

Caracterización de mutantes de *Arabidopsis* alterados en la configuración espacial del sistema radicular

Memoria presentada por

Ana Páez García

para optar al grado de

Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Vº Bº del Director de Tesis

Dr. Antonio Leyva Tejada

Vº Bº de la tutora de Tesis

Dra. Francisca Fernández del Campo

RECONOCIMIENTOS

Francisca Fernández del Campo, tutora de tesis y miembro de la Universidad Autónoma de Madrid.

Antonio Leyva, director de tesis y jefe del laboratorio 312 del Centro Nacional de Biotecnología, en el que se ha desarrollado esta tesis.

Miembros del laboratorio 312: Mónica Lanza, Yolanda Leo, Eduardo Sánchez, Juana Monterrey, Gabriel Castrillo y Pablo Catarecha. Han contribuido con su trabajo y apoyo a la realización de este trabajo.

Miembros del laboratorio 311: M^a Isabel Puga, Isabel Mateos, Mónica Rojas, Érica Gil, Laura Cuyás, Ximena Cardona, M^a Luisa Irigoyen, Laura de Lorenzo, Jennifer Esteban, Patricia Olivares, Marina Trigueros, Vicente Rubio, Javier Paz-Ares y Regla Bustos. Con su apoyo logístico y didáctico han ayudado a llevar a buen fin esta tesis.

Miembros del Departamento de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología, servicios de Invernadero y Cultivo *in vitro*, cuya ayuda y trabajo han facilitado enormemente la realización de esta tesis.

Inés Poveda del servicio de Imagen y Fotografía del CNB, Sylvia Gutiérrez y Susana Hernández del servicio de Microscopía. Su inestimable ayuda en fotografía y manejo de programas de imagen, y su gran experiencia en el uso del microscopio confocal se han hecho imprescindibles en muchos resultados que aquí se exponen.

Liam Dolan y todo su grupo, especialmente Mónica Pernas, enseñaron a la autora de este trabajo distintas técnicas de preparación de muestras e interpretación de imágenes obtenidas en lupa y microscopio, y su apoyo fue constante durante los meses de estancia en el John Innes Centre de Norwich.

Valoro enormemente que alguien sienta el trabajo de otra persona como propio y le dedique todo su interés y experiencia. Y eso me ha ocurrido con los servicios del CNB y con las personas con las que he coincidido en mi corta andadura profesional.

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Genética Molecular de Plantas del Centro Nacional de Biotecnología-CSIC, Madrid. Ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación dentro de su programa de becas FPI.

AGRADECIMIENTOS



Gracias a los que más me habéis enseñado y me habéis hecho pensar. A los que habéis sido mi “fuente de conocimiento” sin pedir nada a cambio. Gracias por darme la oportunidad de aprender lo que más me gusta hacer. Gracias por regalarme vuestro tiempo y llenar mi vida de experiencias con vuestra experiencia.

Gracias a los que habéis compartido mis buenos momentos y soportado los malos. Gracias a los que me habéis regalado una sonrisa por el pasillo, y a todos aquellos cuyo trabajo consiste en hacer el mío más sencillo.

A los que no están ahora conmigo, porque estarían muy orgullosos si pudieran ver esto. Gracias por completar mi vida.

A los que están y pueden verlo, porque sé que ya estáis orgullosos de mí, aunque no hubiese escrito una tesis. Gracias por ayudarme a ser la persona que soy. A mí ya me gustaba este momento sólo por compartirlo con vosotros, porque sois lo más importante para mí.

*“La **NATURALEZA** no ha considerado nunca que la incomprensión humana sea una razón para alterar sus métodos”*

Matt Ridley. Genoma. 1999

Artículo 19.

- ⚖️ Todo individuo tiene derecho a la libertad de opinión y de expresión; este derecho incluye el de no ser molestado a causa de sus opiniones, el de investigar y recibir informaciones y opiniones, y el de difundirlas, sin limitación de fronteras, por cualquier medio de expresión.

Artículo 27.

- ⚖️ 1. Toda persona tiene derecho a tomar parte libremente en la vida cultural de la comunidad, a gozar de las artes y a participar en el progreso científico y en los beneficios que de él resulten.
- ⚖️ 2. Toda persona tiene derecho a la protección de los intereses morales y materiales que le correspondan por razón de las producciones científicas, literarias o artísticas de que sea autora.

Declaración Universal de Derechos Humanos. 1948

*“La mayor gracia que tiene el **FUTURO** es que es el tiempo que nos queda para hacer aquello que aún no hemos hecho”*

Ciudadanos de la Tierra (Joaquín Llorente, 2004)

ABREVIATURAS

35S: Promotor del virus del mosaico de la coliflor

A: Adenina

aa: aminoácido

aaRS: aminoacil-tRNA sintetasa

ABA: Hormona ácido abscísico

ABD2: Actin binding protein 2

ACT8: ACTINA8

act2-5: alelo mutante de *ACTIN2* con fenotipo de raíz ondulada

ADN: Ácido desoxirribunucleico

ADNc: Ácido desoxirribunucleico copia

ahp6: *His-to-Asp phosphorelay*

AMP1: AMINOPEPTIDASA1

ANR1: ARABIDOPSIS NO3-INDUCIBLE

APL: ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT

AR: Arquitectura radicular

ARR: Factores de respuesta a citoquininas

ARF: Factores de Respuesta a Auxina

Arg: Arginina

ARN: Ácido ribunucleico

arn: mutante para el gen *CTL1*

AtHRS1: histidil-tRNA sintetasa de *Arabidopsis*

athrs1-1: mutante de raíz corta

Aux/IAA: represor de la señalización de auxina

BAC: Bacterial Artificial Chromosome

BAP: Bencil amino purina

BDL: BODENLOS

BLAST: Basic Logic Alignment Search Tool

BRX: BREVIS RADIX

BRXL: BREVIS RADIX LIKE

BS: Hormonas brasinoesteroides

BZR1: brassinazol resistant 1

CAPs: Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (polimorfismo de restricción de secuencia amplificada)

CHL1: NITRATE TRANSPORTER 1.1

CLE: CLAVATA3-like small protein ligands

Col: ecotipo Columbia

col.: colaboradores

COL: columela

CQ: Centro quiescente

CTL1: CHITINASE-LIKE 1

Cys: Cisteína

dCAP: derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

DELLA: proteína represora de GA

DR5: promotor sintético de respuesta a auxina

EBL: 2,4-Epibrasinólido

emb: embryo-defective mutants

EMS: metanosulfonato de etilo

EtBr: Bromuro de Etidio

G: Guanina

GA: Hormona giberelina

GEFA: Genómica Funcional en *Arabidopsis*

GDP: guanosina difosfato

GFP: Green Fluorescent Protein

GNOM: ARF-GEF

GTP: guanosina difosfato

GUS: β -Glucuronidasa

HD-ZIP III: CLAS III HOMEODOMAIN-LEUCINE ZIPPER

His: Histidina

HisRS: His-tRNA sintetasa

HYP: hipófisis

IAA: Ácido indolacético

Kb: kilobase

LB: Medio de Luria-Bertani

Ler: Ecotipo Landsberg erecta

LOB: LATERAL ORGAN BOUNDARIES

lpi: low phosphorus insensitive

LPR1: LOW PHOSPHATE ROOT1

LRC: lateral root cap

LSC: Lens shape cell

lx: lux

MIPS: Munich Information Center for Protein Sequences

miRNA, miR: micro ARN de interferencia

MIZ: MIZU-KUSSEI

mM: milimolar

MLO: MILDEW RESISTANCE LOCUS

MP: MONOPTEROS

MS: Medio de Murashige-Skoog

MSBN: MS bajo en nitrato

mx: metaxilema

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nhr: no hydrotropic response

nM: nanomolar

Pb: pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

pdr2: *Pi deficiency response*

PHB: PHABULOSA

PHOT: fototropinas

PHV: PHAVOLUTA

PHY: *phytochrom*

PIN: *PIN-FORMED*

PKS: FITOCROMO KINASA

PLT o plt: *PLETHORA*

PRD: *PHOSPHATE ROOT DEVELOPMENT*

px: protoxilema

PXY: PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM

qRT-PCR: quantitative Reverse Transcription PCR

QTL: Quantitative trait locus

raw: *root as in wol*

RC: root cap

RE: retículo endoplasmático

RGA: proteína de tipo DELLA

ROS: especies reactivas del oxígeno

r.p.m: revoluciones por minuto

SCR o scr: *SCARECROW*

SCZ o scz: *SCHIZORRIZA*

SHR o shr: *SHORT-ROOT*

SHY2: auxin-responsive protein IAA3

SSLP: Simple Sequence Length polymorphism

TABF: tiempo de aparición del botón floral

TAE: TRIS acetato de sodio-EDTA

TAIR: The *Arabidopsis* information resource

TCH: touch-induced

Tm: temperatura de union de oligos

TM07: TARGET OF MONOPTEROS 7

TRIS: N-tris[hidroximetil]amina

tRNA: ARN de transferencia

Uk-1: Ecotipo Umkirch

UPB1: UPBEAT1

VND: VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN

wol: *wooden leg*

wsup: *wavy suppressor*

WT: wild tipe, plantas de genotipo silvestre

ZE: zona de elongación

ZED: zona de elongación distal

ZD: zona de diferenciación

ZM: zona meristemática

μM: micromolar

ÍNDICE

INDICE

	Página
RESUMEN	23
INTRODUCCIÓN	27
1. Importancia del sistema radicular	29
2. Tipos de arquitecturas radiculares	32
3. Factores que controlan el desarrollo del sistema radicular	35
3.1 Factores endógenos	36
3.2 Factores exógenos	54
4. Dificultad del estudio del desarrollo del sistema radicular	63
OBJETIVOS	67
MATERIALES Y MÉTODOS	71
Materiales	73
1. Plásmidos	73
2. Cepas bacterianas	73
3. Material vegetal	73
Métodos	74
1. Cultivo de cepas bacterianas	74
2. Cultivo de plantas	74
2.1 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
2.2 Cultivo en tierra de <i>Arabidopsis thaliana</i>	75
3. Métodos de transformación	76
3.1 Transformación de <i>Escherichia coli</i>	76
3.2 Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	76
3.3 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
4. Tecnología de ácidos nucleicos	77
4.1 Aislamiento y purificación de ADN	77
4.2 Amplificación de fragmentos de ADN	78
4.3 Técnicas electroforéticas	78
4.4 Aislamiento y purificación de ARN de plantas	79
4.5 qRT-PCR	79
5. Clonación posicional del mutante <i>athrs1-1</i>	80
6. Aislamiento del mutante <i>athrs1-1</i>	80
7. Complementación de la mutación <i>athrs1-1</i>	81
8. Mutagénesis con EMS de semillas portadoras de la mutación <i>act2-5</i>	81
9. Ensayo histológico de la actividad β -glucuronidasa (GUS)	82
10. Técnicas microscópicas	82
10.1 Preparación de muestras para microscopía óptica	82
10.2 Preparación de muestras para microscopía confocal	83
11. Tratamientos informáticos	83
12. Fotografía	84

	Página		
RESULTADOS	85		
1. Identificación de mutantes alterados en el desarrollo del sistema radicular	87		
2. Caracterización del mutante <i>raw2</i>	90		
2.1 Caracterización fenotípica	90		
2.2 Identificación del gen <i>RAW2</i>	97		
2.3 Complementación de la mutación <i>raw2</i>	98		
2.4 Expresión de la proteína <i>ATHRS1</i> y su función en <i>Arabidopsis</i>	99		
3. Implicación de la <i>ACTINA2</i> en las rutas de señalización de auxinas y brasinosteroides	103		
3.1 Efecto de los brasinosteroides en el fenotipo de raíz del mutante <i>act2-5</i>	103		
3.2 Efecto de los brasinosteroides en el citoesqueleto de actina	107		
3.3 Efecto de los brasinosteroides en la localización de los transportadores de auxina	110		
3.4 Respuesta transcripcional a auxina y brasinosteroides en el mutante <i>act2-5</i>	112		
4. Caracterización de mutantes supresores de la mutación <i>act2-5</i>	114		
4.1 Rastreo de mutantes supresores del fenotipo <i>act2-5</i>	114		
4.2 Caracterización del mutante <i>wsup3</i>	115		
4.3 Caracterización del mutante <i>wsup5</i>	117		
4.4 Caracterización del mutante <i>wsup6</i>	118		
4.5 Caracterización del mutante <i>wsup7</i>	119		
DISCUSIÓN	121		
1. Caracterización del alelo mutante <i>athrs1-1</i> de <i>Arabidopsis</i> alterado en el desarrollo de la raíz principal	123		
2. Implicación del gen <i>ACTIN2</i> en la comunicación de las rutas de señalización de auxina y brasinosteroides	128		
3. Identificación de mutante supresores de la mutación <i>act2-5</i>	131		
4. Perspectivas futuras	132		
CONCLUSIONES	135		
BIBLIOGRAFÍA	139		
Figura 1 33	Figura 12 51	Figura 23 98	Figura 34 117
Figura 2 37	Figura 13 57	Figura 24 99	Figura 35 118
Figura 3 38	Figura 14 88	Figura 25 100	Figura 36 119
Figura 4 39	Figura 15 89	Figura 26 101	Tabla 1 81
Figura 5 40	Figura 16 89	Figura 27 102	Tabla 2 87
Figura 6 41	Figura 17 91	Figura 28 105	Tabla 3 88
Figura 7 42	Figura 18 91	Figura 29 106	Tabla 4 100
Figura 8 43	Figura 19 93	Figura 30 109	Tabla 5 107
Figura 9 45	Figura 20 94	Figura 31 111	Tabla 6 114
Figura 10 47	Figura 21 95	Figura 32 113	
Figura 11 48	Figura 22 96	Figura 33 116	

RESUMEN

RESUMEN

El estudio de la disposición espacial de la raíz, de los aspectos anatómicos de esta (organización tisular y celular), y de cómo la planta responde y se adapta a los diferentes sustratos, influye decisivamente en el rendimiento de las cosechas y por tanto tiene una relevancia agronómica de primer orden. A pesar de ello, los mecanismos moleculares implicados en la configuración del sistema radicular desde un punto de vista global, son prácticamente desconocidos. En esta tesis hemos identificado y caracterizado dos mutantes alterados en la configuración espacial del sistema radicular. El primero de ellos, *athrs1-1*, es un nuevo alelo de una histidil-tRNA sintetasa que presenta una alteración en la traducción de proteínas en mitocondrias, comprometiendo el aporte de energía en los primeros estados de desarrollo del embrión y en especial el desarrollo del sistema radicular. De hecho, la planta mutante tiene alterada la maduración del xilema de la raíz, comprometiendo la elongación de la raíz principal, lo que conduce al desarrollo de raíces adventicias modificando así la arquitectura radicular (AR). El segundo mutante estudiado, *act2-5*, es un nuevo alelo de la proteína ACTINA2 que forma parte del citoesqueleto; el mutante muestra un crecimiento ondulado de la raíz principal, similar al que se produce en respuesta a choque por un obstáculo. El mutante exhibe constitutivamente fenotipos de respuesta a brasinosteroides y otros fenotipos típicos de respuesta a la acción combinada de brasinosteroides y auxina, por lo que la identificación del mutante *act2-5* proporciona la primera evidencia genética del papel del citoesqueleto en la integración de la respuesta a auxina mediada por la señalización de brasinosteroides. Asimismo, se llevó a cabo la mutagénesis de semillas *act2-5* con el fin de identificar mutantes supresores del fenotipo de raíz ondulada, los que nos llevó a describir cuatro mutantes cuya caracterización en detalle permitirá comenzar a entender los mecanismos implicados en la activación de la señalización de brasinosteroides mediada por citoesqueleto.

Este trabajo aporta nuevas evidencias de la importancia del citoesqueleto y del correcto desarrollo del embrión en aspectos concretos de la configuración espacial del sistema radicular.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La disposición espacial del sistema radicular tiene una importancia agronómica excepcional, ya que condiciona la eficacia de las plantas para explotar los recursos del suelo y por lo tanto, su propio desarrollo y productividad. Sin embargo, hasta ahora no se conoce mucho sobre los mecanismos moleculares que participan en la configuración del sistema radicular, también conocida como arquitectura radicular (AR).

El término arquitectura radicular se define como la disposición espacial de las raíces en su conjunto. Hace referencia a la distribución de las raíces laterales en torno a la raíz principal; es un término que engloba la topología y distribución de las raíces sin entrar en su interacción con el sustrato, definiendo a las raíces según su forma y disposición en el espacio (Lynch J, 1995). La AR se refiere por tanto, al patrón predeterminado con el que las raíces de una planta colonizan el sustrato y se expanden tridimensionalmente. Este concepto no incluye aspectos morfológicos, sino que se refiere a las características superficiales de la raíz como los pelos radiculares, el diámetro de la raíz y el patrón de desarrollo de las raíces laterales. Los rasgos anatómicos de la raíz relacionados con la organización tisular y celular no suelen tenerse en consideración en los estudios de AR (Lynch J, 1995). Sin embargo, todas estas características además de otras como la manera en que la planta responde y se adapta a las diferentes cualidades de los distintos sustratos, son fundamentales durante el desarrollo del sistema radicular, por lo tanto serán tenidas en cuenta y estudiadas en el desarrollo de esta tesis.

1. Importancia del sistema radicular

La raíz es el órgano encargado de la absorción de los nutrientes del suelo y de dar soporte a la planta proporcionando capacidad de anclaje. Es, por tanto, de gran importancia en la capacidad de éstas para colonizar determinados tipos de suelo (Jones B y Ljung K, 2011). Además, la raíz es el lugar donde se establecen interacciones con microorganismos, siendo este factor esencial en suelos pobres donde la disponibilidad de nutrientes es limitada. En estas interacciones la planta aporta al microorganismo una serie de nutrientes que necesita para vivir, recibiendo a cambio otros que los microorganismos han movilizado haciéndolos más fácilmente asimilables para la planta (revisado en Hawes MC y col. 2000; Wen F y col. 2009).

Las plantas tienen un programa de desarrollo con un patrón de crecimiento predeterminado genéticamente. Este patrón juega por sí mismo un papel esencial en la capacidad de las plantas para explotar eficientemente los recursos del suelo. A lo largo de la evolución se han seleccionado y fijado en los sistemas radiculares características morfológicas deseables y mecanismos de respuesta rápidos y eficaces que les permiten adaptarse a diferentes tipos de suelo. Existen estudios comparativos entre distintos genotipos con una capacidad diferente para adaptarse a estados carenciales de nutrientes y agua que se han relacionado con ARs diferentes (Bloom AJ y col. 1985; Rundel PW y col. 1991; Nielsen KL y col. 1994). Por ejemplo, se ha visto que plantas de judía que fueron seleccionadas por su alto rendimiento en suelos pobres en fósforo presentan raíces muy ramificadas, con un gran número de raíces secundarias y terciarias y por tanto, con una gran capacidad de colonización del primer horizonte del suelo donde el fósforo es más abundante (Lynch J y col. 1993). Este hecho sugiere que las plantas, a lo largo de la evolución, han seleccionado aquellas arquitecturas que mejor se adaptan a las condiciones de cada tipo de suelo (Lynch J, 1995). Por ejemplo, las variedades de *Arabidopsis* con las mayores tasas de eficiencia en la captación de fósforo también poseen raíces de mayor superficie de absorción (Narang RA y col. 2000). Sin embargo, a pesar de que el patrón predeterminado es importante, en muchas ocasiones la capacidad de la planta para modificar ese patrón de desarrollo en respuesta a nutrientes y agua es también muy relevante, en cuanto a su capacidad de adaptación y de colonización de nuevos nichos (Jones B y Ljung K, 2011). Así por ejemplo, a comienzos del siglo XX se comprobó que las plantas del desierto varían sus sistemas radiculares en función de la disponibilidad de agua. De esta forma, en épocas de sequía las plantas desarrollan sistemas radiculares muy ramificados que, en las estaciones lluviosas, se transforman en sistemas mucho menos arbustivos (Cannon, 1911). Del mismo modo, se ha comprobado que entre los ecotipos de *Arabidopsis* que aumentan el tamaño de la raíz y de los pelos radiculares en respuesta a la carencia de fósforo, se da una supervivencia mayor en condiciones limitantes de este nutriente (Narang RA y col. 2000). Estas observaciones indican que la distribución espacial del sistema radicular es un carácter de importancia agronómica excepcional que determina la productividad de las cosechas en condiciones extremas (de Dorlodot S y col. 2007).

Existe otro tipo de selección de sistemas radiculares que nada tiene que ver con la que es producto de la selección natural, sino que es fruto de la mejora genética desarrollada por el hombre desde el inicio de la agricultura. En los países en vías de

desarrollo, el control de la AR tiene especial relevancia agronómica puesto que el uso de fertilizantes es impensable debido al elevado coste que le supone al agricultor. Por este motivo, la mejora de la producción se basa en la capacidad de adaptación de las raíces al sustrato mediante la selección de sistemas radiculares más óptimos. Sin embargo, en los países desarrollados las variedades utilizadas en los cultivos extensivos basan sus altos rendimientos en la utilización desmesurada de recursos hídricos y en el aporte masivo de fertilizantes. Ello se debe a que, en mejora genética nunca se ha considerado la eficiencia en la captación de recursos del suelo como un carácter agronómico deseable, ya que el problema estaba solucionado incrementando el aporte de agua y fertilizantes. Es decir, desde siempre se ha tendido a adaptar el suelo a la planta y no al contrario. Este planteamiento es responsable de importantes efectos negativos para el medioambiente. Las aguas que provienen de los riegos contienen cantidades ingentes de fertilizantes, especialmente nitratos, que provocan la eutrofización de las aguas y por tanto su contaminación irreversible (Sharpley A, 1999). Por otro lado, las reservas de fertilizantes comenzarán a escasear en un futuro próximo ya que los nitratos se fabrican utilizando fuentes de energía no renovables, y estudios geológicos recientes indican que las reservas de fosfato se agotarán en menos de 100 años (Runge-Metzger, 1995; Gilbert N, 2009). Asimismo, los recursos hídricos están sometidos anualmente a variaciones impredecibles a las que las variedades cultivadas son incapaces de adaptarse, provocando grandes pérdidas en las cosechas. Estos datos sugieren que la utilización de variedades con ARs más eficientes en la captación de recursos del suelo será determinante para el mantenimiento de la producción de alimentos en el mundo.

Una línea de estudio de los mecanismos moleculares que controlan la AR, es el análisis de la variación fenotípica de este carácter que ocurre entre ecotipos identificados en poblaciones naturales. Se sabe que especies muy relacionadas entre sí desarrollan ARs diferentes. De hecho, existe una variabilidad natural en la disposición del sistema radicular entre ecotipos de *Arabidopsis*. Por el momento se desconocen los mecanismos implicados en esta variación fenotípica natural (Malamy JE, 2005), sin embargo, se ha determinado la existencia de loci responsables de caracteres cuantitativos (QTLs) relacionados con biomasa, profundidad, y capacidad de ramificación de raíces (Kamoshita A y col. 2002a y b; Zhang T y col. 2003). En el estudio realizado por Mouchel CF y colaboradores en 2004, en el que exploraban la variación genética natural de *Arabidopsis*, se aisló un nuevo regulador del crecimiento radicular relacionado con la talla de la raíz en un ecotipo silvestre de raíz pequeña

denominado Uk-1. El QTL identificado es un factor de transcripción llamado BREVIS RADIX (BRX) portador de un codón de parada en su secuencia nucleotídica en las plantas de este ecotipo. BRX controla el grado de proliferación y diferenciación celular en la zona de crecimiento del ápice de la raíz (Mouchel CF y col. 2004). Este estudio indica que la selección natural de determinadas mutaciones ha tenido un papel esencial en la configuración de una determinada arquitectura que ha permitido la colonización de nichos específicos (Mouchel CF y col. 2004; Malamy JE, 2005). En estudios posteriores este factor de transcripción BRX se ha relacionado con la inhibición del inicio del desarrollo de raíces laterales mediada por citoquininas (Li J y col. 2009), y con la respuesta a auxinas y la comunicación de la ruta de esta hormona con la de respuesta a brasinosteroides (Scacchi E y col. 2009). También se ha encontrado que BRX tiene un papel en modular la tasa de crecimiento de la parte aérea de la planta, además de la de la raíz (Beuchat J y col. 2010a). Se ha identificado otro alelo de este gen (*BRXL*) al que se le atribuye un papel más activo en la variación natural del crecimiento de la raíz (Beauchat J y col. 2010b). Tenemos por lo tanto, debido a este gen, un fenotipo de variación de la longitud de la raíz principal dentro de una población natural que, en principio, no plantea ningún problema para el desarrollo de la planta. La implicación de un mismo factor de transcripción en tan amplio conjunto de rutas de señalización y procesos de desarrollo, nos da una idea de lo complejo que resulta el establecimiento de un patrón de crecimiento del sistema radicular y, por tanto, del estudio de los mecanismos moleculares que lo controlan. Esto hace que el uso de mutantes alterados en diferentes aspectos del desarrollo del sistema radicular pueda ser una herramienta útil para llegar a tener un conocimiento integrado de los mecanismos que regulan este desarrollo.

2. Tipos de arquitecturas radiculares

Un sistema radicular se compone de una raíz principal, raíces laterales (primarias, secundarias, etc.) y raíces adventicias:

‡ La raíz principal es la primera que se desarrolla en la planta, está previamente configurada durante el desarrollo del embrión y es el punto de partida para el desarrollo de las raíces laterales. Su función consiste en colonizar el suelo en profundidad y captar el agua y los nutrientes de los estratos más profundos, como el nitrato que tiende a lixiviarse; es también el órgano más importante para la supervivencia de la planta durante las primeras etapas del desarrollo de la misma,

permitiendo la captación inmediata de agua y nutrientes y la correcta disposición de la plántula gracias a su rápida respuesta gravitrópica (positiva) y fototrópica (negativa).

≠ Las raíces laterales se originan más tarde y emergen a partir de la principal con un ángulo determinado genéticamente y su misión consiste en colonizar los primeros estratos del suelo en forma de onda expansiva para captar los nutrientes. A partir de estas raíces laterales se pueden formar otras secundarias, terciarias, etc., que amplían la superficie de absorción del sistema.

≠ Las raíces adventicias se desarrollan en una zona delimitada entre el inicio de la raíz principal y el tallo (la corona) y son las encargadas de aprovechar el agua y nutrientes en las capas más superficiales del sustrato siendo esenciales en la capacidad de anclaje de muchas especies.

Cada uno de estos órganos tiene un carácter funcional y por tanto arquitectónico. Se pueden distinguir dos tipos principales de arquitecturas radiculares: la raíz pivotante y la raíz fasciculada (**Figura 1**).

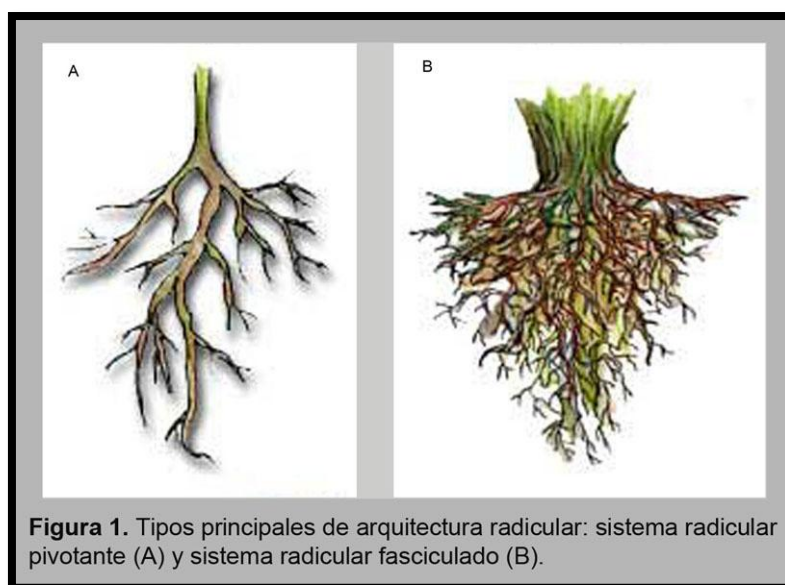


Figura 1. Tipos principales de arquitectura radicular: sistema radicular pivotante (A) y sistema radicular fasciculado (B).

Se denomina raíz pivotante a aquella en la que existe una raíz principal que adquiere una dominancia apical preponderante y unas raíces laterales de menor longitud que se disponen a lo largo de la principal. Este es el caso de *Arabidopsis thaliana*. Por el contrario, una raíz fasciculada se caracteriza por una pérdida de la dominancia apical de la raíz principal. En este tipo, las raíces laterales y adventicias se desarrollan igual que la principal y el resultado es un conjunto de raíces de aspecto

arbustivo como ocurre por ejemplo en plantas de judía *Carioca* (Lynch J, 1995). El hecho de que una determinada especie haya optado por un patrón pivotante o fasciculado durante su evolución se basa en su adaptación a la disponibilidad de agua y nutrientes, así como al tipo de suelo, con el fin de permitir la colonización de un determinado nicho ecológico. Ambos tipos de raíz proporcionan ventajas adaptativas para su desarrollo en determinados ecosistemas. Una raíz pivotante es un sistema especializado en captar los nutrientes y el agua de los estratos más profundos del suelo al mismo tiempo que sus raíces laterales aprovechan los recursos de los estratos más superficiales. Estas raíces son importantes en suelos en los que el agua se pierde por lixiviación y a su paso arrastra los nutrientes vitales para la supervivencia de las plantas, en especial el nitrato. Sin embargo, este sistema es muy poco efectivo en suelos en los que los nutrientes se encuentran localizados en los primeros horizontes y además, proporciona muy poca capacidad de anclaje. Por el contrario un sistema fasciculado es más eficaz en la captación de nutrientes que se acumulan en los estratos más superficiales, como el fosfato, y junto con las raíces adventicias proporcionan una mayor capacidad de anclaje. Son sistemas muy eficaces en suelos poco profundos.

Pivotante y fasciculada son los tipos más importantes y más extremos de arquitectura entre los que se pueden englobar la mayoría de los sistemas. Por ejemplo se define una raíz tuberosa como aquella que posee un patrón pivotante, pero con la particularidad de que su raíz principal actúa como órgano de reserva y está engrosada. Sin embargo, una raíz tubero-fasciculada presenta un patrón fasciculado pero su raíz principal se diferencia del resto por su grosor. Además, existen otros tipos de raíces que actúan como órganos de reserva, como son el rizoma y el bulbo. En ambas la raíz principal es más gruesa, pero en el caso del bulbo adquiere una forma de “pera” invertida y las raíces laterales se desarrollan en el extremo de la misma como si fuera un “pincel”. En un rizoma, por el contrario, la forma de la raíz principal es cilíndrica, su disposición es perpendicular al eje de la gravedad y las raíces laterales se desarrollan solamente en una de las caras de la raíz principal.

La configuración espacial que adopta el conjunto de raíces laterales, adventicias y principal en el sustrato se ve alterada constantemente por las condiciones ambientales (Lynch J, 1995). Estos factores son los responsables de que plantas de la misma especie vegetal adquieran configuraciones espaciales distintas a su patrón original, según el tipo de suelo y las condiciones ambientales en que se

desarrollen, lo que da lugar a ARs diferentes y adaptadas a ambientes determinados (Lynch J, 1995).

3. Factores que controlan el desarrollo del sistema radicular

La plasticidad de las raíces para generar un sistema radicular con una morfología y disposición espacial característico, depende de una serie de factores endógenos predeterminados genéticamente en la planta y de otros exógenos establecidos por las condiciones ambientales que condicionan el desarrollo de la raíz (Osmont KS y col. 2007; revisado en Jones B y col. 2011).

Entender los factores endógenos que controlan los mecanismos moleculares que participan en este desarrollo, requiere la identificación de los genes implicados, mediante aproximaciones de última generación como transcriptómica, proteómica y metabolómica (Iyer-Pascuzzi AS y col. 2009a). El desarrollo radicular comprende una serie de eventos que suceden durante la formación del embrión y otros postembrionarios que, en conjunto, llevan a la correcta formación y funcionamiento del sistema radicular de la planta. Se han identificado una serie de genes que regulan el crecimiento de la raíz en *Arabidopsis*, presentando un especial interés aquellos encargados del mantenimiento del meristemo apical (Perilli S y col. 2012), como por ejemplo, *SHORT ROOT (SHR)*, *SCARECROW (SCR)*, *PLETHORA 1 y 2 (PLT1 Y PLT2)* (Benfey PN y col. 1993; Scheres B y col. 1995; di Laurenzio L y col. 1996; Helariutta Y y col. 2000; Blilou I y col. 2005). *SHR* y *SCR* son genes implicados en el desarrollo del xilema de la raíz (Carlsbecker A y col. 2010); *PLT1* y *PLT2* son factores de transcripción que se expresan en el meristemo apical de la raíz, son regulados indirectamente por auxina (Jenik PD y col. 2007; Aida M y col. 2004) y, junto con *SCR*, participan en el mantenimiento de un centro quiescente (CQ) funcional (Wysocka-Diller JW y col. 2000; Sabatini S y col. 2003; Aida M y col. 2004). Todos estos genes, y algunos más que tendremos en cuenta más adelante, son importantes en el establecimiento y mantenimiento postembrionario del meristemo apical de la raíz, y por tanto tienen un papel relevante en la dominancia apical de la raíz principal (Perilli S y col. 2012). Aunque se sabe de la importancia de estos genes en el funcionamiento del meristemo apical y en el crecimiento indeterminado de la raíz de *Arabidopsis*, hasta la fecha no hay estudios que determinen su impacto en la AR. Otro de los factores más importantes que determinan la AR es el número y disposición de las raíces laterales y adventicias (Nibau C y col. 2008). Hoy en día las aproximaciones de análisis

globalizado están permitiendo determinar cuál es el grado de solapamiento entre los mecanismos implicados en la formación de la raíz principal y los que controlan el desarrollo de las raíces laterales (Lucas M y col. 2011).

La progresión del sistema radicular de una planta desde la formación del meristemo de la raíz principal durante la embriogénesis hasta la configuración espacial definitiva que adquiere un sistema radicular, implica además de factores endógenos, a numerosos factores exógenos, bióticos y abióticos. Los factores exógenos varían en función del ambiente en el que se desarrolle la planta, como la intensidad y calidad de la luz, que condicionan el aporte de energía al sistema radicular, lo que influye en su desarrollo; así como el tipo de suelo, la presencia de agua y de nutrientes, la profundidad, las interacciones con otros organismos (plantas, bacterias, hongos) y la presencia de obstáculos físicos en el terreno. Parece que, de entre todos estos factores, los más relevantes son la presencia de agua, nutrientes y obstáculos (Schiefelbein JW y Benfey P, 1991; Monshausen GB y col. 2009).

3.1.- Factores endógenos.

Para avanzar en el estudio de los factores endógenos que participan en el desarrollo del sistema radicular, se hace imprescindible entender la estructura, ontogenia y desarrollo de la raíz. Un sistema radicular típico consiste en una raíz primaria con un patrón repetitivo de formación de raíces laterales. Es importante entender cómo las distintas regiones funcionales del meristemo radicular se especializan para producir determinados tipos celulares.

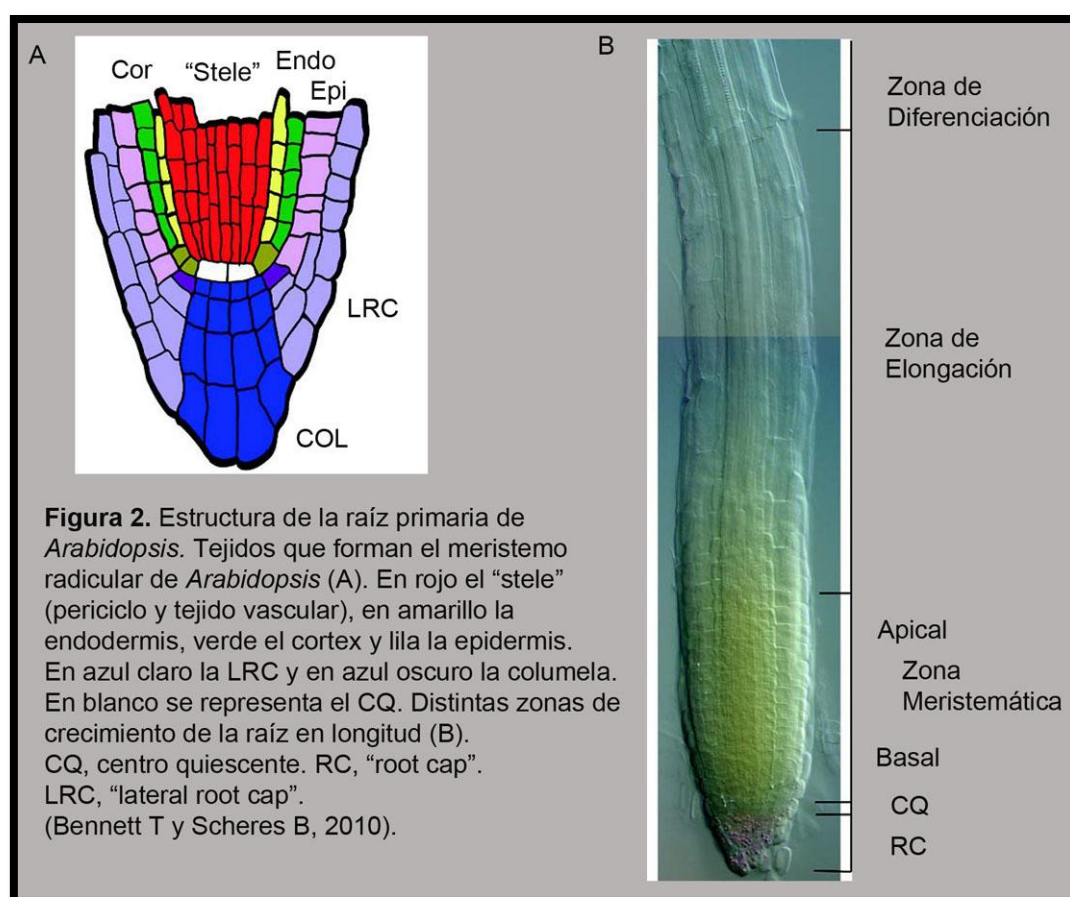
RAÍZ PRINCIPAL O PRIMARIA

Estructura de la raíz. Formación del meristemo apical

La estructura de la raíz de *Arabidopsis* es sencilla y se establece durante la embriogénesis (Dolan L y col. 1993). La parte más distal del ápice de la raíz se denomina Caliptra, Cofia o Pilorriza. En este trabajo usaré la denominación en inglés “root cap” (RC) para coincidir con las siglas usadas en las diferentes figuras. La parte central de la RC se denomina columela (COL) y la lateral, “lateral root cap” (LRC) (**Figura 2A**). En la zona basal de la RC se localiza el centro quiescente (CQ). Alrededor y por encima del CQ se organiza el cuerpo proximal de la raíz, que consiste en diferentes capas tisulares concéntricas. De fuera hacia dentro se localiza la epidermis, el cortex, la endodermis y el “stele”; esta última capa comprende el periciclo

y el cilindro vascular. El cilindro vascular contiene células del cambium capacitadas para formar los elementos vasculares (**Figura 2A**) (Bennett T y Scheres B, 2010).

Si observamos la raíz primaria longitudinalmente, se distingue la Zona Meristemática, que contiene el CQ, las células precursoras del “stele” y las encargadas de la formación de la LRC y de la epidermis. El final de la zona meristemática está determinado por un punto en el que las células empiezan a elongar, se dividen con menos frecuencia y comienzan a adquirir sus destinos celulares (especificidad tisular), definiéndose en la raíz la Zona de Elongación. Finalmente, las células dejan de elongar y entran en diferenciación, en la Zona de Diferenciación, que se define por la aparición de pelos radiculares y células vasculares con un mayor engrosamiento de la pared celular (**Figura 2B**) (revisión en Bennett T y Scheres B, 2010).



Para entender cómo se llega a esta organización de la raíz, se debe estudiar su formación durante el desarrollo embrionario, ya que es en este momento cuando se define su estructura.

La primera división embrionaria da lugar a una célula apical y otra basal. La célula basal dará lugar a la formación del suspensor, mientras la apical dará lugar al embrión propiamente dicho, con una excepción; un punto crucial en la formación de la raíz embrionaria es el reclutamiento de la célula situada más apicalmente en el suspensor (la hipófisis) dentro de la formación del embrión, donde dará lugar al CQ y a la columela de la raíz, y alrededor de la cual se organizará todo el meristemo radicular (**Figura 3**). La formación del CQ puede tomarse como el marcador del inicio de una raíz funcional (revisado en Jenik PD y col. 2007 y en Perilli S y col. 2012). Los mutantes en los que el reclutamiento de la hipófisis falla, presentan alteraciones en el desarrollo de la raíz (Moller B y col. 2009).

