



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *YUCCA4* Y SU IMPACTO EN LA
HOMEOSTASIS HORMONAL EN *Arabidopsis thaliana***

TESIS

Que presenta:

M. C. AARÓN GIOVANNI MUNGUÍA RODRÍGUEZ

Como requisito para obtener el título de

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de tesis:

DR. MIGUEL MARTÍNEZ TRUJILLO

Co-director de tesis:

DR. JOSÉ LÓPEZ BUCIO

Morelia, Michoacán, febrero del 2020



Dedicatoria

A mi familia, amigos y mentores.

Agradecimientos

A mis padres, Ma. Lucía Rodríguez y Ramón Munguía, por haberme dado la vida.

A mi abuela, Julia Álvarez, mi segunda madre.

A mi hermana Lorena, mis tíos, tías y primos, gracias por todo su cariño.

A los doctores: Miguel Martínez, José López y Nayelli Marsh por darme la oportunidad, la confianza y el apoyo para trabajar en sus laboratorios, además de compartirme sus valiosas enseñanzas humanas y académicas.

A los doctores: Randy Ortiz, Rafael Salgado y Rodolfo López por acceder amablemente a ser parte de mi comité de evaluación y por sus sugerencias en la revisión de este trabajo.

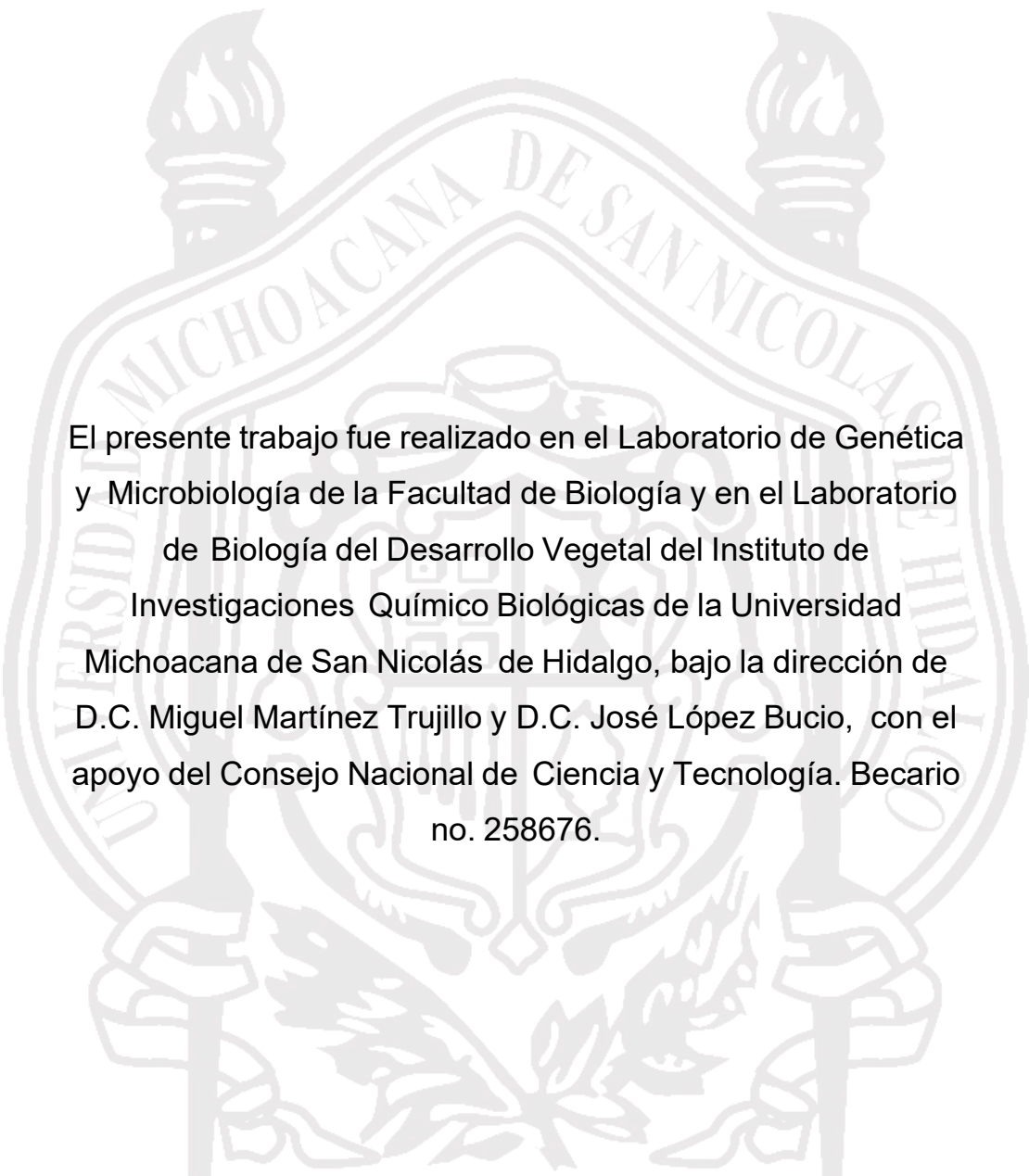
A mis compañeros y amigos de laboratorio: Alejandro, Alfonso, Amira, Carlos, Deyanira, Edith, Elizabeth, Enrique, Guadalupe, Gustavo, Hexon, Javier, Juan, Kirán, León, Marina, Ramón, Randy, Salvador, Sarahí y Viridiana del laboratorio de Fisiología del Desarrollo Vegetal. De igual forma a Amanda, Ángeles, Alejandro, Carlos, Fátima, Fernando, Gerardo, Gloria, Hilda, Itzel, Juanita, Karina, Magandalena, Martha, Nubya, Ricardo, Sandra y Scally del laboratorio de Genética y Microbiología. A Carlos, Daniel, David, Juan Carlos y Yolanda del laboratorio de Identidad Celular de Plantas. Gracias por su apoyo y por lo buenos momentos en el laboratorio.

