo de la celulosa sintasa, mientras que se observó un aumento en los niveles de transcriptos que codifican varias expansinas (Figuras 55 y 56). Estos resultados sugieren una alteración en el metabolismo de

la pared celular, que podría afectar su integridad, aumentando así la susceptibilidad al NaCl [166]. Estas observaciones concuerdan con la baja tasa de supervivencia presentada por las plantas silenciadas *amiR23* tras el tratamiento con NaCl (Figura 49).

De acuerdo con el fenotipo de las plantas silenciadas, el metabolismo del almidón se vio severamente afectado por la ausencia *AtHB23*. Esto se observó no sólo por la evaluación individual de los transcritos por RT-qPCR, sino también por el análisis del transcriptoma. Según el análisis del RNA-Seq de las plantas silenciadas *amiR23* en salinidad, los transcritos de codifican para las enzimas que sintetizan el almidón como *ADG1* y *GBSS1* aumentaron (Figura 56), mientras que, según la evaluación por RT-qPCR, disminuyeron los niveles de estas mismas enzimas (*ADG1* y *GBSS1*), y aumentaron los que codifican las enzimas que degradan el almidón (*GWD* y *BAM1*) (Figura 53). Estos resultados parecen ser contradictorios; sin embargo, hay que considerar que en el análisis por RT-qPCR, *ADG1* y *GBSS1* fueron inducidos en las plantas silenciadas *amiR23* tratadas con NaCl, pero en menor medida que en las plantas Col 0 y AT23 (Figura 53). No obstante, estos transcritos no se identificaron en el RNA-Seq como DEGs en la comparación de salinidad entre los genotipos (*amiR23* versus Col 0). Aun así, se detectaron como DEGs los transcritos de *PGSIP1* y *PGSIP4* en las plantas *amiR23* tratadas con NaCl (Figura 56). En relación con esto, la bibliografía indica que las plantas de *Arabidopsis* que expresan una construcción de ARNi contra *PGSIP1* mostraron niveles reducidos de almidón en las hojas [167], lo que podría explicar el fenotipo de pérdida de almidón de las plantas *amiR23* tratadas con NaCl.

La degradación de la sacarosa es catalizada por sintasas de sacarosa o invertasas [168]. *Arabidopsis* tiene seis genes que codifican sintasas de sacarosa citosólicas (*SUS1-4*) y vasculares (*SUS5-6*), así como también, múltiples genes que codifican invertasas citosólicas, vacuolares y apoplásticas. La planta cuádruple mutante *sus1/sus2/sus3/sus4* muestra contenidos normales de sacarosa y almidón, mientras que la doble mutante *sus5/sus6* presenta una reducción de la callosa. Mientras que, cuando se mutan los genes que codifican para las principales isoformas de la invertasa citosólica de raíces (*CINV1/CINV2*), las plantas se ven afectadas gravemente en su desarrollo, incluyendo la pérdida del almidón en las células de la columela [168], [169]. Aunque la morfología alterada de los mutantes *cinv1/cinv2* fue similar a la observada en las plantas silenciadas *amiR23* tratadas con NaCl, los niveles de transcritos de *CINV1* y *CINV2* no cambiaron significativamente en las plantas *amiR23* expuestas por 8 h 150 mM de NaCl, lo que sugiere que *AtHB23* no está regulando la degradación de la sacarosa a través de esta vía. Sin embargo, observamos una disminución de los niveles del transcripto *CINV1* en las plantas silenciadas *amiR23* expuestas durante 6 días a 75 mM de NaCl (Figura 56).

Las invertasas vacuolares están involucradas en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas en respuesta al estrés abiótico. Se demostró que la *CsINV5* de la planta de té se

induce por la aclimatación al frío y el tratamiento con carbohidratos; la sobreexpresión de este gen promueve la elongación de la raíz pivotante y de las raíces laterales involucrando a los carbohidratos y la señalización de las auxinas [170]. Consistentemente, en el análisis del RNA-Seq de las plantas *amiR23*, se detectaron niveles reducidos del transcripto *BFRUCT3*, que codifica la invertasa vacuolar 1 [171] (Figura 56).

Por otra parte, considerando que las auxinas promueven la formación de gránulos de almidón, se sometió al tratamiento con esta hormona a las raíces de los distintos genotipos, y notoriamente no se logró ni aumentar la cantidad ni revertir la degradación de los gránulos de almidón de las plantas *amiR23*, incluso después de 72 h. Dichas plantas perdieron irreversiblemente sus gránulos de almidón (Figura 57). Estos resultados concuerdan con los informados por Pignocchi y colaboradores (2021) [169], que demuestran que la interrupción de la señalización de las auxinas no explica el fenotipo del doble mutante *cinv1/cinv2*.

En la respuesta a la salinidad mediada por el FT *AtHB23*, las auxinas y su homeostasis podrían ser un factor clave adicional. Por ejemplo, *LAX3*, se reprimió en la punta de la raíz principal luego del tratamiento con 75 mM de NaCl, pero no en las puntas de las raíces de orden superior (Figura 59). Por otro lado, la expresión de este gen transportador desapareció en la raíz principal de las plantas *promotorLAX3:GUS x amiR23-1* en condiciones control y no reapareció cuando las mismas plantas fueron sometidas a estrés salino (Figura 59), a pesar de que *AtHB23* es inducido en las mismas condiciones de estrés. Estos resultados podrían indicar que a pesar de que existe una regulación positiva e irreversible del transportador por *AtHB23* en la punta de la raíz principal, el impacto de la salinidad supera la regulación por este FT. Por lo cual, una hipótesis posible para un contexto salino es que habría una regulación positiva por otro y desconocido FT de la familia HD-Zip I, capaz de heterodimerizar con *AtHB23*, evitando así su acción sobre *LAX3*. Esto sería posible porque los FT de esta familia son capaces de heterodimerizar [172] y varios miembros se expresan en las células de la columela (<http://bar.utoronto.ca/>, [173], [174], [175]; <http://wanglab.sippe.ac.cn/rootatlas>, [176]). Otra hipótesis alternativa podría asociarse a la concentración de NaCl y la relación entre la duración del tratamiento y su respuesta. Esta hipótesis se sustenta en el hecho de que la expresión de *LAX3* aparece disminuida en plantas *promotorLAX3:GUS x amiR23-1* de 14 días y en plantas salvajes de cinco días tratadas durante 8 h con 150 mM de NaCl (Figura 59) mientras que en el análisis del transcriptoma, de plantas de nueve días sometidas durante seis días a 75 mM NaCl, *LAX3* está ligeramente inducido (Figura 56).