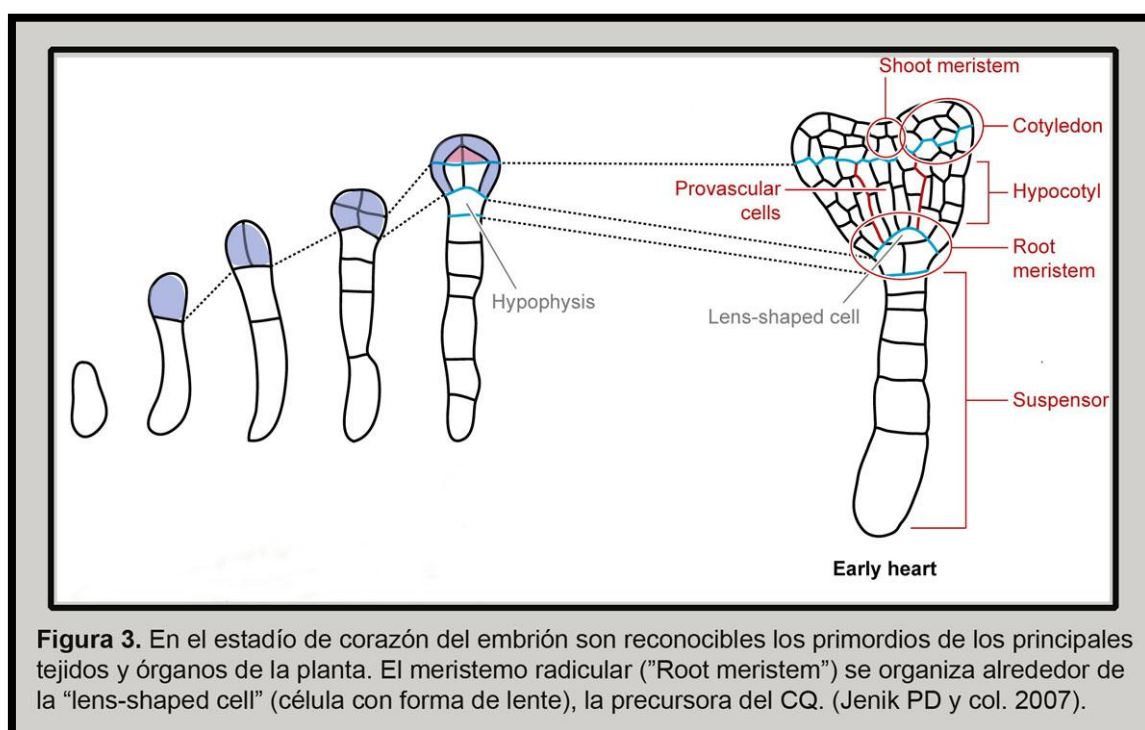
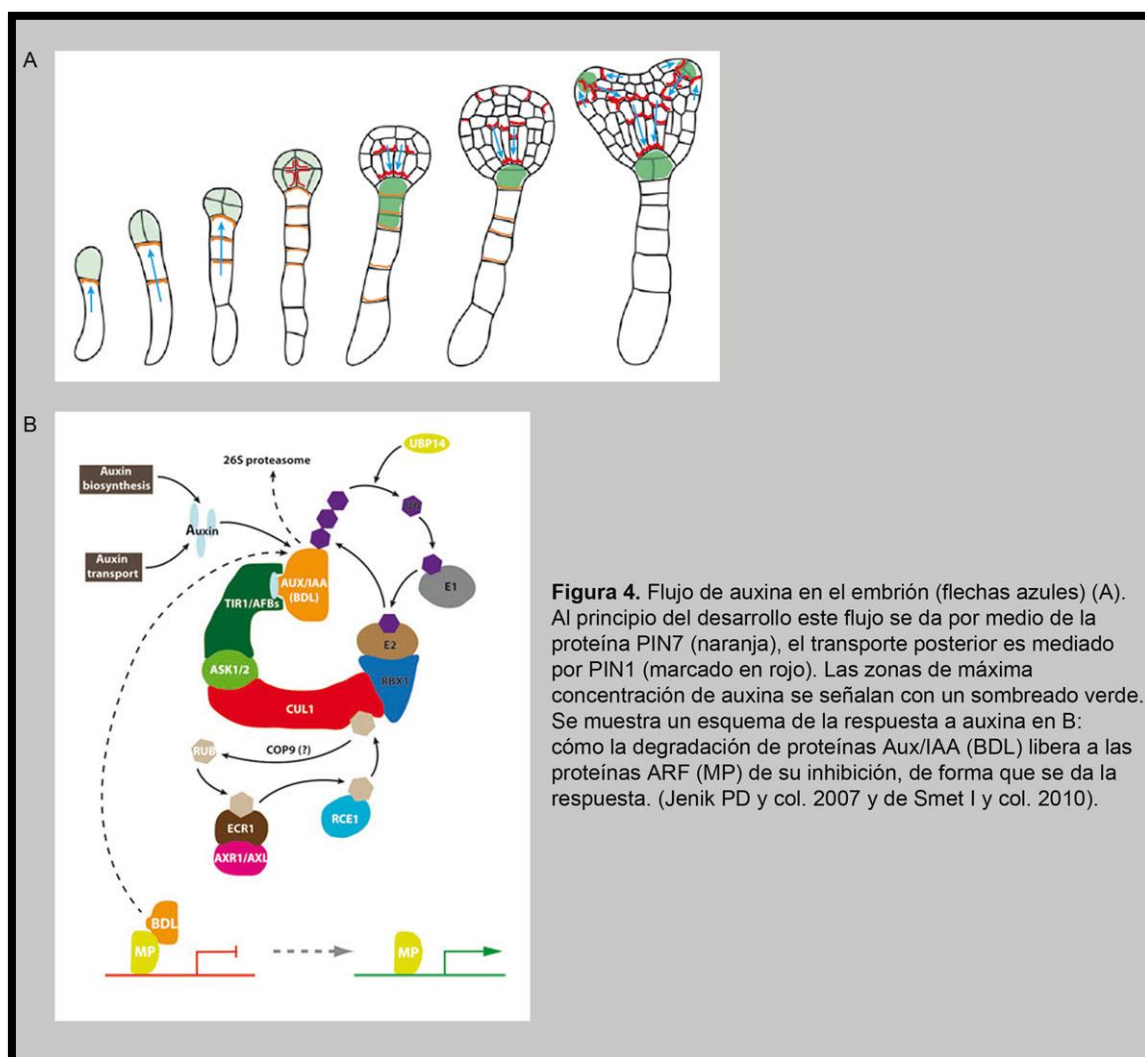


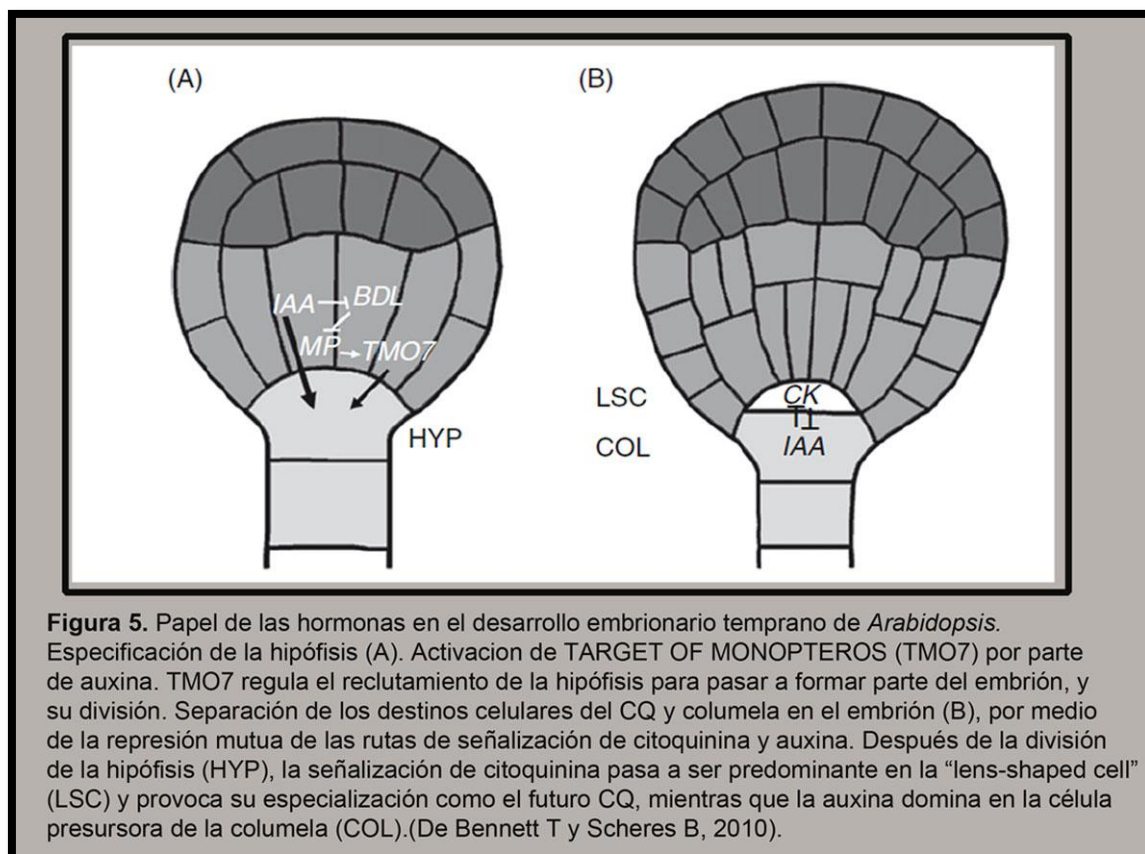
Figura 3. En el estadio de corazón del embrión son reconocibles los primordios de los principales tejidos y órganos de la planta. El meristemo radicular ("Root meristem") se organiza alrededor de la "lens-shaped cell" (célula con forma de lente), la precursora del CQ. (Jenik PD y col. 2007).

Durante el reclutamiento de la hipófisis es importante el papel de la auxina. Previamente a este reclutamiento, se produce un cambio en el sentido del transporte de auxina en el embrión (Friml J y col. 2003). En los primeros estadios es transportada desde la zona basal hacia la apical; después, en el momento del reclutamiento de la hipófisis, cambia desde el polo apical del embrión hacia el basal (**Figura 4A**). La presencia de la auxina en el polo basal del embrión provoca la degradación de un represor transcripcional del tipo Aux/IAA (represor de la señalización de auxina) denominado BODENLOS (BDL). La desaparición del represor permite que los activadores transcripcionales ARF (factor de respuesta a auxina) como

MONOPTEROS (MP) activan los genes de respuesta a auxina, que conducen al reclutamiento de la hipófisis (**Figura 4B**) (de Smet I y col. 2010; Jenik PD y col. 2007).



Al menos uno de los componentes de este mecanismo de reclutamiento es el movimiento del factor de transcripción TARGET OF MONOPTEROS7 (TMO7) desde el embrión hasta la hipófisis. Al verse MP libre de la represión de BDL, activa al factor de transcripción TMO7, que migra hacia la hipófisis (HYP) (**Figura 5A**). TMO7 regula el reclutamiento de la hipófisis para pasar a formar parte del embrión, y su división; aunque aún quedan por determinar muchos otros aspectos de este mecanismo (Bennett T y Scheres B, 2010).

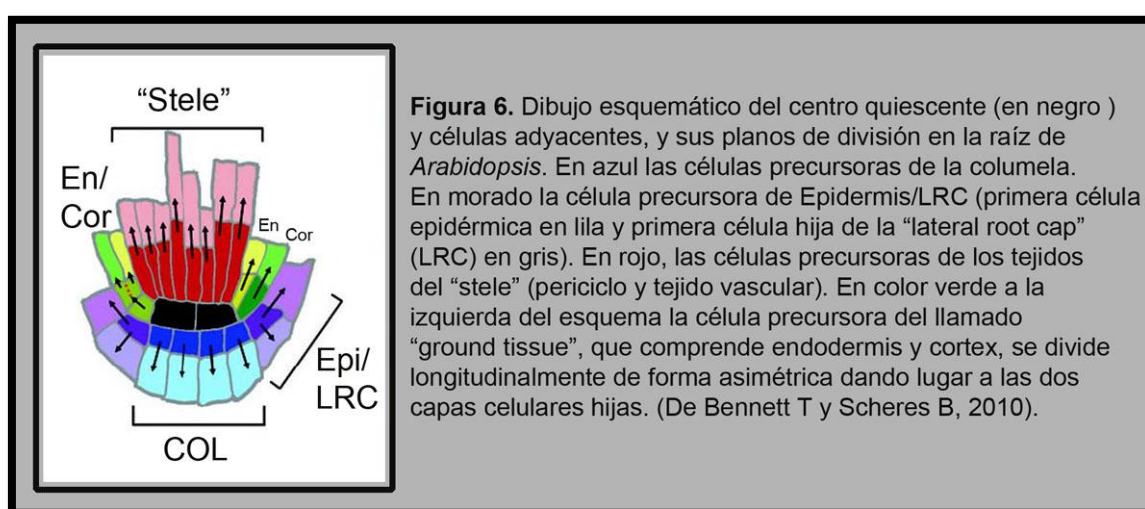


De entre todas las fitohormonas, la auxina es la hormona que más se ha implicado en la embriogénesis. No obstante, sería demasiado sencillo asumir que es la única fitohormona que juega un papel en el desarrollo temprano del embrión. Puede ser que el gran número de evidencias sobre su relación con la embriogénesis simplemente refleje el gran interés que tiene el estudio de este campo, y no necesariamente su papel predominante en este momento del desarrollo (de Smet I y col. 2010).

Trabajos recientes han demostrado que la interacción entre auxina y otro factor de crecimiento de las plantas, la citoquinina, es necesaria para la especificación de las dos células a las que da lugar la división de la hipófisis (Muller B y col. 2008). Una vez se ha producido la especificación de la hipófisis, esta se divide periclinamente, la célula superior ("lens-shape cell" (LSC) o célula con forma de lente) dará lugar a las células del CQ embrionario, mientras que la inferior formará la columela (**Figura 5B**) (Bennett T y Scheres B, 2010). La hormona auxina reprime la señalización de citoquinina en el precursor de la columela, mientras que la señalización de citoquinina no se ve afectada en la LSC (**Figura 5B**). La distinción entre estos dos linajes celulares es necesaria para la formación de la raíz embrionaria y para la expresión de

los genes claves para el establecimiento del patrón radicular. La especificación del CQ embrionario mantiene los patrones de división específicos de las células adyacentes a él durante la embriogénesis, y previenen la división de estas células cuando el crecimiento postembrionario comienza, de manera que se mantienen como células indiferenciadas durante toda la vida de la planta (revisión en Bennett T y Scheres B, 2010; Perrilli S y col. 2012).

Las posición dentro del meristemo radicular y la forma de dividirse de las células precursoras de los tejidos de la raíz son factores importantes que determinan el posterior crecimiento y desarrollo de esta (**Figura 6**).



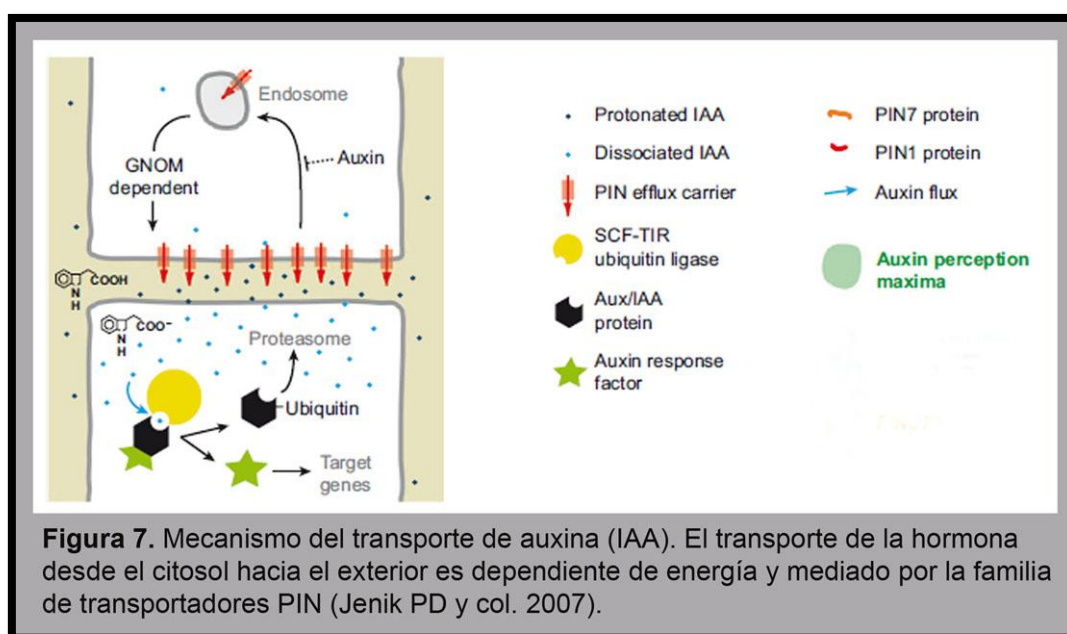
En el caso de la especificación del llamado "ground tissue" (endodermis y cortex), los mecanismos intrínsecos y extrínsecos que influyen en la división asimétrica de la célula precursora y la regulan, han sido ampliamente estudiados (Petricka JJ, 2009). Dos mutantes que tienen alterada la formación del "ground tissue" son *schizoriza* (*scz*) y *scarecrow* (*scr*), debido a que las proteínas SCHIZORIZA (SCZ) y SCARECROW (SCR) intervienen en la formación de las células precursoras del "ground tissue" en el embrión. El grave defecto en la organización tisular que presenta el doble mutante *scr scz* se traduce en un fenotipo de raíz muy corta, ya que la raíz principal deja de ser funcional (Pernas M y col. 2010); sufriendo un acortamiento de la raíz aún mayor que el que sufre cada uno de los mutantes simples *scz* y *scr* (Mylona P y col. 2002; Di Laurenzio L y col. 1996; Sabatini S y col. 2003). Por lo tanto, una alteración en el desarrollo embrionario de la raíz principal puede llevar a que esta no se desarrolle correctamente, desembocando en un cambio sustancial de la AR de la

planta ya que esta puede llegar a aumentar la producción de raíces adventicias y laterales para contrarrestar la falta de desarrollo de la principal (Lucas M y col. 2011).

Desarrollo embrionario tardío y desarrollo post-embrionario de la raíz

La distribución de la auxina en el embrión juega un papel esencial en su desarrollo.

En las etapas finales del desarrollo embrionario, lo que se conoce como embrión maduro, existe un máximo de concentración de auxina en el CQ que controla la especificación continua de las células del meristemo apical de la raíz, y de esta forma hace posible su correcto crecimiento y desarrollo. Esta localización controlada de la hormona en el meristemo radicular se consigue gracias a la actuación de las proteínas transportadoras PIN (PIN-FORMED) (Dhonukshe P y col. 2007; Dhonukshe P y col. 2008a; Geldner N y col. 2001; Steinmann T y col. 1999). Estos transportadores se localizan de forma polar en las células determinando la direccionalidad del transporte de auxina entre los diferentes tejidos de la planta. La auxina regula negativamente la internalización de los PINs, mientras que el transporte polar de estos a la membrana plasmática requiere GTP (Steinmann T y col. 1999, Geldner N y col. 2003) (**Figura 7**).



Una vez establecido este máximo de concentración de auxina en la zona del meristemo, el mantenimiento postembrionario del CQ y el destino celular de su progenie viene determinado por la acción de dos factores de transcripción:

PLETHORA (*PLT*) en el embrión y *SCARECROW* (*SCR*) en la raíz madura (Aida M y col. 2004; Sabatini S y col. 2003; revisión en Jenik PD y col. 2007 y en Perilli S y col. 2012) (**Figura 8**). *PLT* controla los gradientes de auxina, e induce la transcripción de otros genes relacionados con auxina. Asimismo, la auxina, de manera indirecta, induce la transcripción de *PLT* (Blilou I y col. 2005). La transcripción de *SCR* se activa por otro factor transcripcional, *SHORT ROOT* (*SHR*) (Benfey PN y col. 1993; Scheres B y col. 1995), que viaja desde las células del cilindro provascular a las células que lo rodean, incluyendo el CQ. La expresión de *SCR* promueve la diferenciación de la endodermis y del cortex. Por lo tanto, *SCR* y *PLT*, promueven de manera conjunta el destino celular de la progenie del CQ e integran los patrones de formación radial (controlado por la expresión de *SHR/SCR*) y apico/basales (controlado por auxina/*PLT*) que observamos durante el desarrollo y crecimiento de la raíz (Jenik PD y col. 2007).

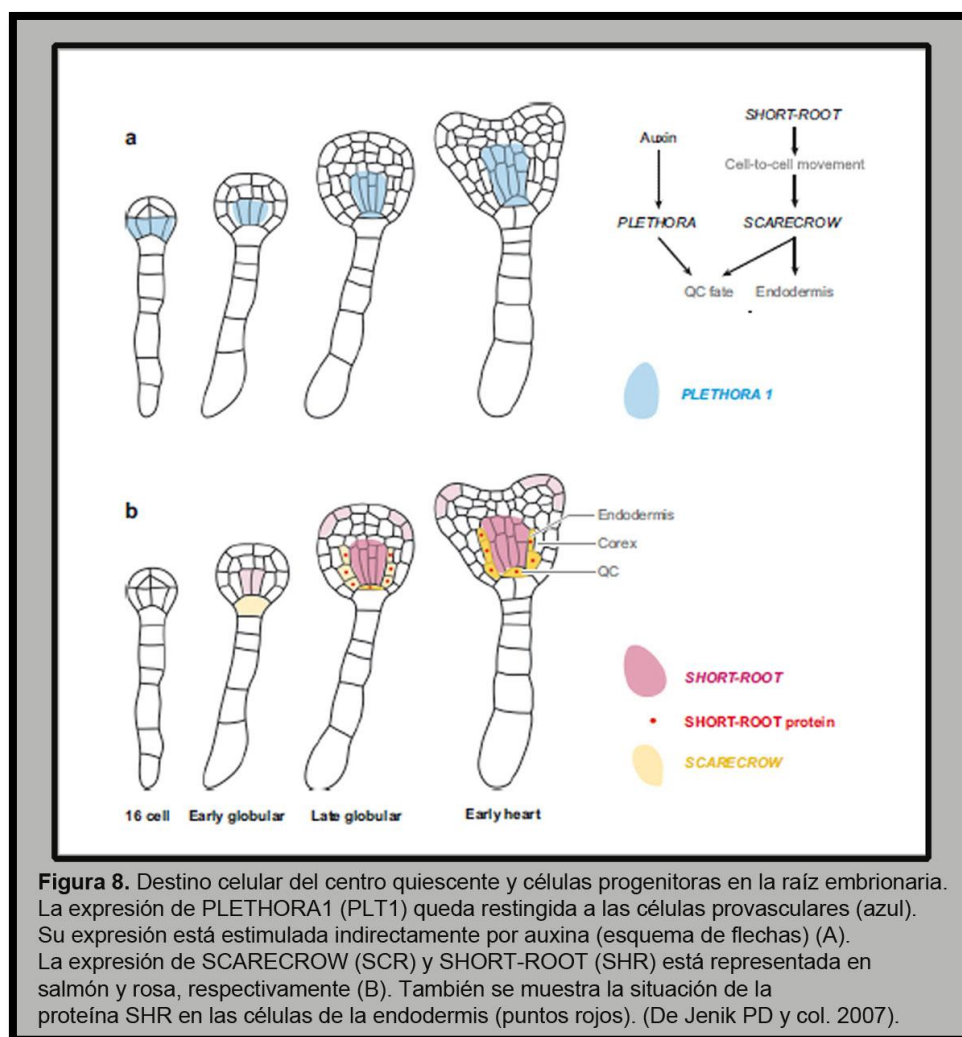


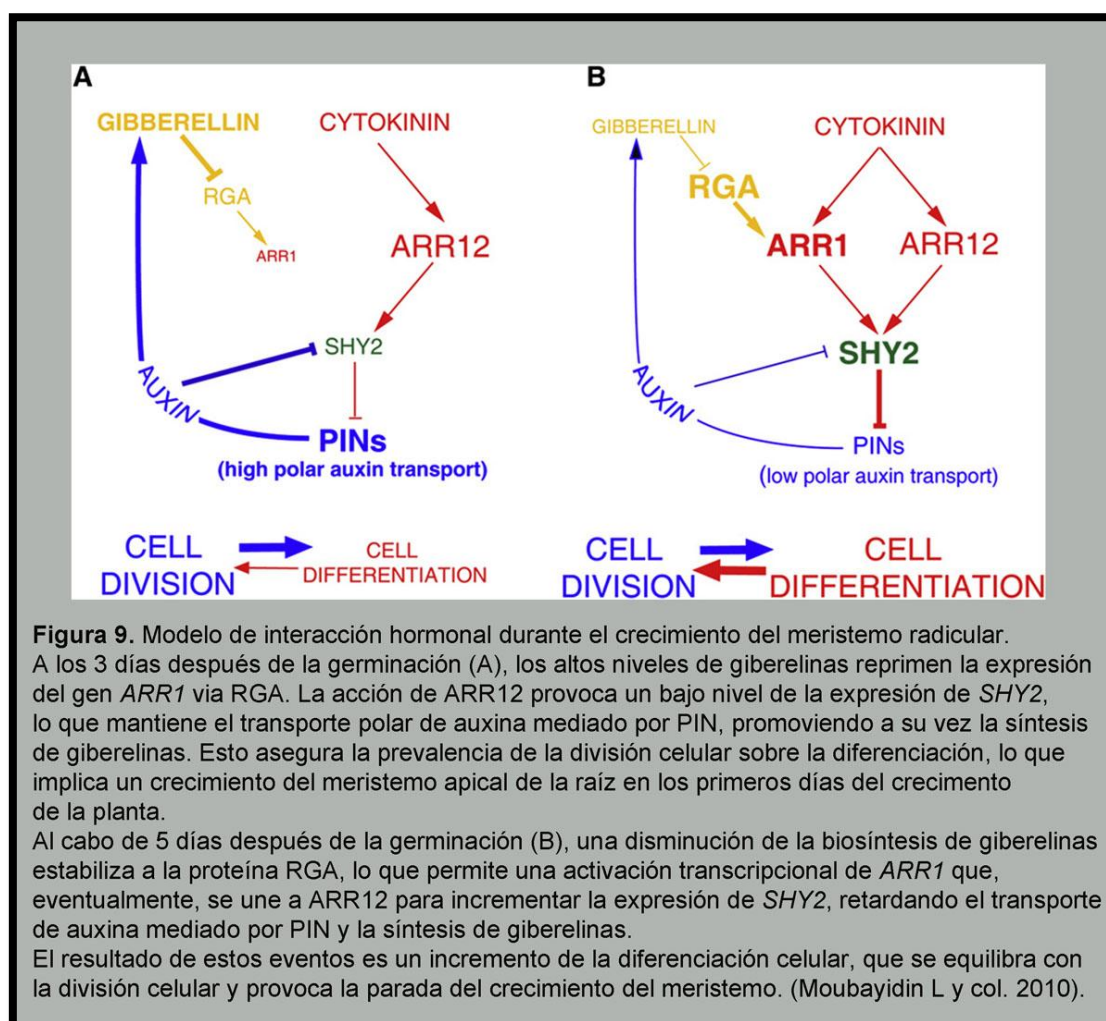
Figura 8. Destino celular del centro quiescente y células progenitoras en la raíz embrionaria. La expresión de *PLETHORA1* (*PLT1*) queda restringida a las células provasculares (azul). Su expresión está estimulada indirectamente por auxina (esquema de flechas) (A). La expresión de *SCARECROW* (*SCR*) y *SHORT-ROOT* (*SHR*) está representada en salmón y rosa, respectivamente (B). También se muestra la situación de la proteína *SHR* en las células de la endodermis (puntos rojos). (De Jenik PD y col. 2007).

Justo después de la germinación de las semillas, el crecimiento y el mantenimiento del meristemo apical de la planta se produce en base a que la división celular prevalece sobre la diferenciación, hasta que alcanza su tamaño final cuando la división y la diferenciación celular llegan a un equilibrio (Moubayidin L y col. 2010; Perilli S y col. 2012). En el meristemo radicular de *Arabidopsis*, este equilibrio resulta de la interacción entre citoquinina (promotor de la diferenciación) (Dello loio R y col. 2007; Dello loio R y col. 2008; Moubayidin L y col. 2009; Perilli S y col. 2010a), y auxina (promotor de la división celular) (Dello loio R y col. 2008; Blilou I y col. 2005), a través un circuito de regulación mediante el cual los factores de transcripción de respuesta a citoquinina, ARR1 y ARR12 (Taniguchi M y col. 2007), activan al gen *SHY2* (codifica para IAA3, miembro de la familia de las Aux/IAA inducidas por auxina) (Dello loio R y col. 2008; Taniguchi M y col. 2007; Tian Q y col. 2002).

En los primeros días después de la germinación existen altos niveles de giberelinas que reprimen la expresión del gen ARR1 via RGA (proteína de tipo DELLA, represora de GA), (Silverstone AL y col. 1998; Dill A y col. 2001; Davière JM y col. 2008). Se ha llegado a establecer que la regulación de esta ruta de señalización giberelina/DELLA en la endodermis es necesaria para el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*, de forma que las giberelinas promueven el crecimiento favoreciendo la degradación de las proteínas represoras DELLA (Úbeda-Tomás S y col. 2008). La acción de ARR12 solo, sin la ayuda de ARR1, provoca un bajo nivel de la expresión de *SHY2*, lo que mantiene el transporte polar de auxina mediado por PIN asegurando la prevalencia de la división celular sobre la diferenciación, lo que implica un crecimiento del meristemo apical de la raíz en los primeros días del crecimiento de la planta (Dello loio R y col. 2008; Bilou I y col. 2005) (**Figura 9**). A *SHY2* se le atribuye, por ello, un papel clave en la interacción citoquinina/auxina, que regula el mantenimiento del tamaño del meristemo radicular (Dello loio R y col. 2008; Moubayidin L y col. 2009; Perilli S y col. 2010b), pero, sin embargo aún se desconoce cómo se establece el tamaño final del meristemo, es decir, cómo un cambio en las tasas relativas de división celular y diferenciación produce una parada en el crecimiento del meristemo. Parece que este cambio se produce a los 5 días de haber germinado las semillas, cuando la expresión de *SHY2* está inducida por ARR12 y ARR1 de manera combinada (Moubayidin L y col. 2010). Al aumentar los niveles de expresión de este gen, se produce una inhibición del transporte de auxina, lo que lleva a un incremento de la tasa de diferenciación celular y se equilibra con la tasa de división, estableciendo así el tamaño del meristemo (**Figura 9**). Asimismo, se ha relacionado a las especies

reactivas del oxígeno (ROS) con el control de la transición entre la proliferación y la diferenciación celular en el meristemo radicular (Tsukagoshi H y col. 2010). Se ha identificado un factor de transcripción, UPBEAT1 (UPB1), como el responsable de la regulación de un grupo de peroxidasas que regulan el balance del ión superóxido y de H_2O_2 en la zona de transición de la raíz (zona que delimita el final de la zona meristemática y el comienzo de la zona de elongación). Las plantas que sobreexpresan *UPB1* presentan cortos meristemas radiculares, debido al alto contenido de H_2O_2 (Tsukagoshi H y col. 2010; Perilli S y col. 2012).

La interacción entre diferentes tipos de hormonas implicadas en el control del tamaño del meristemo apical de la raíz, nos da idea de que un cambio en alguna de las rutas de señalización o síntesis de estas hormonas puede llevar a alteraciones en el tamaño del meristemo y por lo tanto, en el tamaño o disposición de todo el sistema radicular de la planta.

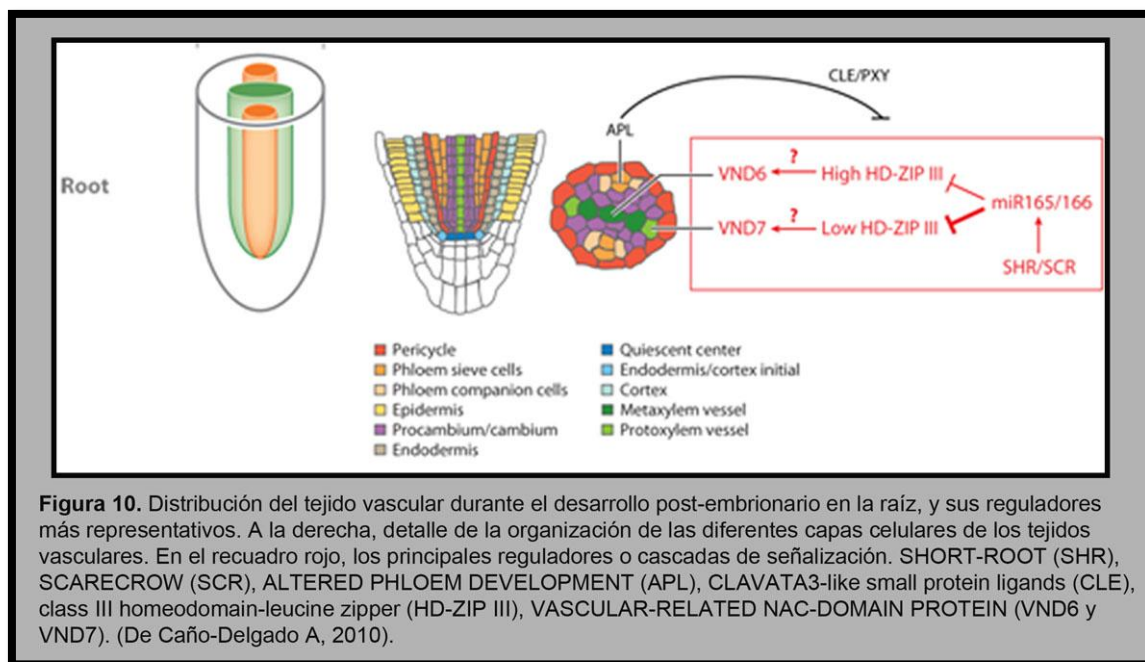


Desarrollo del tejido vascular

Durante todo el crecimiento y desarrollo de la planta, el correcto funcionamiento del sistema vascular es esencial en la configuración del sistema radicular. La formación de estos tejidos es un proceso complejo que integra señalización y regulación génica a nivel transcripcional y post-transcripcional (revisado en Caño-Delgado A y col. 2010).

El correcto desarrollo del sistema vascular durante la formación del embrión condiciona el patrón y el crecimiento postembrionario de los tejidos vasculares y los órganos de la planta. La auxina regula el inicio de las células del procambium en la parte basal del embrión. En ausencia de la señalización de la hormona mediada por el factor de respuesta a auxina MP, las células del procambium embrionario no se forman apropiadamente, alterando el crecimiento postembrionario de los tejidos vasculares (Berleth T y col. 1993; Hardtke CS y col. 1998). Modificaciones en el desarrollo del sistema vascular dan lugar a la formación de una raíz principal que no se desarrolla correctamente, como ocurre en los mutantes de raíz corta *ahp6* (Mähönen AP y col. 2006), *apl* (Bonke B y col. 2003), *wol-1* (Mähönen AP y col. 2000) y *wol-2* (García-Ponce de León B y col. 2004).

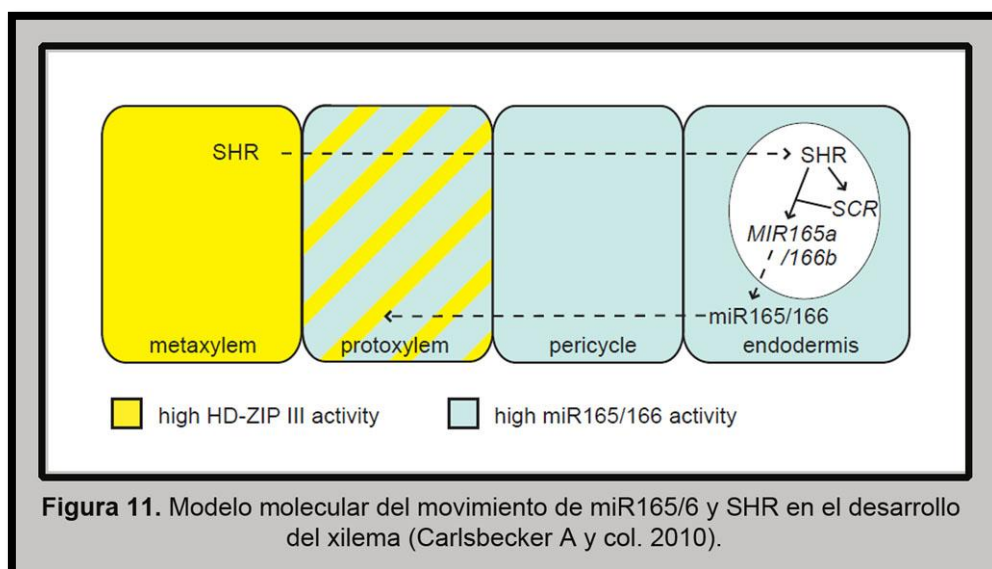
La diferenciación de los tres tipos celulares principales en el tejido vascular (floema, xilema y procambium) se completa después de la germinación y está controlada por una compleja red de regulación transcripcional donde la auxina y las citoquininas juegan un papel esencial (Jenik PD y col. 2007). En la raíz (**Figura 10**), el xilema se desarrolla en el centro del cilindro vascular, a partir de los polos protoxilemáticos, en contacto con el periciclo. Los polos floemáticos se localizan entre los xilemáticos (Caño-Delgado A y col. 2010).



La especificación y diferenciación del xilema en la raíz, está espacial y temporalmente regulada por una red transcripcional (Carlsbecker A y col. 2010). Se sabe que sus precursores están estabilizados en el meristemo radicular, pero su diferenciación no empieza hasta que las raíces elongan activamente y desarrollan pelos radicales en la epidermis. Los vasos xilemáticos de la periferia se diferencian primero, y lo hacen dando lugar al protoxilema. Los vasos precursores de las capas más internas se diferencian a partir del protoxilema dando lugar al metaxilema. (Caño-Delgado A y col. 2010).

La regulación transcripcional y post-transcripcional del desarrollo del xilema es llevada a cabo por medio de factores de transcripción como SHR, SCR y cinco clases de HD-ZIP III (class III homeodomain-leucine zipper). SHR y SCR forman complejos que activan dos genes que codifican para los microRNA (miR) 165/166 en la endodermis. Estos miRs difunden fuera de la endodermis y provocan la degradación de los factores de transcripción HD-ZIP III en la periferia del cilindro vascular. Unos altos niveles de HD-ZIP III promueven la expresión de *VND6* (*VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN6*) que es responsable de la formación del metaxilema, mientras que bajos niveles de HD-ZIP III promueven la expresión de *VND7* (*VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7* gen promotor de la formación de protoxilema) en la periferia del cilindro, dando lugar a la formación de protoxilema (**Figura 10**). Por tanto, cambios en

la degradación de HD-ZIP III pueden llegar a provocar que el protoxilema sea reemplazado por metaxilema (Carlsbecker A y col. 2010) (**Figura 11**).



En cuanto al floema, su desarrollo comienza en el meristemo apical con la división asimétrica de los precursores del floema, formándose las células de compañía y las células cribosas. *ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT (APL)*, un factor de transcripción de tipo myb, promueve esta división asimétrica en la raíz de *Arabidopsis* y además actúa como un represor de la formación del xilema (Bonke M y col. 2003; Caño-Delgado A y col. 2010).

Otro tipo celular presente en el tejido vascular es el procambium, cuya diferenciación da lugar al cambium vascular, responsable de la vascularización secundaria. Hay estudios que sugieren que la diferenciación de este tejido media los mecanismos que establecen los límites entre xilema y floema (Caño-Delgado A y col. 2010). Este proceso de diferenciación está regulado por unas pequeñas proteínas llamadas CLE (CLAVATA3-like small protein ligands), una familia de proteínas que tienen función de moléculas de señalización, y participan en la comunicación intercelular en diferentes procesos de desarrollo de las plantas (Wang G y col. 2010). Las proteínas CLE se unen a sus receptores quinasa denominados PXY (PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM), que se localizan específicamente en el procambium/cambium (Fisher K y Turner S, 2007). Esta interacción es importante para la regulación de la división en el procambium/cambium y para la diferenciación del xilema y del floema.

Podemos decir entonces que el desarrollo embrionario y con él la formación y posterior especificación de los distintos tejidos que forman parte de la planta, como el tejido vascular, están sometidos a la regulación por parte de una compleja red transcripcional que está siendo caracterizada actualmente (revisión en Caño-Delgado A y col. 2010).

El efecto de las fitohormonas es también muy importante durante el desarrollo vascular (revisado en Caño-Delgado A y col. 2010). Auxina, brasinosteroides y citoquininas, entre otras, juegan papeles individuales e interconectados durante todo el desarrollo de los tejidos vasculares. La distribución de auxina prepara el inicio de la vascularización y mantiene la continuidad de los haces vasculares a lo largo de la planta (Berleth T y col. 2000, Hardtke CS y Berleth T 1998, Scarpella E y col. 2006). Los brasinosteroides inducen la diferenciación del xilema en cultivos de *Zinnia* (Yamamoto R y col. 1997) y contribuyen al correcto patrón del cilindro vascular de la inflorescencia en *Arabidopsis* (Caño-Delgado A y col. 2010). Las citoquininas controlan la división celular en el tejido vascular (Matsumoto-Kitano M y col. 2008, Nieminen K y col. 2008) así como la diferenciación de las células provasculares en floema y metaxilema (revisado en Elo A y col. 2009, Mähönen AP y col. 2006).

Un enfoque que integre herramientas de biología molecular, celular, bioinformática y física, permitirá hacer análisis matemáticos del desarrollo y elaborar modelos computacionales para mejorar nuestra comprensión del complejo desarrollo vascular y de la evolución de las plantas vasculares (Grieneisen VA y col. 2009 y 2007; Perilli S y col. 2012); lo que será de gran ayuda a la hora de entender cómo las alteraciones del desarrollo del sistema vascular pueden provocar cambios en el sistema radicular de la planta (Caño-Delgado A y col. 2010).

Zona de Elongación y Zona de Diferenciación

A continuación de la zona meristemática se encuentran dos zonas bien diferenciadas: la zona de elongación y la de diferenciación. Al igual que en la zona meristemática, en estas zonas son esenciales la regulación del ciclo celular y el efecto y control de las fitohormonas, que influyen de manera importante en el desarrollo del sistema radicular. El conocimiento que hoy en día se tiene de estas interacciones queda resumido en la **Figura 12**. Las plantas con una zona meristemática pequeña presentan un crecimiento pequeño de la raíz. Esto implica que cada célula posee una capacidad de elongación definida, y que la deficiencia en el número de células

producidas en la zona meristemática no puede ser compensada con una elongación extra de las células existentes, en la zona de elongación (Bennett T y Scheres B, 2010). Este tipo de control del crecimiento de la raíz principal mediado por el tamaño o mantenimiento del meristemo son factores esenciales en el establecimiento de una AR determinada.