A mis compañeros de generación: Claudia, Cristina, Edith, Mario y Ricardo.

A todos mis amigos.

A los dirigentes y miembros del Grupo Indaparapeo A.C., por el apoyo y confianza que se me ha brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado para la realización de este trabajo.



El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología y en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección de D.C. Miguel Martínez Trujillo y D.C. José López Bucio, con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Becario no. 258676.

ÍNDICE DE CONTENIDO	Pág.
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1. Arabidopsis thaliana como modelo de estudio.....	4
2.2. Los reguladores del crecimiento vegetal.....	4
2.3. Las auxinas.....	5
2.4. Vía de señalización de las auxinas.....	6
2.5. El transporte de auxinas.....	8
2.6. Biosíntesis de las auxinas.....	9
2.6.1. La ruta de la indol-3-acetaldoxima (IAOx).....	11
2.6.2. La ruta de la indol-3-acetamida (IAM).....	11
2.6.3. La ruta del ácido indol-3-pirúvico (IPyA).....	12
2.6.4. La ruta independiente de Trp.....	13
2.7. Conjugación e inactivación del AIA.....	13
2.8. Localización celular del AIA.....	16
2.9. Los genes YUCCA en el desarrollo de las plantas.....	17
2.10. Identificación y generación de la mutante <i>threadlyucca4</i>	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	23
5.1. Objetivo general.....	23
5.2. Objetivos específicos.....	23
6. RESULTADOS.....	24
6.1. Artículo de investigación indizado: YUCCA4 overexpression modulates auxin biosynthesis and transport and influences plant growth and development via crosstalk with abscisic acid in <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
7. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	39
8. LITERATURA CITADA.....	51
9. PRODUCTOS ADICIONALES.....	73

9.1. Artículo de investigación indizado: Chromium differentially affects hydrogen peroxide distribution in primary and adventitious roots of <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	73
9.2. Capítulo de libro. Vías de señalización de las hormonas vegetales.	83
9.3. Artículo de divulgación. Fitohormonas: su función en las semillas...	100

ÍNDICE DE FIGURAS	Pág.
Figura 1. Percepción y señalización de las auxinas.....	7
Figura 2. El transporte de auxinas.....	9
Figura 3. Metabolismo y distribución de las auxinas en células vegetales.	10