En su conjunto, los resultados indican que *AtHB23* presenta roles opuestos en la raíz principal y las raíces laterales cuando las plantas son sometidas NaCl, igualmente este FT es necesario para la supervivencia de las plantas frente a este tipo de estrés abiótico (Figura 62). En este sentido, *AtHB23* es necesario tras el tratamiento con NaCl, para recuperar la biosíntesis de almidón y así formar los gránulos, indispensables para percibir y responder a la

gravedad. AtHB23 integra la modulación de genes que participan tanto en el metabolismo de almidón como en el transporte de auxinas.

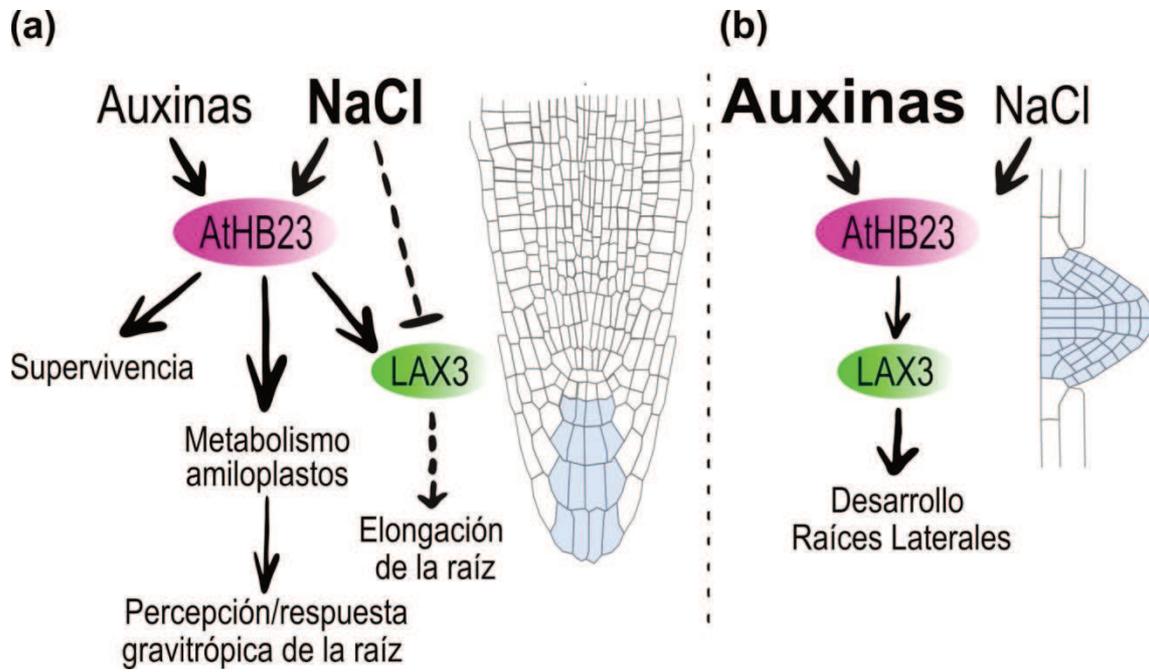


Figura 62. Modelo propuesto de las distintas regulaciones por AtHB23 en el desarrollo de la raíz principal y las raíces laterales bajo estrés salino.

# BIBLIOGRAFÍA

*“Existe siempre durante el acto de leer un momento intenso y placido a la vez, en el que la lectura se trasciende a sí misma, y en el que, por distintos caminos, el lector, abandona el libro y se queda absorto en la parte ignorada de su propio ser que la lectura le ha revelado “*

Juan José Saer

## 6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] R Crang, S Lyons-Sobaski, R Wise (2018) *Plant anatomy. A Concept-Based Approach to the Structure of Seed Plants*. Springer, Switzerland.
- [2] SC Bhatla, M A. Lal (2018) *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer, Singapore.
- [3] KJ Willis (2017) State of the world's plants 2017. *State world's plants 2017* . Report. Royal Botanic Gardens, Kew.
- [4] H Lambers, FS Chapin, TL Pons, (2008) *Plant Physiological Ecology*. Springer Science+Business Media, New York.
- [5] L Taiz, E Zeiger, (2010) *Plant Physiology*. Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers
- [6] U Krämer (2015) Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *e-life* 4:1-13.
- [7] RC O'Malley, JR Ecker (2010) Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *Plant J.* 61 (6): 928-940.
- [8] T Araki (2001) Transition from vegetative to reproductive phase. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4 (1): 63-68.
- [9] M Blümel, N Dally, C Jung (2015) Flowering time regulation in crops-what did we learn from *Arabidopsis*? *Curr. Opin. Biotechnol.* 32:121-129.
- [10] DC Boyes, AM Zayed, R Ascenzi, AJ McCaskill, NE Hoffman, KR Davis, J Görlach (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* 13 (7): 1499-1510.
- [11] KS Osmont, R Sibout, CS Hardtke (2007) Hidden Branches: Developments in Root System Architecture. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58 (1): 93-113.
- [12] EC Morris, M Griffiths, A Golebiowska, S Mairhofer, J Burr-Hersey, T Goh, D von Wangenheim, B Atkinson, CJ Sturrock, JP Lynch, K Vissenberg, K Ritz, DM Wells, SJ Mooney, MJ Bennett (2017) Shaping 3D Root System Architecture. *Curr. Biol.* 27 (17): R919-R930.
- [13] B Scheres, P Benfey, L Dolan (2002) Root Development. En: *The Arabidopsis Book*.