La señalización hormonal tiene una importante implicación en el control de la elongación celular en la raíz (revisión en Bennett T y Scheres B, 2010). Siempre se ha asociado a la auxina con la represión de la elongación celular de la raíz, excepto en muy bajas concentraciones. Esta inhibición forma parte de un sistema de crecimiento que permite a las raíces responder de manera flexible a estímulos como la gravedad. Cuando el estímulo es detectado por la RC, la auxina se redistribuye (mediante los transportadores PIN3 y PIN7), hacia un lado de la raíz. Como consecuencia, un lado de la zona de elongación acumula más auxina que el otro, provocándose así una elongación asimétrica que curva la raíz en dirección del vector gravitatorio (Fu X y col. 2003). Posiblemente, diferencias en la sensibilidad de la planta al vector gravitatorio sean determinantes a la hora de establecerse AR diferentes.

El etileno es otra hormona que inhibe la elongación de la raíz, debido al efecto que tiene en la síntesis de auxina. El etileno activa la expresión de genes de biosíntesis de auxina en la zona de la RC/QC, esta auxina extra es transportada apicalmente a la zona de elongación, donde provoca la inhibición del crecimiento de la raíz (Ruzicka K y col. 2007; Stepanova AN y col. 2007; Swarup R y col. 2007). Asimismo, la auxina promueve la síntesis de etileno en la zona de elongación, lo que incrementa la inhibición asimétrica de la elongación causada por auxina (Stepanova AN y col. 2007).

Las citoquininas también parecen regular negativamente la elongación en las células de la raíz, promoviendo la biosíntesis de etileno en la zona de elongación (Ruzicka K y col. 2009). Mientras por el contrario, las giberelinas promueven la elongación celular (Úbeda-Tomás S y col. 2008).

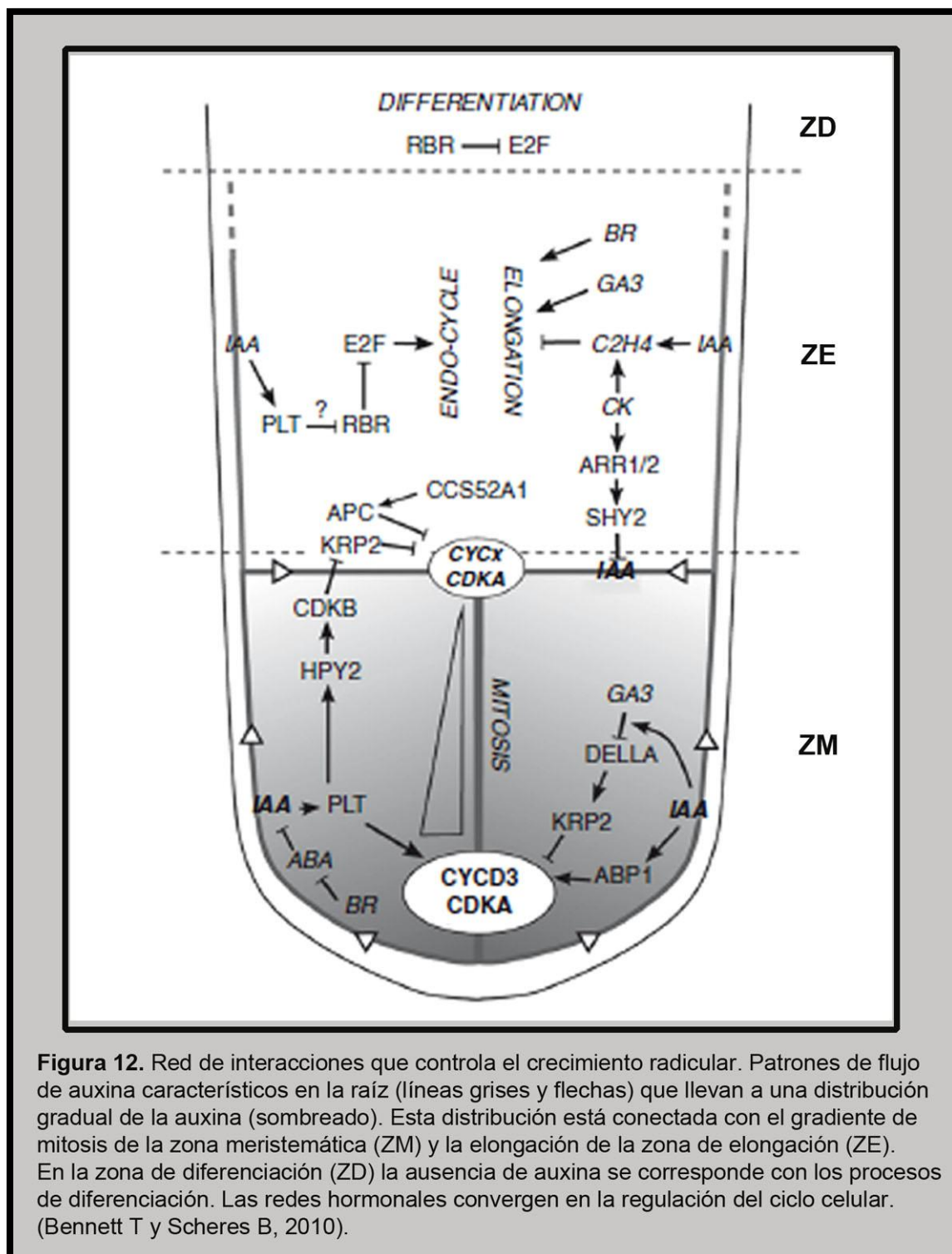


Figura 12. Red de interacciones que controla el crecimiento radicular. Patrones de flujo de auxina característicos en la raíz (líneas grises y flechas) que llevan a una distribución gradual de la auxina (sombreado). Esta distribución está conectada con el gradiente de mitosis de la zona meristémica (ZM) y la elongación de la zona de elongación (ZE). En la zona de diferenciación (ZD) la ausencia de auxina se corresponde con los procesos de diferenciación. Las redes hormonales convergen en la regulación del ciclo celular. (Bennett T y Scheres B, 2010).

Los brasinosteroides han sido bien caracterizados como reguladores de la expansión celular (Clouse SD y Sasse JM, 1998). Los mutantes en el gen *BRX*, que tienen niveles reducidos de brasinosteroides, tienen un tamaño celular en la raíz menor que el genotipo silvestre; las células de la zona de elongación continúan

elongando, pero en menor medida (Mouchel CF y col. 2004). Es probable que los brasinosteroides regulen la elongación celular en la raíz de manera dependiente de auxina, ya que *BRX* es inducible por esta hormona (Bennett T y Scheres B, 2010). Recientemente se ha hablado de una actividad antagonista de *BRX* y el circuito citoquinina-auxina en el control de la diferenciación celular (Scacchi E y col. 2010), evidenciando un escenario de regulación del control del crecimiento de la raíz aún más complejo (Perilli S y col. 2012).

Cuando las células alcanzan su tamaño final, empiezan a diferenciarse. Algunos procesos de diferenciación en la raíz, como el crecimiento de pelos radiculares (revisado en Cárdenas L, 2009), están relativamente bien caracterizados en *Arabidopsis*. Sin embargo, el mecanismo general por el cual las células entran en diferenciación celular, está aún muy poco caracterizado; aunque diferentes estudios parecen indicar que el control de la diferenciación, en sentido general, está también integrado dentro de la red general de regulación de la auxina que controla la actividad del meristemo de la raíz (Bennett T y Scheres B, 2010) (**Figura 12**).

Tenemos, por tanto, que la regulación hormonal juega un importante papel en la elongación de la raíz y en la diferenciación celular. Por consiguiente, el control de los gradientes de hormonas, su síntesis y la capacidad de la planta para percibirlos, modulan de manera efectiva la disposición espacial del sistema radicular.

Mutantes alterados en la formación y/o en el desarrollo de la raíz primaria

Debido a que durante el desarrollo del embrión quedan sentadas las bases para un correcto desarrollo posterior de la raíz principal, es importante prestar atención a las alteraciones que producen en el fenotipo de la planta las mutaciones en genes implicados en este desarrollo embrionario. Los mutantes que presentan un fenotipo de embrión defectuoso se denominan *emb* ("embryo-defective mutants"), y, por lo tanto, los genes afectados se llaman *EMB*, cuya función es esencial para la viabilidad de la semilla (Devic M, 2008). Existen un gran número de mutantes *emb*, más de 300 y unos 600 alelos. Los que se ven afectados en genes conocidos están reflejados en la base de datos www.seedgenes.org. En los últimos años se han hecho avances en la identificación de nuevos genes, pero existen muchos mutantes alterados en el desarrollo del embrión que todavía no han sido clonados (Meinke D y col. 2009). De entre todos los genes *EMB* identificados, los estudios indican que la mayoría de los genes *EMB* están implicados en los procesos de traducción proteica, como las

aminoacil-tRNA sintetasas, que participan en la traducción de proteínas en el citosol y orgánulos (Berg M y col. 2005). Asimismo los genes *EMB* participan en biogénesis y estructura de los ribosomas; procesamiento y modificación de ARN; modificaciones post-traduccionales de proteínas; y procesos metabólicos (síntesis y transporte de carbohidratos, aminoácidos, nucleótidos, coenzimas, lípidos y metabolitos secundarios).

Otras mutaciones que son letales para el desarrollo del embrión, son las implicadas en la ruta de represión de las proteínas PHABULOSA (PHB) y PHAVOLUTA (PHV) (proteínas del tipo HD-ZIP III). Estas proteínas participan en el desarrollo del tejido xilemático de la raíz, pero su papel principal es dirigir el desarrollo del meristemo apical del tallo y la polaridad lateral de los órganos aéreos de la planta. Por lo tanto, la represión de la ruta de desarrollo de la parte aérea es esencial para el correcto desarrollo de la raíz al participar esta ruta de represión en el establecimiento de la polaridad apical-basal y radial del embrión (Grigg SP y col. 2009).

Existen también una serie de mutantes afectados en el desarrollo embrionario y postembrionario que tienen alterado el desarrollo de la raíz principal, pero cuyas semillas son viables, como son *amp1* (Peer WA, 2009), *wol-1* (Mähönen AP y col. 2000), *wol-2* (García-Ponce de León B y col. 2004), *apl* (Bonke M y col. 2003), *ahp6* (Mähönen AP y col. 2006), y otros mencionados anteriormente como *mp*, *shr*, *scr*, *scz*. (revisado en Iyer- Pascuzzi AS y col. 2009b). La arquitectura radicular de estos mutantes se ve alterada por la modificación en el desarrollo de su raíz principal.

A pesar de todos estos resultados, aún queda por obtener mucha información acerca de los mecanismos moleculares que dirigen la formación y el desarrollo de la raíz primaria a nivel pre y postembrionario.

RAÍCES LATERALES Y ADVENTICIAS

Formación de raíces laterales y adventicias

Otro de los factores importantes en la arquitectura del sistema radicular, y que ha sido ampliamente estudiado, es la formación de raíces laterales. Las raíces laterales se forman como órganos totalmente nuevos a partir de divisiones en el periciclo maduro; se ha sugerido que determinadas células del periciclo están precondicionadas a hacerlo desde su origen en la zona meristemática. La auxina actúa en varios pasos durante la formación de la raíz lateral, incluyendo la especificación

inicial del nuevo primordio y su posterior desarrollo, lo que conduce a la formación y crecimiento de la raíz lateral siguiendo un patrón similar al de la raíz principal. Sin embargo, la proteína SHR, por ejemplo, muestra un patrón de expresión alrededor del primordio de la raíz lateral, lo que indica que esta proteína participa en el desarrollo de raíces laterales de manera diferente a cómo lo hace en la raíz primaria (Lucas M y col. 2011). Estudios recientes sugieren que la acumulación de auxina en determinadas células del periciclo es la responsable de la especificación, formación y crecimiento de la raíz lateral (Bennett T y Scheres B, 2010). Los brasinosteroides actúan sinérgicamente con la auxina para promover la formación de raíces laterales; favoreciendo el transporte acropétalo de la auxina en la raíz principal (desde la base de la raíz hasta el ápice), definiendo un nuevo mecanismo de interacción hormonal en plantas (Bao F y col. 2004)

Los mecanismos moleculares implicados en la formación de raíces adventicias son, al contrario de lo que sucede con las raíces laterales, prácticamente desconocidos. Estas raíces se forman a partir de tejidos diferenciados del tallo en vez de hacerlo a partir de otras raíces, normalmente en respuesta a estrés y esencialmente como un mecanismo de compensación ante la pérdida de actividad del meristemo radicular de la raíz principal, como sucede en el mutante *shr* (Lucas M y col. 2011). En algunas especies la formación de raíces adventicias sucede con un patrón de desarrollo predeterminado, y depende, al igual que en las laterales, de gradientes de concentración de auxinas (Sorin C y col. 2005). Sin embargo existen proteínas implicadas en el desarrollo de estas raíces, como los factores de transcripción de la familia LATERAL ORGAN BOUNDARIES (LOB), que no se habían relacionado antes con la formación del sistema radicular (Osmont KS y col. 2007).

3.2.- Factores exógenos

La raíz de la planta está relacionada con dos funciones vitales: el anclaje de su parte aérea al suelo y su aprovisionamiento de agua y nutrientes inorgánicos. Estos últimos no suelen estar homogéneamente distribuidos en el suelo, por lo que las plantas tienen que optimizar la exploración del sustrato adaptando el crecimiento de sus raíces. Otros factores ambientales que condicionan la dirección y la extensión del crecimiento de la raíz son la luz, la gravedad, el gradiente de agua en el suelo y la interacción con patógenos (Arnaud C y col. 2010).

Por lo tanto, las plantas han desarrollado la habilidad de sentir la gran variedad de factores que se dan en el ambiente que las rodea y usar esa información para dirigir cambios en la dirección de su crecimiento (tropismos) que condicionan la disposición del sistema radicular. Parece que el ápice de la raíz es un componente clave en los mecanismos de percepción y/o integración de las condiciones ambientales que rodean a la raíz de la planta (Monshausen GB y col. 2009).

Interacción con la rizosfera

Como ya se ha mencionado al principio de la introducción, en la naturaleza se dan interacciones de las plantas con otros organismos, en las cuales la planta aporta al microorganismo una serie de nutrientes que necesita para vivir, recibiendo a cambio otros que los microorganismos han movilizado haciéndolos más fácilmente asimilables para la planta.

La raíz es el órgano en el que se produce esta interacción con la rizosfera, a través de unas células que se desprenden de la "root cap" (RC) y que tienen la capacidad de producir varias sustancias químicas que alteran drásticamente la relación de la planta con la microflora del suelo. Producen, por ejemplo, compuestos que atraen e inmovilizan a los nemátodos y otros que impiden o estimulan el acercamiento de bacterias (revisado en Hawes MC y col. 2000; Wen F y col. 2009). En las plántulas de *Arabidopsis* se secreta un polisacárido de la pared celular que favorece la interacción de la raíz con rizobacterias (Vicré M y col. 2005). También las secreciones que tienen lugar en el ápice de la raíz son muy importantes en la protección de la planta frente a infecciones (Wen F y col. 2007; Wen F y col. 2009).

Según sea la naturaleza de estas interacciones, se pueden producir alteraciones del sistema radicular, como por ejemplo el caso de los nódulos que fijan nitrógeno atmosférico (interacción entre bacterias y leguminosas; Schultze M y Kondorosi A, 1998; Marquez AJ y col. 2005) o las micorrizas (interacción que se desarrolla entre las raíces de una planta y un hongo; Strack D y col. 2003). Estas interacciones modifican la disposición y la morfología de la raíz y son determinantes para el establecimiento de la AR definitiva de la planta.

Gravitropismo, movimientos de la raíz y fototropismo

Las raíces de las plantas poseen una gran plasticidad. En presencia de obstáculos, son capaces de evitarlos mediante torsiones que dan lugar a cambios en

la dirección del crecimiento (Migliaccio F y col. 2009). Esta capacidad de la raíz le permite reconocer y colonizar el sustrato de manera más eficaz.

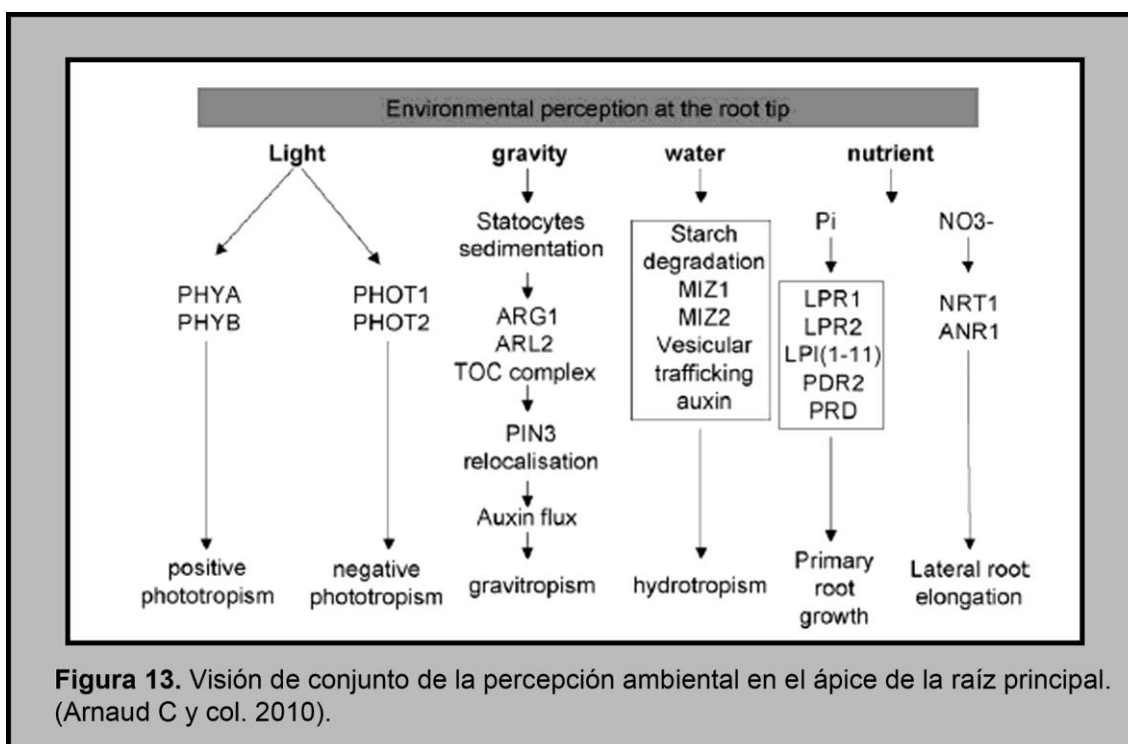
Las respuestas de cambios en la dirección del crecimiento de la raíz principal se basan en la combinación de varios procesos: la circumnutación, el gravitropismo y el tigmotropismo. La circumnutación es la torsión de la raíz principal sobre el eje de dirección del crecimiento. El gravitropismo es el proceso por el cual las raíces de las plantas crecen en la dirección del vector gravitatorio (gravitropismo positivo). El tigmotropismo se refiere al movimiento característico que realizan las plantas trepadoras al enrollarse sobre un soporte (tigmotropismo positivo), en el caso de las raíces de las plantas es el movimiento que ocurre como medida de evitar obstáculos (tigmotropismo negativo) (Migliaccio F y col. 2009). Todos los movimientos de la raíz se producen por la suma de los procesos de circumnutación, gravitropismo positivo y tigmotropismo negativo en las células del ápice de la raíz. Estas tres respuestas participan de forma coordinada en los cambios de dirección del crecimiento de la raíz en respuesta a la presencia de un obstáculo en el terreno, que desencadena la respuesta de giro con el fin de esquivarlo (Braam J, 2005).

Para que se produzca la respuesta a la gravedad, la planta debe ser capaz, primero, de percibirla y, posteriormente, de convertir esta fuerza en una señal química que sea capaz de influir sobre el patrón de crecimiento del órgano que está respondiendo a la gravedad (revisión en Stanga J y col. 2009). En la raíz de *Arabidopsis* hay una separación espacial entre el sitio donde se percibe la gravedad en un primer momento y se da la transducción temprana de la señal, que es el ápice de la raíz (en la RC); y la zona de la raíz que responde al estímulo curvándose, la zona de elongación distal (ZED). Esto hace que la respuesta a la gravedad de la raíz de *Arabidopsis* sea un modelo ideal para estudiar separadamente las fases más tempranas de las fases tardías (Perrin R y col. 2005).

La percepción de la gravedad ocurre en primer lugar en los estatocitos, las células de la columela de la raíz. Los estatocitos se caracterizan por tener amiloplastos rellenos de almidón. Los amiloplastos son más densos que el citoplasma que les rodea, y tienden a sedimentar en la parte basal de los estatocitos. La posición y/o el movimiento de los amiloplastos contribuyen a la formación de la señal química, que es entonces transmitida de manera basipétala hacia la ZED, donde se produce la respuesta de curvatura de la raíz. (**Figura 13**). El papel del almidón en este proceso ha

sido demostrado mediante el uso de mutantes alterados en su síntesis y acumulación (Caspar T y col. 1989; Vitha S y col. 2000).

La fitohormona auxina juega un papel importante en la transmisión de la señal desde la RC hasta la ZED y en las modificaciones en el crecimiento de la raíz inducidas por los cambios de la posición de la raíz respecto al vector gravitropico. En una raíz que está creciendo verticalmente, la auxina se transporta desde su sitio de síntesis (la parte aérea) hasta la RC, donde se distribuye lateralmente y, posteriormente, se transmite de manera basipétala a las células en crecimiento de la zona de elongación (Trewavas A, 1992). De acuerdo con la teoría de Cholodny-Went, en una raíz graviestimulada se establecerá un gradiente de auxina lateral en la RC, con el lado que queda hacia el interior del giro (ya que la raíz gira para colocarse de nuevo hacia el vector gravitatorio) acumulando mayores cantidades de auxina, mientras que en la zona exterior del giro, se acumula una menor concentración de hormona. Este gradiente diferencial de auxina es transmitido a la zona de elongación distal donde se promueve la elongación celular de manera diferente en ambos lados (donde hay mayor concentración de auxina se inhibe la elongación celular, mientras que en la zona exterior se activa), lo que conduce a la curvatura de la raíz en el sentido de la fuerza de la gravedad.



Abundantes evidencias experimentales y genéticas soportan la teoría de Cholodny-Went (Muday G y col. 2008; Rashotte, AM y col. 2000; Boonsirichai K y col. 2003; Ottenschlager I y col. 2003; Lewis D y col. 2007; Harrison B y col. 2008). Entre estos estudios hay uno en el que se implica a la proteína PIN3 (proteína transportadora de auxina) en la respuesta gravitrópica. PIN3 se expresa uniformemente en la membrana plasmática de los estatocitos de raíces que crecen verticalmente. En los estatocitos de la RC, la graviestimulación provoca que PIN3 se recolocque hacia la zona de la membrana plasmática más cercana al sentido del vector gravitatorio, hacia la parte interior del giro de la raíz, en tan solo dos minutos. Se cree que esta relocalización promueve el establecimiento del gradiente lateral de auxina mencionado anteriormente (Friml J y col. 2005).

El mecanismo que convierte la fuerza de la gravedad en una señal bioquímica es aún desconocido (Stanga J y col. 2009) pero, de acuerdo con Leitz G y col., la forma de sentir la gravedad resulta de la conversión de la energía gravitacional en una señal bioquímica por medio de la sedimentación de los estatolitos que desplazan el citosol y deforman las membranas del retículo endoplasmático (RE), y de la rápida liberación de energía cinética proveniente de este fenómeno que activa sitios mecanosensibles de las células de la columela (Leitz G y col. 2009).

Hay otras fitohormonas que también participan en el gravitropismo, como son etileno, brasinosteroides, ácido abscísico giberelinas, ácido salícico y jasmonico (Muday y col. 2008). La hormona brasinosteroides aumenta la respuesta a la gravedad mediada por auxina (Kim S y col. 2000; Li L y col. 2005). Por tanto, un correcto funcionamiento del transporte de auxina, así como de la ruta de señalización de esta hormona y su comunicación con la ruta de señalización de brasinosteroides, supone en la raíz de la planta una correcta percepción de la gravedad y, por consiguiente, una correcta disposición del sistema radicular. Otra fitohormona, la citoquinina, es capaz de inducir la curvatura de la raíz cuando se aplica de manera exógena, pero no existen evidencias genéticas de la participación de esta hormona en la respuesta gravitrópica (Aloni R y col. 2004).

Los mecanismos implicados en la respuesta tigmotrópica que sucede como respuesta al estímulo mecánico son poco conocidos. Esta respuesta se puede observar cuando una planta de *Arabidopsis thaliana* se siembra sobre una placa de medio impenetrable por la raíz, y se dispone esta placa con un ángulo de inclinación de 45° respecto a la horizontal. La raíz principal de la planta comienza a crecer en

forma de ondas, ya que el meristemo radicular choca con la superficie del agar hacia un lado y otro y esto obliga a la raíz a cambiar alternativamente su dirección de crecimiento. Se sabe que en *Arabidopsis*, los genes implicados en la respuesta a choque son los denominados *TCH* (“touch-induced”), que se descubrieron al observar los genes que se estimulaban en las plantas al ser estas perturbadas por choque o por el viento (Braam J y Davis RW, 1990; Braam J, 2000). Pero la expresión de los genes *TCH* no está regulada solamente por estímulos mecánicos, sino que también intervienen una amplia variedad de estímulos mediambientales, hormonales y del desarrollo (Braam J y Davis RW, 1990; Braam J, 1992; revisión en Braam J y col. 1997; Sistrunk ML y col. 1994; Antosiewicz DM y col. 1995; Xu W y col. 1995; Polisensky DH y Braam J, 1996; Lee D y col. 2005). El análisis del perfil transcriptómico en respuesta a choque ha permitido identificar nuevos genes que podrían participar en esta respuesta. Así por ejemplo, se ha determinado que en respuesta a choque se activan genes que intervienen en la fijación del calcio; genes reguladores, como proteínas kinasa y factores de transcripción; o proteínas implicadas en la modificación de la pared celular o en la resistencia a patógenos (Lee D y col. 2005). Otro grupo de genes de *Arabidopsis* implicados en el crecimiento de la raíz en presencia de obstáculos son *MLO4* y *MLO11* (*MILDEW RESISTANCE LOCUS O 4 y 11*). Estos genes codifican para proteínas de membrana que se expresan predominantemente en el ápice de la raíz. Los mutantes en estos genes presentan un fenotipo exagerado de giro y el transporte de auxina se ve alterado en el ápice de la raíz, lo que indica nuevamente la participación del establecimiento de gradientes de auxina, y que tanto *MLO4* como *MLO11* actúan conjuntamente como moduladores del movimiento de la raíz inducido por choque (Chen Z y col. 2009). Recientemente se ha determinado que las torsiones de la raíz inducidas mecánicamente o en respuesta a choque, provocan la formación de raíces laterales en la zona exterior de la curvatura lo que sugiere que la respuesta a choque juega un papel importante en la alteración de la configuración del sistema radicular (Ditengou FA y col. 2008)

Por otro lado, los mecanismos implicados en la circumnutación son desconocidos, aunque aproximaciones genéticas indican que el citoesqueleto participa de forma activa en este movimiento (Massa GD y Gilroy S, 2003).

El fototropismo, o movimiento de la raíz en respuesta a un estímulo lumínico, es otra de las respuestas de crecimiento de la planta (Arnaud C y col. 2010). No se conoce bien la importancia fisiológica y ecológica de este tropismo, pero se ha

propuesto que reduce la exposición a la desecación al promover el crecimiento de la raíz hacia las capas profundas del suelo nada más producirse la germinación (Galen C, 2007). Al tener efectos asociados al gravitropismo, es difícil analizar por separado sus papeles específicos, y en qué medida cada una de estas respuestas influye en el desarrollo del sistema radicular y, por tanto, en la AR. Sin embargo, mutantes deficientes en la respuesta gravitrópica han permitido la identificación de elementos específicos de la respuesta a luz (revisado en Correll MJ y col. 2002). En la raíz de *Arabidopsis*, la luz azul es percibida por PHOT1 y PHOT2, dos fototropinas que median el fototropismo negativo (Liscum E y col. 1995; Briggs WR y col. 2002) (**Figura 13**). Recientemente se ha publicado un estudio sobre una respuesta fototrópica positiva mediada por PHYA y PHYB (fitocromos), y esta respuesta interfiere con la respuesta a la gravedad (Correll MJ y col. 2005). Parece ser que la fitocromo kinasa PKS1 (Lariguet P y col. 2006; Fankhauser C y col. 1999) proporciona un enlace complejo entre fototropismo y gravitropismo (Boccalandro HE y col. 2008), lo que la convertiría en una proteína importante a la hora de determinar la capacidad de respuesta de la raíz frente a estos factores exógenos que influyen en el desarrollo del sistema radicular.

Hidrotropismo

Las raíces de la planta tienen la habilidad de sentir y crecer hacia las zonas de mejor disponibilidad de agua (hidrotropismo positivo), lo que determina su disposición espacial (Takahashi H y col. 1997). Como en el caso del fototropismo, la respuesta a la gravedad interfiere con el hidrotropismo. El gradiente de humedad y la fuerza de gravedad son ambos detectados en el ápice de la raíz y disparan una respuesta de crecimiento en la zona de elongación (Monshausen GB y col. 2009; Arnaud C y col. 2010). La cantidad de almidón que contienen las células llamadas estatocitos disminuye durante la respuesta hidrotrópica, lo que reduce la respuesta gravitrópica (Takahashi N y col. 2003) (**Figura 13**). El mutante *nhr1* de *Arabidopsis* que contiene amiloplastos muy grandes en la RC, presenta hidrotropismo negativo y una rápida respuesta positiva a la gravedad (Eapen D y col. 2003). Una hipótesis propuesta es que la degradación del almidón podría estar dirigida por el estrés osmótico, así, estos amiloplastos tan grandes funcionarían como una reserva de azúcares que se liberarían durante el estrés producido por la falta de agua (Ponce G y col. 2008).

Dos genes han sido relacionados con la respuesta de la planta al gradiente de humedad, *MIZ1* y *MIZ2* (codifican para proteínas con un dominio MIZ). El estudio de

mutantes para estos genes indica que el hidrotropismo está relacionado con el fototropismo (Kobayashi A y col. 2007). El gen *MIZ2* es el gen *GNOM* (factor de transporte asociado a la membrana, dependiente de GDP/GTP, implicado en transporte de vesículas), lo que sugiere que el tráfico de vesículas es crucial para el hidrotropismo en la raíz (Geldner N y col. 2003; Miyazawa Y y col. 2009) (**Figura 7**).

El papel de las hormonas en el hidrotropismo es complejo. ABA actúa como un regulador crítico de las respuestas trópicas y juega un importante papel en la acumulación del almidón (Ponce G y col. 2008). El uso de drogas en algunos experimentos revela que el flujo de auxinas hacia el interior o el exterior celular no tiene efectos en la respuesta al gradiente de humedad, sin embargo la aplicación de un inhibidor de la respuesta a auxina, reduce la curvatura de la raíz a la mitad en respuesta a este gradiente (Kaneyasu T y col. 2007). Esto revela un nuevo papel de la auxina en el hidrotropismo, a través de su propia respuesta y no a través de su transporte polar, y vuelve a poner de manifiesto el papel preponderante de la auxina en el desarrollo del sistema radicular.

Presencia de nutrientes

Las plantas tienen la habilidad de sentir y adaptar la arquitectura de su raíz a la disponibilidad de nutrientes en su medio de crecimiento (revisión en Lopez-Bucio J y col. 2003). Dos de los principales nutrientes determinantes en el desarrollo del sistema radicular de la planta son el fosfato y el nitrato.

En condiciones de ayuno de fosfato, la raíz primaria paraliza su crecimiento y se activa el desarrollo de numerosas raíces laterales (Ticconi CA y col. 2004a; Desnos T y col. 2008). Para que se dé este fenotipo es necesario que el ápice de la raíz esté en contacto con el medio de bajo fosfato. Esta observación demuestra que, primero, lo que dirige esta respuesta no es un estado de bajo fosfato en toda la raíz (Svistonoff S y col. 2007); y segundo, que el ápice de la raíz juega un papel específico en este fenómeno (Arnaud C y col. 2010). Muchos de los elementos de esta ruta de señalización han sido identificados mediante rastreo de mutantes insensibles (*lp*) (Sanchez-Calderón L y col. 2006) e hipersensibles (*pdr2*) (Ticconi CA y col. 2004b) a medios con bajo fosfato. Un análisis genético cuantitativo basado en la variación natural presente entre dos ecotipos de *Arabidopsis*, ha dado como resultado la identificación de un QTL, *LPR1*, que controla el tamaño de la raíz principal en respuesta a ayuno de fosfato. Parece que la RC es el lugar requerido para que se

dispare la respuesta de crecimiento a bajo fosfato (Reymond M y col. 2006). Otra evidencia que demuestra esto es que mutantes en el gen *PRD* (AINTEGUMENTA-like gene) que se expresa en el ápice de la raíz, exhiben una leve reducción en el desarrollo de la raíz primaria y las laterales durante el ayuno de fosfato, lo que sugiere que este gen participa en la regulación de la arquitectura radicular en respuesta al ayuno de fosfato controlando la elongación de la raíz primaria y de las raíces laterales (Camacho-Cristóbal JJ y col. 2008; Svistoonoff S y col. 2007).

Parece que el ápice de la raíz también esté implicado en la respuesta de la arquitectura radicular al nitrato (Zhang HM y col. 1999; revisión en Forde BG, 2009). El principal efecto en el sistema radicular de la planta es la estimulación local del crecimiento de raíces laterales cuando hay bajos niveles de nitrato en el medio, mientras que a altas concentraciones se inhibe su formación (**Figura 13**). Esta ruta de respuesta cuenta con la acción de ANR1 (ARABIDOPSIS NO₃-INDUCIBLE), un factor de transcripción del tipo MADS (Zhang HM y col. 1998); y con el transportador de nitrato NRT1.1 (CHL1). Se han encontrado mutantes en CHL1 que muestran una actividad desacoplada de su papel como transportador y sensor de nitrato, lo que indica que esta proteína posee una función dual de recepción y transmisión de la señal, actuando por tanto como un transceptor (Ho CH y col. 2009).

Se ha encontrado un mutante de *Arabidopsis*, *arn*, para el gen *CTL1* ("chitinase-like 1") cuyo fenotipo es muy similar a las plantas silvestres cuando crecen en bajas o moderadas concentraciones de nitrato. Sin embargo, en altas concentraciones de nitrato el mutante exhibe una reducción de la elongación de la raíz primaria y un incremento del número de raíces laterales y de la densidad de los pelos radiculares, en comparación con las plantas control. Parece por lo tanto que esta proteína tiene un doble efecto, por un lado en el crecimiento, basándose en el efecto constitutivo que la mutación *arn* tiene en el crecimiento de la raíz primaria; y por otro en el desarrollo de la planta, mediante el impacto que las diferentes concentraciones de nitrato tienen en la arquitectura radicular (Hermans C y col. 2010).

Algunos autores sugieren que entender cómo las plantas interaccionan con los cambios en su ambiente, requiere una perspectiva espaciotemporal. Mientras la genética y la fisiología clásica han puesto los cimientos de nuestro conocimiento sobre las respuestas ambientales de las plantas, la biología celular y del desarrollo, con imágenes en vivo y análisis específicos de tipos celulares (imágenes en directo de plantas expresando marcadores y datos de la expresión génica espaciotemporal), nos

dejarán entrever lo compleja e interesante que es esta respuesta. La mayoría de los estudios sobre la respuesta de las plantas al ambiente se han centrado en los eventos que ocurren después de la percepción del estímulo, y el desafío actual es entender cómo ese estímulo es percibido por la planta (Wee CH y col. 2010).

4. Dificultad del estudio del desarrollo del sistema radicular

A pesar de la importancia del sistema radicular, se conoce muy poco acerca de su disposición real en el sustrato y de los genes implicados en el control de su desarrollo. Un sistema radicular es difícil de observar en tiempo real, de cuantificar e interpretar. Las raíces están constituidas por muchos ejes que varían en morfología, fisiología y desarrollo, y es muy difícil establecer las herramientas analíticas cuantitativas que permitan diseñar modelos en un sistema tan complejo, como para hacer predicciones.

Las primeras estrategias de estudio de cuantificación de la AR se han basado en la geometría fractal. Esta teoría se centra en la consideración de unidades mínimas de estudio que se van repitiendo en un sistema un número indeterminado de veces. Así, la raíz se considera la suma de unidades similares en complejidad que se repiten en todas las direcciones y se ramifican, para dar lugar a la AR definitiva de la planta (Nielsen KL y col. 1997). Sin embargo, aunque podamos considerar el sistema radicular como una consecuencia de patrones predefinidos y repetitivos, no son nunca modelos estables, sino sistemas dinámicos cuya disposición, como hemos visto a lo largo de esta introducción, depende de una serie de factores internos y externos a la planta. Por lo tanto, un estudio tan estático como este, que propone una repetición de patrones para establecer y estudiar una AR, no es suficiente ni, mucho menos, algo cercano a la realidad de un sistema radicular. Se hacen necesarios estudios que permitan estudiar y, de alguna manera, establecer modelos que nos permitan predecir el dinamismo del desarrollo radicular de la planta.

En los últimos años se han desarrollado técnicas de imagen no invasivas como, por ejemplo, la tomografía computacional. Esta herramienta de análisis permite efectuar medidas continuas en el tiempo a alta resolución mediante la monitorización de las raíces en 3D calculando a su vez el contenido de agua y material del suelo (Gregory PJ y col. 2003; Van As H, 2007; Lucas M y col. 2011). Esta tecnología aporta datos dinámicos, estructurales y funcionales de la disposición de las raíces en el sustrato y es un método de estudio apropiado para el análisis de las respuestas

morfológicas de las raíces a la heterogeneidad del sustrato, ya que tiene en cuenta las interacciones de la raíz con el suelo (de Dorlodot S y col. 2007). Sin embargo, una de las limitaciones principales de la tomografía para la identificación de genes relevantes en el establecimiento de la AR, es el tiempo que se tarda en la adquisición de las imágenes (de una a varias horas en función del volumen de suelo y de la resolución). Estas limitaciones se salvan utilizando sistemas de imágenes en 2D tomadas por absorción de rayos X (Pierret A y col. 2003) y transmisión de la luz (Garrigues E y col. 2006).

En 2010 Iyer-Pascuzzi AS y col. han desarrollado, en plantas de arroz, un sistema de toma de imágenes y análisis posterior de los datos no invasivo. Este sistema permite la observación del crecimiento de las raíces en tres dimensiones sin restricciones, por lo menos durante 2 semanas. Las plantas se crecen en unos cilindros transparentes llenos de medio nutritivo cuyo agente solidificante es la "goma gellan". Este compuesto es un polisacárido de origen natural, producido por la bacteria *Pseudomonas* a partir del almidón. Se van tomando fotografías diarias de cada planta desde 20 ángulos, y después de procesadas se puede reconstruir una estructura tridimensional a partir de imágenes en 2D (Iyer-Pascuzzi AS y col. 2010)

Además de estas técnicas de estudio, en una publicación reciente se explica la utilidad de un nuevo programa llamado EZ-Rhizo (<http://EZ-Rhizo.psrg.org.uk>) que combina la adquisición no invasiva de imágenes con un nuevo programa que mide múltiples parámetros de la AR y almacena y analiza los datos (Armengaud P, 2009). Es por lo tanto, adecuado para la descripción fenotípica de las distintas especies de plantas y mutantes crecidos bajo diferentes condiciones nutricionales y ambientales. En su primera versión, la principal limitación de EZ-Rhizo es la complejidad del sistema radicular mismo: intersecciones de raíces, raíces que crecen demasiado cerca unas de otras, etc. Para superar estos problemas, el desarrollo futuro del software se basa en algoritmos de aprendizaje de la máquina que le ayuden a integrar espacial y temporalmente la "historia" de las características de la raíz. Por ahora, la disponibilidad de dicho programa abre una nueva perspectiva en el estudio del desarrollo del sistema radicular y de la predicción del rendimiento de las plantas según su AR y el ambiente en el que crezcan o sean cultivadas.

En plantas herbáceas, como *Arabidopsis*, la visualización del sistema radicular es posible cuando se crecen las plantas en placas verticales con un sustrato con una dureza tal que impide la penetración de la raíz en el mismo. En estas condiciones se

pueden visualizar y diferenciar ARs alteradas, lo que permite estudiar los genes implicados en esos procesos.

En un aspecto no tan técnico del estudio de la AR, tenemos que durante el proceso de domesticación de las plantas se han producido cambios en la disposición espacial de sus raíces (Beebe SE y col. 2006; Chloupek O y col. 2006; Kato Y y col. 2006; Sanguineti MC y col. 2006; Yue B y col. 2006). La búsqueda de los QTLs responsables de estos cambios ha sido la vía de estudio de los genes responsables de esa variación genética. Hasta ahora las especies que más se han estudiado son *Oryza sativa* (arroz) y *Zea mays* (maíz), aunque existen otras 15 que incluyen *Arabidopsis* y tres especies de árboles. Asimismo, existen una serie de ejemplos que explican el 30% de la variación fenotípica, pero la mayoría de los cambios en la disposición del sistema radicular se deben a la adición de varios QTLs de efecto menor que interaccionan con el medio ambiente (de Dorlodot S y col. 2007).

En la actualidad aún se conoce muy poco acerca de los mecanismos implicados en el desarrollo del sistema radicular. Los factores que controlan tanto los patrones predeterminados genéticamente como los adaptativos a las condiciones del suelo siguen sin estar totalmente explicados. En muchos casos los resultados obtenidos se han basado en aproximaciones indirectas. En esta tesis abordamos la identificación de mutantes alterados en la disposición espacial y la morfología del sistema radicular con el fin de identificar genes implicados en este proceso de desarrollo, de gran importancia agronómica.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo general contribuir a la caracterización de mutantes alterados en el desarrollo del sistema radicular en *Arabidopsis thaliana*.