RESUMEN

Las auxinas regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas en función de su propia biosíntesis, conjugación, transporte y degradación en los tejidos vegetales; aspectos que están influenciados por factores exógenos y endógenos incluyendo otras fitohormonas. En *Arabidopsis thaliana*, los genes *YUCCA* codifican para una familia de enzimas de tipo flavin monoxigenasas que participan en la síntesis del ácido indol-3-acético, la principal auxina natural, cuyos niveles se incrementan cuando se sobreexpresan estos genes. En este trabajo se generaron líneas transgénicas de *Arabidopsis* que expresan el gen *YUCCA4* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (*35S::YUC4*) que recapitulan el fenotipo de la línea *thread* generada por *activation tagging*. Las plantas transgénicas mostraron un fenotipo similar al de otras líneas previamente reportadas como sobreproductoras de auxinas, así como una respuesta diferencial en los transportadores de auxinas, en donde PIN1 mostró una expresión disminuida, contrario a lo que ocurre en los genes PIN2, PIN3 y PIN7, que incrementan su expresión.

Por otra parte, las líneas *35S::YUC4* mostraron una mayor sensibilidad al ácido abscísico durante la germinación de las semillas y el crecimiento post-germinativo. Mediante análisis histoquímicos, encontramos que la expresión del gen reportero *ABI4::GUS* se incrementa en las líneas sobreproductoras de auxinas mientras que la pérdida de función de *ABI4* disminuye la sensibilidad de *35S::YUC4* al ácido abscísico. Finalmente, la respuesta auxínica, evidenciada por los reporteros de auxinas *DR5::GUS* y *BA3::GUS*, disminuye de manera dependiente del ácido abscísico. Este trabajo aporta nuevas observaciones para los estudios donde se sobreexpresan los genes *YUCCA*, además de proporcionar información valiosa sobre la participación de *YUCCA4* en la interacción auxinas-ácido abscísico durante la germinación y el desarrollo post-embriionario de *Arabidopsis thaliana*.

Palabras clave: *Arabidopsis thaliana*, auxinas, ácido abscísico, *YUCCA4*, germinación.

ABSTRACT

Auxin regulates plant growth and development, based on their own biosynthesis, conjugation, transport and degradation in plant tissues; aspects that are influenced by exogenous and endogenous factors including other phytohormones. In *Arabidopsis thaliana*, *YUCCA* genes code for a family of flavin monooxygenase-like enzymes that participate in the synthesis of indole-3-acetic acid, the main natural auxin, whose levels increase when *YUCCA* genes are overexpressed. In this work, transgenic lines of *Arabidopsis* were generated expressing the *YUCCA4* gene under control of the 35S promoter of the cauliflower mosaic virus (*35S::YUC4*) that recapitulate the *thread* phenotype, a line generated by activation tagging. Transgenic plants showed a phenotype similar to other previously reported lines with auxin overproduction, as well as a differential response in auxin transporters, where *PIN1* showed decreased expression while *PIN2*, *PIN3* and *PIN7* were up-regulated.

Moreover, the *35S::YUC4* lines showed enhanced sensibility to the abscisic acid effect during seed germination and post-germinative growth. Through histochemical analysis, we found that the expression of the reporter gene *ABI4::GUS* is increased in auxin overproducer lines while the loss of function of *ABI4* decreases the sensibility of *35S::YUC4* to abscisic acid. Finally, the auxinic response, evidenced by the auxin reporters *DR5::GUS* and *BA3::GUS*, decreases in a manner dependent on abscisic acid. This work provides new observations for studies where *YUCCA* genes are overexpressed, in addition to providing valuable information on the participation of *YUCCA4* in the auxin-abscisic acid crosstalk during germination and post-embryonic development of *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, auxin, abscisic acid, *YUCCA4*, germination.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos eucariontes, multicelulares, con gran capacidad adaptativa y los productores primarios de los ecosistemas terrestres al poder llevar a cabo la fotosíntesis. El desarrollo en estos organismos está regulado por factores fisiológicos y señales ambientales que influyen en la producción de compuestos de diferente identidad química y diversos procesos celulares. Estas sustancias son denominadas hormonas vegetales o reguladores del crecimiento y ejercen sus funciones mediante programas de señalización intracelular específicos que conducen al encendido o apagado de genes. Todos estos compuestos son requeridos para la viabilidad celular, participan en procesos específicos del desarrollo y como integradores de señales ambientales. Las funciones que ejercen cada uno de los reguladores de crecimiento, han sido elucidadas mediante su aplicación exógena en diferentes sistemas vegetales o manipulando la expresión de genes que participan en la respuesta a los diferentes fitoreguladores en plantas mutantes y/o transgénicas (Weyers y Paterson, 2001). Los reguladores del crecimiento vegetal denominados auxinas, representados principalmente por el ácido indol acético (AIA), fueron los primeros descubiertos debido a que están implicadas en prácticamente todos los procesos del crecimiento y desarrollo vegetal. No obstante que las diferentes especies de plantas pueden presentar estrategias únicas y diversificar sus rutas metabólicas, es lógico esperar la conservación de módulos proteínicos que determinan la biosíntesis y respuesta al AIA, debido a que es una molécula fundamental para su ciclo de vida. Sin embargo, la biosíntesis y homeostasis del AIA en angiospermas así como sus interacciones con otros reguladores del crecimiento continúa sin dilucidarse completamente.