- The American Society of Plant Biologists, p :1-18.
- [14] I Casimiro, T Beeckman, N Graham, R Bhalerao, H Zhang, P Casero, G Sandberg, MJ Bennett (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8 (4): 165-171.
- [15] AI Fernandez, N Vangheluwe, K Xu, J Jourquin, LAN Claus, S Morales-Herrera, B Parizot, H De Gernier, Q Yu, A Drozdzecki, T Maruta, K Hoogewijs, W Vannecke, B Peterson, D Opdenacker, A Madder, ZL Nimchuk, E Russinova, T Beeckman (2020) GOLVEN peptide signalling through RGI receptors and MPK6 restricts asymmetric cell division during lateral root initiation. *Nat. Plants* 6 (5): 533-543.
- [16] JM Van Norman, W Xuan, T Beeckman, PN Benfey (2013) To branch or not to branch: The role of pre-patterning in lateral root formation. *Development.* 140 (21):4301-4310.
- [17] M Lucas, C Godin, C Jay-Allemand, L Laplaze (2008) Auxin fluxes in the root apex co-regulate gravitropism and lateral root initiation. *J. Exp. Bot.* 59 (1): 55-66.
- [18] J Banda, K Bellande, D von Wangenheim, T Goh, S Guyomarc'h, L Laplaze, MJ Bennett (2019) Lateral Root Formation in Arabidopsis: A Well-Ordered LRexit. *Trends Plant Sci.* 24 (9):826-839.
- [19] JE Malamy, PN Benfey (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana. *Development.* 124 (1):33-44.
- [20] S Porco, A Larrieu, Y Du, A Gaudinier, T Goh, K Swarup, R Swarup, B Kuempers, A Bishopp, J Lavenus, I Casimiro, K Hill, E Benkova, H Fukaki, SM Brady, B Scheres, B Péret, MJ Bennett (2016) Lateral root emergence in Arabidopsis is dependent on transcription factor LBD29 regulation of auxin influx carrier LAX3. *Development.* 143 (18): 3340-3349.
- [21] JE Malamy (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant. Cell Environ.* 28 (1): 67-77.
- [22] H Fukaki, M Tasaka (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol. Biol.* 69 (4):437-449.
- [23] B Péret, K Swarup, A Ferguson, M Seth, Y Yang, S Dhondt, N James, I Casimiro, P Perry, A Syed, H Yang, J Reemmer, E Venison, C Howells, MA Perez-Amador, J Yun, J Alonso, GTS Beemster, L Laplaze, A Murphy, MJ Bennett, E Nielsen, R Swarup (2012)

- AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during arabidopsis development. *Plant Cell* 24 (7): 2874-2885.
- [24] J Petrášek, J Friml (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136 (16): 2675-2688.
- [25] K Swarup, E Benková, R Swarup, I Casimiro, B Péret, Y Yang, G Parry, E Nielsen, I De Smet, S Vanneste, MP Levesque, D Carrier, N James, V Calvo, K Ljung, E Kramer, R Roberts, N Graham, S Marillonnet, K Patel, JDG Jones, CG Taylor, DP Schachtman, S May, G Sandberg, P Benfey, J Friml, I Kerr, T Beeckman, L Laplace, MJ Bennett (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* 10 (8): 946-954.
- [26] P Marhavý, M Vanstraelen, B De Rybel, D Zhaojun, MJ Bennett, T Beeckman, E Benková (2013) Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *EMBO J.* 32 (1):149-158.
- [27] J Lavenus, T Goh, I Roberts, S Guyomarc'h, M Lucas, I De Smet, H Fukaki, T Beeckman, M Bennett, L Laplace (2013) Lateral root development in Arabidopsis: Fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.* 18 (8): 450-458.
- [28] I De Smet, T Tetsumura, B De Rybel, N Frei dit Frey, L Laplace, I Casimiro, R Swarup, M Naudts, S Vanneste, D Audenaert, D Inzé, MJ Bennett, T Beeckman (2007) Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis. *Development* 134 (4): 681-690.
- [29] M Laskowski, KH Ten Tusscher (2017) Periodic lateral root priming: What makes it tick? *Plant Cell* 29 (3): 432-444.
- [30] JG Dubrovsky, M Sauer, S Napsucialy-Mendivil, MG Ivanchenko, J Friml, S Shishkova, J Celenza, E Benková (2008) Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105 (25): 8790-8794.
- [31] B Péret, A Larrieu, MJ Bennett (2009) Lateral root emergence: A difficult birth. *J. Exp. Bot.* 60 (13): 3637-3643.
- [32] T Werner, T Schmülling (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12 (5): 527-538.
- [33] T Werner, T Schmülling (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant*