Para lograrlo se han abordado los siguientes objetivos específicos:

- ∞ Caracterización genética y molecular de dos mutantes obtenidos del rastreo de una población de semillas mutagenizada por EMS, cuyo sistema radicular está alterado en la disposición y el crecimiento.
- ∞ Caracterización fenotípica, de respuesta a hormonas y mediante análisis de microscopía confocal de los mutantes seleccionados.
- ∞ Localización e identificación de la mutación causante del fenotipo de raíz corta en el mutante *raw2* mediante paseo cromosómico.
- ∞ Análisis transcriptómico del mutante *act2-5*
- ∞ Búsqueda de mutaciones supresoras del fenotipo *act2-5* de alteración en la respuesta a tropismos, mediante el rastreo de una población de semillas mutagenizadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Plásmidos

pGWB2, plásmido binario

pDONOR207 (Invitrogen), plásmido con origen de replicación para *E.coli*

2. Cepas de bacterias

***Escherichia coli*, cepa DH5 α** (Woodcock DM y col. 1989).

***Agrobacterium tumefaciens* C58C1** (Yanofsky MF y Nester EW, 1986).

3. Material vegetal

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. Ecotipos Columbia-0 (Col) y Landsberg erecta (Ler).

Colección de semillas mutagenizadas con EMS (metanosulfonato de etilo) de LEHLE (www.arabidopsis.com), de la que proceden los mutantes *athrs1-1* y *act2-5*.

Semillas con la mutación *act2-5* mutagenizadas con EMS, de las que proceden los mutantes supresores del fenotipo *act2-5*.

Líneas marcadoras PIN2-GFP (Müller A y col. 1998), **ABD2-GFP** (Wang YS y col. 2008), **DR5-GUS** (de Smet I y col. 2007).

MÉTODOS

1. Cultivo de cepas bacterianas

El crecimiento de las estirpes bacterianas se realizó utilizando medio líquido Luria-Bertani (LB), (Sambrook J y col. 1989). El medio sólido se obtuvo añadiendo al medio LB líquido un 15% de Bactoagar (Disco).

Para poder seleccionar las cepas bacterianas se usaron los antibióticos correspondientes según el caso, suplementando el medio con concentraciones finales de: 100 µg/mL de Ampicilina, 50 µg/mL de Kanamicina, 50 µg/mL de Rifampicina y 50 µg/mL de Espectinomicina. El crecimiento de las bacterias se realizó en una cámara en el caso de placas sólidas y en un agitador a 200 r.p.m. cuando el cultivo era líquido. La temperatura de crecimiento fue 37°C para *E.coli* y 28°C para *A.tumefaciens*. La conservación se consiguió a -80°C con el uso de glicerol al 50% sobre el cultivo líquido, obteniendo un congelado al 15% de glicerol.

2. Cultivo de plantas

2.1. Cultivo *in vitro* de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* necesitan pasar por un período de estratificación en frío (a 4°C) para que puedan germinar, por esta razón la esterilización de las semillas se realizó tres días antes de que fueran sembradas en las placas para su cultivo en las cámaras. La esterilización se efectuó con una solución de lejía al 75% y Tween-20 (Sigma) al 0,01% durante 5 minutos y con agitación; posteriormente se realizaron tres lavados consecutivos con agua MiliQ estéril y, por último, se añadió agua MiliQ estéril y se pusieron las semillas en una cámara de 4°C en oscuridad.

Se empleó el medio de Murashige y Skoog (MS, Duchefa) al 0,5X y con 5 gr/L de sacarosa. En el caso del mutante *act2-5*, se usó un medio MS bajo en nitrato (MSBN) con MS al 1x, 5gr/L de sacarosa, 0,5gr/L de MES (Sigma) y 1mM de KNO₃, (en lugar de 17mM que lleva el MS); este medio no contiene NH₄NO₃. El pH se ajustó a 5.6 con KOH (Merck). Como agente solidificante se usó bactoagar al 1% para placas dispuestas en un soporte vertical con un ángulo de 90° respecto a la horizontal, y al 0,6% para placas horizontales. Para la observación del desarrollo del sistema radicular, se sembraron 70 semillas por placa manteniendo entre ellas una distancia

de 2 cm, intercalándolas de tal forma que se evitase el solapamiento de las raíces. Para los experimentos de medida del ángulo de crecimiento de la raíz en respuesta al cambio del vector gravitatorio, las placas se llenaron con 40mL de medio, se dejó secar y a continuación se sembraron las semillas. Pasados unos minutos se vertió con cuidado otros 40mL de medio, hasta llenar la placa. De esta manera las plantas germinaron y crecieron en medio de dos capas de medio, evitando así la ondulación de la raíz propia del mutante *act2-5* y permitiendo una fácil medición del ángulo de giro en respuesta a la gravedad.

Cuando los medios todavía estaban calientes fueron suplementados, antes de distribuirlos en las placas, con los distintos reactivos usados en los experimentos: 24-epibrasinolide (EBL) a 5 y 10 nM para experimentos de visualización del fenotipo de raíz en respuesta al tratamiento con la hormona, en experimentos de graviestimulación y en la visualización de inicio y cuantificación de raíces laterales; y en concentración de 1 μ M durante 30 minutos en los estudios de expresión génica. Se suplementaron con ácido Indolacético (IAA) en concentración de 1 μ M en experimentos de raíces laterales. Y fue usada una combinación de ambos tratamientos, IAA y EBL, también en el caso de raíces laterales. Se usó también IAA a concentración 1 μ M en tratamientos de 30 minutos, o también una combinación de IAA y EBL (concentración 1 μ M de cada hormona, durante 30 minutos) en los experimentos de expresión génica.

Las condiciones de cultivo fueron 22 °C, 60% de humedad relativa y 8000 lux de intensidad lumínica, con luz fluorescente mixta blanca/roja y un fotoperiodo de 16 horas de iluminación y 8 de oscuridad.

Para los experimentos de observación de citoesqueleto y distribución de la proteína PIN2 (PIN-FORMED2), se crecieron las plantas en medio MSBN sólido vertical y, después de 4 y 5 días respectivamente, se pasaron a medio MSBN líquido (al 0,5X, con 5 gr/L de sacarosa y pH 5.6) en placas de pocillos (Nunc). Así se pudo separar plántulas que se usarían como control, creciendo en medio sin suplementar, de plántulas que recibieron el tratamiento: medio suplementado con 5nM EBL durante 1 hora. Durante el tiempo que duró este tratamiento, las placas con las plántulas se mantenían en las condiciones de cultivo citadas anteriormente pero en agitación.

2.2. Cultivo en tierra de *Arabidopsis thaliana*

Las plántulas crecidas en placa, se recuperaron de cultivo “in vitro” y se dispusieron en macetas humedecidas que contenían una mezcla 3:1 de sustrato

universal (Brill) y vermiculita. En el caso de las semillas, se sembraron directamente en maceta con esta misma mezcla de sustrato y vermiculita, procediendo a la estratificación posterior a la siembra en una cámara de 4°C y en oscuridad durante tres días.

Las condiciones de cultivo fueron de 22°C y luz blanca, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, tanto en invernadero como en cámaras climáticas (Fitotron y Conviron).

Las plantas crecidas de esta forma sirvieron como fuente de semilleros cuando estaban secas, como material para extraer ácido desoxirribonucleico (ADN) y para visualizar fenotipos en planta adulta, para ser transformadas con los plásmidos de interés y como plantas donadoras o receptoras de polen cuando se efectuó un cruzamiento dirigido en una fase del desarrollo de la planta tardía, cuando ya tenía las primeras silicuas. También se recogieron silicuas de distintas edades de plantas Col y *athrs1-1* para observación directa de los embriones. Se colocaron las silicuas en portaobjetos, se abrieron con ayuda de una aguja y se observaron y a la lupa.

Las líneas de proteína verde fluorescente (GFP) para las construcciones PIN2-GFP (*act2-5*) y ABD2-GFP (*act2-5*) se obtuvieron mediante el cruce del mutante *act2-5* con las líneas PIN2 (Col) y ABD2-GFP (Col), y seleccionando en la segregación F2 las plantas con fenotipo mutante y homocigotas para las construcciones PIN-GFP y ABD2-GFP (mediante siembra en placa con medio suplementado con el antibiótico de resistencia, Kanamicina en este caso).

3. Métodos de transformación

3.1. Transformación de *Escherichia coli*

Para la complementación del mutante *athrs1-1*, las células competentes de *E.coli* se obtuvieron y transformaron según Inoue H y col. (1990). Las células se sembraron sobre placas de medio LB con el antibiótico de selección del plásmido.

3.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para transformar *A. tumefaciens* se siguió el protocolo de An y col. (1988), para la complementación del mutante. Las células se sembraron en placas de LB con Rifampicina para seleccionar colonias de *Agrobacterium* y el/los antibiótico/s necesarios de selección para los plásmidos transformados.

3.3. Transformación de *Arabidopsis thaliana*

Las plantas de *Arabidopsis* crecidas en tierra durante tres semanas se transformaron con la cepa de *A.tumefaciens* portadora del plásmido con el ADN que se quería introducir en el genoma de la planta. Se utilizó el método de inmersión floral con una suspensión de *A.tumefaciens* en medio MS suplementado con 5% sacarosa, 11ng/mL de bencil amino purina (BAP) y 0,02% de “Silwet L-77” (Bechtold N y Pelletier G, 1998).

4. Tecnología de ácidos nucleicos

Los protocolos descritos por Sambrook J y col. 1989, han sido empleados de forma mayoritaria para el tratamiento de extracción y análisis de las muestras de ADN, excepto cuando se han utilizado preparados o reactivos comerciales, en los que se ha seguido el protocolo especificado por el fabricante.

4.1. Aislamiento y purificación de ADN

El ADN plasmídico de las bacterias se obtuvo con Qiaprep Spin Miniprep Kit o bien con Qiaprep HiSpeed Midi Kit en el caso de cultivos más voluminosos, ambos de Qiagen.

Para purificar fragmentos de ADN digeridos con enzimas de restricción, fragmentos resultantes de la técnica de reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) para secuenciar o fragmentos extraídos de geles de agarosa se empleó el kit de purificación de Qiagen QiaQuick.

La extracción de ADN genómico de planta se realizó siguiendo el método de Dellaporta SL y col. 1983, modificado en algunos puntos (Lanza M, 2008. Tesis Doctoral). La recogida del material vegetal se efectuó con hojas de roseta o caulinares en tubos Eppendorf de 1,5 ml que contenían 5 ó 6 bolas de vidrio de entre 450 y 600 mm de diámetro. El material fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado en un ultra congelador de -80°C para su posterior trituración en un agitador de vaivén con una capacidad para 48 tubos durante un minuto y medio a máxima potencia. Se añadieron 300 ml del buffer de extracción y se volvió a triturar, se adicionaron entonces 400 ml del buffer de lisis y 75 ml del detergente sarcosil, se voltearon las muestras para mezclarlas bien y se incubaron media hora a 65°C. A continuación, se añadió un volumen de cloroformo isoamílico (24:1) (Merck) y se centrifugó a 13.000 r.p.m. 15 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante en otro tubo y se precipitó con 800

ml de isopropanol enfriado a -20°C, se centrifugaron otros 15 minutos a 13.000 r.p.m. y 4°C y se lavó el sedimento con 600 ml de etanol al 70%. Cuando todo el etanol se hubo evaporado, se diluyó el ADN en agua miliQ estéril con RNAsa (10 mg/ml).

4.2. Amplificación de fragmentos de ADN

Los fragmentos de ADN se amplificaron según la PCR descrita por Mullis (Mullis K y col. 1986), mediante el uso de oligos específicos (Sigma-Genosys e Invitrogen) de las regiones de interés en cada caso, a una concentración de 20µM.

La polimerasa Taq de Amersham fue la utilizada en la mayoría de las ocasiones: para realizar la PCR de los marcadores moleculares en el paseo cromosómico de los mutantes de EMS; para comprobar clones de bacterias haciendo la PCR directamente sobre la colonia o sobre el cultivo líquido; para comprobar ADN genómico de *Arabidopsis* y, por último, para elaborar sondas utilizadas en ensayos tipo qRT-PCR (PCR reversa cuantitativa). Cuando el objetivo era secuenciar o clonar un fragmento de PCR se emplearon las polimerasas Pwo o Expand High Fidelity de Roche y se siguieron las instrucciones del fabricante.

Se usó una mezcla de desoxinucleótidos comercial (Invitrogen) a una concentración de 0,2mM y el tampón de PCR se preparó siguiendo los protocolos de Sambrook J y col. (1989).

Las máquinas de PCR empleadas pertenecen a los modelos PTC-100 (Peltier Termal Cycler) de MJ Research y Gene Amp PCR System 2700 de Applied Biosystem. Se utilizó un programa estándar de amplificación modificando únicamente la temperatura de unión de los oligos y los tiempos de extensión en función del tamaño de los fragmentos esperados.

4.3. Técnicas electroforéticas

Para las electroforesis de ADN se usaron rutinariamente geles de agarosa (Pronadisa) al 1% en tampón TRIS acetato de sodio-EDTA (TAE) 1x teñidos con bromuro de etidio (BrEt, Sigma). El tampón de carga fue glicerol al 5% teñido con azul de bromofenol y xilenocianol (ambos de Sigma) y el tampón de corrida fue TAE 1x. La diferencia de potencial fue de 100 a 150 V. Las bandas se revelaron mediante exposición a luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc (BioRad). En caso de ser

geles para separar fragmentos de “Simple Sequence Length Polymorphism” (SSLP) se usó agarosa de alta resolución (Biotools) al 5% y una diferencia de potencial de 150 V.

Para comprobar el tamaño de los fragmentos se recurrió al uso de los marcadores moleculares α Eco/Hind III (Roche) para los fragmentos mayores de 1 Kb y Low leader (Invitrogen) para los menores.

4.4. Aislamiento y purificación de ARN de plantas

Tres réplicas biológicas de cada tratamiento fueron recolectadas y conservadas a -80° para su uso posterior.

El ácido ribonucleico (ARN) total se extrajo usando “Plant RNeasy Mini Kit (Qiagen)”, la cantidad total de ARN en cada muestra fue cuantificada usando el Nanodrop, y el ácido desoxirribonucleico copia (ADNc) se obtuvo usando “High Capacity First Strand cDNA Synthesis Kit” (Applied Biosystems).

4.5. qRT-PCR

Todos los experimentos de qPCR fueron diseñados en el Universal ProbeLibrary Assay Design Center (<http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome.html>). Las sondas fueron pedidas a Roche.

Los oligos utilizados fueron pedidos a Sigma Genosys.

Cada juego de oligos-sonda fue calibrado para obtener parámetros de amplificación óptimos (ver Base de Datos de Sondas Calibradas del Laboratorio 312 del Centro Nacional de Biotecnología).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en el equipo “LightCycler 7300” de Applied Biosystems usando “FastStart Universal Probe Maste (Rox)” de Roche. Se analizaron los datos con el programa “7300 System Software”. Se normalizó la expresión usando ACTINA8 (ACT8) y se relativizó usando el método de la doble diferencia (Wong ML y Medrano JF, 2005).

5. Clonación posicional del mutante *athrs1-1*

Para localizar en el genoma de *Arabidopsis thaliana* el gen responsable del fenotipo mutante se utilizó la técnica del paseo cromosómico. Este proceso consiste en cruzar plantas mutantes de la variedad Col con otra variedad, en este caso con Ler,

y así seleccionar plantas con fenotipo mutante dentro de la F2. Estas plantas seleccionadas tendrán la mutación en algún punto de su genoma, de la variedad Col, y en otra zona del mismo habrá ocurrido recombinación con la variedad Ler. Amplificando regiones concretas del genoma de *Arabidopsis* con el uso de marcadores que diferencien ambas variedades, se pueden ir eliminando puntos, porque la aparición de una planta heterocigota u homocigota para Ler implica que ese marcador amplificado está aún lejos del punto de la mutación, ya que en el lugar de la mutación solo pueden aparecer plantas Col. Llega un momento en el que no se puede avanzar más porque todos los ADNs de las plantas son Col pero la región es tan amplia que incluye muchos genes, entonces hay que localizar de forma más concisa la zona de la mutación diseñando nuevos marcadores. Al final se hace necesaria la secuenciación de varios genes hasta llegar a encontrar el mutado.

Los marcadores moleculares CAPs (polimorfismos de restricción de secuencia amplificada) y SSLPs se diseñaron según los datos recogidos en la base de datos de polimorfismos CERION. Una primera aproximación a la localización de la mutación basada en el empleo de marcadores moleculares de los cinco cromosomas de *Arabidopsis* para asociar la zona de la mutación a unos de ellos, fue realizada por el Servicio de Cartografiado Genético de Mutantes del proyecto GEFA (Genómica Funcional en *Arabidopsis*).

Los marcadores se probaron en plantas con fenotipo mutante *athrs1-1* de poblaciones F2 segregantes.

6. Aislamiento del mutante *athrs1-1*

En la **Tabla 1** se muestran los oligos empleados para secuenciar el gen que codifica para la proteína AtHRS1 (histidil-tRNA sintetasa de *Arabidopsis*) en el mutante *athrs1-1*.

OLIGOS DE SECUENCIACIÓN	Nº Pb	Tm (°)
6100-1F: acctaacttgactacatgtctaaaacg	28	55
6100-1R: ccacgtttctgatgaacaatgc	23	55
6100-2F: tctgtttactttgatttaaaggctcacg	29	55
6100-2R: ttcatcaattggtatctttctatctatttagc	33	55
6100-3F: ttggaagagttgtatcattatagacaagg	30	55
6100-3R: tacttttgacgaataagagatttgaatgattgg	33	55

Tabla1. Oligos empleados en la secuenciación del gen que codifica para la proteína AtHRS1 en el mutante *athrs1-1*.

7. Complementación de la mutación *athrs1-1*

Se realizó introduciendo, por medio de tecnología Gateway, en plantas mutantes *athrs1-1* el vector pGWB2, portador de promotor sintético 35S fusionado al ADNc del gen At3g46100.

Las líneas homocigotas se obtuvieron del análisis de varias generaciones de la línea heterocigota original.

8. Mutagénesis con EMS de semillas portadoras de la mutación *act2-5*

50000 semillas de *Arabidopsis thaliana* de una línea homocigota portadora de la mutación *act2-5* fue mutagenizada con EMS (Sigma), siguiendo el procedimiento descrito por Rédei GP y col. 1992. Las semillas previamente hidratadas (se dejan en remojo toda la noche) son tratadas con EMS 0.3% durante 13 horas. Posteriormente se lavan varias veces con agua para eliminar los restos de EMS.

La totalidad de las semillas mutagenizadas (M1) se sembraron directamente en tierra, a una densidad de una semilla por centímetro cuadrado. La generación M2 fue recolectada separadamente por familias M2 y fueron sembradas en placa. Cuando las plántulas tuvieron 7 días de edad se seleccionaron las que presentaban un fenotipo de raíz recta como el fenotipo silvestre.

9. Ensayo histológico de la actividad β -Glucuronidasa (GUS)

El ensayo de actividad β -glucuronidasa (GUS) se hizo en base a Jefferson RA y col. 1987, usando plantas Col y mutantes *act2-5* portadoras de la construcción DR5-GUS (promotor sintético de respuesta a auxina unido a GUS). La línea DR5-GUS en fondo *act2-5* se obtuvo cruzando el mutante con la línea DR5-GUS (Col) y seleccionando en la generación F2 segregante las plantas con fenotipo mutante y homocigotas para la construcción DR5-GUS (mediante siembra en medio suplementado con antibiótico de resistencia).

Para visualizar la actividad β -glucuronidasa (GUS) se distribuyó 1 ml de solución de X-Gluc (Glycosynth) sobre las placas del medio donde crecían las plántulas, se taparon con papel de aluminio y se incubaron a 37 °C durante la noche.

10. Técnicas microscópicas

10.1. Preparación de muestras para microscopía óptica

Plántulas de 4, 5 y 7 días de edad fueron seccionadas con bisturí, separándose la raíz de la parte aérea. Las raíces fueron alineadas y cubiertas con agarosa 1%. Se cortaron bloques de agarosa con el tamaño correcto para los moldes de plástico en los que se harán los bloques que posteriormente se cortarán al microtomo. Estos bloques son de una resina plástica llamada Technovic 7100 (Heraeus). Se embeben los bloques de agarosa en los que están inmersas las raíces en esta solución de Technovic. Después de una noche a temperatura ambiente están listos para ser cortadas al microtomo con una cuchilla de cristal.

Las secciones así obtenidas (de aproximadamente 10 μ de grosor) se montan en portaobjetos, sobre una gota de agua. Se pone el portaobjetos a la llama para evaporar el agua, de forma que la preparación quede fijada al portaobjetos.

En este momento se preparan las secciones para su tinción con azul de toluidina (Sigma), tinción específica para visualización del tejido vascular (Mähönen AP y col. 2000).

10.2. Preparación de muestras para microscopía confocal

Las plántulas portadoras de las construcciones ABD2-GFP y PIN2-GFP fueron cultivadas y tratadas según se detalla en Métodos de cultivo *in vitro*. Posteriormente fueron colocadas en un portaobjetos sobre una gota de agua, se les amputó la parte aérea con un bisturí y se cubrió la preparación con un cubreobjetos para su visualización al microscopio y la toma de imágenes.

En el caso de aplicación de la fucsina básica se siguió el protocolo de Mahönen AP y col. (2000). Se usaron plántulas de 7 días de edad.

Para la observación del meristemo apical de la raíz y las distintas capas celulares se usaron plántulas de 4 días crecidas en vertical a las que se les cortaron con un bisturí los cotiledones; las raíces fueron montadas en un portaobjetos sobre una solución de Ioduro de Propidio a concentración 10µg/mL, tapadas con un cubreobjetos y directamente observadas al microscopio y fotografiadas.

Se usaron los equipos de microscopía confocal del Centro Nacional de Biotecnología (Leica TCS SP5) y del John Innes Centre (Zeiss 510 META confocal).

11. Tratamientos informáticos

Las bases de datos empleadas para la búsqueda de información relacionada con genes de *Arabidopsis* han sido NCBI (“National Center of Biotechnology Information”) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), TAIR (“The *Arabidopsis* Information Resource”) (<http://www.arabidopsis.org>) y MIPS (“Munich Information Center for Protein Sequences”) (<http://mips.gsf.de>). Las secuencias de los genes se han editado en EditView y 4Peaks y las comparaciones se han realizado con BLAST (“Basic Logic Alignment Search Tool”) (Altschul SF y col. 1997) en NCBI y en TAIR.

La búsqueda bibliográfica se ha realizado en Pubmed dentro de la página de NCBI y en la biblioteca del Centro Nacional de Biotecnología.

Para las predicciones de secuencia, sitio de corte y localización del péptido señal de la proteína AtHRS1 de *A.thaliana* se usaron las bases de datos:

Mitoprot II (Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. Claros MG, P. Vincens. Eur. J. Biochem. 241, 770-786).

ChloroP (A neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. Emanuelsson O, Henrik Nielsen, and Gunnar von Heijne Protein Science: 8: 978-984, 1999).

Las imágenes se han tratado con Adobe Photoshop. Las medidas de longitud de raíces, y la medida de ángulos en experimentos de respuesta gravitrópica se han efectuado utilizando como herramienta el programa ImageJ.

Para el análisis de datos y la exposición de las conclusiones se han usado los programas que forman el paquete de Microsoft Office.

12. Fotografía

Las fotografías de raíces y de embriones se hicieron con una cámara digital Canon DP50 montada sobre una lupa Leica, volteando la placa y con iluminación indirecta, en el Departamento de Genética Molecular de Plantas del CNB.

Las imágenes de raíces necesarias para el experimento de medida de longitud de la raíz principal del mutante *athrs1-1* fueron tomadas por una cámara Nikon digital ensamblada a una lupa Leica. Las imágenes de los cortes transversales de la raíz de WT y *athrs1-1* fueron obtenidas en un microscopio Nikon Microphot-SA con una cámara Nikon Coolpix 990 digital ensamblada. Ambos equipos ubicados en el servicio de microscopía del John Innes Centre.

Las imágenes restantes se obtuvieron en el Servicio de Fotografía del CNB: plantas adultas, imágenes de raíces después de 4, 8 y 24 horas de haber sido sometidas a graviestimulación y fotografías de plántulas creciendo en placa.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES ALTERADOS EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA RADICULAR

Con el propósito de identificar y caracterizar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la raíz, se llevó a cabo una selección de mutantes de *Arabidopsis* alterados en la disposición espacial del sistema radicular. Para la identificación de estos mutantes, se realizó el escrutinio de una población de semillas de *Arabidopsis* del ecotipo Col, mutagenizada por EMS. Estas semillas se germinaron en placas verticales para facilitar la visualización y el crecimiento de las raíces sobre la superficie del medio de cultivo.

Se analizaron un total de 25.000 semillas mutagenizadas, de las que se seleccionaron 211 plantas como posibles mutantes con alteraciones en la disposición de sus raíces. De éstas, en 106 se confirmó el fenotipo en la siguiente generación. Entre estas plantas confirmadas, se eligieron 22 con un fenotipo claro y repetitivo y que, por tanto, permitiría abordar con garantías la identificación del gen mutado mediante paseo cromosómico (**Tabla 2**). Estos 22 mutantes presentaban fenotipos de alteración en el patrón de desarrollo del sistema radicular, siendo los fenotipos más destacados la pérdida de la dominancia apical de la raíz principal y alteraciones en la disposición y distribución de las raíces laterales y adventicias.

Escrutinio de mutantes alterados en arquitectura radicular	
Plantas analizadas	25000
Plantas seleccionadas	211
Plantas con fenotipo confirmado	106
Fenotipos alterados identificados	22

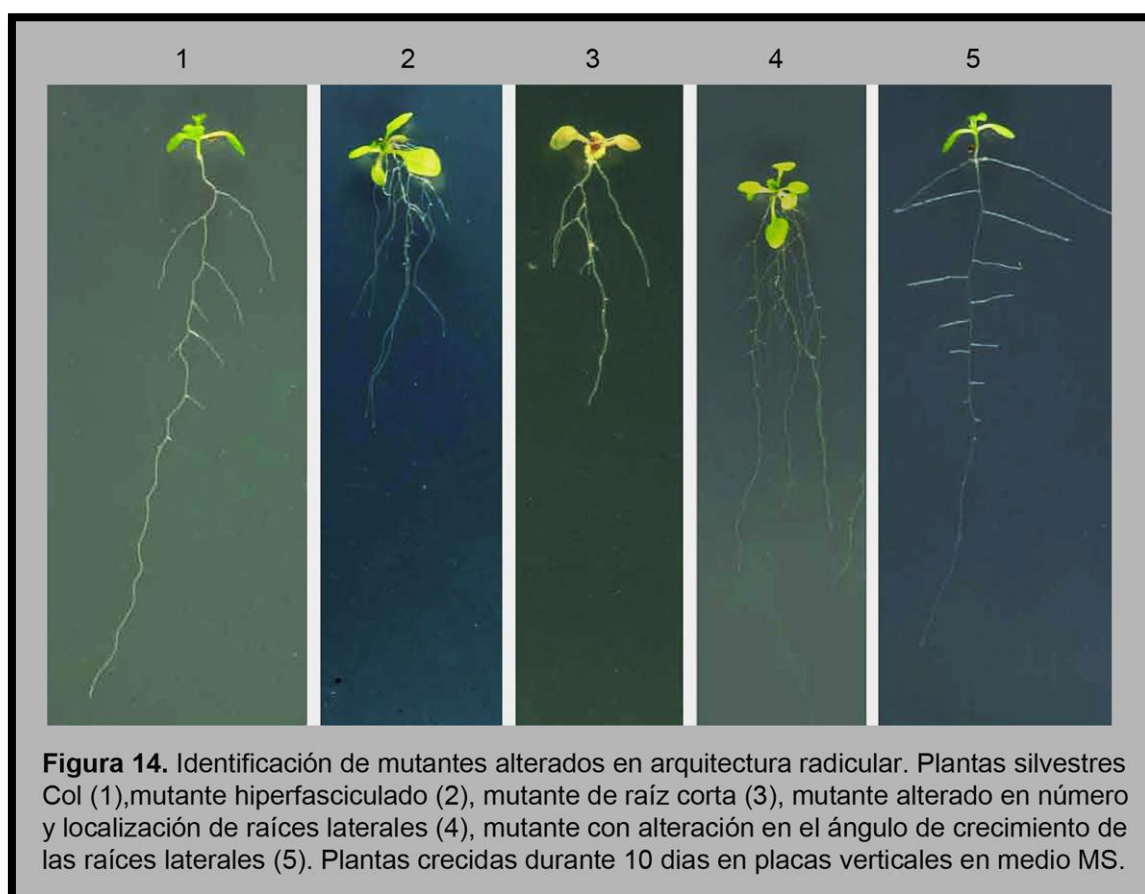
Tabla 2. Resultados del escrutinio de mutantes alterados en arquitectura radicular.

Como se muestra en la **Tabla 3**, se encontraron 11 mutantes que presentaban una clara pérdida de la dominancia apical. Otros tres de los mutantes tenían una disminución del crecimiento de la raíz principal y ausencia de raíces laterales. Asimismo, se identificaron dos mutantes que mostraban un fenotipo de crecimiento de raíces ondulado, muy similar al que muestran las plantas de *Arabidopsis* cuando

crecen sobre una superficie inclinada que no pueden penetrar, presentando un fenotipo de respuesta constitutiva a choque. Otros seis mutantes identificados tienen afectadas las raíces laterales; cuatro de ellos, en cuanto a la distribución de las mismas y los otros dos en cuanto al ángulo de crecimiento. En la **Figura 14** se muestran algunos ejemplos de estos mutantes.

Fenotipos detectados	
Pérdida de dominancia apical	11
Disminución crecimiento raíz ppal + ausencia de laterales	3
Crecimiento ondulado de raíz	2
Alteración en número y disposición raíces laterales	4
Alteración del ángulo de crecimiento de raíces laterales	2

Tabla 3. Fenotipos detectados en el escrutinio



De todos los mutantes identificados se escogieron dos con el fin de caracterizarlos en detalle durante el desarrollo de esta tesis. Uno de ellos se seleccionó en base a su fenotipo de raíz corta (**Figura 15**).



Este fenotipo es interesante en el contexto de la AR y por tanto en el desarrollo de esta tesis, ya que el control de la dominancia apical en raíces es determinante en el cambio de un sistema radicular fasciculado a pivotante. El fenotipo de este mutante es similar al del mutante “*wooden leg*” (*wol*) (Mähönen AP y col. 2000) y por ello se denominó *raw2*, del inglés “*root as in wol*”. En general, la mayoría de los mutantes de raíz corta como *wol*, *scarecrow* (*scr*) o *short root* (*shr*) presentan alteraciones postembrionarias en las capas celulares que forman la raíz (Helariutta Y y col. 2000; Jenik PD y col. 2007). Los factores de transcripción SHR y SCR son importantes a la hora de mantener las divisiones celulares asimétricas que dan lugar a endodermis y cortex, y definen el correcto desarrollo del meristemo apical de la raíz. Dada la similitud de *raw2* con *wol*, *scr* y *shr*, lo primero que se realizó fue un test de alelismo. Las plantas F1 resultantes del cruzamiento de *raw2* con estos mutantes mostraron fenotipo WT (datos no mostrados). Estos resultados indican que *raw2* no es un nuevo alelo de ninguno de los mutantes anteriormente descrito. Por este motivo, nuestro

interés por caracterizar este mutante *raw2* estriba en que su clonación podría permitir la identificación de genes implicados en el control de la dominancia apical del sistema radicular.

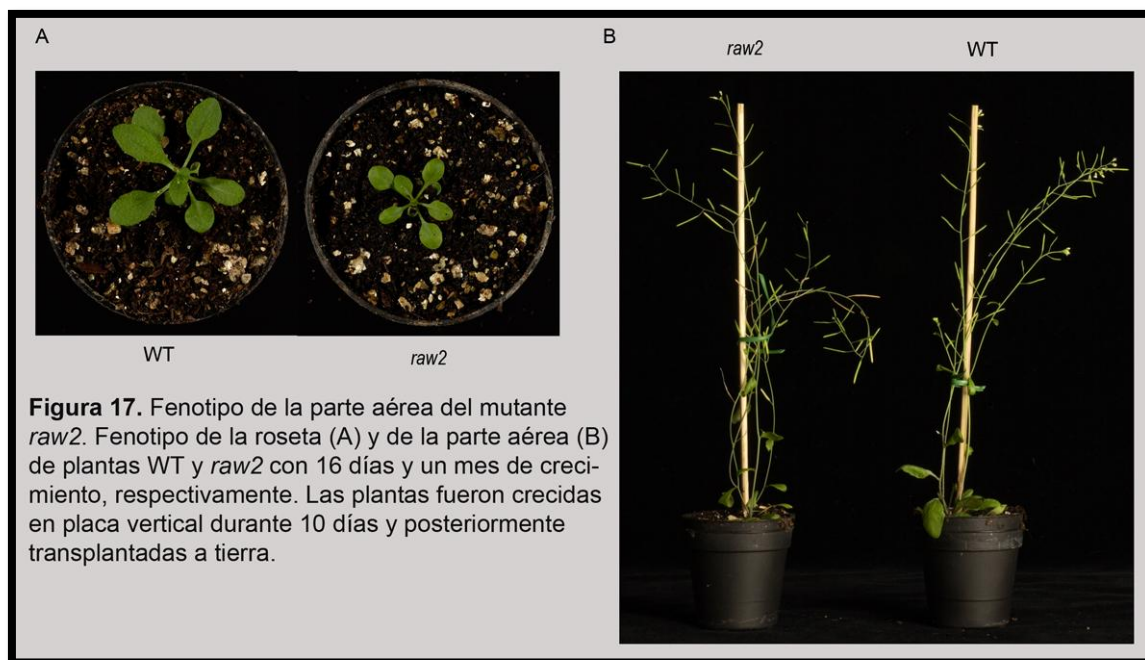
El otro mutante seleccionado en este escrutinio fue *wavy*. Este mutante exhibe un fenotipo de torsión y curvatura de raíces similar al que muestran las plantas en respuesta al impedimento mecánico provocado por la presencia de obstáculos (**Figura 16**); presenta, por tanto, un fenotipo constitutivo de crecimiento ondulado del sistema radicular. Por ello, la caracterización de este mutante puede permitir la identificación de genes implicados en la capacidad de las raíces para evitar obstáculos (tigmotropismo). En este tipo de crecimiento participan de forma activa el gravitropismo y el crecimiento en espiral de las raíces (circumnutación), por lo que su caracterización es de gran interés en el contexto de la AR.

2. CARACTERIZACIÓN DEL MUTANTE RAW2

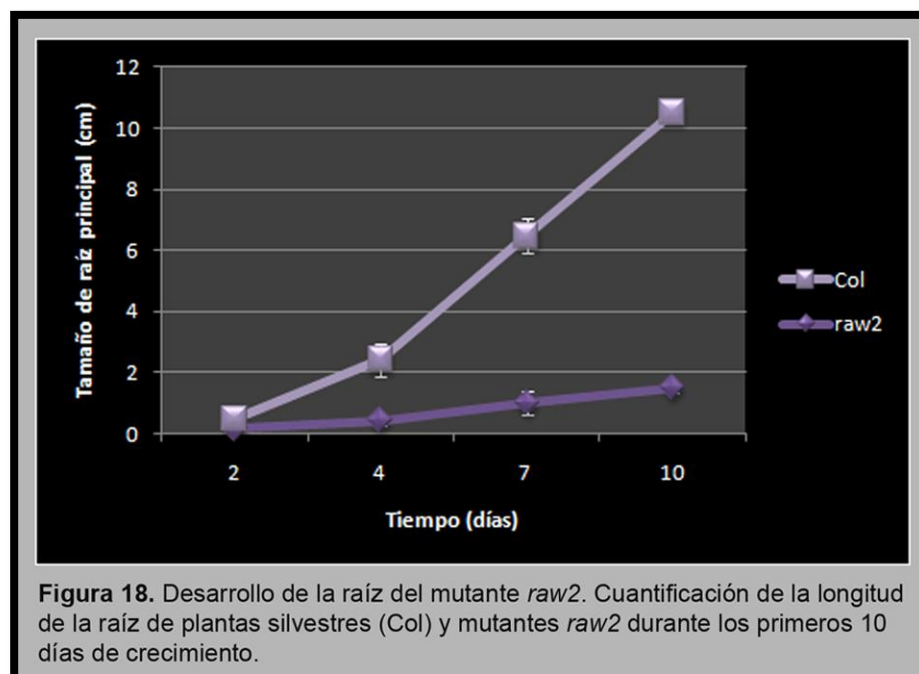
2.1 Caracterización fenotípica

El mutante *raw2* tiene disminuida la longitud de su raíz principal y no consigue producir raíces laterales. De esta forma, la supervivencia de la planta depende directamente de su capacidad para desarrollar raíces adventicias, que se inducen como mecanismo compensatorio en respuesta a la reducción de la longitud y de la capacidad de exploración de la raíz principal (Lucas M y col. 2011).

Con el objeto de determinar si el mutante presenta otros fenotipos asociados, además del acortamiento de la raíz principal, se analizó su patrón de desarrollo desde el momento de la germinación hasta alcanzar su fase de planta adulta. El mutante *raw2* no mostró retraso en el inicio de la germinación ni diferencias significativas con plantas silvestres en el porcentaje de germinación (datos no mostrados). Al cabo de 16 días de crecimiento, las rosetas de la planta silvestre presentan hojas verdaderas más desarrolladas que el mutante, aunque su disposición y morfología son idénticas (**Figura 17A**). Sin embargo, después de un mes de crecimiento en tierra, la parte aérea de Col (genotipo silvestre) y del mutante son idénticas en tamaño y porte, como podemos observar en la **Figura 17B**.



La cuantificación de la longitud de la raíz principal en plantas Col y mutante a lo largo de los primeros 10 días de crecimiento muestra que la raíz de las plantas silvestre es unas ocho veces la longitud de la raíz principal de las plantas *raw2* (**Figura 18**).



El crecimiento de la raíz principal en el mutante es muy lento en los primeros días del desarrollo, hasta que queda definitivamente interrumpido. Se pudo observar

que el 50% de las plantas *raw2* dejan de elongar su raíz principal a los 10 días de germinar.

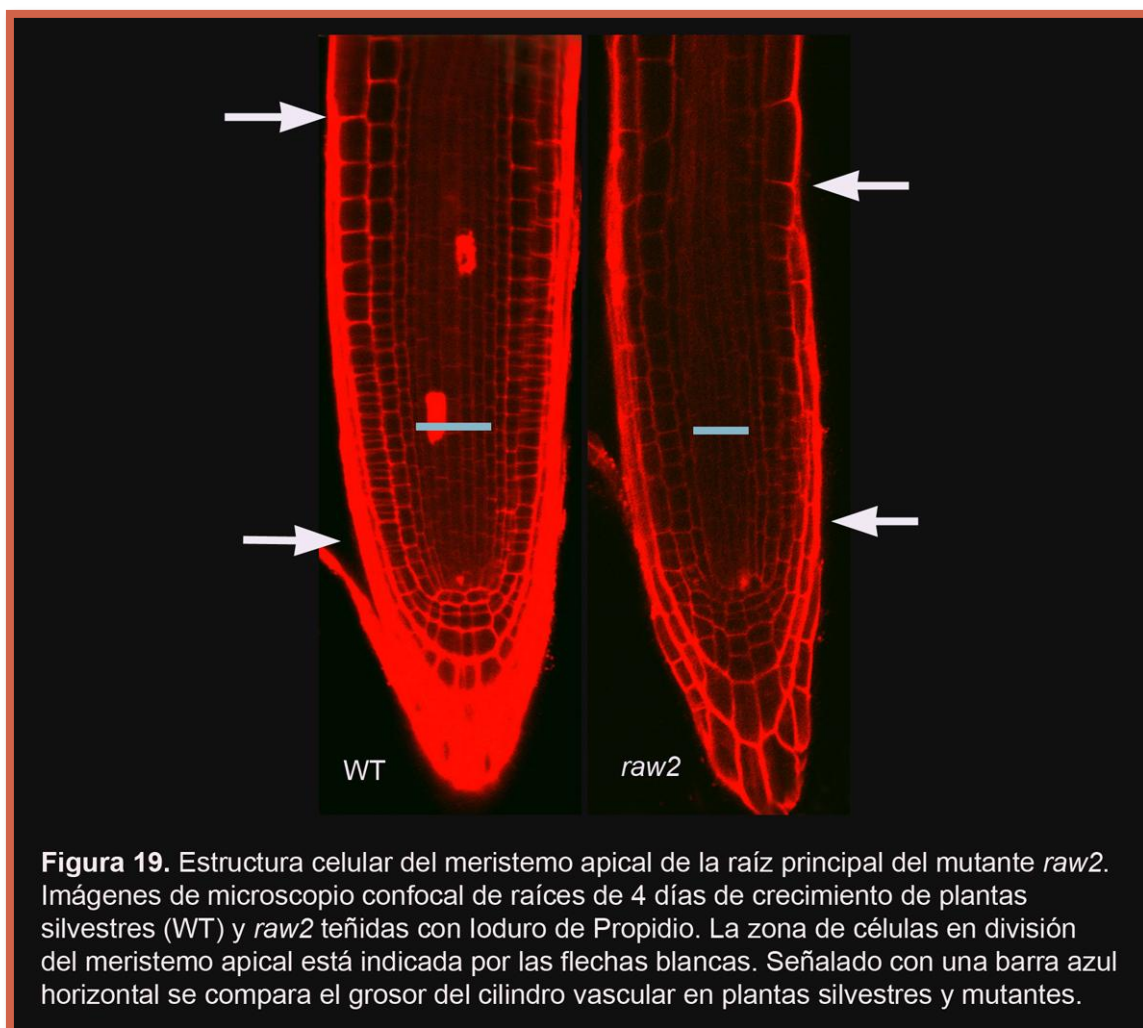
Sin embargo, el mutante *raw2* no presenta un retraso significativo en el tiempo de floración, medido como el Tiempo de Aparición del Botón Floral (TABF), que es el tiempo transcurrido desde el día de inicio de la germinación hasta la visualización macroscópica del botón floral ($38,76 \pm 5,92$ días en el WT frente a $42,21 \pm 5,85$ días en el caso del mutante).

Estos resultados indican que el mutante *raw2* presenta un retraso en las primeras fases del desarrollo debido a la menor longitud de su raíz principal. Este retraso se ve compensado en etapas posteriores del desarrollo, ya que las plantas mutantes en su parte aérea son idénticas a las silvestres. Ambos ejemplares presentan el mismo número de hojas, y la filotaxia y morfología de flores y silicuas son idénticas a las observadas en plantas silvestres. A los 15 días después de la germinación, el mutante *raw2* desarrolla raíces adventicias funcionales y, en la mayoría de los casos, más largas que la raíz principal (datos no mostrados), que deben favorecer el reinicio del crecimiento de la planta.