2.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

Arabidopsis thaliana es un excelente modelo para el estudio de los procesos fisiológicos y moleculares. Es una angiosperma que pertenece a la familia *Brassicaceae* donde se incluyen especies de importancia agronómica como la coliflor (*Brassica oleracea*) y la canola (*Brassica napus*). *A. thaliana* es de tamaño pequeño (30 cm) y posee un ciclo corto de vida (6-8 semanas), produce gran cantidad de semilla, se puede cultivar en un espacio reducido y es fácil de manipular en el laboratorio. Esta especie cuenta con un genoma nuclear pequeño, secuenciado y publicado, distribuido en 5 cromosomas, con cerca de 25,500 genes, lo que facilita su manipulación genética, aunado a la existencia de métodos de transformación bien establecidos. Todo ello ha derivado en que la mayoría de los estudios que abordan los mecanismos genéticos, evolutivos, bioquímicos y moleculares que controlan el desarrollo de las plantas se hayan relacionado de alguna forma con *Arabidopsis thaliana* (Meyerowitz y Pruitt, 1985; Meinke *et al.*, 1998).

2.2. Los reguladores del crecimiento vegetal

Debido a su estilo de vida sésil, las plantas son organismos sofisticados, que integran información del ambiente muy eficientemente y responden activamente ante los estímulos bióticos y abióticos. Esto es posible por una comunicación efectiva entre los diferentes órganos y tejidos, a través de la síntesis de los diferentes reguladores del crecimiento vegetal, compuestos producidos por diferentes vías metabólicas que ejercen sus funciones mediante programas de señalización intracelular específica que conducen, en la mayoría de los casos, a la activación o represión de genes. Un solo regulador puede afectar una amplia gama de procesos y un solo proceso puede estar controlado al mismo tiempo por múltiples reguladores de crecimiento (Gray, 2004), en concentraciones nanomolares o micromolares (Weyers y Paterson, 2001).

Los reguladores clásicos del crecimiento identificados desde la primera mitad del siglo XX fueron las auxinas, citocininas, giberelinas, el ácido abscísico y el etileno; sin embargo, cada vez más compuestos se han incorporado a esta lista, incluyendo a los brasinoesteroides, al ácido salicílico, las estrigolactonas, el óxido nítrico, jasmonatos, karrikinas, poliaminas y algunos péptidos (Santner y Estelle,

2009).

2.3. Las auxinas

Las auxinas son los reguladores del crecimiento vegetal más estudiados, su nombre deriva de la palabra griega “*auxein*” que significa crecer. Dichas fitohormonas están implicadas en la división, elongación y diferenciación celular, repercutiendo en cada aspecto del crecimiento y desarrollo. Las auxinas participan en la embriogénesis, al regular la polaridad basal-apical en el embrión y en el establecimiento de los meristemas de la raíz y el follaje, así como en la modulación de las respuestas a la luz y gravedad, la arquitectura general de la raíz y follaje, la organogénesis, el desarrollo vascular y el crecimiento de explantes en cultivo de tejidos (Teale *et al.*, 2006).

El estudio de las auxinas es uno de los campos más antiguos de experimentación dentro de la investigación en plantas, los primeros reportes de su función se remontan hasta 1872, cuando Theophil Ciesielski postuló la presencia de una “influencia transmitida” presente en la punta de las raíces y responsable del gravitropismo (Ciesielski, 1872). Más tarde, Charles y Francis Darwin mostraron que esta “influencia transmitida” modulaba el alargamiento del brote, lo que le permite un crecimiento trófico hacia la luz (Darwin y Darwin, 1881).