- Biol.* 12 (5): 527-538.
- [34] M Riefler, O Novak, M Strnad, T Schmülling (2006) Arabidopsis cytokinin receptors mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *Plant Cell* 18 (1): 40-54.
- [35] X Li, X Mo, H Shou, P Wu (2006) Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 47 (8): 1112-1123.
- [36] A Bielach, K Podlešáková, P Marhavý, J Duclercq, C Cuesta, B Müller, W Grunewald, P Tarkowski, E Benková (2012) Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in Arabidopsis by cytokinin. *Plant Cell* 24 (10): 3967-3981.
- [37] L Laplaze, E Benkova, I Casimiro, L Maes, S Vanneste, R Swarup, D Weijers, V Calvo, B Parizot, MB Herrera-Rodriguez, R Offringa, N Graham, P Dumas, J Friml, D Bogusz, T Beeckman, M Bennett (2007) Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell* 19 (12): 3889-3900.
- [38] N Vukašinović, E Russinova (2018) BRexit: Possible Brassinosteroid Export and Transport Routes. *Trends Plant Sci.* 23 (4): 285-292.
- [39] C Müssig, GH Shin, T Altmann (2003) Brassinosteroids Promote Root Growth in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 133 (3):1261-1271.
- [40] Y Hacham, N Holland, C Butterfield, S Ubeda-Tomas, MJ Bennett, J Chory, S Savaldi-Goldstein (2011) Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* 138 (5): 839-848.
- [41] F Bao, J Shen, SR Brady, GK Muday, T Asami, Z Yang (2004) Erratum: Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in arabidopsis. *Plant Physiol.* 135 (3):1864.
- [42] H Cho, H Ryu, S Rho, K Hill, S Smith, D Audenaert, J Park, S Han, T Beeckman, MJ Bennett, D Hwang, I De Smet, I Hwang (2013) A secreted peptide acts on BIN2-mediated phosphorylation of ARFs to potentiate auxin response during lateral root development. *Nat. Cell Biol.* 16 (1): 66-76.
- [43] S Negi, MG Ivanchenko, GK Muday (2008) Ethylene regulates lateral root formation and auxin transport in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 55 (2):175-187.

- [44] MG Ivanchenko, GK Muday, JG Dubrovsky (2008) Ethylene-auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 55 (2):335-347.
- [45] I De Smet, H Zhang, D Inzé, T Beeckman (2006) A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci.* 11 (9): 434-439.
- [46] I De Smet, L Signora, T Beeckman, D Inzé, CH Foyer, H Zhang (2003) An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J.* 33 (3): 543-555.
- [47] SM Brady, SF Sarkar, D Bonetta, P McCourt (2003) The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34 (1): 67-75.
- [48] I De Smet, H Zhang, D Inzé, T Beeckman (2006) A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci.* 11 (9): 434-439.
- [49] Y Geng, R Wu, CW Wee, F Xie, X Wei, PMY Chan, C Tham, L Duan, JR Dinneny (2013) A spatio-temporal understanding of growth regulation during the salt stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25 (6): 2132-2154.
- [50] NM Iraki, RA Bressan, PM Hasegawa, NC Carpita (1989) Alteration of the Physical and Chemical Structure of the Primary Cell Wall of Growth-Limited Plant Cells Adapted to Osmotic Stress. *Plant Physiol.* 91 (1): 39-47.
- [51] L Xiong, RG Wang, G Mao, JM Koczan (2006) Identification of drought tolerance determinants by genetic analysis of root response to drought stress and abscisic acid. *Plant Physiol.* 142 (3):1065-1074.
- [52] L Duan, D Dietrich, CH Ng, PM Yeen Chan, R Bhalerao, MJ Bennett, JR Dinneny (2013) Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 25 (1): 324-341.
- [53] S Burssens, K Himanen, B Van De Cotte, T Beeckman, M Van Montagu, D Inzé, N Verbruggen (2000) Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211 (5): 632-640.
- [54] G West, D Inzé, GTS Beemster (2004) Cell Cycle Modulation in the Response of the Primary Root of *Arabidopsis* to Salt Stress. *Plant Physiol.* 135:1050-1058.
- [55] Z Ding, I De Smet (2013) Localised ABA signalling mediates root growth plasticity.

- Trends Plant Sci.* 18 (10):533-535.
- [56] B Orosa-Puente, N Leftley, D von Wangenheim, J Banda, AK Srivastava, K Hill, J Truskina, R Bhosale, E Morris, M Srivastava, B Kümpers, T Goh, H Fukaki, JEM Vermeer, T Vernoux, JR Dinneny, AP French, A Bishopp, A Sadanandom, MJ Bennett (2018) Root branching toward water involves posttranslational modification of transcription factor ARF7. *Science*. 362 (6421): 1407-1410.
- [57] R Swarup, MJ Bennett (2009) Root gravitropism. En: *Annual Plant Reviews. Root Development*. Ed: Tom Beeckman, Wiley-Blackwell, p:157-167
- [58] MT Morita, M Tasaka (2004) Gravity sensing and signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7 (6): 712-718.
- [59] EB Blancaflor, JM Fasano, S Gilroy (1998) Mapping the functional roles of cap cells in the response of arabidopsis primary roots to gravity. *Plant Physiol.* 116 (1): 213-222.
- [60] M Nakamura, T Nishimura, MT Morita (2019) Bridging the gap between amyloplasts and directional auxin transport in plant gravitropism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 52: 54-60.
- [61] EM Sato, H Hijazi, MJ Bennett, K Vissenberg, R Swarup (2015) New insights into root gravitropic signalling. *J. Exp. Bot.* 66 (8): 2155-2165.
- [62] Y Zhang, G Xiao, X Wang, X Zhang, J Friml (2019) Evolution of fast root gravitropism in seed plants. *Nat. Commun.* 10 (1):4-13.
- [63] Y Zhang, P He, X Ma, Z Yang, C Pang, J Yu, G Wang, J Friml, G Xiao (2019) Auxin-mediated statolith production for root gravitropism. *New Phytol.* 224 (2):761-774.
- [64] N Takahashi, Y Yamazaki, A Kobayashi, A Higashitani, H Takahashi (2003) Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of Arabidopsis and radish. *Plant Physiol.* 132 (2): 805-810.
- [65] F Sun, W Zhang, H Hu, B Li, Y Wang, Y Zhao, K Li, M Liu, X Li (2008) Salt modulates gravity signaling pathway to regulate growth direction of primary roots in arabidopsis. *Plant Physiol.* 146 (1): 178-188.
- [66] M de Jong, O Leyser (2012) Developmental Plasticity in Plants. *Cold Spring Harb. Lab. Press* 77: 63-73.
- [67] JL Riechmann (2002) Transcriptional regulation: a genomic overview: The Arabidopsis