El mutante *wol* de raíz corta presenta un defecto en el número de células precursoras del tejido vascular que se generan durante el desarrollo del embrión y por lo tanto su raíz principal no llega a ser funcional. También los genes alterados en los mutantes *shr* y *scr* participan en el correcto desarrollo del tejido xilemático (revisado en Caño-Delgado A y col. 2010), alterando el crecimiento de la raíz principal. Con el fin de determinar de qué manera nuestro mutante estaba afectado en el desarrollo del sistema radicular, decidimos estudiar el meristemo apical y el desarrollo del tejido vascular en la raíz del mutante *raw2*.

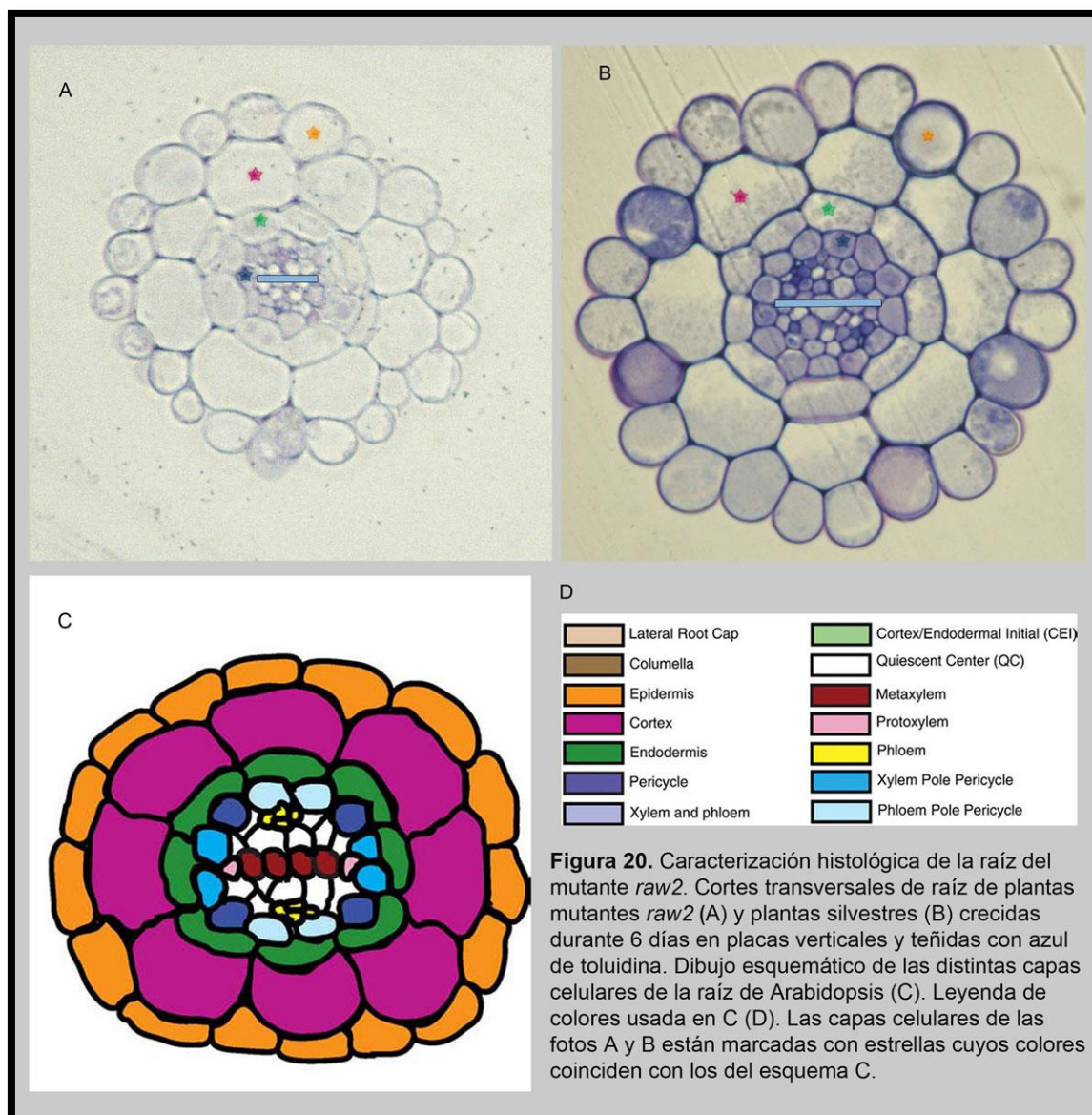
Con el propósito de observar las diferentes capas celulares y la estructura del meristemo apical se llevó a cabo una tinción con Ioduro de Propidio, que tiñe de rojo la pared celular y permite observar la estructura de la raíz al microscopio confocal.

En la **Figura 19** se observa que la raíz del mutante *raw2* es más estrecha que la del WT. El cilindro vascular del mutante *raw2*, que aparece señalado en la figura por una barra azul horizontal, es más estrecho que el del WT. No se observan diferencias en el resto de las capas celulares de ambos ejemplares (epidermis, cortex, endodermis y periciclo). Asimismo, el centro quiescente en plantas *raw2* no presenta ninguna alteración.



Longitudinalmente, vemos que la zona de división celular (señalada en ambos ejemplares entre dos flechas blancas) es más corta en el mutante que en el WT. Por lo tanto, el mutante *raw2* presenta problemas en la división celular.

Con el objetivo de caracterizar más en detalle la organización tisular de la raíz, decidimos realizar cortes transversales en raíces de plantas silvestres y mutantes (**Figura 20**). Los cortes se hicieron a la altura de la zona de maduración, que corresponde en longitud con la zona de elongación anterior al inicio de los pelos radiculares (Dolan L y col. 1993).

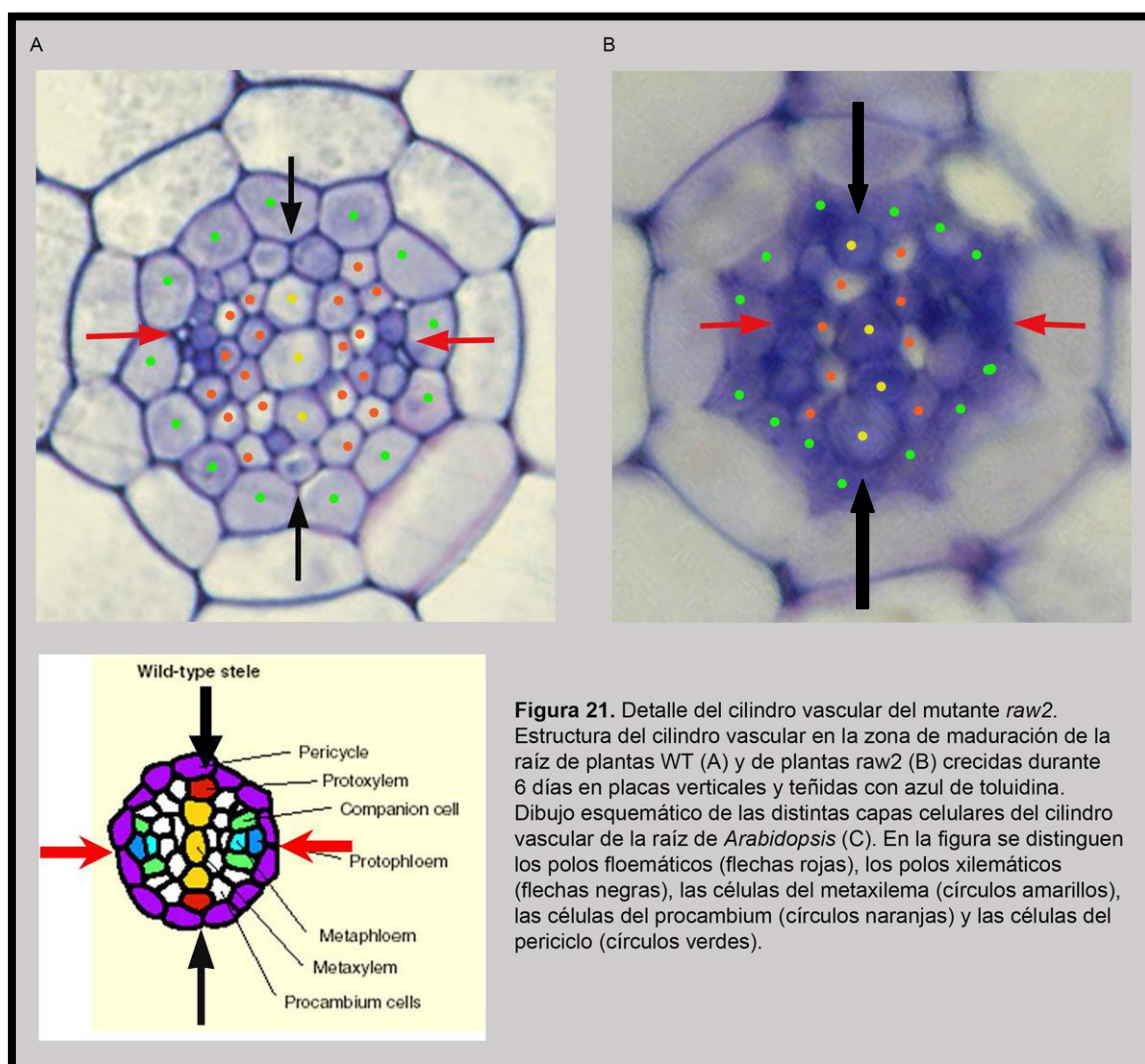


Los cortes fueron teñidos con azul de toluidina, que señala de manera específica las células del tejido vascular (Mähönen AP y col. 2000). En conjunto, la raíz del mutante es menos gruesa y la tinción es menos intensa (**Figura 20A**). Tanto en el cortex como en la endodermis (señaladas en las **Figuras 20A** y **20B** con estrellas de colores rosa y verde, respectivamente) no hay alteraciones morfológicas y el número de células es similar.

Nuevamente se observa un menor grosor del cilindro vascular, señalado en **20A** y **20B** por barras azules horizontales.

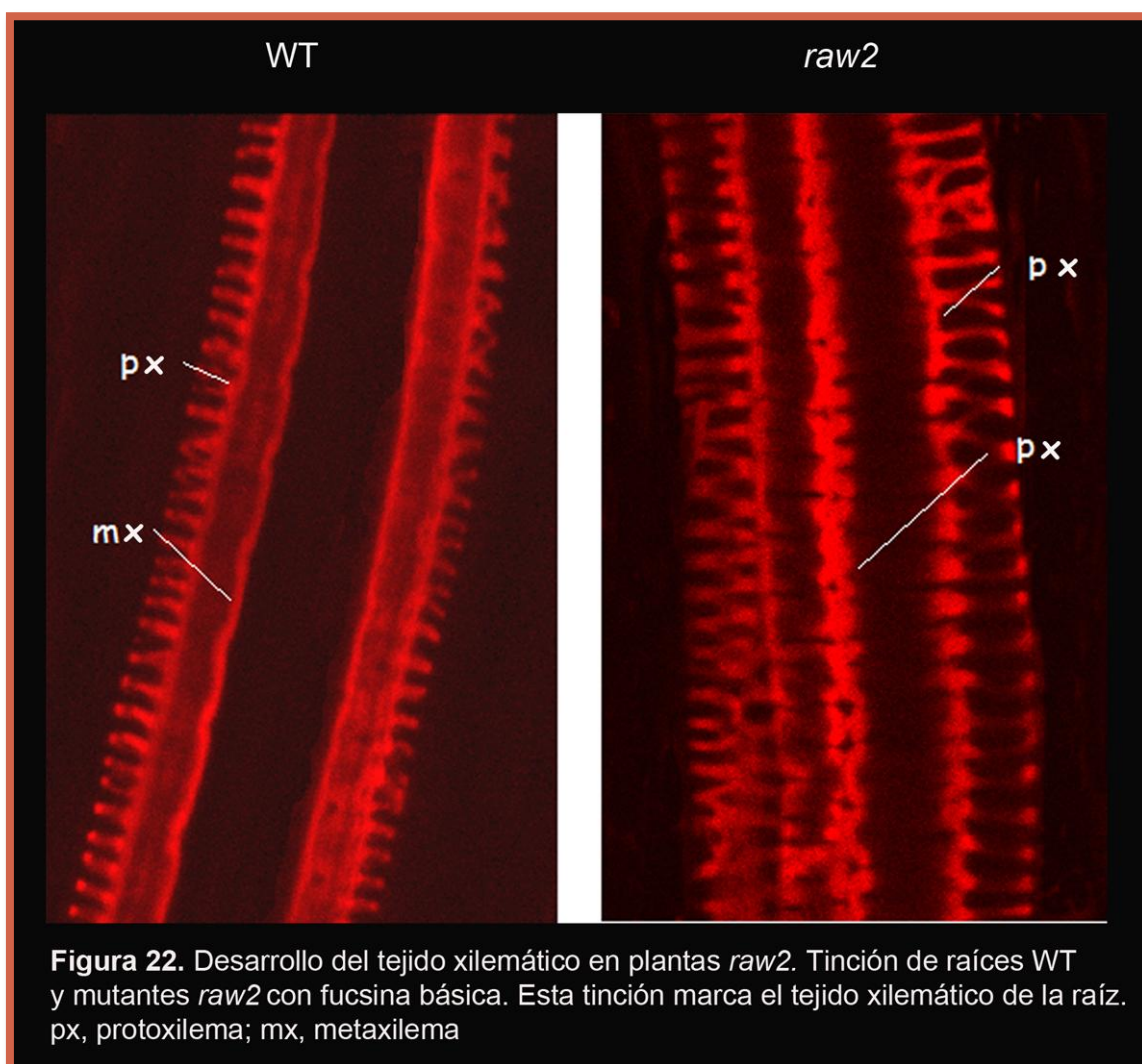
En la **Figura 21** podemos observar el cilindro vascular en detalle. La capa que circunda al cilindro vascular, denominada periciclo (círculos verdes), tiene igual

número de células en el mutante y en el silvestre. Sin embargo, las células de los polos floemáticos en el mutante *raw2*, son de mayor tamaño (**Figura 21B**, flechas rojas). En el mutante no podemos diferenciar las células protoxilemáticas de las células del metaxilema ya que todas las células son similares, más grandes, se tiñen de color más oscuro y no presentan la misma organización que en la planta silvestre (**Figura 21A y 21B**, flechas negras y círculos amarillos). La diferencia más notable se observa en las células del procambium, que son menos numerosas en el fondo mutante (**Figura 21A y 21B**; círculos naranjas).



La **Figura 22** muestra las raíces de plántulas de 7 días teñidas con fucsina básica. Esta tinción permite visualizar los haces vasculares de la raíz en disposición longitudinal mediante microscopía confocal, pudiéndose así distinguir de una manera sencilla el grado de diferenciación del xilema. Como se observa en la **Figura 22A**, en las plantas Col el protoxilema aparece como una banda reticulada mientras que el

metaxilema aparece teñido como una banda continua. En plantas mutantes la banda correspondiente al metaxilema no aparece, y en su lugar vemos una banda adicional de protoxilema (**Figura 22B**). Este resultado indica que el mutante presenta un problema de maduración del tejido xilemático, lo que se corresponde con la alteración de las células del metaxilema del mutante que observamos en los cortes transversales de la raíz (**Figura 21B**).



Este estudio fenotípico indica que el mutante *raw2* no tiene alterado el meristemo apical, ya que la composición de las diferentes capas celulares no difiere de la planta silvestre. El mutante presenta un menor grosor de la raíz, debido principalmente al menor tamaño del cilindro vascular por un menor número de células del procambium. La disposición y composición de los tejidos vasculares es diferente en WT y mutante, no observándose metaxilema en la raíz de *raw2*. Estos cambios en la morfología de la raíz principal del mutante se han correlacionado con los que se

observan en otros mutantes de fenotipo de raíz similar, y que presentan alteraciones durante el desarrollo embrionario (Mähönen AP y col. 2000).

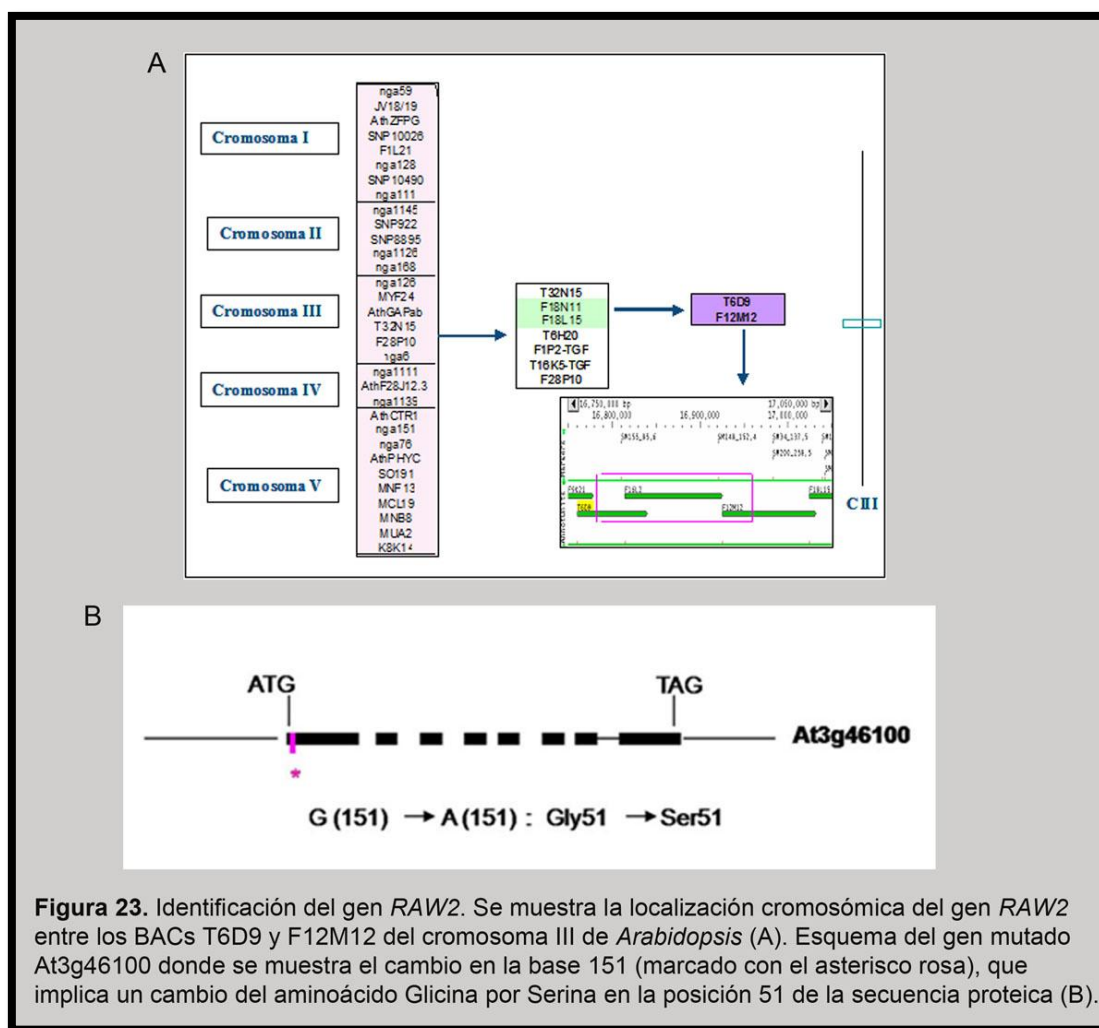
En el laboratorio se llevó a cabo un estudio del desarrollo vascular de la parte aérea del mutante (Lanza M, 2008. Tesis doctoral) y no se pudieron observar alteraciones con respecto al silvestre. Lo que reitera la idea de que la mutación presente en *raw2* debe afectar mayoritariamente al desarrollo del sistema radicular, y no al de su parte aérea.

2.2. Identificación del gen *RAW2*

Con el fin de identificar el gen *RAW2* se procedió a su cartografiado molecular seleccionando plantas con fenotipo mutante de raíz corta en una población F2 de un cruzamiento entre el mutante (en fondo Col), y el ecotipo Ler.

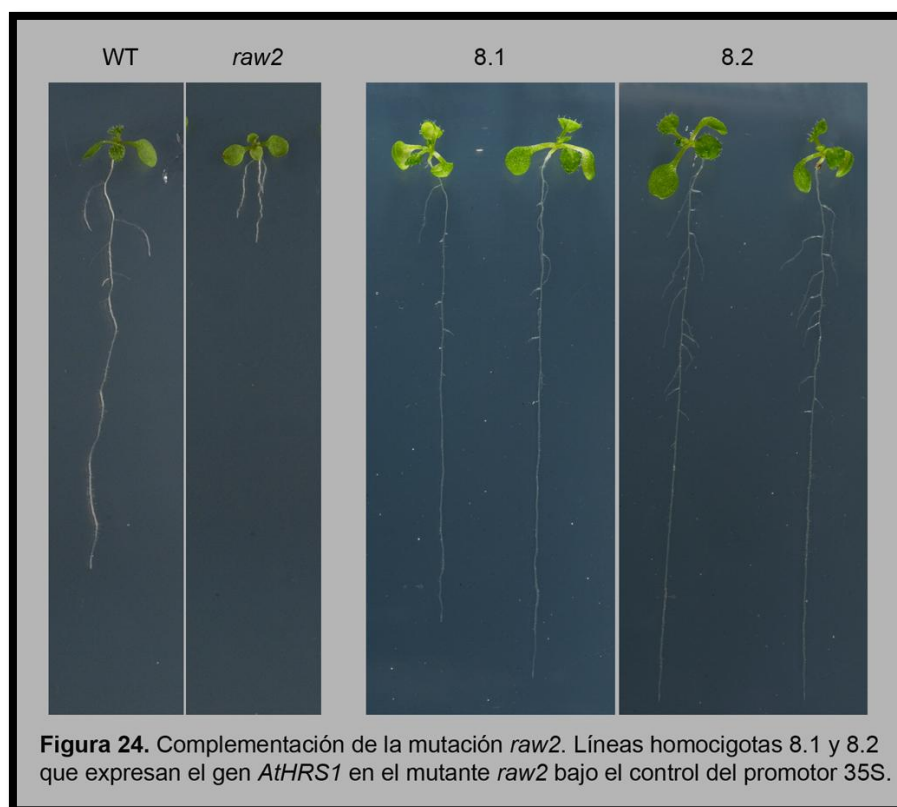
En las plantas seleccionadas de este cruzamiento se extrajo el ADN y se procedió a su análisis con el uso de marcadores moleculares de tipo SSLP. En total, se analizaron 800 plantas homocigotas para la mutación *raw2*, en donde se probaron marcadores de los 5 cromosomas de *Arabidopsis* que permitieron establecer una zona de ligamiento entre los BAC ("Bacterial Artificial Chromosome") F18N11 y F18L15 del cromosoma III. Un análisis más exhaustivo utilizando marcadores específicos de esa zona permitió acotar la región que contiene el gen mutado entre los BAC T6D9 y F12M12 que comprende 160 Kb y que engloba 41 genes. Con el uso de marcadores dCAPs (secuencias CAPs modificadas) se redujo la búsqueda a unos cuantos genes que fueron secuenciados, encontrándose el cambio de una base G (Guanina) por una A (Adenina) en la posición 151 del primer exón del gen At3g46100 del cromosoma III de *Arabidopsis*, como se muestra en la **Figura 23**. Este gen codifica para una proteína HISTIDIL-tRNA SINTETASA de *Arabidopsis* (AtHRS1).

El cambio en la secuencia de nucleótidos se traduce en la proteína en el cambio de una Glicina (aminoácido situado en la posición 51 de la cadena aminoacídica) por una Serina. Ambos están dentro del grupo de los aminoácidos (aa) neutros o sin carga, aunque la Glicina pertenece al grupo de los no polares o hidrófobos y la Serina es polar o hidrófila, pero los dos son similares en cuanto a sus propiedades (como punto isoeléctrico, etc.).



2.3. Complementación de la mutación *raw2*

Con el fin de demostrar que la mutación encontrada en el gen At3g46100 era responsable del fenotipo de raíz corta, se generaron plantas transgénicas transformando plantas mutantes *raw2* con una construcción que contenía una fusión del promotor 35S con el ADNc del gen *AtHRS1*. Las plantas transformadas se seleccionaron por su resistencia al antibiótico kanamicina. Se eligieron 20 líneas homocigotas para el gen de la kanamicina en la generación T3 y se estudiaron sus fenotipos. En 17 líneas se encontró que el gen de la *AtHRS1* silvestre es capaz de complementar la mutación puesto que el fenotipo de raíz era de nuevo idéntico al de las plantas Col silvestres. En la **Figura 24** se muestra un ejemplo del fenotipo de raíz de dos líneas complementadas, 8.1 y 8.2. Por tanto, el gen *RAW2* codifica para la proteína *AtHRS1*; y en este momento pasamos a nombrar al mutante *raw2* como *athrs1-1*.



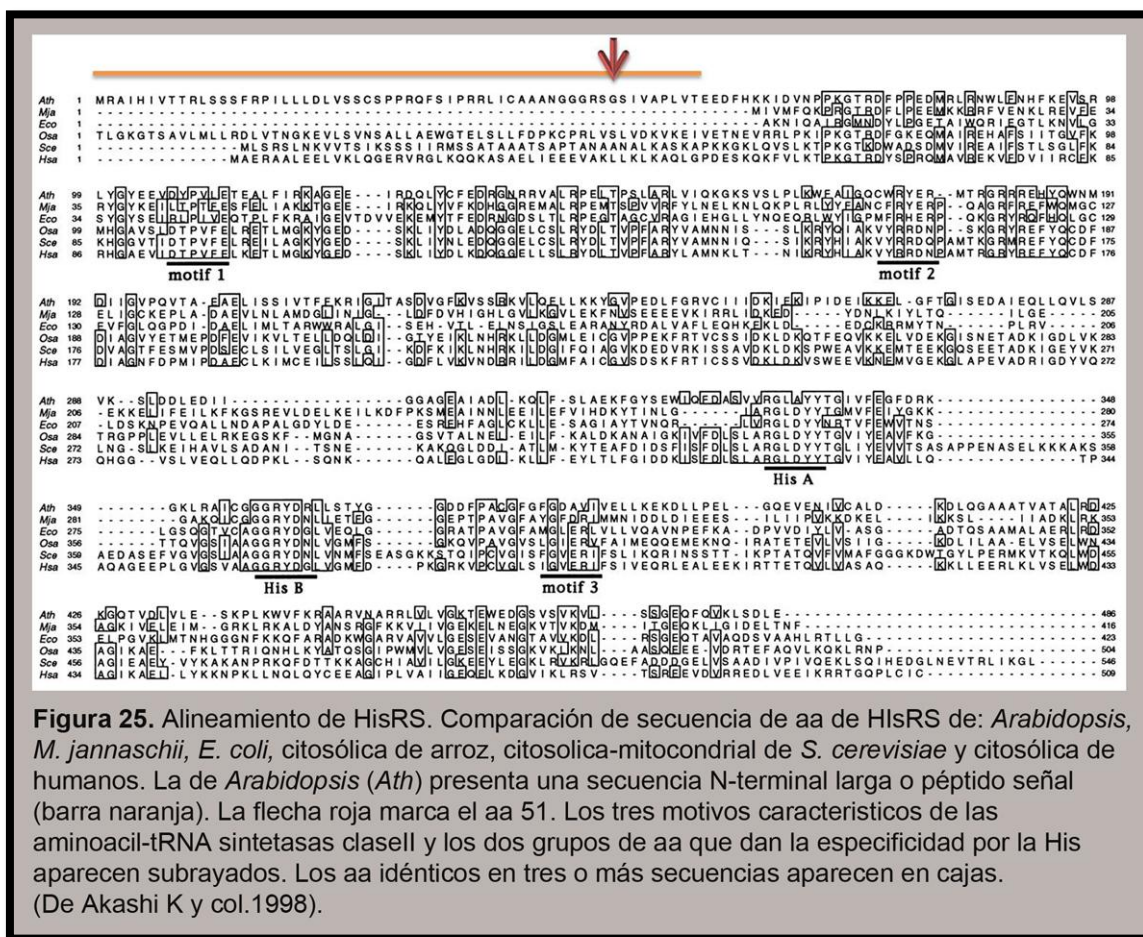
2.4. Expresión de la proteína *AtHRS1* y función en *Arabidopsis*. Alteraciones en el mutante *athrs1-1*

El gen At3g46100 codifica para una His-tRNA sintetasa (HisRS) denominada AtHRS1 (Akashi K y col. 1998 y TAIR), que participa en la traducción de proteínas catalizando la adición covalente del aminoácido His a su correspondiente ARN de transferencia (tRNA).

Mediante ensayos de expresión *in vivo* en protoplastos de tabaco, está descrito que esta proteína está presente en cloroplastos y mitocondrias (Akashi K y col. 1998). Es decir, que es una proteína con señal de migración dual para ambos orgánulos (Akashi K y col. 1998; Duchêne AM y col. 2005; Zybailov B y col. 2008). Las proteínas que tienen péptido señal y están destinadas a ser transportadas a determinados orgánulos, poseen en su extremo N-terminal una secuencia de entre 20 a 60 aminoácidos que, con su composición aminoacídica y la estructura secundaria que esta adquiere, señalan a las proteínas su destino final en los diferentes orgánulos.

En la **Figura 25** (modificada de Akashi K y col. 1998) vemos la secuencia de aminoácidos de AtHRS1. Marcado con una línea naranja está el péptido señal, constituido por los primeros 60 aminoácidos, y señalado con una flecha roja está el

aminoácido 51 que es el que varía en la proteína mutante. Por lo tanto, la mutación *athrs1-1* provoca un cambio en un aminoácido que forma parte del péptido señal de la proteína y que, por tanto, podría ser relevante para su correcta localización subcelular.



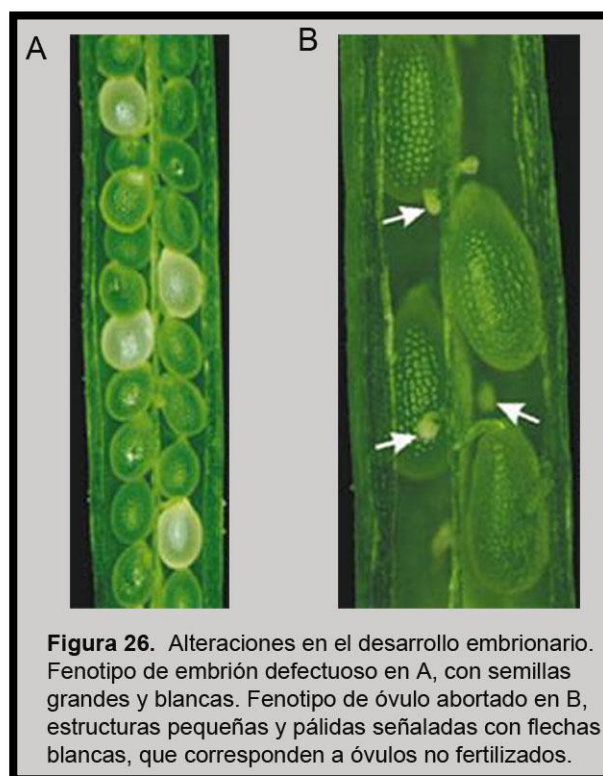
Se realizaron a continuación análisis *in silico* de secuencia usando los programas Mitoprot II y ChloroP, que sirven para predecir, según la secuencia de aa del péptido señal, la probabilidad de que la proteína esté localizada en la mitocondria o en el cloroplasto, respectivamente. En la **Tabla 4** se muestra el análisis comparado de secuencia para los péptidos señal WT y mutante *athrs1-1*.

	Probabilidad de migración a Mitocondria	Sitio de corte del péptido señal (para Mitocondria)	Probabilidad de migración a Cloroplasto	Sitio de corte del péptido señal (para cloroplasto)
WT	0,9939	Después aa 50	0,522	Después aa 41
<i>athrs1-1</i>	0,9932	Después aa 50	0,527	Después aa 41

Tabla 4. Datos de predicción de secuencia para las proteínas AtHRS1 WT y mutante *athrs1-1*. Datos obtenidos de las bases Mitoprot II y ChloroP.

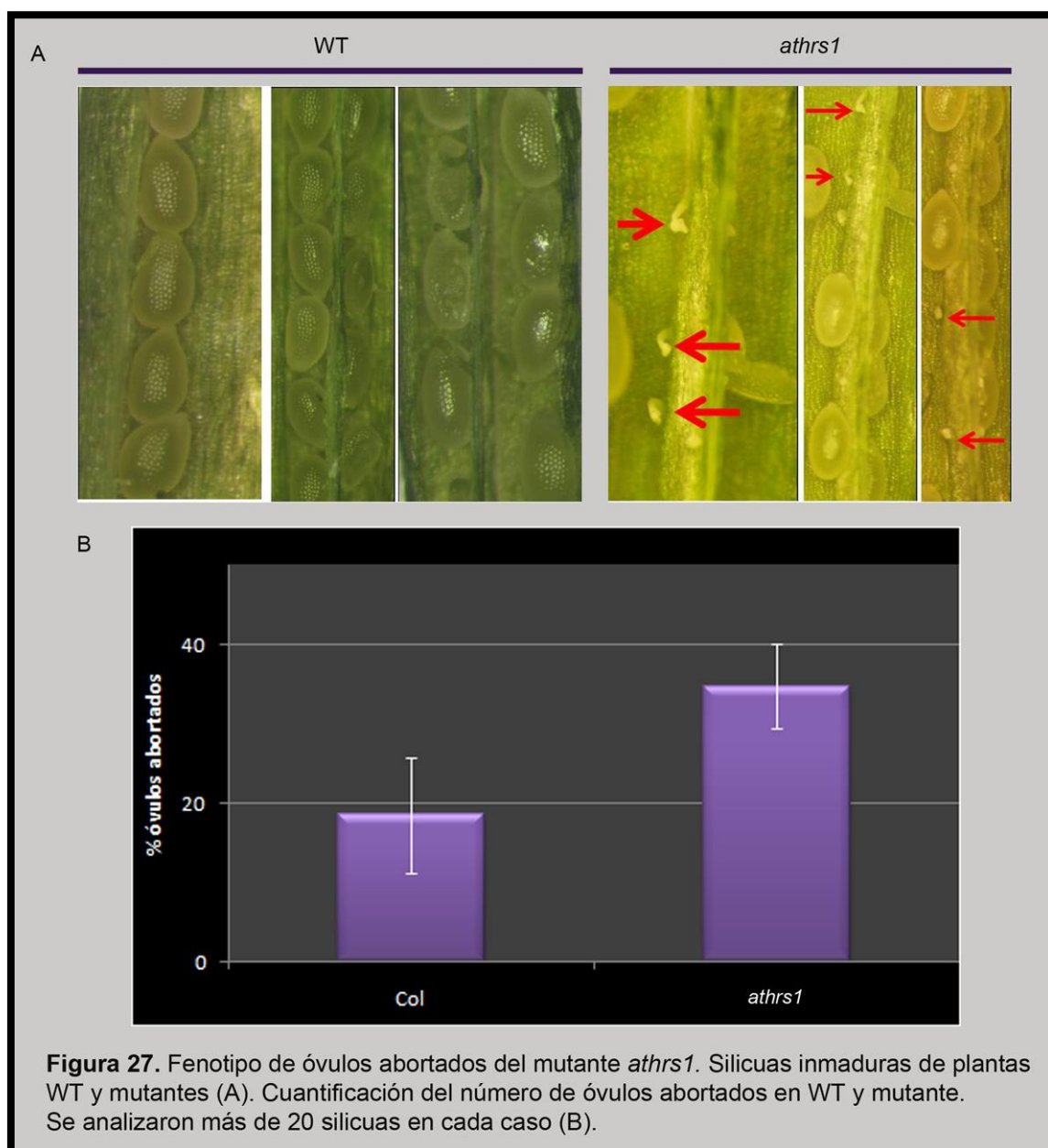
Según los datos de la **Tabla 4**, la probabilidad de que la proteína se localice en mitocondria y cloroplasto es la misma en el WT que en el mutante *athrs1-1*. Tampoco cambian los sitios de corte predichos para el péptido señal en la proteína mutante. El sitio de corte predicho para la mitocondria es entre los aminoácidos 50 y 51. El residuo que cambia en el mutante es el 51, pero incluso con este cambio de aminoácido la predicción de sitio de corte se sigue conservando entre los aminoácidos 50 y 51 en el mutante. Por tanto, *athrs1-1* presenta una mutación puntual en la región del péptido señal de la proteína AtHRS1, que marca a la proteína para su transporte al interior de la mitocondria.

En la bibliografía (Berg M y col. 2005) está descrito que en mutantes nulos para las aminoacil-tRNA sintetasa (aaRS) se observan alteraciones en el desarrollo embrionario. En general, la presencia de embriones defectuosos, es característico de un mutante nulo para una aaRS de localización cloroplástica (**Figura 26A**). Sin embargo, los mutante nulos de aaRS de localización mitocondrial muestran un fenotipo distinto, de óvulos abortados (**Figura 26B**).



Al hacer un estudio de los embriones del mutante *athrs1-1*, observamos la presencia de óvulos abortados (**Figura 27A**). En la publicación mencionada anteriormente se obtienen porcentajes de óvulos abortados entre 26% y casi 60% para

silicuas heterocigotas de los mutantes nulos de aaRS con señal de localización a mitocondrias, ya que la mutación nula para aaRS en homocigosis es letal (Berg M y col. 2005). En el mutante *athrs1-1* observamos un porcentaje de óvulos abortados del 34% aproximadamente (**Figura 27B**), casi el doble que el porcentaje encontrado en plantas silvestres, y similar al de algunos mutantes nulos, a pesar de ser *athrs1-1* un mutante puntual.



Por lo tanto, la mutación *athrs1-1* se localiza en el péptido señal de una aaRS. El fenotipo de óvulos abortados sugiere que la mutación podría afectar la localización de la proteína a la mitocondria. La deslocalización de aaRS en la mitocondria podría

ser responsable de las alteraciones en el desarrollo embrionario de la planta, impidiendo la correcta formación del tejido vascular dando lugar a una raíz que no consigue elongar correctamente. Actualmente estamos determinando la localización subcelular de AtHRS1 en el mutante *athrs1-1*.

3. IMPLICACIÓN DE LA ACTINA2 EN LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN DE AUXINAS Y BRASINOSTEROIDES

3.1. Efecto de los brasinosteroides en el fenotipo de raíz del mutante

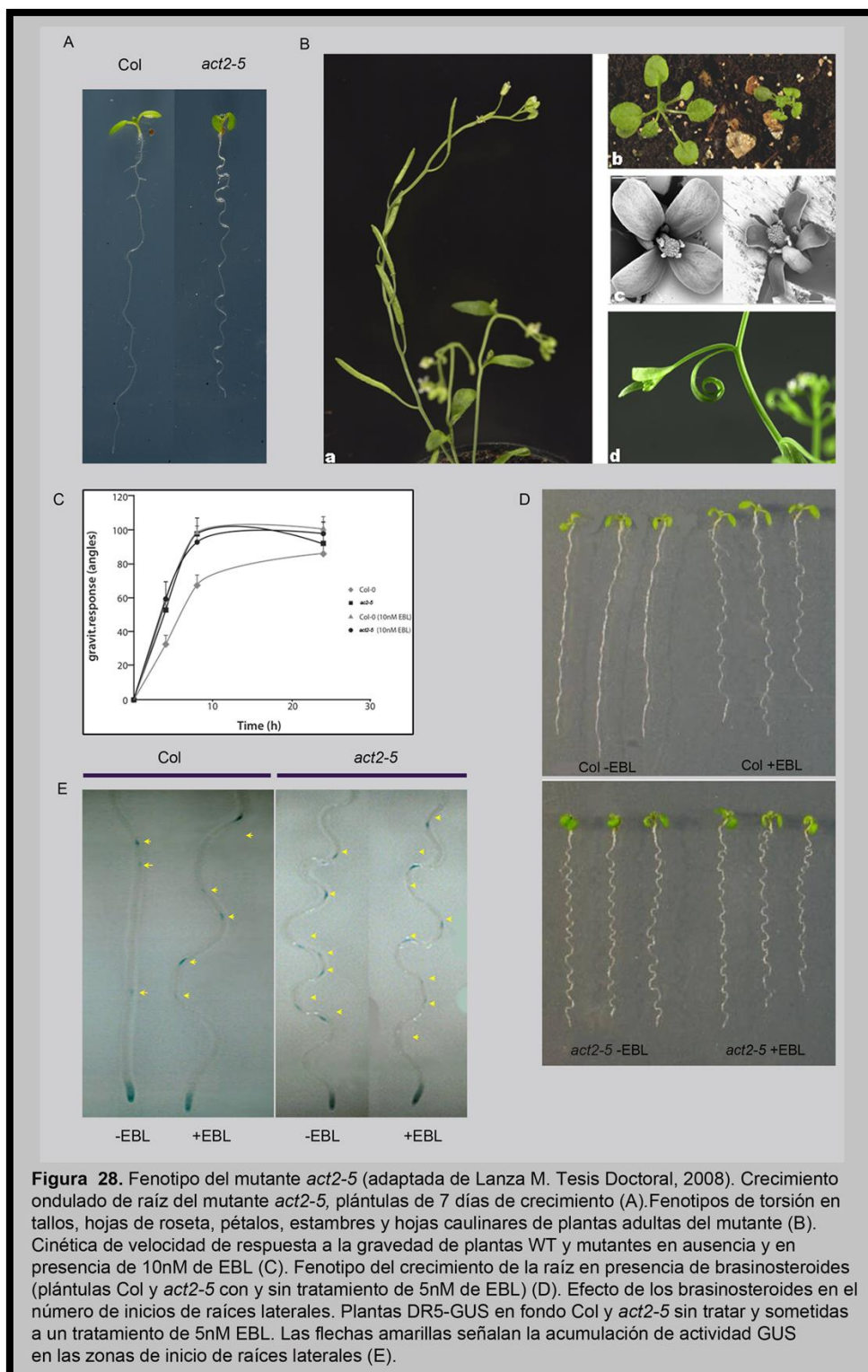
En el rastreo mencionado en el punto 1.1 se identificó también un mutante que mostraba un crecimiento ondulado de la raíz, por ello fue nombrado *wavy* (descrito en Lanza M. 2008, Tesis Doctoral). El mutante no presenta ninguna otra alteración en el desarrollo de la raíz, su elongación y el número de raíces laterales es similar a las plantas silvestres. Este mutante *wavy* presenta también una serie de fenotipos constitutivos de giro y torsión en los órganos de la parte aérea, incluyendo cotiledones, pétalos, hojas y silicuas (**Figura 28 A y B**).