El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más abundante en la naturaleza, está presente en los hongos, algas, animales y principalmente en las plantas (Weissbach *et al.*, 1959). Otros compuestos naturales con actividad auxínica incluyen al ácido 4-cloroindol-3-acético (4-Cl-IAA), al ácido indol-3-butírico (IBA) y al ácido fenilacético (PAA) (Sauer *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2017). Algunos compuestos sintéticos con estructura y actividad similares a las auxinas endógenas son: el ácido 1-naftaleneacético (NAA), ácido 2-(2,4-diclorofenoxi) propiónico (2,4-DP), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), dicamba, picloram, quinclorac, etc. Estos compuestos se utilizan ampliamente como herramientas químicas en prácticas científicas y agronómicas (Ma *et al.*, 2017). El AIA se ha caracterizado ampliamente y el término auxina generalmente se refiere a dicha molécula (Ma *et al.*, 2017).

2.4. Vía de señalización de las auxinas

Las auxinas regulan rápidamente la transcripción de cientos de genes a través de una ruta de transducción de señales dinámica y regulada por retroalimentación con otras fitohormonas (Chapman y Estelle, 2009; Paponov *et al.*, 2008; Leyser, 2018).

Cuando los niveles de AIA son bajos en la célula, los miembros de la familia de co-receptores/represores transcripcionales Aux/IAA regulan negativamente la señalización de las auxinas (Tan *et al.*, 2007). Estos represores contienen un dominio EAR conservado a través del cual reclutan a los co-represores de la familia TOPLESS (TPL). A su vez, los TPL pueden interactuar con proteínas de remodelado de cromatina que reprimen la transcripción (Szemenyei *et al.*, 2008). Por otra parte, los Aux/IAA se encuentran unidos a los factores de respuesta a auxinas (ARFs), un grupo de factores transcripcionales que regulan los genes de respuesta temprana a las auxinas (Szemenyei *et al.*, 2008). Los ARFs se unen a elementos de respuesta a auxinas (AREs) que portan una secuencia consenso TGTCTC localizados en los promotores de los genes regulados por auxinas (Abel y Theologis, 1996; Guilfoyle y Hagen, 2007; Mironova *et al.*, 2014). Cuando existen niveles intracelulares elevados de AIA, éste funciona como un “pegamento molecular” entre los represores Aux/IAA y un complejo SCF de ubiquitina ligasa formado por seis posibles receptores TIR1/AFB1-5 y otras proteínas como ASK1, CUL1, RBX. La función del complejo SCF^{TIR1/AFBs} es transferir varios monómeros de ubiquitina a los represores Aux/IAA (Smalle y Vierstra, 2004; Dharmasiri *et al.*, 2005). Una vez ubiquitinizados, los Aux/IAA, son reconocidos y degradados por el proteosoma 26S (Mockaitis y Estelle, 2008), proceso que permite la liberación de los ARFs, dando como resultado el inicio de la transcripción (Benjamins y Scheres, 2008) (Fig. 1).