- Book. (Eds: C.R. Somerville y E.M. Meyerowitz) Rockville, MD: American Society of Plant Biologists 1:e0085.
- [68] OJ Ratcliffe, JL Riechmann (2002) Arabidopsis transcription factors and the regulation of flowering time: A genomic perspective. *Curr. Issues Mol. Biol.* 4 (3): 77-91.
- [69] Y Xiong, T Liu, C Tian, S Sun, J Li, M Chen (2005) Transcription factors in rice: a genome-wide comparative analysis between monocots and eudicots. *Plant Mol. Biol.* 59 (1):191-203.
- [70] N Mitsuda, M Ohme-Takagi (2009) Functional analysis of transcription factors in arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 50 (7): 1232-1248.
- [71] E Bornberg-Bauer, F Beaussart, SK Kummerfeld, SA Teichmann, J Weiner (2005) The evolution of domain arrangements in proteins and interaction networks. *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (4): 435-445.
- [72] T Morton, J Petricka, DL Corcoran, S Li, CM Winter, A Carda, PN Benfey, U Ohler, M Megraw (2014) Paired-end analysis of transcription start sites in Arabidopsis reveals plant-specific promoter signatures. *Plant Cell* 26 (7): 2746-2760.
- [73] RL Garber, A Kuroiwa, WJ Gehring, RJ Gehring (1983) Genomics and cDNA clones of the homeotic locus *Antennapedia* in *Drosophila*. *EMBO J.* 2 (11): 2027-2036.
- [74] FD Ariel, PA Manavella, CA Dezar, RL Chan (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci.* 12 (9): 419-426.
- [75] CB Moens, L Selleri (2006) Hox cofactors in vertebrate development. *Dev. Biol.* 291 (2): 193-206.
- [76] K Mukherjee, L Brocchieri, TR Bürglin (2009) A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes. *Mol. Biol. Evol.* 26 (12): 2775-2794.
- [77] IL VIOLA, DH GONZALEZ (2016) Structure and Evolution of Plant Homeobox Genes, En: *Plant Transcription Factors evolutionary, structural, and functional aspects*, Elsevier, p. :101-112.
- [78] M Capella, PA Ribone, AL Arce, RL Chan (2016) Homeodomain–Leucine Zipper Transcription Factors: Structural Features of These Proteins, Unique to Plants, En: *Plant Transcription Factors evolutionary, structural, and functional aspects*, Elsevier,p. :113-126.

- [79] AE Tron, E Welchen, DH Gonzalez (2004) Engineering the loop region of a homeodomain-leucine zipper protein promotes efficient binding to a monomeric DNA binding site. *Biochemistry* 43 (50):15845-15851.
- [80] I Ruberti, G Sessa, S Lucchetti, G Morelli (1991) A novel class of plant proteins containing a homeodomain with a closely linked leucine zipper motif. *EMBO J.* 10 (7): 1787-1791.
- [81] M Schena, RW Davis (1992) HD-Zip proteins: members of an Arabidopsis homeodomain protein superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (9): 3894-3898.
- [82] AL Arce, J Raineri, M Capella, J V. Cabello, RL Chan (2011) Uncharacterized conserved motifs outside the HD-Zip domain in HD-Zip subfamily I transcription factors; a potential source of functional diversity. *BMC Plant Biol.* 11 (1): 42.
- [83] P Döring, E Treuter, C Kistner, R Lyck, A Chen, L Nover (2000) The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell* 12 (2): 265-78.
- [84] RL Chan, GM Gago, CM Palena, DH Gonzalez (1998) Homeoboxes in plant development. *Biochim. Biophys. Acta* 1442 (1): 1-19.
- [85] CM Palena, DH Gonzalez, RL Chan (1999) A monomer-dimer equilibrium modulates the interaction of the sunflower homeodomain leucine-zipper protein Hahb-4 with DNA. *Biochem. J.* 341 : 81-87.
- [86] CM Palena, AE Tron, CW Bertoncini, DH Gonzalez, RL Chan (2001) Positively charged residues at the N-terminal arm of the homeodomain are required for efficient DNA binding by homeodomain-leucine zipper proteins. *J. Mol. Biol.* 308 (1): 39-47.
- [87] MF Perotti, PA Ribone, RL Chan (2017) Plant transcription factors from the homeodomain-leucine zipper family I. Role in development and stress responses. *IUBMB Life* 69 (5).
- [88] E Henriksson, ASB Olsson, H Johannesson, H Johansson, J Hanson, P Engström, E Söderman (2005) Homeodomain leucine zipper class I genes in Arabidopsis. Expression patterns and phylogenetic relationships. *Plant Physiol.* 139 (1): 509-518.
- [89] PA Ribone, M Capella, AL Arce, RL Chan (2016) What Do We Know about Homeodomain-Leucine Zipper I Transcription Factors? Functional and Biotechnological

- Considerations, En: *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*, Elsevier p. :343-358.
- [90] A Himmelbach, T Hoffmann, M Leube, B Höhener, E Grill (2002) Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in Arabidopsis. *EMBO J.* 21 (12): 3029-3038.
- [91] A Olsson, P Engström, E Söderman (2004) The homeobox genes ATHB12 and ATHB7 encode potential regulators of growth in response to water deficit in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 55 (5): 663-677.
- [92] JC Harris, M Hrmova, S Lopato, P Langridge (2011) Modulation of plant growth by HD-Zip class I and II transcription factors in response to environmental stimuli. *New Phytol.* 190 (4): 823-837.
- [93] DA Ré, M Capella, G Bonaventure, RL Chan (2014) Arabidopsis AtHB7 and AtHB12 evolved divergently to fine tune processes associated with growth and responses to water stress. *BMC Plant Biol.* 14 (1):150.
- [94] M Hjellström, ASB Olsson, P Engström, EM Söderman, M Hjellström, ASB Olsson, P Engström, EM Söderman (2003) Constitutive expression of the water deficit-inducible homeobox gene ATHB7 in transgenic Arabidopsis causes a suppression of stem elongation growth. *Plant Cell Environ.* 26 (7): 1127-1136.
- [95] Y Wang, E Henriksson, E Söderman, KN Henriksson, E Sundberg, P Engström (2003) The Arabidopsis homeobox gene, ATHB16, regulates leaf development and the sensitivity to photoperiod in Arabidopsis. *Dev. Biol.* 264 (1): 228-239.
- [96] J Hanson, S Regan, P Engström (2002) The expression pattern of the homeobox gene ATHB13 reveals a conservation of transcriptional regulatory mechanisms between Arabidopsis and hybrid aspen. *Plant Cell Rep.* 21 (1): 81-89.
- [97] PA Ribone, M Capella, RL Chan (2015) Functional characterization of the homeodomain leucine zipper i transcription factor AtHB13 reveals a crucial role in Arabidopsis development. *J. Exp. Bot.* 66 (19): 5929-5943
- [98] T Aoyama, CH Dong, Y Wu, M Carabelli, G Sessa, I Ruberti, G Morelli, NH Chua (1995) Ectopic expression of the Arabidopsis transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell* 7 (11): 1773-1785.