Basándonos en el fenotipo de la raíz, mediante paseo cromosómico, identificamos que la proteína WAVY es un nuevo alelo mutante del gen de la *ACTINA2*. La mutación *wavy* consiste en un cambio puntual en la secuencia de nucleótidos que da lugar a la sustitución de la Arg-179 por una Cys en el mutante. Pasamos a denominar al mutante *act2-5*, siguiendo la numeración de otros alelos mutantes descritos previamente.

El fenotipo ondulado de raíz que presenta el mutante es similar al crecimiento zigzagueante que se observa en las raíces de plantas crecidas en placas de agar inclinadas unos 45° sobre la horizontal, en un medio que la raíz no pueda penetrar. En la literatura y en experiencias previas en el laboratorio, hemos comprobado que el medio en el que se crecen las plantas influye en la intensidad de su fenotipo de raíz. Así por ejemplo, hemos observado un incremento en la intensidad de fenotipos de raíces mutantes en un medio pobre en nutrientes como el Johnson (Bates TR y Lynch, 1996) o en un medio MS con bajo contenido en nitrato (MSBN). De hecho, se considera que estos medios proporcionan a la planta unas condiciones más próximas a las que se encuentran en un medio natural, potenciando un desarrollo radicular más funcional (Lanza M. 2008, Tesis Doctoral). Por tanto, este medio MSBN fue usado para los experimentos con el mutante *act2-5*, permitiéndonos así observar más fácilmente los cambios en el fenotipo de crecimiento ondulado de la raíz en respuesta

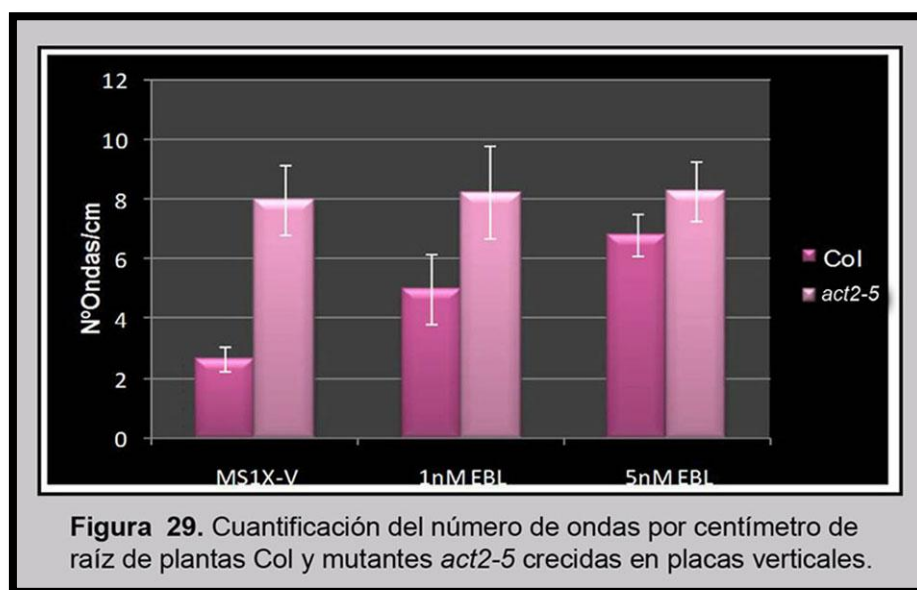
a los diferentes tratamientos.

El fenotipo de respuesta a choque está mediado por gravitropismo y por el transporte basipétalo de auxinas (Simmons C y col. 1995; Rashotte AM y col. 2000). Otra hormona que estimula la respuesta gravitrópica son los brasinosteroides (Kim S y col. 2000; Li L y col. 2005). En realidad, auxina y brasinosteroides actúan de forma sinérgica no sólo en la respuesta gravitrópica sino también en otras respuestas como la formación de raíces laterales o la elongación del hipocotilo (Bao F y col. 2004; Nemhauser JL y col. 2004). Ya que la respuesta a la gravedad es un buen ejemplo de la interdependencia entre auxinas y brasinosteroides, decidimos evaluar la cinética de graviestimulación en el fondo mutante. Como se muestra en la **Figura 28C** la cinética de respuesta a la gravedad está aumentada en el mutante *act2-5*. Esta cinética no varía en presencia del brasinosteroide epibrasinolide (EBL). Sin embargo, plantas silvestres expuestas a EBL muestran una velocidad de respuesta a la gravedad mayor que las plantas sin tratar, siendo su cinética idéntica a la de plantas *act2-5* (**Figura 28C**). Esta observación sugiere que, para la respuesta al estímulo gravitatorio, *act2-5* se comporta como un mutante de respuesta constitutiva a brasinosteroides.



Decidimos entonces comprobar si el mutante *act2-5* mostraba también otras respuestas a brasinosteroides de forma constitutiva. De hecho, en el laboratorio hemos determinado que la exposición a brasinosteroides provoca un crecimiento ondulado de la raíz de forma similar al observado en el mutante (**Figura 28D**). Plantas

silvestres expuestas a concentraciones crecientes de EBL sufren un incremento del número de ondas por cm, mimetizando al mutante *act2-5*. Sin embargo, el mutante no muestra un incremento en el número de ondas, lo que indica que la respuesta a BR está saturada en el mutante *act2-5* (**Figura 28D** y **Figura 29**). Estos resultados sugieren que *act2-5* se comporta como un mutante de respuesta constitutiva a BR también para este carácter.



El número de raíces laterales es otro buen ejemplo del efecto de los brasinosteroides, y de la interacción auxinas/brasinosteroides (Bao F y col. 2004). Se ha descrito que los brasinosteroides aumentan el número de raíces laterales en una planta silvestre y que el tratamiento conjunto de auxina y EBL provoca un incremento sinérgico del número de raíces laterales. Como se ha mencionado anteriormente, el mutante no muestra un incremento del número de raíces laterales. Sin embargo decidimos estudiar este carácter en más detalle, analizando la respuesta de la planta al tratamiento con hormonas. En primer lugar, analizamos el patrón de expresión del promotor sintético de respuesta a auxinas y brasinosteroides, DR5, fusionado al gen GUS (de Smet I y col. 2007). Como se muestra en la **Figura 28E**, el número de inicios de raíces laterales es notablemente mayor en el mutante *act2-5*. Además, el tratamiento con EBL en plántulas silvestres fenocopia a *act2-5* mientras que el mutante no muestra un incremento adicional en el número de inicios de raíces laterales en presencia de brasinosteroides.

La cuantificación del número de raíces laterales en plantas Col y *act2-5* (**Tabla 5**) mostró que, aunque el mutante presenta un mayor número de inicios de raíces laterales (flechas amarillas en **Figura 28E**), el número de raíces laterales que desarrolla es similar al de plantas silvestres. En nuestras manos, las plantas silvestres expuestas al tratamiento con EBL no muestran un aumento significativo en el número de laterales. Sin embargo, *act2-5* presenta un incremento significativo del número de raíces laterales en respuesta a auxinas, siendo este aumento superior al de plantas silvestres tratadas con la misma hormona. Por tanto, *act2-5* tiene comprometido el desarrollo posterior de los primordios, y en respuesta a auxina, se produce la elongación de todos los inicios, lo que se traduce en un mayor número de raíces laterales. Este resultado indica que *act2-5* se comporta como una planta hipersensible a auxina. Por otro lado, plantas silvestres expuestas a un tratamiento combinado de auxinas y brasinosteroides muestran un número de raíces laterales similar al del mutante *act2-5* tratado solamente con auxinas (**Tabla 5**). Por lo tanto, el efecto sinérgico de los brasinosteroides en la promoción de raíces laterales en respuesta a auxinas se manifiesta de forma constitutiva en el mutante.

	Mock	+EBL	+IAA	+IAA+EBL
Col	2,3±0,08	1,8±0,13	4,3±0,14	6,4±0,35
<i>act2-5</i>	1,9±0,08	1,8±0,19	6,3±0,18	6,5±0,51

Tabla 5. Número de raíces laterales de Col y *act2-5* en respuesta al tratamiento con auxina y/o brasinosteroides.

3.2. Efecto de los brasinosteroides en el citoesqueleto de actina

El gen alterado en el mutante *act2-5* codifica para la proteína ACTINA2 que forma parte del citoesqueleto de las células vegetales. Esta proteína es una de las formas más abundante de entre los miembros de la familia de la actina (An YQ y col.

1996; Ringli C y col. 2002). El análisis fenotípico del mutante indica que el citoesqueleto participa de forma activa en la respuesta de las plantas a auxina y brasinosteroides. Experimentos realizados en otros laboratorios indican que la auxina es capaz de alterar la configuración del citoesqueleto. Plantas tratadas con auxinas muestran unos filamentos de actina más cortos y finos, lo que se correlaciona con un incremento del transporte de la hormona y por tanto, de la respuesta a auxina (Maisch J y col. 2007; Nick P y col. 2009). En base a estas observaciones, dado que los brasinosteroides aumentan la respuesta a auxina, decidimos estudiar el efecto de esta hormona en la configuración del citoesqueleto de actina. Para ello se visualizó la F-actina *in vivo* en plántulas de *Arabidopsis* usando plantas transgénicas que expresan el segundo dominio de unión a actina (ABD2) de la fimbrina, fusionado a la proteína verde fluorescente GFP (Wang YS y col. 2008). Como podemos ver en la **Figura 30A**, en las células epidérmicas de plantas silvestres aparecen filamentos largos con una fluorescencia intensa. Plantas silvestres expuestas a EBL muestran fibras de actina más finas y cortas, siendo la señal de fluorescencia mucho más débil (**Figura 30B**). Esta configuración es muy similar a la que presentan los haces de actina de plantas expuestas a un tratamiento con auxina (Nick P y col. 2009).

Del mismo modo, visualizamos el citoesqueleto de actina en el mutante generando líneas transgénicas que expresan la proteína de fusión ABD2-GFP en fondo *act2-5*. Como vemos en la **Figura 30A**, *act2-5* muestra filamentos de actina cortos y menos agrupados que el silvestre. Por lo tanto, la configuración de los filamentos de actina en el fondo mutante está alterada, de forma similar a como vemos esa configuración en plantas silvestres tratadas con EBL. En el mutante, el tratamiento con EBL no tiene un efecto adicional significativo.

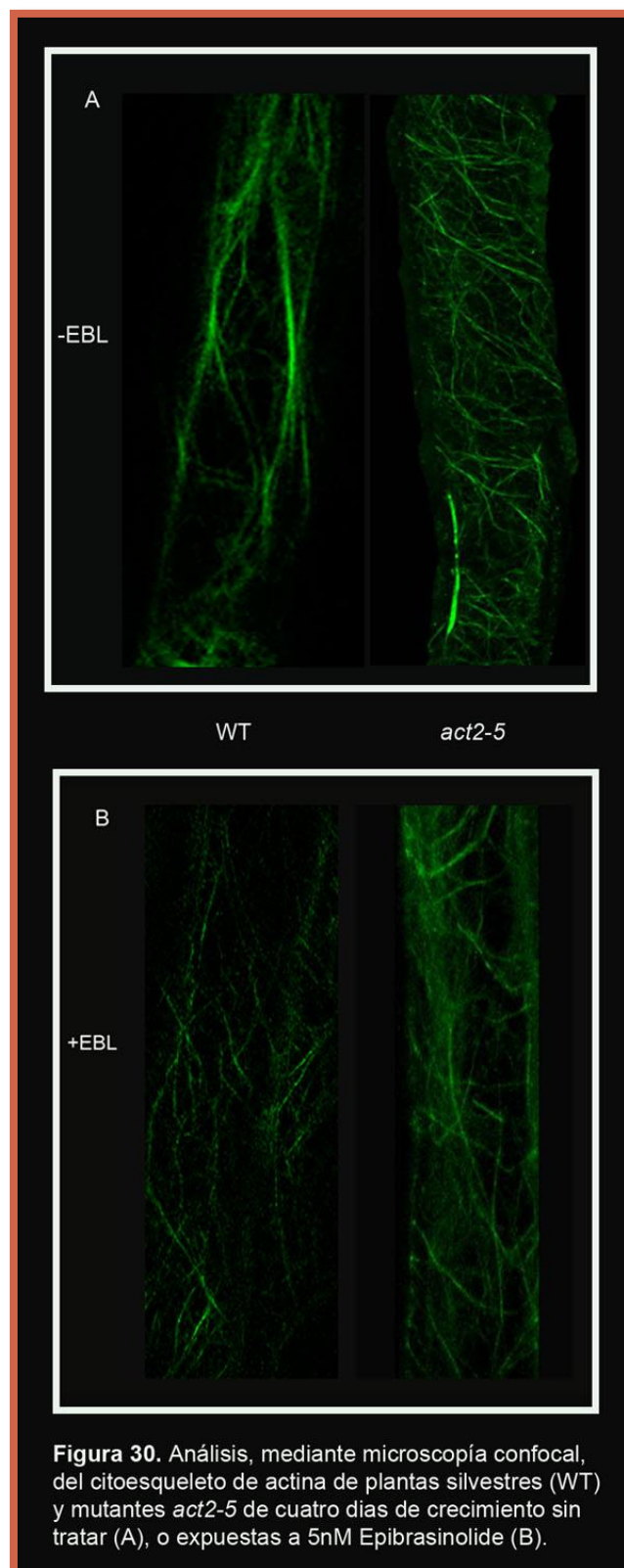


Figura 30. Análisis, mediante microscopía confocal, del citoesqueleto de actina de plantas silvestres (WT) y mutantes *act2-5* de cuatro días de crecimiento sin tratar (A), o expuestas a 5nM Epibrasinolide (B).

3.3. Efecto de los brasinosteroides en la localización de los transportadores de auxinas

La auxina es transportada desde las zonas de la planta en que se sintetiza hasta el resto de células mediante los transportadores PIN-FORMED (PIN). Estos transportadores, se localizan en principio de forma uniforme a lo largo de toda la membrana plasmática de la célula, y en respuesta a auxina son relocalizados de forma polar a través de los endosomas (Dhonuske P y col. 2008a). De esta forma los transportadores son reciclados constantemente, favoreciendo el transporte direccional de la hormona. Este proceso de localización polar de los transportadores de auxina esta mediada por el citoesqueleto (Geldner N y col. 2001; Dhonuske P y col. 2008b). La respuesta a auxina depende del establecimiento de gradientes de la hormona y, por lo tanto, de la correcta localización de estos transportadores. Dado que el mutante *act2-5* muestra un fenotipo de hipersensibilidad a auxinas mediada por brasinosteroides, decidimos analizar el efecto de los brasinosteroides en la localización del transportador de auxina PIN2 (Sukumar P y col. 2009) en el mutante *act2-5*. Este transportador se encarga del transporte basipétalo de la auxina, desde el ápice de la raíz hasta la parte aérea, y por tanto, su localización en la membrana celular es basal. El experimento se llevó a cabo usando una línea transgénica que expresa la proteína PIN2 fusionada a GFP (Müller A y col. 1998). Como se observa en la **Figura 31**, la localización polar de PIN2 se altera parcialmente en presencia de EBL. En el mutante *act2-5*, PIN2 está parcialmente despolarizado, de manera similar a como se observa en plantas silvestres tratadas con EBL (**Figura 31A**).

Estos resultados indican que el efecto de los brasinosteroides en la configuración del citoesqueleto es una respuesta primaria que conduce a la deslocalización polar del transportador de auxinas PIN2.

Todos los resultados expuestos hasta ahora indican que el mutante *act2-5* mimetiza los fenotipos característicos de respuesta a brasinosteroides, por tanto, se comporta como un mutante de respuesta constitutiva a esta hormona.

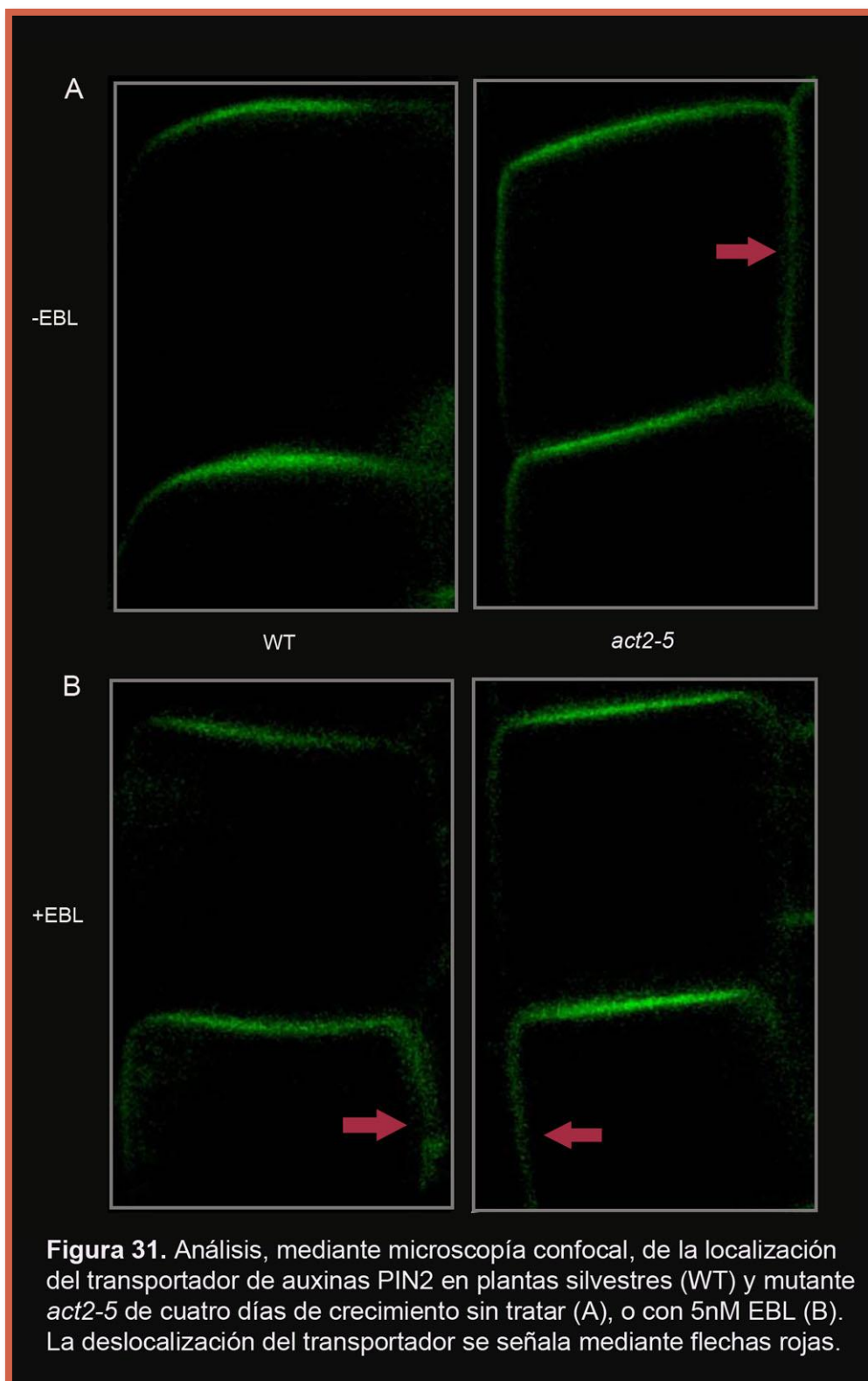


Figura 31. Análisis, mediante microscopía confocal, de la localización del transportador de auxinas PIN2 en plantas silvestres (WT) y mutante *act2-5* de cuatro días de crecimiento sin tratar (A), o con 5nM EBL (B). La deslocalización del transportador se señala mediante flechas rojas.

3.4. Análisis de la respuesta transcripcional a auxinas en el mutante *act2-5*

Los brasinosteroides incrementan la sensibilidad a auxinas (Vert G y col. 2008) en muchos procesos de desarrollo (lo hemos visto anteriormente en el efecto que tiene la acción conjunta de ambas hormonas en el desarrollo de raíces laterales, **Tabla 5**). El efecto sinérgico de los brasinosteroides en las respuestas a auxina no se limita a respuestas morfológicas, sino que se produce también a nivel transcripcional (Goda H y col. 2002; Yin Y y col. 2002; Nakamura A y col. 2003a y 2003b; Vert G y col. 2008; Nemhauser JL y col. 2004). Estudios de análisis globalizado muestran que un conjunto de genes que responden tanto a brasinosteroides como a auxinas, son inducidos de forma sinérgica cuando las plantas son expuestas al tratamiento con ambas hormonas (Nemhauser JL y col. 2004; Vert G y col. 2008).

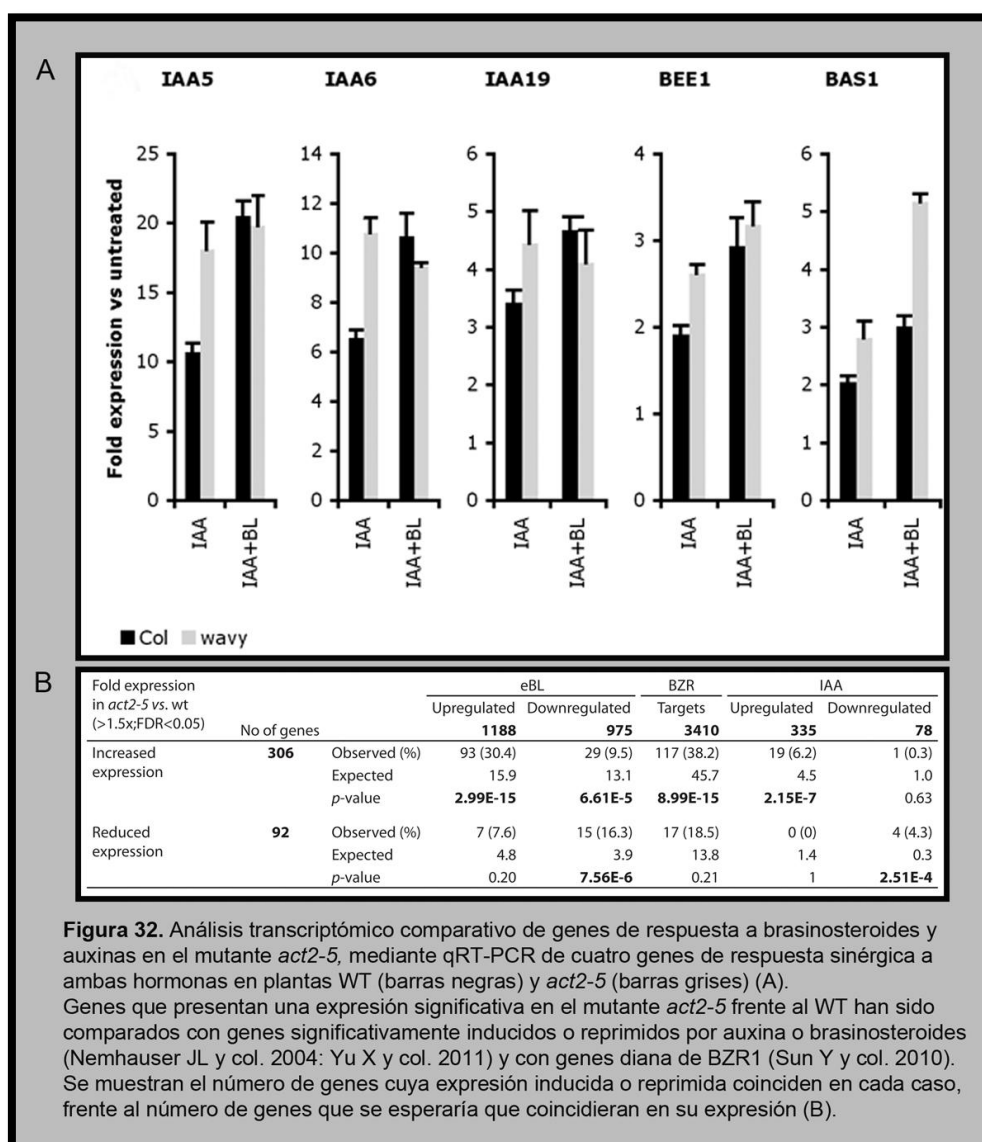
En esta tesis hemos mostrado que el mutante *act2-5* fenocopia plantas silvestres tratadas con brasinosteroides. Por tanto, decidimos analizar el perfil transcriptómico del mutante *act2-5* con el fin de determinar si la regulación transcripcional de la respuesta sinérgica a auxina:brasinosteroides está activada constitutivamente en el fondo mutante. Primero se llevó a cabo qRT-PCR en cinco genes de respuesta a auxina que habían mostrado previamente una inducción sinérgica en respuesta a un tratamiento combinado de brasinosteroides y auxinas (Goda H y col. 2004; Vert G y col. 2008; Nemhauser JL y col. 2004).

Como aparece en la **Figura 32A**, en plantas silvestres todos los genes analizados muestran un incremento de la respuesta a auxinas en presencia de brasinosteroides. En el fondo mutante la respuesta a auxina es mayor que en las plantas silvestres y en cuatro de los genes analizados, el nivel de inducción de respuesta a auxinas es similar al que se observa en plantas silvestres expuestas al tratamiento combinado de auxinas y brasinosteroides. Por tanto, el mutante también mimetiza a las plantas tratadas con brasinosteroides a nivel transcripcional.

Con objeto de analizar el significado del aumento de la respuesta a auxinas en el fondo mutante, y si este aumento puede extenderse a los genes inducibles por brasinosteroides, se hizo una comparación de perfiles transcriptómicos entre plantas silvestres y *act2-5*. Para ello se usaron micromatrices de oligonucleótidos de Affymetrix representando 22000 genes de *Arabidopsis*. De este análisis, identificamos en el mutante *act2-5* 307 genes que presentan un nivel de inducción mayor que en el silvestre (del orden de 1,5 veces mayor). Asimismo, observamos que en 92 genes la

expresión está reprimida en el mutante en comparación con plantas silvestres (**Figura 32B**).

La comparación de nuestros resultados con resultados previos de micromatrices usando plántulas tratadas con auxinas o con brasinosteroides (Nemhauser JL y col. 2004; Zhao Y y col. 2003; Yu X y col. 2011) mostró que, de todos los genes que presentan una mayor expresión en el fondo mutante frente al silvestre, un 6% son genes que se ven inducidos en respuesta a auxina, y el 30% son genes inducibles por brasinosteroides (**Figura 32B**). Por lo tanto, un número significativo de genes inducidos en el mutante *act2-5* están regulados por auxinas o por brasinosteroides.



Al comparar los genes que presentan un aumento de su expresión en el mutante *act2-5*, con genes que son diana directa para el factor de transcripción BZR1 (clave en la ruta de respuesta a brasinosteroides, Sun Y y col. 2010), observamos que casi el 40% de estos genes son diana para BZR1.

Todos estos resultados indican un papel del citoesqueleto de actina como integrador en la señalización de auxinas y brasinosteroides.

4. CARACTERIZACIÓN DE MUTANTES SUPRESORES DE LA MUTACIÓN ACT2-5

4.1. *Rastreo de mutantes supresores del fenotipo act2-5*

Con el fin de identificar nuevos genes implicados en la integración de las rutas de señalización de auxinas y brasinosteroides, decidimos realizar una búsqueda de mutantes supresores del fenotipo del mutante *act2-5*. Para ello se llevó a cabo el rastreo de una población de semillas de *act2-5* mutagenizadas de nuevo con EMS, con el objetivo de encontrar plantas mutantes que hayan revertido el fenotipo de raíz ondulada (Lanza M, 2008. Tesis Doctoral).

Como resultado de este escrutinio, identificamos cuatro mutantes supresores del fenotipo de raíz ondulada (**Tabla 6**). Mediante marcadores dCAPs comprobamos que estos mutantes conservaban el cambio puntual en el gen de la *ACTINA2*. Estos mutantes se retrocruzaron tres veces con el *act2-5* para eliminar otras mutaciones diferentes a la de interés. Los mutantes fueron llamados, según su orden de obtención en el rastreo como *wsup3*, *wsup5*, *wsup6* y *wsup7* (*wsup* de “wavy suppressor”).

Búsqueda de mutantes supresores del fenotipo <i>act2-5</i>	
Semillas mutagenizadas analizadas	42000
Plantas seleccionadas por fenotipo supresor	133
Plantas recomprobadas y con mutación <i>act2-5</i>	4

Tabla 6. Datos del escrutinio de mutantes supresores de la mutación *act2-5*.

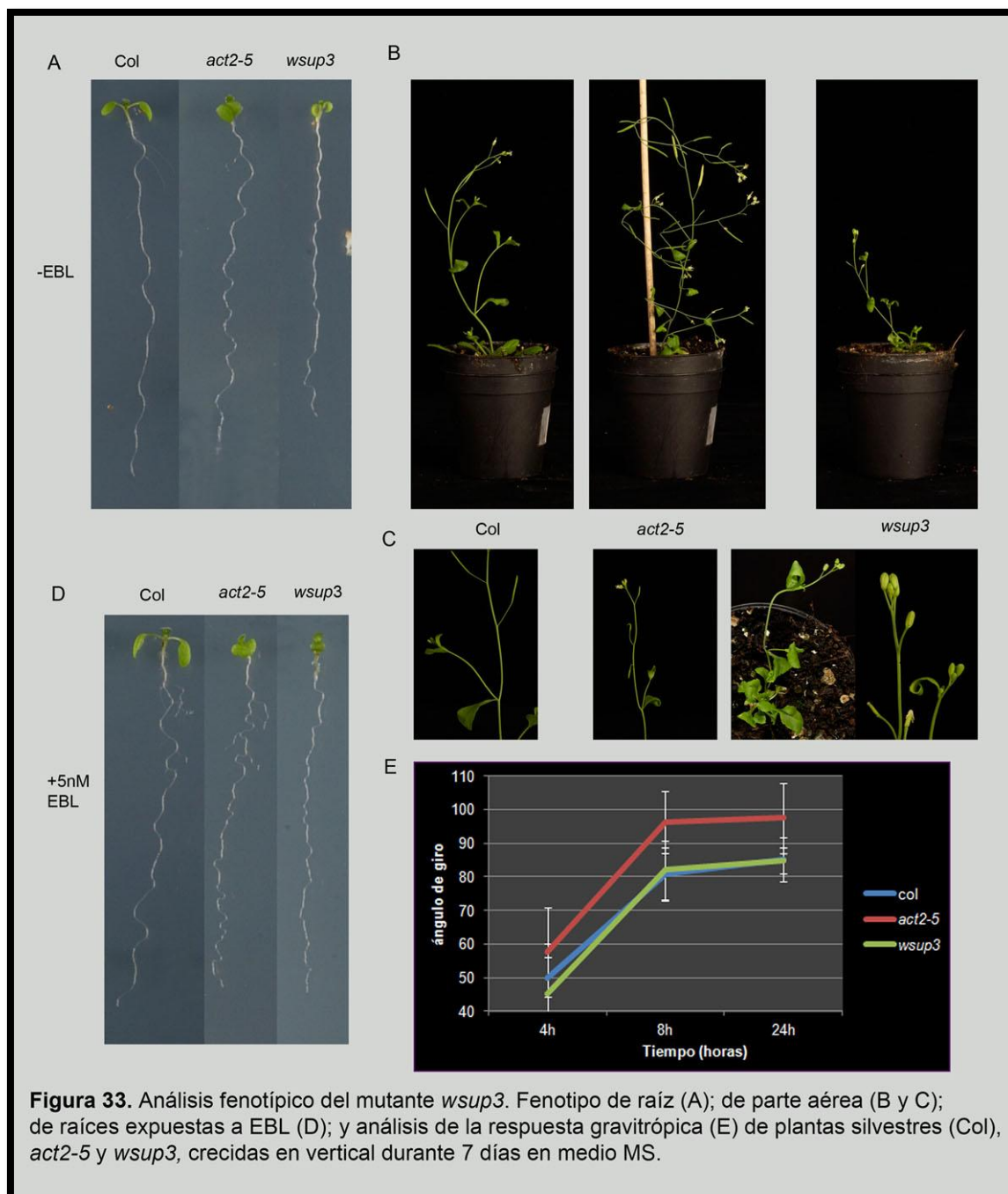
Con el fin de determinar el grado de supresión de la respuesta a brasinosteroides en los mutantes, analizamos el crecimiento de la raíz en presencia de la hormona y su velocidad de respuesta a la gravedad.

4.2. Caracterización del mutante *wsup3*

Los resultados que vemos en la **Figura 33** corresponden a la planta que denominamos *wsup3*.

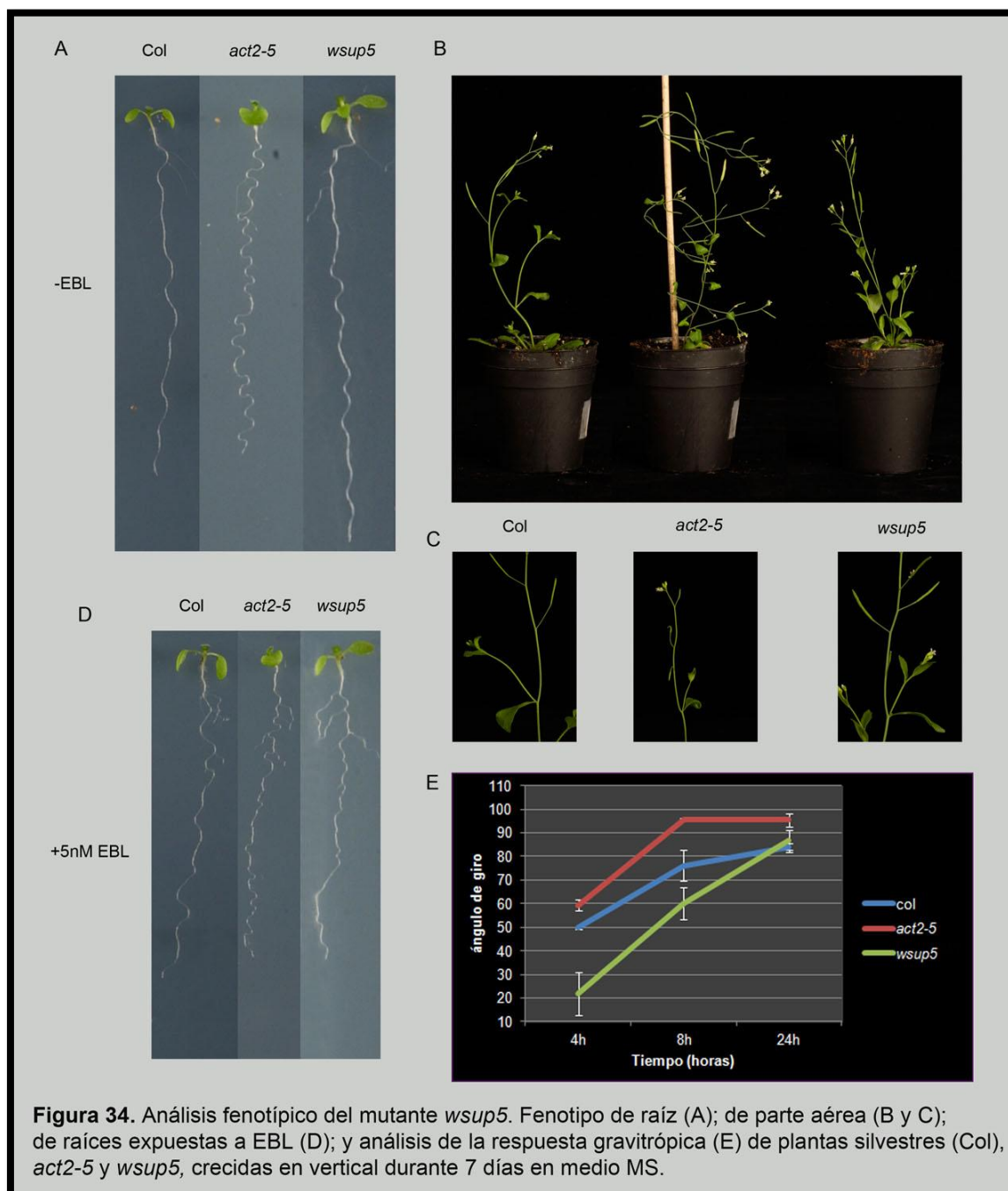
En el panel **A** vemos que la raíz del mutante *wsup3* crece de forma quebrada; este fenotipo recuerda al de plantas crecidas a concentraciones muy altas de brasinosteroides. Los cotiledones en *wsup3* se presentan torsionados sobre sí mismos al igual que en el mutante *act2-5*. Asimismo, se observa que el nuevo mutante presenta fenotipos de torsión en el tallo y las hojas caulinares (**Figura 33B**). Las hojas de roseta crecen rizadas hacia el envés, de forma similar a las del mutante *act2-5* (**Figura 33C**). El tratamiento con brasinosteroides apenas afecta al fenotipo de la raíz del nuevo mutante (**Figura 33D**). Al graviestimular plantas Col, *act2-5* y *wsup3* vemos que este último tiene una velocidad de respuesta idéntica a la de las plantas de genotipo silvestre (**Figura 33E**).

Este estudio indica que *wsup3* muestra fenotipos exacerbados de torsión en parte aérea y raíz. Sin embargo, el incremento de la cinética de respuesta gravitrópica está suprimido en *wsup3*.



4.3. Caracterización del mutante *wsup5*

El mutante *wsup5* presenta una raíz recta y cotiledones extendidos, idénticos a una planta silvestre (**Figura 34A**). Asimismo, el mutante no presenta ningún tipo de torsión en la parte aérea (**Figura 34B y C**).



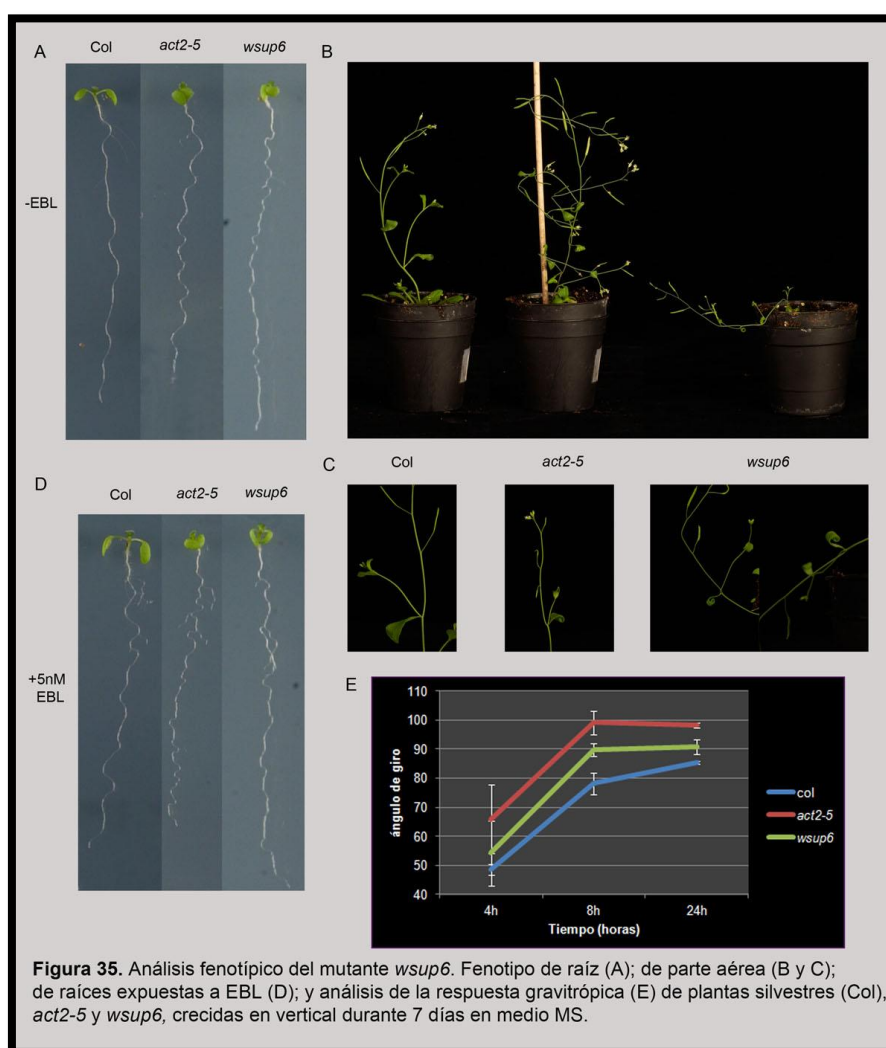
El tratamiento con brasinosteroides provoca el crecimiento ondulado de la raíz de *wsup5* (**Figura 34D**) de manera similar a la raíz de Col. El mutante es más lento que el silvestre en su velocidad de respuesta a la gravedad, igualándose la velocidad

de respuesta de ambas plantas llegadas las 24 horas después de haber sido graviestimuladas (**Figura 34E**).

Estos resultados indican que la nueva mutación que encontraremos en el mutante *wsup5* proporciona a la planta un fenotipo silvestre en todos los aspectos estudiados, excepto en la velocidad de respuesta a la graviestimulación, haciéndola más lenta que las plantas silvestres.

4.4. Caracterización del mutante *wsup6*

En la **Figura 35A** se describe el fenotipo de raíz de *wsup6*.