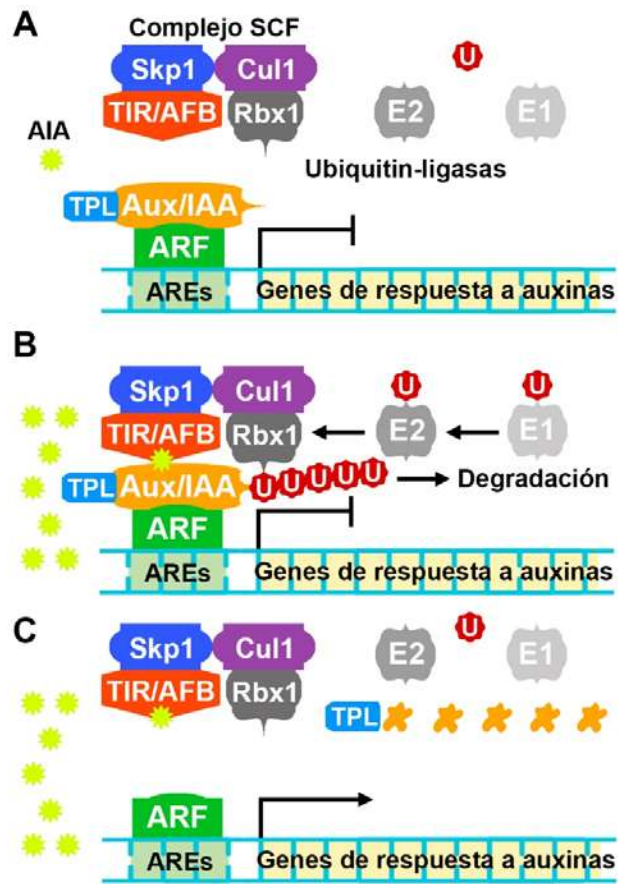


Figura 1. Percepción y señalización de las auxinas. Los genes inducibles por auxinas tienen secuencias AREs en sus promotores, los cuales están unidos a proteínas de la familia ARF. La expresión génica se evita mediante la unión con represores transcripcionales de la familia Aux/IAA que a su vez reclutan co-represores de la familia TPL, que controlan enzimas modificadoras de cromatina. Los pasos en la ruta de señalización de las auxinas se indican con diferentes letras: A) Cuando la concentración celular de auxinas es baja, las proteínas Aux/IAA reprimen a los factores de transcripción ARFs que regulan la expresión de los genes de respuesta a auxinas. B) Cuando los niveles de auxinas aumentan, estas se unen a los receptores TIR1/AFBs y actúan como un pegamento molecular entre los receptores y los represores Aux/IAA. Los receptores forman parte de un complejo SCF de ubiquitina ligasa de tipo E3 que transfiere la ubiquitina activada (Ub) desde un sistema enzimático E1/E2, provocando la poli-ubiquitinación de los Aux/IAAs resultando en su degradación. C) Los factores de transcripción ARFs se liberan de su represión y se expresan los genes de respuesta a auxinas.

Se han descrito 29 genes que codifican para proteínas Aux/IAAs en *Arabidopsis*; sus vidas medias en condiciones normales y bajo la aplicación de auxinas es muy variable (Dreher *et al.*, 2006; Paponov *et al.*, 2008). Un determinante importante de esta característica es un motivo en su dominio II que induce fácilmente su

degradación (Zenser *et al.*, 2001). La vida media de los Aux/IAA también depende del receptor con el que interactúan (Moss *et al.*, 2015). Los diferentes TIR1/AFBs-Aux/IAA tienen afinidades muy diferentes entre sí y hacia diferentes auxinas, e incluso especificidad celular, lo que contribuye a una amplia gama de respuestas dependiendo del sitio, tipo y cantidad de auxinas en la poza intracelular (Calderón-Villalobos *et al.*, 2012; Bargmann *et al.*, 2013). Además, existen 23 ARFs en *Arabidopsis* que también muestran afinidades diferenciales con los Aux/IAA (Vernoux *et al.*, 2011), y diversifican las respuestas a auxinas (Rademacher *et al.*, 2012; Bargmann *et al.*, 2013).

Una vía de señalización auxínica alternativa, independiente del proteosoma, es a través del receptor putativo de auxinas AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1), que está localizado en el retículo endoplásmico y en la membrana celular, y se le involucra en el ablandamiento de la pared, la regulación de la endocitosis y el rearrreglo del citoesqueleto durante la expansión celular por medio de un mecanismo independiente a la transcripción (Sauer *et al.*, 2013).

2.5. El transporte de auxinas

El AIA es un ácido orgánico con un anillo indólico unido a una cadena lateral que contiene un ácido carboxílico a una distancia de 0.55 Å (Sauer *et al.*, 2013). El grupo carboxilo se protona a pH ácido, haciendo a la molécula menos polar, forma en la que puede difundirse a través de la membrana celular, mientras que la molécula no protonada y cargada negativamente (AIA⁻) es muy polar y no puede atravesar la membrana. El pH varía en diferentes compartimentos celulares, de 5.0 a 5.5 en el fluido apoplástico de la pared celular y vacuolas, y alrededor de 7.0 en el citosol. El AIA-H en el apoplasto y las vacuolas puede difundirse a través de las membranas, mientras que el AIA⁻ permanece atrapado dentro de la célula y no puede salir del citosol sin la ayuda de transportadores específicos conocidos como acarreadores de eflujo (Ljung, 2013) (Fig. 2).