- [99] E Söderman, M Hjelström, J Fahleson, P Engström (1999) The HD-Zip gene ATHB6 in Arabidopsis is expressed in developing leaves, roots and carpels and up-regulated by water deficit conditions. *Plant Mol. Biol.* 40 (6):1073-1083.
- [100] Y Liu, J Xu, S Guo, X Yuan, S Zhao, H Tian, S Dai, X Kong, Z Ding (2020) AtHB7/12 regulate root growth in response to aluminum stress. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (11): 1-15.
- [101] AT Silva, PA Ribone, RL Chan, W Ligterink, HWM Hilhorst (2016) A predictive coexpression network identifies novel genes controlling the seed-to-seedling phase transition in Arabidopsis Thaliana. *Plant Physiol.* 170 (4): 2218-2231.
- [102] ZQ Miao, PX Zhao, JL Mao, LH Yu, Y Yuan, H Tang, ZB Liu, C Bin Xiang (2018) HOMEODOMAIN PROTEIN52 mediates the crosstalk between ethylene and auxin signaling during primary root elongation by modulating auxin transport-related gene expression. *Plant Cell* 30 (11): 2761-2778.
- [103] O Son, HY Cho, MR Kim, H Lee, MS Lee, E Song, JH Park, KH Nam, JY Chun, HJ Kim, SK Hong, YY Chung, CG Hur, HT Cho, CI Cheon (2004) Induction of a homeodomain-leucine zipper gene by auxin is inhibited by cytokinin in Arabidopsis roots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326 (1): 203-209.
- [104] MF Perotti, AL Arce, RL Chan (2021) The underground life of homeodomain-leucine zipper transcription factors. *J. Exp. Bot.* 72 (11):4005-4021.
- [105] FD Ariel, A Diet, M Verdenaud, V Gruber, F Frugier, R Chan, M Crespi (2010) Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1. *Plant Cell* 22 : 2171-2183.
- [106] FD Ariel, A Diet, M Crespi, RL Chan (2010) The LOB-like transcription factor Mt LBD1 controls *Medicago truncatula* root architecture under salt stress. *Plant Signal. Behav.* 5 (12):1666-1668.
- [107] GM Gago, C Almoguera, J Jordano, DH Gonzalez, RL Chan (2002) Hahb-4, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in abscisic acid-dependent responses to water stress in sunflower. *Plant, Cell Environ.* 25 (5):633-640.
- [108] PA Manavella, CA Dezar, FD Ariel, RL Chan (2008) Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower HAHB4 promoter. *Plant Physiol. Biochem.* 46 (10):860-867.

- [109] J V. Cabello, JI Giacomelli, C V. Piattoni, AA Iglesias, RL Chan (2016) The sunflower transcription factor HaHB11 improves yield, biomass and tolerance to flooding in transgenic *Arabidopsis* plants. *J. Biotechnol.* 222:73-83.
- [110] J V. Cabello, JI Giacomelli, MC Gómez, RL Chan (2016) The sunflower transcription factor HaHB11 confers tolerance to water deficit and salinity to transgenic *Arabidopsis* and alfalfa plants. *J. Biotechnol.* 257:35-46.
- [111] Y Okushima, H Fukaki, M Onoda, A Theologis, M Tasaka (2007) ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19 (1):118-130.
- [112] Y Okushima, PJ Overvoorde, K Arima, JM Alonso, A Chan, C Chang, JR Ecker, B Hughes, A Lui, D Nguyen, C Onodera, H Quach, A Smith, G Yu, A Theologis (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN RESPONSE FACTOR gene family members in *Arabidopsis thaliana*: Unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. *Plant Cell* 17 (2):444-463.
- [113] J Li, X Dai, Y Zhao (2006) A role for auxin response factor 19 in auxin and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 140 (3):899-908.
- [114] B Shuai, CG Reynaga-Peña, PS Springer (2002) The Lateral Organ Boundaries gene defines a novel, plant-specific gene family. *Plant Physiol.* 129 (2):747-761.
- [115] J Lavenus, T Goh, S Guyomarc'H, K Hill, M Lucas, U Voß, K Kenobi, MH Wilson, E Farcot, G Hagen, TJ Guilfoyle, H Fukaki, L Laplaze, MJ Bennett (2015) Inference of the *Arabidopsis* lateral root gene regulatory network suggests a bifurcation mechanism that defines primordia flanking and central zones. *Plant Cell* 27 (5):1368-1388.
- [116] HW Lee, C Cho, J Kim (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 Physiol.* 168 (4):1792-1806.
- [117] T Goh, S Joi, T Mimura, H Fukaki (2012) The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development* 139 (5):883-893.
- [118] B Berckmans, V Vassileva, SPC Schmid, S Maes, B Parizot, S Naramoto, Z Magyar, C Lessa Alvim Kamei, C Koncz, L Bögre, G Persiau, G de Jaeger, J Friml, R Simon, T Beeckman, L de Veylder (2011) Auxin-Dependent cell cycle reactivation through