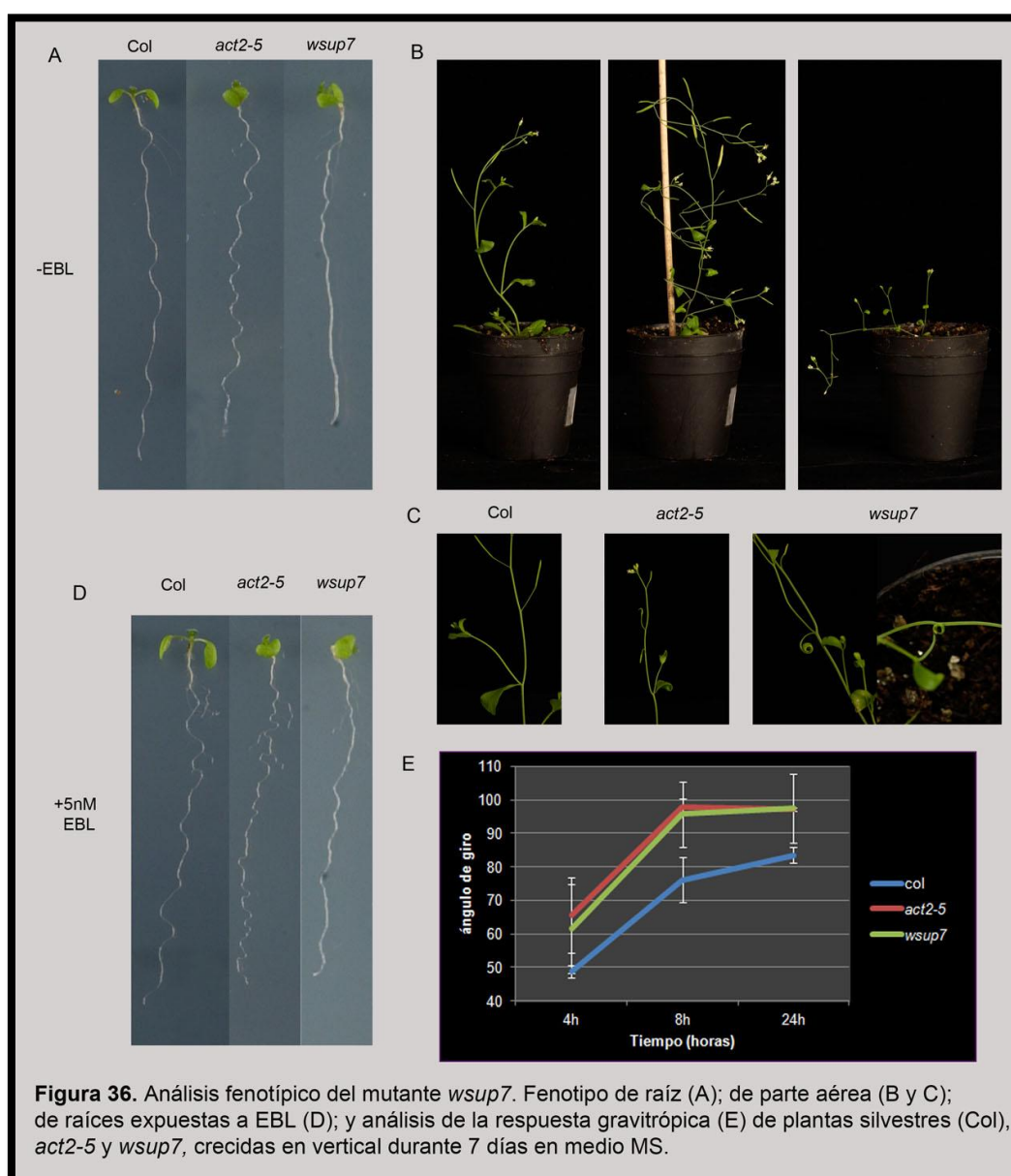
Este mutante muestra unas ondulaciones menos pronunciadas que la raíz del mutante *act2-5*. De hecho, el aspecto de la raíz es algo quebrado, similar al mutante *wsup3* y, por tanto, mimetizando a plantas expuestas a dosis altas de brasinosteroides. El mutante *wsup6* muestra un porte menor que *act2-5*, y los

fenotipos de torsión de la parte aérea son evidentes tanto en los cotiledones de las plántulas como en las hojas de plantas adultas (**Figura 35B y C**), siendo muy similar a los del mutante *act2-5*.

En presencia de brasinosteroides (**Figura 35D**) la raíz de *wsup6* no parece sufrir cambios. En cuanto a la graviestimulación, este nuevo mutante tiene una velocidad de respuesta intermedia entre el silvestre y el *act2-5*.

4.5. Caracterización del mutante *wsup7*

Por último estudiamos el mutante *wsup7*.



Como podemos observar en la **Figura 36A**, el mutante tiene una raíz más gruesa que la planta silvestre y prácticamente recta. Sin embargo, la torsión en los órganos aéreos es muy notable, llegando a formar auténticos bucles en el tallo (**Figura 36 B y C**).

El tratamiento con brasinosteroides provoca un ligero ondulado en la raíz del mutante y la velocidad de respuesta a la graviestimulación es muy alta respecto al silvestre, llegando a valores similares a los del mutante *act2-5*.

En esta tesis hemos identificado, por tanto, cuatro mutantes supresores:

wsup3, que se comporta como el silvestre en cuanto a la velocidad de respuesta a la gravedad. Su torsión de parte aérea es incluso más exagerada que en *act2-5*, igual que el fenotipo de raíz, que crece de forma quebrada simulando el crecimiento de la raíz de plantas tratadas con altas concentraciones de EBL.

wsup5 presenta fenotipo silvestre en todos los aspectos estudiados, salvo en la velocidad de respuesta a la graviestimulación, que es incluso más lenta que la de las plantas silvestres.

wsup6 muestra un crecimiento de la raíz con ondulaciones algo quebradas, pero no presenta un fenotipo tan extremo como el mutante *wsup3*. Su velocidad de respuesta a la gravedad es algo más lenta que la mostrada por *act2-5* pero más rápida que la de plantas silvestres.

wsup7 solo muestra supresión del fenotipo *act2-5* de raíz, manteniendo intactas la velocidad de respuesta a la gravedad y las torsiones de la parte aérea.

La caracterización molecular de estos mutantes supresores nos permitirá identificar nuevos componentes implicados en la integración de las rutas de señalización de auxinas y brasinosteroides mediadas por el citoesqueleto de actina.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El estudio del desarrollo del sistema radicular tiene una gran importancia agronómica. Por este motivo, el entendimiento de los mecanismos que permiten la adaptación de los programas de desarrollo de la raíz al conjunto de condiciones ambientales, es esencial para mejorar el rendimiento de los cultivos en base a la mejora en su capacidad de anclaje, captación de agua y asimilación de nutrientes del suelo. En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio molecular y genético de dos mutantes alterados en el desarrollo de su sistema radicular. El primero de ellos, *athrs1-1*, presenta una mutación puntual en el gen *AtHRS1*, que codifica para una proteína implicada en la traducción de proteínas en mitocondrias y cloroplastos. Esta mutación provoca en la planta un problema en la fecundación, que se traduce en un aumento en el número de óvulos abortados. Los embriones que resultan ser viables tienen alterada la maduración del tejido xilemático de la raíz, lo que da lugar a la interrupción del crecimiento de la raíz principal. El segundo mutante, denominado *act2-5*, es un nuevo alelo del gen que codifica para la proteína ACTINA2 del citoesqueleto, que provoca en la planta un fenotipo constitutivo de crecimiento ondulado de la raíz, similar al de la respuesta a choque. Los resultados aquí presentados permiten relacionar a este mutante con la intercomunicación de las rutas de señalización de brasinosteroides y auxina. Finalmente, en esta tesis se ha llevado a cabo el rastreo de mutantes supresores del fenotipo de *act2-5* que servirán como herramientas para la identificación de nuevos genes que participan en la integración de las rutas de señalización de estas dos hormonas, mediada por el citoesqueleto.

*1. Caracterización del alelo mutante *athrs1-1* de *Arabidopsis* alterado en el desarrollo de la raíz principal*

Las aminoacil-tRNA sintetasas (aaRS) son enzimas clave en la traducción de proteínas mediando la unión de los aminoácidos a sus correspondientes moléculas de ARN de transferencia (Freist W y col. 1999). En este tesis hemos identificado un nuevo alelo mutante de una histidil-tRNA sintetasa (HisRS), denominada *AtHRS1*, responsable de la síntesis de his-tRNA, esencial para la incorporación del aminoácido Histidina en las proteínas (Freist W y col. 1999). Este mutante que denominamos *athrs1-1*, muestra un fenotipo pronunciado de raíz corta sin presentar otros fenotipos relevantes en el resto de la planta. La Histidina es uno de los aa esenciales para la síntesis proteica y su importancia queda bien demostrada al comprobarse que los

inhibidores de su síntesis son letales para las plantas (Guyer D y col. 1995; Mori I y col. 1995). No obstante, se han descrito mutantes alterados en la ruta de biosíntesis de His, como el *hpa1* (Mo X y col. 2006), que no presentan defectos fenotípicos generalizados propios del ayuno de Histidina, de forma similar al mutante *athrs1-1* identificado en esta tesis. Ambos mutantes muestran una parte aérea idéntica a la de plantas silvestres y sin embargo su raíz principal no es capaz de desarrollarse completamente. Sin embargo, mientras que *hpa1* muestra un defecto en el mantenimiento del meristemo radicular, nuestro mutante no presenta alteraciones en el meristemo y sí en la maduración de los vasos xilemáticos. Por tanto, los diferentes estados de desarrollo de la planta, deben ser más o menos susceptibles a la falta de His (Mo X y col. 2006).

En plantas, la síntesis proteica se da en tres compartimentos subcelulares (citosol, mitocondria y cloroplasto), lo que requiere que diferentes versiones de las aaRS se localicen en todos estos compartimentos teniendo además que ser funcionales para los t-RNAs de origen mitocondrial, cloroplástico y nuclear (Woodson JD y col. 2008). Estas proteínas por tanto, llevan información en el extremo N-terminal de su secuencia, que las señala para su localización final en un orgánulo determinado. En la mayoría de las familias de aaRs hay proteínas marcadas de forma dual para su transporte a mitocondria y cloroplasto (Brandão MM y Silva-Filho MC, 2011). Evidencias experimentales demuestran que esto mismo ocurre con la proteína AtHRS1 (Akashi K y col. 1998). El mutante *athrs1-1* presenta un cambio puntual en la base 151 del gen *AtHRS1*, que se traduce en un cambio del aminoácido 51 de una Glicina a una Serina. Según los datos obtenidos en esta tesis mediante análisis de la secuencia de aa del péptido señal usando las bases de datos Mitoprot II y ChloroP, pudimos determinar que este aminoácido 51 se sitúa flanqueando el sitio de corte del péptido señal que marca a la proteína para su transporte al interior de la mitocondria.

Las características de un péptido señal varían según la localización final de la proteína sea a cloroplasto (Zybailov B y col. 2008), a mitocondria (Roise D y col. 1986; Huang S y col. 2009) o para ambos orgánulos (von HeijneG y col. 1989; Chabregas SM y col. 2001). Hay multitud de estudios intentando identificar un dominio estructural consenso implicado en la señalización de las proteínas hacia unos orgánulos o a otros (von HeijneG y col. 1989). Más recientemente se han llevado a cabo estudios que han permitido desarrollar bases de datos de secuencias de péptidos señal, lo que facilita hacer un análisis predictivo de localización de una proteína según la secuencia

aminoacídica de este péptido (Duchêne AM y col. 2005, Carrie C y col. 2009b; Pujol C y col. 2007).

AtHRS1 presenta características para una localización dual, mostrando una Arginina a continuación de la Metionina inicial (característico de señalización a mitocondrias), y una secuencia rica en Serinas (rasgo característico de señalización a cloroplastos). Además, la presencia de Leucinas, Alaninas y aa cargados positivamente, representa una parte importante de la secuencia, lo que es típico de péptidos señal de marcaje dual, corroborando así las evidencias experimentales obtenidas previamente (Akashi K y col. 1998). El péptido señal de AtHRS1 presenta también dos dominios β -lámina y un dominio α -hélice, que han sido descritos como frecuentes en la estructura secundaria de proteínas con señalización para cloroplasto y mitocondria, respectivamente (Zybailov B y col. 2008; Huang S y col. 2009). La estructura secundaria de una proteína está determinada por la hidrofobicidad de su cadena polipeptídica y por los plegamientos y enlaces que se forman como consecuencia de esta. Algunos estudios señalan que es importante para un péptido señal de marcaje a orgánulos, presentar un centro hidrofóbico con distribución asimétrica de cargas, que permita una unión específica a la membrana de los orgánulos para estabilizar toda la maquinaria de procesamiento de la proteína hacia el interior del orgánulo (Roise D y col. 1986; Prabhakaran M, 1990; Glaser E y col. 1998). Al analizar la hidrofobicidad de la secuencia de aa de AtHRS1, vemos que existe un pico de hidrofobicidad a la altura del aa situado en la posición 50. Al producirse el cambio del aa 51 en el mutante *athrs1-1*, este pico se hace algo más hidrofóbico. Por otro lado, también se ha descrito que la conservación de un aminoácido hidrofóbico en la posición +1 desde el sitio de corte del péptido señal es clave en el contacto con la maquinaria de procesamiento de la mitocondria (Dvoráková-Holá K y col. 2010). Esta observación es importante en el contexto de este trabajo, ya que la mutación en *athrs1-1* provoca la sustitución de un aminoácido hidrofóbico (Glicina) por otro hidrofílico (Serina) en esta posición +1 desde el sitio de corte de la secuencia señal para la mitocondria, lo que podría dar lugar a la alteración de la localización subcelular de la proteína AtHRS1 en el mutante *athrs1-1*. Sin embargo, ninguna de estas características son determinantes. Se ha visto, por ejemplo, que las estructuras en α -hélice no son suficientes por sí mismas para el procesamiento de una proteína en la membrana de la mitocondria, y por tanto, se necesitan de otras estructuras en la proteína para un correcto plegamiento y reconocimiento por parte de los mecanismos de transporte al interior del orgánulo (Tanudji M y col. 1999). En nuestro caso,

utilizando un programa de predicción de estructura secundaria de proteínas denominado PsiPred (Bryson K y col. 2005; Berglund AK y col. 2009), hemos podido determinar que el cambio en el aminoácido 51 en la secuencia mutante *athrs1-1* provoca un cambio en la estructura de una α -hélice del péptido señal de la proteína y un cambio en la estructura β -lámina a la altura del aminoácido 380. No obstante, la importancia que tiene este cambio de estructura secundaria en la localización subcelular de ATHRS1-1 está aún por demostrar experimentalmente. De hecho, existen varias revisiones recientes sobre la estructura y evolución de las aaRS y los elementos determinantes en su marcaje dual a mitocondria y cloroplasto (Berglund AK y col. 2009; Carrie C y col. 2009a; Duchêne AM y col. 2009), en las que se llega a la conclusión de que no hay una regla general sobre cómo están distribuidos los determinantes de la señalización dual en el péptido señal. Existen evidencias, sin embargo, de que cambios puntuales de un solo aa en el péptido señal pueden llegar a ser determinantes en la localización subcelular de una proteína (Pujol C y col. 2007). Asimismo, utilizando la base de datos PsiPred (Bryson K y col. 2005), hemos observado que la mutación en *athrs1-1* provoca que el péptido señal no quede hacia el exterior del orgánulo, si no hacia el interior, lo que dificultaría su procesamiento y, como consecuencia, su internalización por medio del mecanismo de reconocimiento y transporte hacia el interior de los orgánulos.

Por tanto, la mutación puntual en el gen *AtHRS1* del mutante *athrs1-1* implica un cambio notable en la estructura secundaria de la proteína que podría ser determinante para el correcto transporte a cualquiera de los dos orgánulos. Sin embargo, todas estas predicciones no nos permiten discernir si está afectado el transporte a un determinado orgánulo o hacia los dos de igual forma; esto requeriría evidencias experimentales que no han podido obtenerse durante el transcurso de esta tesis.

Evidencias indirectas obtenidas en este trabajo, indican que *athrs1-1* podría presentar una alteración al menos parcial en su localización a mitocondrias. Está descrito que la presencia de óvulos abortados se correlaciona con una falta de funcionalidad de proteínas aaRS con señalización para mitocondrias (Berg M y col. 2005). En esta tesis hemos determinado que el mutante *athrs1-1* presenta un número significativamente mayor de óvulos abortados que los que aparecen en plantas silvestres, lo que indica que la mutación podría afectar preferencialmente a la correcta localización de la proteína en mitocondrias. Si esto es así, es sorprendente que un

mutante que tenga alterada la síntesis de proteínas mitocondriales sólo muestre afectado el desarrollo de la raíz. Se sabe que el correcto funcionamiento de la mitocondria y su síntesis de proteínas son esenciales en las primeras etapas de desarrollo del embrión (Steinebrunner I y col. 2011; Jiang K y col. 2006) y en especial en el desarrollo de la raíz. Durante el desarrollo embrionario, por ejemplo, existe una fase muy importante para el correcto desarrollo de la raíz que se denomina “reclutamiento de la hipófisis”. Esta fase del desarrollo embrionario requiere una gran cantidad de energía para llevar a cabo el reciclaje de los transportadores de membrana de la auxina, implicados en este proceso. Si la obtención de energía se ve comprometida, como sucedería si la síntesis de proteínas mitocondriales estuviera alterada, es de esperar que ello de lugar a defectos en el desarrollo de embrión (Berg M y col. 2005; Hauser BA y col. 2006; Steinebrunner I y col. 2011; Kägi C y col. 2010), y en etapas posteriores del desarrollo del sistema radicular (Jia L y col. 2010; Tomaz T y col. 2010; Yuan H y col. 2012). Así por ejemplo, el mutante *mp* para el gen *MONOPTEROS*, alterado en este reclutamiento de la hipófisis durante el desarrollo, presenta una zona de división de la raíz más corta que el WT (Jenik PD y col. 2007), de forma muy similar a lo observado en el mutante *athrs1-1*.

Otro efecto de la alteración de la síntesis proteica en mitocondrias es que las plantas en las que el funcionamiento de la cadena respiratoria es deficiente presentan acumulación de ROS, lo que llevará consigo alteraciones dramáticas en el desarrollo de la planta (Kubo T y col. 2008). No sabemos hasta qué punto es importante la relación entre la mitocondria y los niveles de ROS para el crecimiento celular, pero se ha visto que la inactivación de una enzima mitocondrial (Malato Deshidrogenasa) implicada en el metabolismo y la homeostasis redox, provoca una disminución del crecimiento en *Arabidopsis* (Tomaz T y col. 2010). Se ha descrito también una proteína mitocondrial de maíz implicada en el desarrollo de la raíz principal. En la planta mutante existe un aumento de la producción de ROS y de la muerte celular y una pérdida de elongación celular, lo que conlleva el desarrollo de una raíz postembrionaria corta. Estas observaciones demuestran que la mitocondria juega un papel esencial en el desarrollo de la raíz (Jia L y col. 2010).

Podemos por tanto, especular que el mutante *athrs1-1* tiene alterado, al menos parcialmente, la localización de la aaRS, lo cual posiblemente sea crítico durante el desarrollo embrionario mientras que no lo será en estados posteriores del desarrollo, donde una limitación de energía podría verse compensada por un incremento en el

número de mitocondrias, al aumentar el número de células en la planta adulta. Esto podría explicar porqué el mutante *athrs1-1* presenta una alteración a nivel del desarrollo del embrión asociada a una alteración del tejido vascular, mientras que esta limitación de energía no afecta a la planta en etapas posteriores del desarrollo, como es el caso de la parte aérea o de las raíces adventicias. De hecho, está descrito que los genes de traducción, aminoacilación y síntesis proteica están muy representados en el xilema maduro, lo que indica que la síntesis proteica es muy importante para el correcto desarrollo de los vasos xilemáticos (Brady SM y col. 2007). Si la síntesis de proteínas en la mitocondria está parcialmente afectada en el mutante *athrs1-1*, puede que esta sea la causa del incorrecto desarrollo del xilema. En estos momentos, los análisis basados en predicción de secuencias no permiten asegurar que exista un cambio en la forma en la que la proteína migra hacia la mitocondria y es introducida en este orgánulo para llevar a cabo allí su función. Se hace necesario un estudio de la expresión y localización subcelular de la proteína *in vivo* en el fondo mutante *athrs1-1* que, desafortunadamente, no hemos tenido tiempo suficiente para realizar durante el desarrollo de esta tesis.

2. Implicación del gen *ACTIN2* en la comunicación de las rutas de señalización de auxina:brasinosteroide

El mutante *act2-5* ha sido identificado como un nuevo alelo del gen *ACTINA2*, que codifica para la ACTINA2, una proteína del citoesqueleto. El crecimiento ondulado de la raíz que muestra *act2-5* es el mismo que presentan las plantas silvestres cuando crecen en placas de agar inclinadas y con un medio de crecimiento que no pueden penetrar, activándose así la respuesta a choque. Este fenómeno está mediado por el gravitropismo y el transporte basipétalo de auxina (Rashotte AM y col. 2000; Simmons C y col. 1995). La respuesta gravitrópica depende de los gradientes de auxina, y se ve incrementada en presencia de brasinosteroides (Rahman A y col. 2010; Rashotte AM y col. 2000; Sukumar P y col. 2009), por lo que la respuesta de la raíz de las plantas a la gravedad es un ejemplo de la interdependencia de las rutas de respuesta a estas dos hormonas. El mutante *act2-5* presenta una cinética de respuesta a la gravedad más rápida que la de plantas silvestres, y similar a la de plantas silvestres tratadas con brasinosteroides, lo que indica que *act2-5* es hipersensible al estímulo gravitatorio. La respuesta a choque es un mecanismo importante a la hora del correcto desarrollo de la raíz (Migliaccio F y col. 2009), pero también lo es a la hora de que la planta responda adecuadamente a cambios ambientales (Braam J, 2005; Migliaccio F y col. 2009). Todo ello es esencial en el adecuado desarrollo del sistema radicular, y la

identificación de este nuevo alelo de la ACTINA2 demuestra que el citoesqueleto es un factor esencial para la correcta configuración del sistema radicular.

El mutante *act2-5* presenta una alteración de la configuración del citoesqueleto, presentando filamentos más cortos y finos, de forma similar a cómo se altera el citoesqueleto de la planta en presencia de auxina (Nick P y col. 2009). En este trabajo hemos demostrado que los brasinosteroides provocan una reconfiguración del citoesqueleto de forma similar a como lo hace la auxina. Además, hemos observado que el tratamiento del mutante *act2-5* con brasinosteroides no provoca una configuración distinta a la observada de forma constitutiva en el mutante sin tratar, lo que indica que esta respuesta está saturada en el mutante.

La dinámica del citoesqueleto de actina es esencial para el transporte de vesículas, por lo que una adecuada organización del citoesqueleto también se hace necesaria para la correcta localización de los transportadores de auxina y, por tanto, para la respuesta de la planta a esta hormona (Friml J y col. 2002; Geldner N y col. 2001; Grebe M y col. 2003; Dhonukshe P y col. 2008b). La importancia de la auxina como reguladora del crecimiento de las plantas está ampliamente documentada, y esta regulación es llevada a cabo mediante el establecimiento de gradientes de la hormona (Benjamins R y Scheres B, 2008; Kleine-Vehn J y Friml J, 2008; Leyser O, 2006; Rahman A y col. 2010; Vanneste J y Friml J, 2009). La implantación de estos gradientes se consigue con un sistema de transporte de la auxina altamente regulado (Wiśniewska J y col. 2006), en el que intervienen los transportadores PIN que, con su correcta localización polar y su constante reciclaje entre la membrana plasmática y los compartimentos endosomales, modulan este transporte de la hormona en los diferentes tejidos de la planta (Dhonukshe P y col. 2007; Dhonukshe P y col. 2008a; Geldner N y col. 2001; Steinmann T y col. 1999). En esta tesis hemos observado que *act2-5* presenta una deslocalización parcial del transportador PIN2, lo que se relaciona con un incremento en el reciclado de los transportadores de auxina y por tanto de su transporte. Además, hemos demostrado que los brasinosteroides provocan una deslocalización de PIN2 de forma similar a la observada en el mutante *act2-5*. Todos estos análisis indican que el citoesqueleto está participando en la respuesta a auxinas mediadas por brasinosteroides.

El adecuado establecimiento de los gradientes de auxina en la planta es imprescindible para que procesos como el crecimiento de la raíz, el desarrollo de raíces laterales (Bao F y col. 2004) y la respuesta a la gravedad (Hou G y col. 2003;

Yamamoto K y Kiss JZ, 2002) se den correctamente. De hecho, otro ejemplo de la interacción entre brasinosteroides y auxina es el desarrollo de raíces laterales (Bao F y col. 2004). El mutante *act2-5* en presencia de auxina desarrolla un mayor número de raíces laterales que las plantas silvestres, y ese número de raíces laterales es el mismo que se observa en plantas silvestres tras un tratamiento combinado de auxina y EBL. Por lo tanto, vemos que *act2-5* es hipersensible a auxina y presenta, de manera constitutiva, el mismo aumento en el número de raíces laterales que es promovido en plantas silvestres de manera sinérgica por auxina y brasinosteroides.

La auxina no solo actúa junto con los brasinosteroides de forma sinérgica (Halliday KJ, 2004; Hardtke CS, 2007) potenciando respuestas morfológicas de la planta como por ejemplo, la elongación del hipocotilo (Nakamura A y col. 2006; Nemhauser JL y col. 2004), el aumento del número de raíces laterales (Bao F y col. 2004) o la respuesta gravitrópica (Kim S y col. 2000; Li L y col. 2005). El efecto sinérgico del tratamiento combinado de estas hormonas también sucede a nivel transcripcional (Goda H y col. 2004; Nakamura A y col. 2003a; Nakamura A y col. 2003b; Nemhauser JL y col. 2004; Vert G y col. 2005; Vert G y col. 2008). En este trabajo hemos observado que en el mutante *act2-5* el tratamiento con auxina activa los genes de respuesta a esta hormona a los mismos niveles que los observados en plantas silvestres tratadas con auxinas y brasinosteroides. Además, al analizar el perfil transcriptómico de *act2-5*, encontramos que más del 30% de los genes activados en el mutante son genes de respuesta a brasinosteroides y casi un 40% de ellos son dianas del factor de transcripción BZR1, considerado como un marcador de la activación de la ruta de señalización de brasinosteroides (Sun Y y col. 2010). Estos resultados demuestran que el mutante *act2-5* se comporta como un mutante de respuesta constitutiva a brasinosteroides, lo que indica que cambios en la configuración del citoesqueleto son suficientes para activar la ruta de señalización implicada en la respuesta de las plantas a esta hormona.

Los mecanismos moleculares implicados en el efecto sinérgico de auxina y brasinosteroides a nivel transcripcional son aún desconocidos. Recientemente se ha descrito que la auxina controla, directa o indirectamente, la expresión de genes que participan en la síntesis de brasinosteroides. Un ejemplo es el gen *DWF4* (*DWARF4*), que codifica para una enzima que participa en la biosíntesis de brasinosteroides y su expresión está controlada por auxina (Chung Y y col. 2011; Yoshimitsu Y y col. 2011). Asimismo, la expresión del gen *CPD* (*CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS*

AND DWARF) que codifica para una enzima de la síntesis de brasinosteroides, está regulada por el factor de transcripción BRX (*BREVIS RADIX*), que es inducible, a su vez, por auxina (Mouchel CF y col. 2006). Por tanto, es posible que el incremento del transporte de auxinas mediado por la reconfiguración del citoesqueleto pueda ser suficiente para incrementar los niveles endógenos de brasinosteroides y por tanto, activar de forma constitutiva los genes de respuesta a esta hormona.

En el presente trabajo aportamos evidencias de que el citoesqueleto de actina puede actuar como nexo de integración entre las rutas de señalización de brasinosteroides y auxina. Se ha identificado un nuevo alelo mutante para la proteína ACTINA2 que presenta una alteración del citoesqueleto de actina similar a la que provocan los tratamientos con auxina o con brasinosteroides. El mutante *act2-5* presenta constitutivamente fenotipos de respuesta saturada a brasinosteroides como el crecimiento ondulado de la raíz o el incremento de la velocidad de respuesta a la gravedad (Li L y col. 2005); y fenotipos similares a la acción combinada de ambas hormonas, como es el incremento en el número de raíces laterales (Bao F y col. 2004) o la activación transcripcional de genes de respuesta sinérgica a ambas hormonas (Nemhauser JL y col. 2004). Este trabajo proporciona la evidencia genética de que los cambios que se observan en la configuración del citoesqueleto de actina del mutante *act2-5* son suficientes para activar la ruta de señalización de brasinosteroides y, por tanto, de que la actina es un punto de integración de la respuesta a auxina mediada por la señalización de brasinosteroides.

3. Identificación de mutantes supresores de la mutación *act2-5*

En este trabajo hemos identificado cuatro mutantes supresores del fenotipo mostrado por el mutante *act2-5*, en base a la supresión del crecimiento ondulado de la raíz. En el transcurso de esta tesis hemos caracterizado en estos mutantes el efecto de los brasinosteroides en el crecimiento de la raíz, la presencia de curvaturas y torsiones en órganos de la parte aérea y la velocidad de respuesta de la raíz a la estimulación gravitropica. El resultado de este análisis indica que el mutante *wsup7* es un supresor parcial; mientras que *wsup5* muestra un fenotipo de raíz y parte aérea más parecido al de las plantas silvestres y, por tanto, la supresión del fenotipo de *act2-5* es más acentuado. La identificación de los mutantes *wsup3* y *wsup6* es, sin embargo, una sorpresa ya que presentan un fenotipo de torsión de raíz y parte aérea más acentuado que el mostrado por el mutante original *act2-5*, pero, por el contrario, presentan una cinética de respuesta a la gravedad más lenta; idéntica a la de las plantas silvestres,

en el caso de *wsup3*, e intermedia entre plantas silvestres y *act2-5* para el caso de *wsup6*. Este resultado podría indicar que el mecanismo de respuesta gravitrópica opera de manera independiente al de torsión de la raíz y parte aérea. Sin embargo, es posible que una respuesta exacerbada a brasinosteroides, como parece indicar el fenotipo de raíces y parte aérea de los mutantes *wsup3* y *wsup6*, podría conducir a una disminución de la respuesta gravitrópica, ya que algunos de los fenotipos asociados a *act2-5* podrían estar controlados por fenómenos de retroinhibición. De hecho, cuando las plantas silvestres son sometidas a altas concentraciones de brasinosteroides, el crecimiento ondulado de la raíz queda suprimido. Puede que, entonces, la dinámica del citoesqueleto de actina se vea también alterada y, como consecuencia, la capacidad de respuesta a la gravedad se vea disminuída. La utilización de inhibidores de la síntesis de brasinosteroides y un análisis más detallado de los fenotipos, nos ayudarán a determinar la naturaleza de la respuesta a brasinosteroides en los mutantes *wsup3* y *wsup6*. La identificación de los genes *wsup* permitirá ayudar a entender los mecanismos moleculares implicados en la comunicación de las rutas de señalización de auxinas y brasinosteroides mediados por el citoesqueleto de actina.

4. Perspectivas futuras

- Estudios de localización “in vivo” e “in vitro” de la proteína AtHRS1 y *athrs1-1* nos permitirán determinar si la mutación identificada altera la localización de la proteína y si esta alteración es parcial. El carácter débil del alelo mutante identificado en este trabajo podría permitir determinar con más precisión los requerimientos energéticos de diferentes estados y/o programas de desarrollo.
- En el caso de la ACTINA2, se llevarán a cabo estudios de interacción de esta proteína en los procesos de desestructuración de la cromatina y de su implicación en la formación de complejos de inicio de la transcripción de genes regulados por brasinosteroides.
- Un primer acercamiento al estudio genético de los mutantes supresores comprende la secuenciación del gen *ACTINA2* para ver si una nueva mutación en este gen es responsable del fenotipo de los mutantes. Posteriormente se llevará a cabo el mapeo cromosómico de los mutantes para identificar los nuevos genes afectados, y la caracterización de las proteínas que codifican, lo que permitirá identificar nuevos componentes del mecanismo de integración de

las rutas de señalización de auxina y brasinosteroides mediada por el citoesqueleto de actina.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El mutante *athrs1-1* de raíz corta presenta un retraso en el crecimiento de su raíz principal sin presentar ningún fenotipo en el resto de la planta, lo que indica que pueda tratarse de un alelo débil.
2. El mutante *athrs1-1* presenta una alteración en la maduración de su tejido xilemático y del procambium. Estas modificaciones influyen en el fenotipo de raíz corta característico del mutante.
3. El mutante *athrs1-1* presenta una mutación puntual en el gen que codifica para la proteína AtHRS1 implicada en la síntesis proteica en mitocondrias y cloroplastos. Esta mutación modifica el aa 51 de su secuencia proteica, exactamente en el sitio de corte del péptido señal que marca a la proteína para su traslado a mitocondria, comprometiendo su correcta localización en el orgánulo.
4. El mutante presenta un incremento del número de óvulos afectados con respecto al silvestre, lo que indica la síntesis proteica en mitocondrias está alterada.
5. La síntesis proteica en mitocondrias, y el rendimiento energético de este orgánulo, son de gran importancia en el correcto desarrollo de la raíz principal, y no tanto en el desarrollo de parte aérea o raíces adventicias. Esta observación sugiere que la síntesis de proteínas esta parcialmente alterada en el mutante *athrs1-1* y que ello afecta de manera preferencial y crítica al correcto desarrollo de la raíz principal.
6. El mutante *act2-5* presenta una mutación puntual en el gen que codifica para la ACTINA2, proteína que forma parte del citoesqueleto, provocando una alteración en la configuración de este.
7. El mutante *act2-5* presenta un crecimiento ondulado de su raíz principal, de manera similar a como lo hace una raíz en respuesta a choque, lo que sugiere un papel importante del citoesqueleto en este tipo de respuesta.
8. El mutante *act2-5* presenta varios fenotipos de respuesta constitutiva a la hormona brasinosteroides, como son la alteración de la distribución de las fibras del citoesqueleto de actina, el crecimiento ondulado de su raíz, una velocidad alta de respuesta a la gravedad y la deslocalización, en la membrana celular, del transportador de auxina PIN2. Además, un número elevado de genes cuya expresión está inducida en el mutante respecto al silvestre, son genes diana para el factor de transcripción BZR1 implicado en la respuesta a brasinosteroides. Todo esto indica que la actina es suficiente para activar la ruta de señalización de brasinosteroides.

9. La planta mutante *act2-5* presenta constitutivamente dos fenotipos típicos de la respuesta sinérgica a auxina:brasinosteroides como son el aumento del número de raíces laterales o el incremento de la transcripción de genes de respuesta a auxinas y brasinosteroides en respuesta al tratamiento con ambas hormonas. Por lo que podemos concluir que el citoesqueleto de actina tiene un papel integrador en la señalización de auxinas y brasinosteroides, y de esta forma interviene en procesos de desarrollo del sistema radicular.
10. La mutación presente en *wsup5* está actuando como supresora total del fenotipo *act2-5*, contrarrestando el efecto de la mutación *act2-5* en la disposición del citoesqueleto de actina.
11. La mutación *wsup7* determina una supresión parcial del fenotipo *act2-5*, por lo que el citoesqueleto actuará de manera parcialmente independiente en el conjunto de los fenotipos asociados a la mutación *act2-5*.
12. Los exagerados fenotipos de torsión en raíces y parte aérea de los mutantes *wsup3* y *wsup6* podrían indicar que la nueva mutación está incapacitando al citoesqueleto de actina para responder correctamente al tratamiento con brasinosteroides y al estímulo gravitatorio, lo que supondría una alteración en la forma que el sistema radicular interactúa con su entorno.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemssen V, Blilou I, et al. 2004. The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119:109–20

Akashi K, Grandjean O, Small I. FEBS Lett. 1998 Jul 10;431(1):39-44. Potential dual targeting of an *Arabidopsis* archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts.

Aloni R, Langhans M, Aloni E, Ullrich CI. Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. *Planta* 2004; 220:177-82.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1;25(17):3389-402. Review. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

An y col. 1988. Direct *Agrobacterium* transformation: freeze-thaw method. *Plant Molecular Biology Annual* 1-19.

An YQ, McDowell JM, Huang S, McKinney EC, Chambliss S, Meagher RB. 1996 Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* Jul;10(1):107-21.

Antosiewicz DM, Polisensky DH y Braam J (1995) Cellular localization of the Ca²⁺ binding TCH3 protein of *Arabidopsis*. *Plant J* 8: 623-636

Armengaud P. *Plant Signal Behav.* 2009 Feb;4(2):139-41. EZ-Rhizo software: the gateway to root architecture analysis.

Arnaud C, Bonnot C, Desnos T, Nussaume L. *C R Biol.* 2010 Apr;333(4):335-43. Epub 2010 Mar 15. The root cap at the forefront.

Bao F, Shen J, Brady SR, Muday GK, Asami, T., and Yang, Z. (2004). Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134, 1624-1631

Bechtold N y Pelletier G (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* 82:259-266

Beebe SE, Rojas-Piercea, Yanb, Blair, Pedrazac, Muñoz, Tohmea y Lynche (2006) Quantitative Trait Loci for Root Architecture Traits Correlated with Phosphorus Acquisition in Common Bean *Crop Sci* 46: 413-423

Benfey PN, Linstead PJ, Roberts K, Schiefelbein JW, Hauser MT, Aeschbacher RA. *Development.* 1993 Sep;119(1):57-70. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis.

Benjamins R and Scheres B. (2008). Auxin: the looping star in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59, 443-465.

Bennett T, Scheres B. *Curr Top Dev Biol.* 2010;91:67-102. Review. Root development-two meristems for the price of one?

- Berg M**, Rogers R, Muralla R, Meinke D. *Plant J.* 2005 Dec;44(5):866-78. Requirement of aminoacyl-tRNA synthetases for gametogenesis and embryo development in Arabidopsis.
- Berglund AK**, Pujol C, Duchene AM, Glaser E. *J Mol Biol.* 2009 Nov 6;393(4):803-14. Epub 2009 Sep 4. Defining the determinants for dual targeting of amino acyl-tRNA synthetases to mitochondria and chloroplasts.
- Berleth T** y Jurgens G. 1993. The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the Arabidopsis embryo. *Development* 118:575–87
- Berleth T**, Mattsson J, Hardtke CS (2000) *Trends Plant Sci.* Sep;5(9):387-93. Vascular continuity and auxin signals
- Beuchat J**, Scacchi E, Tarkowska D, Ragni L, Strnad M, Hardtke CS. *New Phytol.* 2010a Oct;188(1):23-9. Epub 2010a Jul 23. BRX promotes Arabidopsis shoot growth.
- Beuchat J**, Li S, Ragni L, Shindo C, Kohn MH, Hardtke CS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010b May 4;107(18):8475-80. Epub 2010 Apr 19. A hyperactive quantitative trait locus allele of Arabidopsis BRX contributes to natural variation in root growth vigor.
- Blilou I**, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature.* Jan 6;433(7021):39-44.
- Bloom AJ**, Chapin, F.S. III y Mooney, H.A. (1985) Resource limitation in plants-an economic analogy. *Annu Rev Ecol Syst* 16: 363-392
- Boccalandro HE**, S.N. De Simone, A. Bergmann-Honsberger, I. Schepens, C. Fankhauser, J.J. Casal, Phytochrome Kinase Substrate1 regulates root phototropism and gravitropism, *Plant physiology* 146 (2008) 108–115.
- Bonke M**, Thitamadee S, Mähönen AP, Hauser MT, Helariutta Y. 2003 *Nature.* Nov 13;426(6963):181-6. APL regulates vascular tissue identity in Arabidopsis.
- Boonsirichai K**, y col. 2003. ARG1 is a peripheral membrane protein that modulates gravity-induced cytoplasmic alkalization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell*; 15:2612-25.
- Braam J y Davis RW** (1990) Rain-, wind-, and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in Arabidopsis. *Cell* 60: 357-364
- Braam J** (1992) Regulated expression of the calmodulin-related TCH genes in Cultured Arabidopsis cells: induction by calcium and heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3213-3216
- Braam J**, Sistrunk ML, Polisensky DH, Xu W, Purugganan MM, Antosiewicz DM, Campbell P, Johnson KA. *Planta.* 1997;203 Suppl:S35-41. Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the Arabidopsis TCH genes.
- Braam J** (2000) The Arabidopsis TCH genes: Regulated in expression by mechanotransduction?, Vol 83. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands

- Braam J** (2005) In touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytol* 165: 373- 389
- Brady SM**, Orlando DA, Lee JY, Wang JY, Koch J, Dinneny JR, Mace D, Ohler U, Benfey PN. *Science*. 2007 Nov 2;318(5851):801-6. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns.
- Brandão MM, Silva-Filho MC**. *Mol Biol Evol*. 2011 Jan;28(1):79-85. Epub 2010 Jul 12. Evolutionary history of *Arabidopsis thaliana* aminoacyl-tRNA synthetase dual-targeted proteins.
- Briggs WR**, J.M. Christie, Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors, *Trends in plant science* 7 (2002) 204–210.
- Bryson K**, McGuffin LJ, Marsden RL, Ward JJ, Sodhi JS, Jones DT. *Nucleic Acids Res*. 2005 Jul 1;33(Web Server issue):W36-8. Protein structure prediction servers at University College London.
- Camacho-Cristóbal JJ**, Rexach J, Conéjero G, Al-Ghazi Y, Nacry P, Dumas P. *Planta*. 2008 Aug;228(3):511-22. Epub 2008 May 28. PRD, an *Arabidopsis* AINTEGUMENTA-like gene, is involved in root architectural changes in response to phosphate starvation.
- Cannon** (1911) *The Root Habits of Desert Plants*. DC, Washington
- Caño-Delgado A**, Lee JY, Demura T. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010 Nov 10;26:605-37. Review. Regulatory mechanisms for specification and patterning of plant vascular tissues.
- Cárdenas L** (2009). New findings in the mechanisms regulating polar growth in root hair cells. *Plant Signal. Behav.* 4,4–8.
- Carlsbecker A**, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, Campilho A, Sebastian J, Bowman JL, Helariutta Y, Benfey PN. *Nature*. 2010 May 20;465(7296):316-21. Epub 2010 Apr 21. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate.
- Carrie C**, Giraud E, Whelan J. *FEBS J*. 2009a Mar;276(5):1187-95. Review. Protein transport in organelles: Dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts.
- Carrie C**, Kühn K, Murcha MW, Duncan O, Small ID, O'Toole N, Whelan J. *Plant J*. 2009b Mar;57(6):1128-39. Epub 2008 Dec 11. Approaches to defining dual-targeted proteins in *Arabidopsis*.
- Caspar T**, Pickard BG. *Planta*. 1989;177:185-97. Gravitropism in a starchless mutant of *Arabidopsis*: implications for the starch-statolith theory of gravity sensing.
- Chabregas SM**, Lucho DD, Farias LP, Ribeiro AF, van Sluys MA, Menck CF, Silva-Filho MC. *Plant Mol Biol*. 2001 Aug;46(6):639-50. Dual targeting properties of the N-terminal signal sequence of *Arabidopsis thaliana* THI1 protein to mitochondria and chloroplasts.
- Chen Z**, Noir S, Kwaaitaal M, Hartmann A, Wu M-J, Mudgil Y, Sukumar P, Muday G, Panstruga R, Jones A. 2009 *The Plant Cell*, Vol. 21: 1972–1991. Two Seven-Transmembrane Domain MILDEW RESISTANCE LOCUS O Proteins Cofunction in *Arabidopsis* Root Thigmomorphogenesis

- Chloupek O**, Forster BP y Thomas WT (2006) The effect of semi-dwarf genes on root system size in field-grown barley. *Theor Appl Genet* 112: 779-786
- Chung Y**, Maharjan, P.M., Lee, O., Fujioka, S., Jang, S., Kim, B., Takatsuto, S., Tsujimoto, M., Kim, H., Cho, S., et al. (2011). Auxin stimulates DWARF4 expression and brassinosteroid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J.* 66, 564-578.
- Claros MG**, Vincens P. *Eur. J. Biochem.* 241, 770-786. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences.
- Clouse SD, and Sasse JM** (1998). Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annu. Rev. Plant Phys. Mol. Biol.* 49, 427–451.
- Correll MJ**, J.Z. Kiss, Interactions between gravitropism and phototropism in plants, *Journal of plant growth regulation* 21 (2002) 89–101.
- Correll MJ**, J.Z. Kiss, The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots, *Plant & cell physiology* 46 (2005) 317–323.
- Daviere JM**, de Lucas, M., and Prat, S. (2008). Transcriptional factor interaction: A central step in DELLA function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18, 295–303.
- de Dorlodot S**, Forster B, Pages L, Price A, Tuberosa R y Draye X (2007) Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends Plant Sci* 12: 474-481
- de Smet I**, Lau S, Mayer U, Jürgens G. *Plant J.* 2010 Mar;61(6):959-70. Review. Embryogenesis - the humble beginnings of plant life
- de Smet I**, Tetsumura T, De Rybel B, Frey NF, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R, Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, Inzé D, Bennett MJ, Beeckman T. *Development.* 2007 Feb;134(4):681-90. Epub 2007 Jan 10. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis.
- Dellaporta SL**, Wood J y Hicks JB (1983). *Plant Mol Biol Rep.* 1: 19-21. A plant DNA miniprep: version II.
- Dello Iorio R**, Linhares FS, Scacchi E, Casamitjana-Martinez E, Heidstra R, Costantino P, Sabatini S: Cytokinins determine Arabidopsis root-meristem size by controlling cell differentiation. *Curr Biol* 2007, 17:678-682.
- Dello Iorio R**, Nakamura K, Moubayidin L, Perilli S, Taniguchi M, Morita MT, Aoyama T, Costantino P, Sabatini S: A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* 2008, 322:1380-1384.
- Desnos T.** *Curr Opin Plant Biol.* 2008 Feb;11(1):82-7. Epub 2007 Nov 19. Review. Root branching responses to phosphate and nitrate.
- Devic M.** *C R Biol.* 2008 Oct;331(10):726-36. Epub 2008 Sep 2. Review. The importance of being essential: EMBRYO-DEFECTIVE genes in Arabidopsis.