- transcriptional regulation of arabidopsis E2Fa by lateral organ boundary proteins. *Plant Cell* 23 (10):3671-3683.
- [119] Z Feng, X Sun, G Wang, H Liu, J Zhu (2012) LBD29 regulates the cell cycle progression in response to auxin during lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.* 110 (1):1-10.
- [120] E Jeon, NY Kang, C Cho, PJ Seo, MC Suh, J Kim (2017) LBD14/ASL17 positively regulates lateral root formation and is involved in ABA response for root architecture in *arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 58 (12):2190-2201.
- [121] DM Woodcock, PJ Crowther, J Doherty, S Jefferson, E Decruz, M Noyer-Weidner, SS Smith, MZ Michael, MW Graham (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17 (9):3469-3478.
- [122] G Ooms, PJJ Hooykaas, RJM Van Veen, P Van Beelen, TJG Regensburg-Tuïnk, RA Schilperoort (1982) Octopine Ti-plasmid deletion mutants of *Agrobacterium tumefaciens* with emphasis on the right side of the T-region. *Plasmid* 7 (1):15-29.
- [123] J Sambrook, D Russell (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Fourth edit, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- [124] T Murashige, F Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15 (1):473-797.
- [125] M Karimi, D Inzé, A Depicker (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant.pdf. *Trends Plant Sci.* 7 (5):193-195.
- [126] A Marchant, J Kargul, ST May, P Muller, A Delbarre, C Perrot-Rechenmann, MJ Bennett (1999) AUX1 regulates root gravitropism in *Arabidopsis* by facilitating auxin uptake within root apical tissues. *EMBO J.* 18 (8):2066-2073.
- [127] K Bainbridge, S Guyomarc'h, E Bayer, R Swarup, M Bennett, T Mandel, C Kuhlemeier (2008) Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev.* 22 (6):810-823.
- [128] T Ulmasov, J Murfett, G Hagen, TJ Guilfoyle (1997) Aux/IAA Proteins Repress Expression of Reporter Genes Containing Natural and Highly Active Synthetic Auxin Response Elements. *Plant Cell* 9 (11):1963-1971.
- [129] H. Birnboim, D J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening

- recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7 (1):1513-1523.
- [130] J Li, J Chory (1998) Preparation of DNA from Arabidopsis. *Methods Mol. Biol.* 82:55-60.
- [131] P Chomczynski, N Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162 (1):156-159.
- [132] JL Hartley, GF Temple, MA Brasch (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 10 (11):1788-1795.
- [133] F Ausubel, R Brent, R Kingston, D Moore, J Seidman, J Smith, K Struhl (1983) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley Sons, New York 36 (2):228-229.
- [134] B Charrier, A Champion, Y Henry, M Kreis (2002) Expression profiling of the whole Arabidopsis Shaggy-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiol.* 130 (2):577-590.
- [135] KJ Livak, TD Schmittgen (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25 (4):402-408.
- [136] SF Altschul, W Gish, W Miller, EW Myers, DJ Lipman (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215 (3):403-410.
- [137] LE Lucero, PA Manavella, DE Gras, FD Ariel, DH Gonzalez (2017) Class I and Class II TCP Transcription Factors Modulate SOC1-Dependent Flowering at Multiple Levels. *Mol. Plant* 10 (12):1571-1574.
- [138] AM Bolger, M Lohse, B Usadel (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30 (15):2114-2120.
- [139] A Dobin, CA Davis, F Schlesinger, J Drenkow, C Zaleski, S Jha, P Batut, M Chaisson, TR Gingeras (2013) STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29 (1):15-21.
- [140] A Pasha, S Shabari, A Cleary, X Chen, T Berardini, A Farmer, C Town, N Provart (2020) Araport lives: An updated framework for arabidopsis bioinformatics. *Plant Cell* 32 (9):2683-2686.
- [141] H Li, B Handsaker, A Wysoker, T Fennell, J Ruan, N Homer, G Marth, G Abecasis, R Durbin (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25 (16):2078-2079.

- [142] J Köster, S Rahmann (2012) Snakemake - A scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics* 34 (20):3600.
- [143] MI Love, W Huber, S Anders (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15 (12):550.
- [144] SJ Clough, AF Bent (1998) Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16 (6):735-743.
- [145] W Teale, K Palme (2018) Naphthylphthalamic acid and the mechanism of polar auxin transport. *J. Exp. Bot.* 69 (2):303-312.
- [146] E Jeon, NY Kang, C Cho, PJ Seo, MC Suh, J Kim (2017) LBD14/ASL17 positively regulates lateral root formation and is involved in ABA response for root architecture in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 58 (12):2190-2201.
- [147] H Johannesson, Y Wang, P Engström (2001) DNA-binding and dimerisation preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factors in vitro. *Plant Mol Biol* 45 (1):63--73.
- [148] ER Schultz, AK Zupanska, NJ Sng, AL Paul, RJ Ferl (2017) Skewing in *Arabidopsis* roots involves disparate environmental signaling pathways. *BMC Plant Biol.* 17 (1):31.
- [149] S de Dorlodot, B Forster, L Pagès, A Price, R Tuberosa, X Draye (2007) Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci.* 12 (10):474-481.
- [150] JZ Kiss, KM Miller, LA Ogden, KK Roth (2002) Phototropism and gravitropism in lateral roots of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 43 (1):35-43.
- [151] S Guyomarc'h, S Léran, M Auzon-Cape, F Perrine-Walker, M Lucas, L Laplaze (2012) Early development and gravitropic response of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 367 (1595):1509-1516.
- [152] Z Ma, KH Hasenstein (2006) The onset of gravisensitivity in the embryonic root of flax. *Plant Physiol.* 140 (1):159-166.
- [153] E Benková, M Michniewicz, M Sauer, T Teichmann, D Seifertová, G Jürgens, J Friml (2003) Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell* 115 (5):591-602.

- [154] B Péret, B De Rybel, I Casimiro, E Benková, R Swarup, L Laplaze, T Beeckman, MJ Bennett (2009) Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14 (7):399-408.
- [155] K Ljung, AK Hull, J Celenza, M Yamada, M Estelle, J Normanly, G Sandberg (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in arabidopsis roots. *Plant Cell* 17 (4):1090-1104.
- [156] HW Lee, NY Kim, DJ Lee, J Kim (2009) LBD18/ASL20 regulates lateral root formation in combination with LBD16/ASL18 downstream of ARF7 and ARF19 in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 151 (3):1377-1389.
- [157] DJ Gibbs, JC Coates (2014) AtMYB93 is an endodermis-specific transcriptional regulator of lateral root development in arabidopsis. *Plant Signal. Behav.* 9 (10):1-4.
- [158] U Fujikura, L Elsaesser, H Breuninger, C Sánchez-Rodríguez, A Ivakov, T Laux, K Findlay, S Persson, M Lenhard (2014) Atkinesin-13A Modulates Cell-Wall Synthesis and Cell Expansion in Arabidopsis thaliana via the THESEUS1 Pathway. *PLoS Genet.* 10 (9).
- [159] T Blein, C Balzergue, T Roulé, M Gabriel, L Scalisi, T François, C Sorin, A Christ, C Godon, E Delannoy, ML Martin-Magniette, L Nussaume, C Hartmann, D Gautheret, T Desnos, M Crespi (2020) Landscape of the noncoding transcriptome response of two arabidopsis ecotypes to phosphate starvation. *Plant Physiol.* 183 (3):1058-1072.
- [160] JNF Gerald, MD Lehti-Shiu, PA Ingram, KI Deak, T Biesiada, JE Malamy (2005) Identification of quantitative trait loci that regulate arabidopsis root system size and plasticity. *Genetics* 172 (1):485-498.
- [161] MM Julkowska, C Testerink (2015) Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends Plant Sci.* 20 (9):586-594.
- [162] G Zolla, YM Heimer, S Barak (2010) Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in Arabidopsis thaliana roots. *J. Exp. Bot.* 61 (1):211-224.
- [163] MM Julkowska, HCJ Hoefsloot, S Mol, R Feron, GJ De Boer, MA Haring, C Testerink (2014) Capturing arabidopsis root architecture dynamics with root-fit reveals diversity in responses to salinity. *Plant Physiol.* 166 (3):1387-1402.
- [164] MM Julkowska, F McLoughlin, CS Galvan-Ampudia, JM Rankenberg, D Kawa, M

- Klimecka, MA Haring, T Munnik, EE Kooijman, C Testerink (2015) Identification and functional characterization of the Arabidopsis Snf1-related protein kinase SnRK2.4 phosphatidic acid-binding domain. *Plant. Cell Environ.* 38 (3):614-624.
- [165] MJ Iglesias, MC Terrile, CG Bartoli, S D'Ippólito, CA Casalongué (2010) Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.* 74 (3):215-222.
- [166] J Liu, W Zhang, S Long, C Zhao (2021) Maintenance of cell wall integrity under high salinity. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (6):3260.
- [167] M Chatterjee, P Berbezy, D Vyas, S Coates, T Barsby (2004) Reduced expression of a protein homologous to glycogenin leads to reduction of starch content in Arabidopsis leaves. *Plant Sci.* 168 (2):501-509.
- [168] DHP Barratt, P Derbyshire, K Findlay, M Pike, N Wellner, J Lunn, R Feil, C Simpson, AJ Maule, AM Smith (2009) Normal growth of Arabidopsis requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (31):13124-13129.
- [169] C Pignocchi, A Ivakov, R Feil, M Trick, M Pike, TL Wang, JE Lunn, AM Smith (2021) Restriction of cytosolic sucrose hydrolysis profoundly alters development, metabolism, and gene expression in Arabidopsis roots. *J. Exp. Bot.* 72 (5):1850-1863.
- [170] W Qian, B Xiao, L Wang, X Hao, C Yue, H Cao, Y Wang, N Li, Y Yu, J Zeng, Y Yang, X Wang (2018) CsINV5, a tea vacuolar invertase gene enhances cold tolerance in transgenic Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 18 (1):228.
- [171] LI Sergeeva, JJB Keurentjes, L Bentsink, J Vonk, LHW Van Der Plas, M Koornneef, D Vreugdenhil (2006) Vacuolar invertase regulates elongation of Arabidopsis thaliana roots as revealed by QTL and mutant analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (8):2994-2999.
- [172] M Capella, DA Ré, AL Arce, RL Chan (2014) Plant homeodomain-leucine zipper I transcription factors exhibit different functional AHA motifs that selectively interact with TBP or/and TFIIB. *Plant Cell Rep.* 33 (6):955-967.
- [173] SM Brady, DA Orlando, J-Y Lee, JY Wang, J Koch, JR Dinneny, D Mace, U Ohler, PN Benfey (2007) A High-Resolution Root Spatiotemporal Map Reveals Dominant Expression Patterns. *Science.* 318 (5851):801-806.

- [174] J Kilian, D Whitehead, J Horak, D Wanke, S Weinl, O Batistic, C D'Angelo, E Bornberg-Bauer, J Kudla, K Harter (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: Protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J.* 50 (2):347-363.
- [175] JR Dinneny, TA Long, JY Wang, JW Jung, D Mace, S Pointer, C Barron, SM Brady, J Schiefelbein, PN Benfey (2008) Cell identity mediates the response of Arabidopsis roots to abiotic stress. *Science.* 320 (5878):942-945.
- [176] TQ Zhang, ZG Xu, GD Shang, JW Wang (2019) A Single-Cell RNA Sequencing Profiles the Developmental Landscape of Arabidopsis Root. *Mol. Plant* 12 (5):648-660.