- Dhonukshe P**, Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D.G., Mravec, J., Stierhof, Y., and Friml, J. (2007). Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 17, 520-527.
- Dhonukshe P**, Tanaka, H., Goh, T., Ebine, K., Mähönen, A.P., Prasad, K., Blilou, I., Geldner, N., Xu, J., Uemura, T., et al. (2008a). Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 456, 962-966
- Dhonukshe P**, Grigoriev I, Fischer R, Tominaga M, Robinson DG, Hasek J, Paciorek T, Petrásek J, Seifertová D, Tejos R, Meisel LA, Zazimalová E, Gadella TW Jr, Stierhof YD, Ueda T, Oiwa K, Akhmanova A, Brock R, Spang A, Friml J. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2008b) Mar 18;105(11):4489-94. Epub 2008b Mar 12. Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes.
- di Laurenzio L**, Wysocka-Diller J, Malamy JE, Pysh L, Helariutta Y, Freshour G, Hahn MG, Feldmann KA, Benfey PN (1996) *Cell.* Aug 9;86(3):423-33. The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root.
- Dill A**, Jung, H.S., and Sun, T.P. (2001). The DELLA motif is essential for gibberellin-induced degradation of RGA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 14162–14167.
- Ditengou FA**, Teale, W.D., Kochersperger, P., Flittner, K. A., Kneuper, I., van der Graaff, E., Nziengui, H., Pinosa, F., Li, X., Nitschke, R. et al. (2008). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 18818-18823. Mechanical induction of lateral root initiation in Arabidopsis thaliana.
- Dolan L**, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B. *Development.* 1993 Sep;119(1):71-84. Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root.
- Duchêne AM**, Giritch A, Hoffmann B, Cognat V, Lancelin D, Peeters NM, Zaepfel M, Maréchal-Drouard L, Small ID. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Nov 8;102(45):16484-9. Epub 2005 Oct 26 Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in Arabidopsis thaliana.
- Duchêne AM**, Pujol C, Maréchal-Drouard L. *Curr Genet.* 2009 Feb;55(1):1-18. Epub 2008 Dec 16. Review. Import of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases into mitochondria.
- Dvoráková-Holá K**, Matusková A, Kubala M, Otyepka M, Kucera T, Vecer J, Herman P, Parkhomenko N, Kutejova E, Janata J. *J Mol Biol.* 2010 Mar 12;396(5):1197-210. Epub 2010 Jan 4. Glycine-rich loop of mitochondrial processing peptidase alpha-subunit is responsible for substrate recognition by a mechanism analogous to mitochondrial receptor Tom20.
- Eapen D**, M.L. Barroso, M.E. Campos, G. Ponce, G. Corkidi, J.G. Dubrovsky, et al., A no hydrotropic response root mutant that responds positively to gravitropism in arabidopsis, *Plant physiology* 131 (2003) 536–546.
- Elo A**, Immanen J, Nieminen K, Helariutta Y. 2009 *Semin Cell Dev Biol.* Dec;20(9):1097-106. Epub 2009 Sep 19. Review. Stem cell function during plant vascular development.
- Emanuelsson O**, Nielsen H, and von Heijne G. *Protein Science:* 8: 978-984, 1999. A neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites.

Fisher K, Turner S. *Curr Biol.* 2007 Jun 19;17(12):1061-6. PXY, a receptor-like kinase essential for maintaining polarity during plant vascular-tissue development.

Forde BG. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 60, No. 14, pp. 3989–4002, 2009 doi:10.1093/jxb/erp265 Advance Access publication 16 September, 2009 Is it good noise? The role of developmental instability in the shaping of a root system

Fankhauser C, K.-C. Yeh, J. Clark, H. Lagarias, T.D. Zhang, J. Elich, et al., PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in Arabidopsis, *Science* 284 (1999) 1539–1541.

Freist W, Verhey JF, Rühlmann A, Gauss DH, Arnez JG. *Biol Chem.* 1999 Jun;380(6):623-46. Histidyl-tRNA synthetase.

Friml J, Wiśniewska, J., Benková, E., Mendgen, K., and Palme, K. (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in Arabidopsis. *Nature* 415, 806-809

Friml J, Benfey P, Benková E, Bennett M, Berleth T, Geldner N, Grebe M, Heisler M, Hejácíko J, Jürgens G, Laux T, Lindsey K, Lukowitz W, Luschnig C, Offringa R, Scheres B, Swarup R, Torres-Ruiz R, Weijers D, Zazímalová E. *Trends Plant Sci.* 2006 Jan;11(1):12-4. Epub 2005 Dec 13. Review. Apical-basal polarity: why plant cells don't stand on their heads.

Fu X, and Harberd, N. P. (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 421, 740–743.

Galen C, J.R. Jessica, L. Emmanuel, Functional ecology of a blue light photoreceptor: effects of phototropin-1 on root growth enhance drought tolerance in “Arabidopsis thaliana”, *New phytologist* 173 (2007) 91–99.

García-Ponce de León B, Zorrilla JM, Rubio V, Dahiya P, Paz-Ares J, Leyva A. *Plant J.* 2004 Apr;38(1):70-9. Intrallelic complementation at the Arabidopsis CRE1 locus uncovers independent pathways for the proliferation of vascular initials and canonical cytokinin signalling.

Garrigues E, Doussan y Pierret (2006) Water Uptake by Plant Roots: I – Formation and Propagation of a Water Extraction Front in Mature Root Systems as Evidenced by 2D Light Transmission Imaging *Plant and Soil* 283: 83-98

Geldner N, Friml J., Stierhof, Y., Jürgens, G., and Palme, K. (2001). *Nature* 413, 425-428. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking.

Geldner N, Anders N, Wolters H, Keicher J, Kornberger W, Muller P, Delbarre A, Ueda T, Nakano A, Jürgens G. *Cell.* 2003 Jan 24;112(2):219-30. The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth.

Gilbert N. *Nature.* 2009 Oct 8;461(7265):716-8. Environment: The disappearing nutrient.

Glaser E, Sjöling S, Tanudji M, Whelan J. *Plant Mol Biol.* 1998 Sep;38(1-2):311-38. Review. Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation.

Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S. *Plant Physiol.* 2002 Nov;130(3):1319-34. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in Arabidopsis.

- Goda H**, Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2004). *Plant Physiol.* 134, 1555-1573. Comprehensive Comparison of Auxin-Regulated and Brassinosteroid-Regulated Genes in Arabidopsis.
- Grebe M**, Xu, J., Möbius, W., Ueda, T., Nakano, A., Geuze, H.J., Rook, M.B., and Scheres, B. (2003). Arabidopsis sterol endocytosis involves actin-mediated trafficking via ARA6-positive early endosomes. *Curr. Biol.* 13, 1378-1387.
- Gregory PJ**, Hutchison, Read, Jenneson, Gilboy WB y Morton EJ (2003) Non-invasive imaging of roots with high resolution X-ray micro-tomography. *Plant and Soil* 255: 351-359 (359)
- Grigg SP**, Galinha C, Kornet N, Canales C, Scheres B, Tsiantis M. *Curr Biol.* 2009 Sep 15;19(17):1485-90. Epub 2009 Jul 30. Repression of apical homeobox genes is required for embryonic root development in Arabidopsis.
- Guyer D**, Patton D, Ward E (1995) Evidence for cross-pathway regulation of metabolic gene expression in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:4997–5000
- Hardtke CS** y Berleth T (1998) The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* Mar 2;17(5):1405-11.
- Halliday KJ** (2004). Plant hormones: the interplay of brassinosteroids and auxin. *Curr. Biol.* 14, R1008-1010.
- Hardtke CS** (2007). Transcriptional auxin-brassinosteroid crosstalk: who's talking? *BioEssays* 29, 1115-1123.
- Harrison B**, Masson P. ARL2, ARG1 and PIN3 define a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Plant J* 2008; 53:380-92.
- Hauser BA**, Sun K, Oppenheimer DG, Sage TL. *Planta.* 2006 Feb;223(3):492-9. Epub 2005 Sep 14. Changes in mitochondrial membrane potential and accumulation of reactive oxygen species precede ultrastructural changes during ovule abortion.
- Hawes MC**, Gunawardena U, Miyasaka S, Zhao X. *Trends Plant Sci.* 2000 Mar;5(3):128-33. The role of root border cells in plant defense.
- Helariutta Y**, Fukaki H, Wysocka-Diller J, Nakajima K, Jung J, Sena G, Hauser MT, Benfey PN. *Cell.* 2000 May 26;101(5):555-67. The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling.
- Hermans C**, Porco S, Verbruggen N, Bush DR. *Plant Physiol.* 2010 Feb;152(2):904-17. Epub 2009 Dec 9. Chitinase-like protein CTL1 plays a role in altering root system architecture in response to multiple environmental conditions.
- Ho CH**, Lin SH, Hu HC, Tsay YF. *Cell.* 2009 Sep 18;138(6):1184-94. CHL1 functions as a nitrate sensor in plants.
- Hou G**, Mohamalawari, D.R., and Blancaflor, E.B. (2003). *Plant Physiol.* 131, 1360-1373. Enhanced gravitropism of roots with a disrupted cap actin cytoskeleton.

- Huang S**, Taylor NL, Whelan J, Millar AH. *Plant Physiol.* 2009 Jul;150(3):1272-85. Epub 2009 May 27. Refining the definition of plant mitochondrial presequences through analysis of sorting signals, N-terminal modifications, and cleavage motifs.
- Inoue H**, Nojima H y Okayama H (1990) *Gene* 96: 23-28. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
- Iyer-Pascuzzi AS**, June Simpson², Luis Herrera-Estrella², and Philip N. Benfey. *Curr Opin Plant Biol.* 2009a April ; 12(2): 165–171. Functional genomics of root growth and development in *Arabidopsis*.
- Iyer-Pascuzzi AS** and Philip N. Benfey. *Biochim Biophys Acta.* 2009b April 1789(4): 315–325. Transcriptional Networks in Root Cell Fate Specification
- Iyer-Pascuzzi AS**, Symonova O, Mileyko Y, Hao Y, Belcher H, Harer J, Weitz JS, Benfey PN. *Plant Physiol.* 2010 Mar;152(3):1148-57. Epub 2010 Jan 27. Imaging and analysis platform for automatic phenotyping and trait ranking of plant root systems.
- Jefferson RA**, Kavanagh TA, Bevan MW. *EMBO J.* 1987 Dec 20;6(13):3901-7. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.
- Jenik PD**, Gillmor CS, Lukowitz W. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:207-36. Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*.
- Jia L**, Wu Z, Hao X, Carrie C, Zheng L, Whelan J, Wu Y, Wang S, Wu P, Mao C. *New Phytol.* 2011 Feb;189(3):843-55. doi: 10.1111/j.1469-8137.2010.03513.x. Epub 2010 Oct 29. Identification of a novel mitochondrial protein, short postembryonic roots 1 (SPR1), involved in root development and iron homeostasis in *Oryza sativa*.
- Jiang K**, Ballinger T, Li D, Zhang S, Feldman L. *Plant Physiol.* 2006 Mar;140(3):1118-25. Epub 2006 Jan 27. A role for mitochondria in the establishment and maintenance of the maize root quiescent center.
- Jones B y Ljung K** 2011. *Current Opinion in Plant Biology*, 15:1–6. Subterranean space exploration: the development of root system architecture
- Kägi C**, Baumann N, Nielsen N, Stierhof YD, Gross-Hardt R. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Dec 21;107(51):22350-5. Epub 2010 Dec 6. The gametic central cell of *Arabidopsis* determines the lifespan of adjacent accessory cells.
- Kamoshita A**, Wade J, Ali L, Pathan S, Zhang J, Sarkarung S y Nguyen T (2002a) *Theor Appl Genet* 104: 880-893. Mapping QTLs for root morphology of a rice population adapted to rainfed lowland conditions.
- Kamoshita A**, Zhang J, Siopongco J, Sarkarung S, Nguyen HT y Wade LJ (2002b) *Crop Sci* 42: 255-265. Effects of Phenotyping Environment on Identification of Quantitative Trait Loci for Rice Root Morphology under Anaerobic Conditions.
- Kaneyasu T**, Kobayashi A, Nakayama M, Fujii N, Takahashi H, Miyazawa Y. *J Exp Bot.* 2007;58(5):1143-50. Epub 2007 Jan 22. Auxin response, but not its polar transport, plays a role in hydrotropism of *Arabidopsis* roots.

- Kato Y**, Abe, Kamoshita y Yamagishi (2006) Genotypic Variation in Root Growth Angle in Rice (*Oryza sativa* L.) and its Association with Deep Root Development in Upland Fields with Different Water Regimes. *Plant and Soil* 287: 117-129 (113)
- Kim S**, Chang, S.C., Lee, E.J., Chung, W., Kim, Y., Hwang, S., and Lee, J.S. (2000). *Plant Physiol.* 123, 997-1004. Involvement of brassinosteroids in the gravitropic response of primary root of maize.
- Kleine-Vehn J y Friml J.** (2008). Polar targeting and endocytic recycling in auxin-dependent plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 447-473.
- Kobayashi A**, Takahashi A, Kakimoto Y, Miyazawa Y, Fujii N, Higashitani A, Takahashi H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Mar 13;104(11):4724-9. Epub 2007 Mar 5. A gene essential for hydrotropism in roots.
- Kubo T**, Newton KJ. *Mitochondrion.* 2008 Jan;8(1):5-14. Epub 2007 Nov 4. Review. Angiosperm mitochondrial genomes and mutations.
- Lanza M**, 2008. Tesis Doctoral: Identificación de genes que participan en el desarrollo de la arquitectura radicular en *Arabidopsis thaliana*.
- Lariguet P**, I. Schepens, D. Hodgson, U.V. Pedmale, M. Trevisan, C. Kami, et al., Phytochrome Kinase Substrate 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism, in : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, pp. 10134–10139, 103.
- Lee D**, Polisensky DH y Braam J (2005) Genome-wide identification of touch- and darkness-regulated *Arabidopsis* genes: a focus on calmodulin-like and XTH genes. *New Phytol* 165: 429-444
- Leitz G**, Kang BH, Schoenwaelder ME, Staehelin LA. *Plant Cell.* 2009 Mar;21(3):843-60. Epub 2009 Mar 10. Statolith sedimentation kinetics and force transduction to the cortical endoplasmic reticulum in gravity-sensing *Arabidopsis* columella cells.
- Lewis D**, et al. Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporter genes. *Plant Cell* 2007; 19:183850.
- Leyser O.** (2006). Dynamic integration of auxin transport and signalling. *Curr. Biol.* 16, R424-433.
- Li J**, Mo X, Wang J, Chen N, Fan H, Dai C, Wu P. *Planta.* 2009 Feb;229(3):593-603. Epub 2008 Nov 27. BREVIS RADIX is involved in cytokinin-mediated inhibition of lateral root initiation in *Arabidopsis*.
- Li L**, Xu J., Xu Z., and Xue H. (2005). *Plant Cell* 17, 2738-2753. Brassinosteroids stimulate plant tropisms through modulation of polar auxin transport in *Brassica* and *Arabidopsis*.
- Liscum E**, W.R. Briggs, Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli, *The Plant cell* 7 (1995) 473–485.
- López-Bucio J**, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L. *Curr Opin Plant Biol.* 2003 Jun;6(3):280-7. The role of nutrient availability in regulating root architecture.

Lucas M, Swarup R, Paponov IA, Swarup K, Casimiro I, Lake D, Peret B, Zappala S, Mairhofer S, Whitworth M, Wang J, Ljung K, Marchant A, Sandberg G, Holdsworth MJ, Palme K, Pridmore T, Mooney S, Bennett MJ *Plant Physiol.* 2011 Jan;155(1):384-98. Short-Root regulates primary, lateral, and adventitious root development in Arabidopsis.

Lynch J (1995) *Plant Physiol* 109: 7-13. Root Architecture and Plant Productivity.

Lynch J, van Beem, J. (1993) *Crop. Sci.* 33: 1253-1257. Growth and architecture of seedling roots of common bean genotypes.

Mähönen AP, Bonke M, Kauppinen L, Riikonen M, Benfey PN, Helariutta Y. *Genes Dev.* 2000 Dec 1;14(23):2938-43. A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the Arabidopsis root.

Mähönen AP, Anthony Bishopp, Masayuki Higuchi, Kaisa M. Nieminen, Kaori Kinoshita, Kirsi Törmäkangas, Yoshihisa Ikeda, Atsuhiko Oka, Tatsuo Kakimoto, Ykä Helariutta Published 6 January 2006, *Science* 311, 94 (2006) Cytokinin Signaling and Its Inhibitor AHP6 Regulate Cell Fate During Vascular Development

Maisch J, Nick P *Plant Physiol.* 2007 Apr;143(4):1695-704. Epub 2007 Mar 2. Actin is involved in auxin-dependent patterning.

Malamy JE (2005) *Plant Cell Environ* 28: 67-77. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture.

Márquez AJ, Betti M, García-Calderón M, Pal'ove-Balang P, Díaz P, Monza J. 2005 *J Exp Bot.* 2005 Jul;56(417):1741-9. Epub 2005 May 23. Review. Nitrate assimilation in *Lotus japonicus*.

Massa GD y Gilroy S (2003) Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 33: 435-445

Matsumoto-Kitano M, Kusumoto T, Tarkowski P, Kinoshita-Tsujimura K, Václavíková K, Miyawaki K, Kakimoto T. 2008 *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 16;105(50):20027-31. Epub 2008 Dec 11. Cytokinins are central regulators of cambial activity.

Meinke D, Sweeney C, Muralla R. *PLoS One.* 2009 Oct 8;4(10):e7386. Integrating the genetic and physical maps of *Arabidopsis thaliana*: identification of mapped alleles of cloned essential (EMB) genes.

Migliaccio F, Fortunati A, Tassone P. *Plant Signal Behav.* 2009 Mar;4(3):183-90. Review. Arabidopsis root growth movements and their symmetry: progress and problems arising from recent work.

Miyazawa Y, Takahashi A, Kobayashi A, Kaneyasu T, Fujii N, Takahashi H. *Plant Physiol.* 2009 Feb;149(2):835-40. Epub 2008 Dec 3. GNOM-mediated vesicular trafficking plays an essential role in hydrotropism of Arabidopsis roots.

Monshausen GB, Gilroy S. *Curr Opin Plant Biol.* 2009 Dec;12(6):766-72. Epub 2009 Sep 25. Review. The exploring root--root growth responses to local environmental conditions.

- Mori I**, Fonne-Pfister R, Matsunaga S, Tada S, Kimura Y, Iwasaki G, Mano J, Hatano M, Nakano T, Koizumi S, et al (1995) A novel class of herbicides (specific inhibitors of imidazoleglycerol phosphate dehydratase). *Plant Physiol* 107: 719–723
- Moubayidin L**, Di Mambro R, Sabatini S. *Trends Plant Sci.* 2009 Oct;14(10):557-62. Epub 2009 Sep 4. Cytokinin-auxin crosstalk.
- Mouchel CF**, Briggs GC y Hardtke CS (2004) Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation.
- Mouchel CF**, Osmont, K.S., and Hardtke, C.S. (2006). BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* 443, 458-461.
- Mo X**, Qingyu Zhu, Xiang Li, Jing Li, Qingning Zeng, Honglin Rong, Hanma Zhang, and Ping Wu. *Plant Physiology*, August 2006, Vol. 141, pp. 1425–1435. The hpa1 Mutant of *Arabidopsis* Reveals a Crucial Role of Histidine Homeostasis in Root Meristem Maintenance
- Muday G**, Rahman A. 2008. Auxin transport and the integration of gravitropic growth. In *Plant Tropisms*. Gilroy S, Masson P, (eds.) Blakwell Publishing ; 3:47-78.
- Müller A**, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E, Palme K. *EMBO J.* 1998 Dec 1;17(23):6903-11. AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control.
- Mullis K**, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H (1986) *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.
- Mylona P**, Linstead P, Martienssen R, Dolan L. *Development.* 2002 Sep;129(18):4327-34. SCHIZORIZA controls an asymmetric cell division and restricts epidermal identity in the *Arabidopsis* root.
- Nakamura, A.**, Higuchi, K., Goda, H., Fujiwara, M.T., Sawa, S., Koshiba, T., Shimada, Y., and Yoshida, S. (2003a). *Plant Physiol.* 133, 1843-1853. Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in *Arabidopsis*, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling.
- Nakamura, A.**, Shimada, Y., Goda, H., Fujiwara, M. T., Asami, T., and Yoshida, S. (2003b). *BS Lett.* 553, 28-32. AXR1 is involved in BR-mediated elongation and SAUR-AC1 gene expression in *Arabidopsis*. *FEBS Lett.* 553, 28-32.
- Nakamura A**, Nakajima, N., Goda, H., Shimada, Y., Hayashi, K., Nozaki, H., Asami, T., Yoshida, S., and Fujioka, S. (2006). *Arabidopsis* Aux/IAA genes are involved in brassinosteroid-mediated growth responses in a manner dependent on organ type. *Plant J.* 45, 193-205
- Narang RA**, Bruene A y Altmann T (2000) *Plant Physiol* 124: 1786-1799 Analysis of phosphate acquisition efficiency in different *Arabidopsis* accessions.
- Nemhauser JL**, Mockler TC, Chory J. *PLoS Biol.* 2004 Sep;2(9):E258. Epub 2004 Aug 24. Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in *Arabidopsis*.

- Nibau C**, Gibbs DJ, Coates JC. (2008) *New Phytol* 179(3):595-614. Epub 2008 Apr 30. Branching out in new directions: the control of root architecture by lateral root formation.
- Nick P**, Han MJ, An G. *Plant Physiol.* 2009 Sep;151(1):155-67. Epub 2009 Jul 24. Auxin stimulates its own transport by shaping actin filaments.
- Nielsen KL**, Lynch, J., Jablókow, A.G., Curtis, P.S. (1994) *Plant Soil* 165: 161-161 169. Carbon cost of root systems: an architectural approach.
- Nielsen KL**, Lynch JP y Weiss HN (1997) Fractal geometry of bean root systems: correlations between spatial and fractal dimension. *Am J Bot* 84: 26-33
- Nieminen K**, Immanen J, Laxell M, Kauppinen L, Tarkowski P, Dolezal K, Tähtiharju S, Elo A, Decourteix M, Ljung K, Bhalerao R, Keinonen K, Albert VA, Helariutta Y. 2008 *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 16;105(50):20032-7. Epub 2008 Dec 8. Cytokinin signaling regulates cambial development in poplar.
- Osmont KS**, Sibout R, Hardtke CS. *Annu Rev Plant Biol.* 2007; 58:93-113. Review. Hidden branches: developments in root system architecture.
- Ottenschlager I**, et al. 2003. Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100:2987-91.
- Peer WA**, Hosein FN, Bandyopadhyay A, Makam SN, Otegui MS, Lee GJ, Blakeslee JJ, Cheng Y, Titapiwatanakun B, Yakubov B, Bangari B, Murphy AS. *Plant Cell.* 2009 Jun;21(6):1693-721. Epub 2009 Jun 16. Mutation of the membrane-associated M1 protease APM1 results in distinct embryonic and seedling developmental defects in *Arabidopsis*.
- Perilli S**, Sabatini S. *Methods Mol Biol.* 2010a;655:177-87. Analysis of root meristem size development.
- Perilli S**, Moubayidin L, Sabatini S. *Curr Opin Plant Biol.* 2010b Feb;13(1):21-6. Epub 2009 Oct 21. The molecular basis of cytokinin function.
- Perilli S**, Riccardo Di Mambro and Sabrina Sabatini. *Current Opinion in Plant Biology* 2012, 15:17–23. Growth and development of the root apical meristem.
- Pernas M**, Ryan E, Dolan L. *Curr Biol.* 2010 May 11;20(9):818-23. Epub 2010 Apr 22. SCHIZORIZA controls tissue system complexity in plants.
- Perrin R**, y col. 2005 Gravity signal transduction in primary roots. *Ann Bot*; 96:737-43.
- Petricka JJ**, Van Norman JM, Benfey PN. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Nov;1(5):a000497. Review. Symmetry breaking in plants: molecular mechanisms regulating asymmetric cell divisions in *Arabidopsis*.
- Pierret A**, Kirby y Moran (2003) Simultaneous X-ray imaging of plant root growth and water uptake in thin-slab systems. *Plant And Soil* 255: 361-373
- Polisensky DH**, Braam J. 1996. Cold-shock regulation of the *Arabidopsis* TCH genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiology* 111: 1271–1279.

- Ponce G**, Rasgado F, Cassab GI. *Plant Signal Behav.* 2008 Jul;3(7):460-2. How amyloplasts, water deficit and root tropisms interact?
- Prabhakaran M**. *Biochem J.* 1990 Aug 1;269(3):691-6. The distribution of physical, chemical and conformational properties in signal and nascent peptides.
- Pujol C**, Maréchal-Drouard L, Duchêne AM. *J Mol Biol.* 2007 Jun 1;369(2):356-67. Epub 2007 Mar 15. How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach.
- Rahman A**, Takahashi, M., Shibasaki, K., Wu, S., Inaba, T., Tsurumi, S., and Baskin, T.I. (2010). Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells. *Plant Cell* 22, 1762-1776.
- Rashotte, A.M.**, Brady, S.R., Reed, R.C., Ante, S.J., and Muday, G.K. (2000). *Plant Physiol.* 122, 481-490. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*.
- Rédei G.P** and Koncz C (1992). In *Methods in Arabidopsis research* (ed. C. Koncz, N-H.Chua, and J. Schell), p. 16. World Scientific Publishing, Singapore.
- Reymond M**, Svistoonoff S, Loudet O, Nussaume L, Desnos T. *Plant Cell Environ.* 2006 Jan;29(1):115-25. Identification of QTL controlling root growth response to phosphate starvation in *Arabidopsis thaliana*.
- Ringli C**, Baumberger N, Diet A, Frey B, Keller B. 2002. ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* Aug;129(4):1464-72.
- Roise D**, Horvath SJ, Tomich JM, Richards JH, Schatz G *EMBO J.* 1986 Jun;5(6):1327-34. A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers.
- Rundel PW**, Nobel, P.S. (1991) Special publication No. 10 of the British Ecological Society. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK. Structure and function in desert root systems.
- Runge-Metzger** (1995) Closing the cycle: obstacles to efficient P management for improved global security. John Wiley & Sons, New York
- Ruzicka K**, Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beeckman, T., Friml, J., and Benková, E. (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* 19, 2197–2212.
- Ruzicka K**, Simásková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zazimalová, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M. C., and Benková, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4284–4289.
- Sabatini S**, Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B. (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes Dev.* 17, 354–358.
- Sambrook J**, Fritsch EF y Maniatis T (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. *Molecular cloning: a laboratory manual*, Ed 2nd.

- Sánchez-Calderón L**, López-Bucio J, Chacón-López A, Gutiérrez-Ortega A, Hernández-Abreu E, Herrera-Estrella L. *Plant Physiol.* 2006 Mar;140(3):879-89. Epub 2006 Jan 27. Characterization of low phosphorus insensitive mutants reveals a crosstalk between low phosphorus-induced determinate root development and the activation of genes involved in the adaptation of *Arabidopsis* to phosphorus deficiency.
- Sanguineti MC**, Duvick, Smith, Landi y Tuberosa (2006) Effects of long-term selection on seedling traits and ABA accumulation in commercial maize hybrids. *Maydica* 51: 329-338
- Scacchi E**, Osmont KS, Beuchat J, Salinas P, Navarrete-Gómez M, Trigueros M, Ferrándiz C, Hardtke CS. *Development.* 2009 Jun;136(12):2059-67. Dynamic, auxin-responsive plasma membrane-to-nucleus movement of *Arabidopsis* BRX.
- Scarpella E**, Marcos D, Friml J, Berleth T. 2006 *Genes Dev.* Apr 15;20(8):1015-27. Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport.
- Scheres B**, Di Laurenzio L, Willemsen V, Hauser M-T, Janmaat K, Weisbeek P, Benfey PN (1995) Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 121: 53-62
- Schiefelbein JW, Benfey PN.** *Plant Cell.* 1991 Nov;3(11):1147-54. The development of plant roots: new approaches to underground problems.
- Schultze M, Kondorosi A** 1998 *Annu Rev Genet.*;32:33-57. Regulation of symbiotic root nodule development.
- Sharpley A** (1999) *Poult Sci* 78: 660-673. Agricultural phosphorus, water quality, and poultry production: are they compatible?
- Silverstone AL**, Ciampaglio, C.N., and Sun, T. (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellins signal transduction pathway. *Plant Cell* 10, 155–169.
- Simmons, C**, Migliaccio, F., Masson, P., Caspar, T., and Söll, D. (1995). *Physiol. Plant* 93, 790-798. A novel root gravitropism mutant of *Arabidopsis thaliana* exhibiting altered auxin physiology.
- Sistrunk ML**, Antosiewicz DM, Purugganan MM y Braam J (1994) *Arabidopsis* TCH3 encodes a novel Ca²⁺ binding protein and shows environmentally induced and tissue-specific regulation. *Plant Cell* 6: 1553-1565.
- Sorin C**, Bussell JD, Camus I, Ljung K, Kowalczyk M, Geiss G, McKhann H, Garcion C, Vaucheret H, Sandberg G, Bellini C. *Plant Cell.* 2005 May;17(5):1343-59. Epub 2005 Apr 13. Auxin and light control of adventitious rooting in *Arabidopsis* require ARGONAUTE1.
- Stanga J**, Baldwin K y Masson PH 2009. Joining forces .The interface of gravitropism and plastid protein import. *Plant Signaling & Behavior* 4:10, 933-941.
- Steinebrunner I**, Landschreiber M, Krause-Buchholz U, Teichmann J, Rödel G. *J Exp Bot.* 2011 Jan;62(1):319-30. Epub 2010 Nov 1. HCC1, the *Arabidopsis* homologue of the yeast mitochondrial copper chaperone SCO1, is essential for embryonic development.

- Steinmann T**, Geldner, N., Grebe, M., Mangold, S., Jackson, C.L., Paris, S., Gälweiler, L., Palme, K., and Jürgens, G. (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286, 316-318.
- Stepanova AN**, Yun, J., Likhacheva, A. V., and Alonso, J. M. (2007). Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 19, 2169–2185.
- Strack D**, Fester T, Hause B, Schliemann W, Walter MH. 2003 *J Chem Ecol.* Sep;29(9):1955-79. Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects.
- Strittmatter P, Soll J, Bölter B. *Methods Mol Biol.* 2010;619:307-21. Review. The chloroplast protein import machinery: a review.
- Sukumar P**, Edwards, K.S., Rahman, A., Delong, A., and Muday, G.K. (2009). *Plant Physiol.* 150, 722-735. PINOID kinase regulates root gravitropism through modulation of PIN2-dependent basipetal auxin transport in Arabidopsis.
- Sun Y**, Fan, X.Y., Cao, D.M, Tang, W., He, K., Zhu, J.Y., He, J.X., Bai, M.Y., Zhu, S., Oh, E., et al. (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Dev. Cell* 16, 765-77.
- Svistoonoff S**, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T 2007 Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture VOLUME 39 [NUMBER 6 [JUNE NATURE GENETICS.
- Swarup R**, Perry, P., Hagenbeek, D., van der Straeten, D., Beemster, G. T., Sandberg, G., Bhalerao, R., Ljung, K., and Bennett, M. J. (2007). Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19, 2186–2196.
- Takahashi H**. Hydrotropism: The current state of our knowledge, *Journal of plant research* 110 (1997) 163–169.
- Takahashi N**, Y. Yamazaki, A. Kobayashi, A. Higashitani, H. Takahashi, Hydrotropism interacts with gravitropism by degrading amyloplasts in seedling roots of arabidopsis and radish, *Plant physiology* 132 (2003) 805–810.
- Taniguchi M.**, Sasaki, N., Tsuge, T., Aoyama, T., and Oka, A. (2007). ARR1 directly activates cytokinin response genes that encode proteins with diverse regulatory functions. *Plant Cell Physiol.* 48, 263–277.
- Tanudji M**, Sjöling S, Glaser E, Whelan J. *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1286-93. Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria.
- Tian Q**, Uhlir NJ, Reed JW. *Plant Cell.* 2002 Feb;14(2):301-19. Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression.
- Ticconi CA**, Abel S. *Trends Plant Sci.* 2004a Nov;9(11):548-55. Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures.
- Ticconi CA**, Delatorre CA, Lahner B, Salt DE, Abel S. *Plant J.* 2004 Mar;37(6):801-14. Arabidopsis pdr2 reveals a phosphate-sensitive checkpoint in root development.

- Tomaz T**, Bagard M, Pracharoenwattana I, Lindén P, Lee CP, Carroll AJ, Ströher E, Smith SM, Gardeström P, Millar AH. *Plant Physiol.* 2010 Nov;154(3):1143-57. Epub 2010 Sep 27. Mitochondrial malate dehydrogenase lowers leaf respiration and alters photorespiration and plant growth in Arabidopsis.
- Trewavas A.** 1992. What remains of the Cholodny-Went theory? *Plant Cell Environ*; 15:759-94.
- Tsukagoshi H**, Busch W, Benfey PN: Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell* 2010, 143:606-616.
- Ubeda-Tomas S**, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplace L, Beemster GT, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ: Root growth in Arabidopsis requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol* 2008, 10:625-628.
- Van As H** (2007) Intact plant MRI for the study of cell water relations, membrane permeability, cell-to-cell and long distance water transport. *J Exp Bot* 58: 743-756
- Vanneste S, y Friml J** (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136, 1005-1016.
- Vert G**, Nemhauser, J.L., Geldner, N., Hong, F., and Chory, J. (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21, 177-201.
- Vert G**, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Jul 15;105(28):9829-34. Epub 2008 Jul 3. Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2.
- Vicré M**, Santaella C, Blanchet S, Gateau A, Driouich A. *Plant Physiol.* 2005 Jun;138(2):998-1008. Epub 2005 May 20. Root border-like cells of Arabidopsis. Microscopical characterization and role in the interaction with rhizobacteria.
- Vitha S**, Zhao L y Sack FD (2000) Interaction of root gravitropism and phototropism in Arabidopsis wild-type and starchless mutants. *Plant Physiol* 122: 453-462
- von Heijne G**, Steppuhn J, Herrmann RG. *Eur J Biochem.* 1989 Apr 1;180(3):535-45. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides.
- Wang G**, Fiers M. *Protoplasma.* 2010 Apr;240(1-4):33-43. Epub 2009 Dec 17. CLE peptide signaling during plant development.
- Wang YS**, Yoo CM, Blancaflor EB. *New Phytol.* 2008;177(2):525-36. Epub 2007 Nov 20. Improved imaging of actin filaments in transgenic Arabidopsis plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2.
- Wee CH**, Dinneny JR. *Biotechnol Lett* (2010) 32:1361–1371 DOI 10.1007/s10529-010-0307-8. Tools for high-spatial and temporal-resolution analysis of environmental responses in plants
- Wen F**, Curlango-Rivera G, Hawes MC. *Plant Signal Behav.* 2007 Sep;2(5):410-2. Proteins among the polysaccharides: a new perspective on root cap slime.
- Wen F**, White GJ, VanEtten HD, Xiong Z, Hawes MC. *Plant Physiol.* 2009 Oct;151(2):820-9. Epub 2009 Aug 21. Extracellular DNA is required for root tip resistance to fungal infection.

- Wiśniewska J**, Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P.B., Růžička, K., Blilou, I., Rouquié, D., Benková, E., Scheres, B., and Friml, J. (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 312, 883.
- Wong ML, Medrano JF** *Biotechniques*. 2005 Jul;39(1):75-85. Real-time PCR for mRNA quantitation.
- Woodcock DM**, Crowther PJ, Doherty J, Jefferson S, DeCruz E, Noyer-Weidner M, Smith SS, Michael MZ y Graham MW (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17: 3469-3478
- Woodson JD**, Chory J. *Nat Rev Genet*. 2008 May;9(5):383-95. Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes.
- Xu W**, Purugganan MM, Polisensky DH, Antosiewicz DM, Fry SC y Braam J (1995) *Arabidopsis* TCH4, regulated by hormones and the environment, encodes a xyloglucan endotransglycosylase. *Plant Cell* 7: 1555-1567
- Yamamoto R**, Demura T, Fukuda H. 1997 *Plant Cell Physiol*. Aug;38(8):980-3. Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells.
- Yamamoto K, y Kiss JZ** (2002). *Plant Physiol*. 128, 669-681. Disruption of the actin cytoskeleton results in the promotion of gravitropism in inflorescence stems and hypocotyls of *Arabidopsis*.
- Yanofsky MF** y Nester EW (1986) *J Bacteriol* 168: 244-250. Molecular characterization of a host-rangedetermining locus from *Agrobacterium tumefaciens*.
- Yin Y**, Wang, Z. Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., and Chory, J. (2002). *Cell* 109, 181-191. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation.
- Yoshimitsu Y**, Tanaka, K., Fukuda, W., Asami, T., Yoshida, S., Hayashi, K., Kamiya, Y., Jikumaru, Y., Shigeta, T., Nakamura, Y., et al. (2011). Transcription of DWARF4 plays a crucial role in auxin-regulated root elongation in addition to brassinosteroid homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 6, e23851.
- Yuan H**, Liu D. Functional disruption of the pentatricopeptide protein SLG1 affects mitochondrial RNA editing, plant development, and responses to abiotic stresses in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2012 Jan 16
- Yu X.**, Li L., Zola. J, Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., Guo, H., Anderson, S., Aluru, S., Liu, P., Rodermeil, S., and Yin Y. (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 65, 634-46.
- Yue B**, Xue W, Xiong L, Yu X, Luo L, Cui K, Jin D, Xing Y y Zhang Q (2006) Genetic basis of drought resistance at reproductive stage in rice: separation of drought tolerance from drought avoidance. *Genetics* 172: 1213-1228

Zhang HM, Forde BG. 1998. An Arabidopsis MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science* 279, 407–409.

Zhang HM, Jennings A, Barlow PW, Forde BG. 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96, 6529–6534.

Zhang T, Yuan Y, Yu J, Guo W y Kohel RJ (2003) *Theor Appl Genet* 106: 262-268. Molecular tagging of a major QTL for fiber strength in Upland cotton and its marker-assisted selection.

Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, van Wijk KJ. *PLoS One*. 2008 Apr 23;3(4):e1994. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome.