Se han descrito tres familias de acarreadores de eflujo en *Arabidopsis*: PIN, PILS y ABCB. También existen proteínas de influjo, como las AUX/LAX, las cuales son importantes para el incremento de los niveles de AIA dentro de las células (Barbez *et al.*, 2012). La localización de los acarreadores de eflujo e influjo en la membrana celular dirige el transporte del AIA dentro y fuera de la célula (también llamado transporte polar de auxinas), para su movilización entre diferentes tejidos

(Ljung, 2013) (Fig. 2). Los genes PIN codifican para proteínas con 10 dominios transmembranales, con localización asimétrica a través de la membrana plasmática, consistente con el papel de controlar la polaridad en el movimiento de auxinas; esta función se ve afectada por la acción de los inhibidores del transporte de auxinas tales como el ácido triodobenzoico (TIBA) y el ácido *N*-naftiltalámico (NPA) (Thomson *et al.*, 1973).

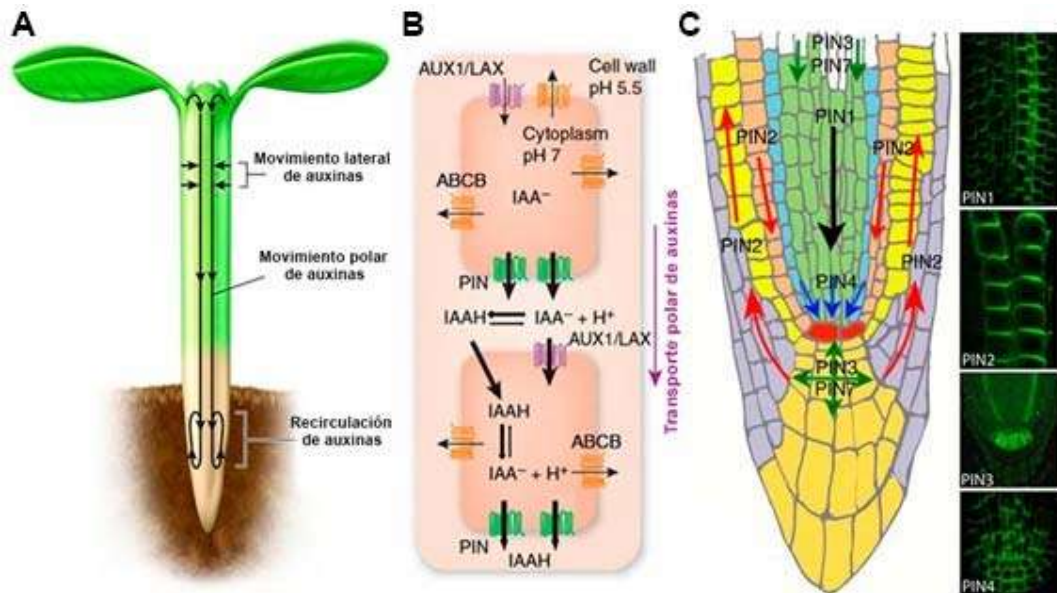


Figura 2. El transporte de auxinas. (A) Esquema del movimiento de las auxinas que incluye la distribución lateral y polar desde sus sitios de síntesis hasta alcanzar el meristemo de la raíz, en donde ocurre su recirculación. (B) Modelo de trampa ácida para el transporte polar de auxinas. (C) Localización de los transportadores PIN en el meristemo apical de la raíz.

2.6. Biosíntesis de las auxinas

Aunque el AIA se sintetiza principalmente en primordios foliares y hojas jóvenes, se puede producir en diferentes tejidos del brote y la raíz. Las enzimas para la síntesis de AIA generalmente están codificadas por grandes familias de genes, por lo que la identificación y caracterización de las rutas individuales ha sido un desafío (Leyser, 2018). No obstante, hasta la fecha se han logrado progresos notables en la comprensión de la complejidad subyacente de estas vías metabólicas y cómo las plantas usan dicha complejidad para modular la producción local de AIA. El triptófano (L-Trp) sirve como un precursor común para la síntesis de AIA en plantas y bacterias productoras de auxinas. En las plantas, el Trp se produce en los cloroplastos a partir de corismato, el producto final de la vía del shikimato (Maeda

y Dudareva, 2012). Los diferentes derivados del Trp, incluidos el ácido indolpirúvico (IPyA), el indol acetaldoxima (IAOx) y el indol acetamida (IAM), se consideran precursores del AIA para las rutas paralelas de la llamada biosíntesis de AIA dependiente de Trp (Fig. 3).

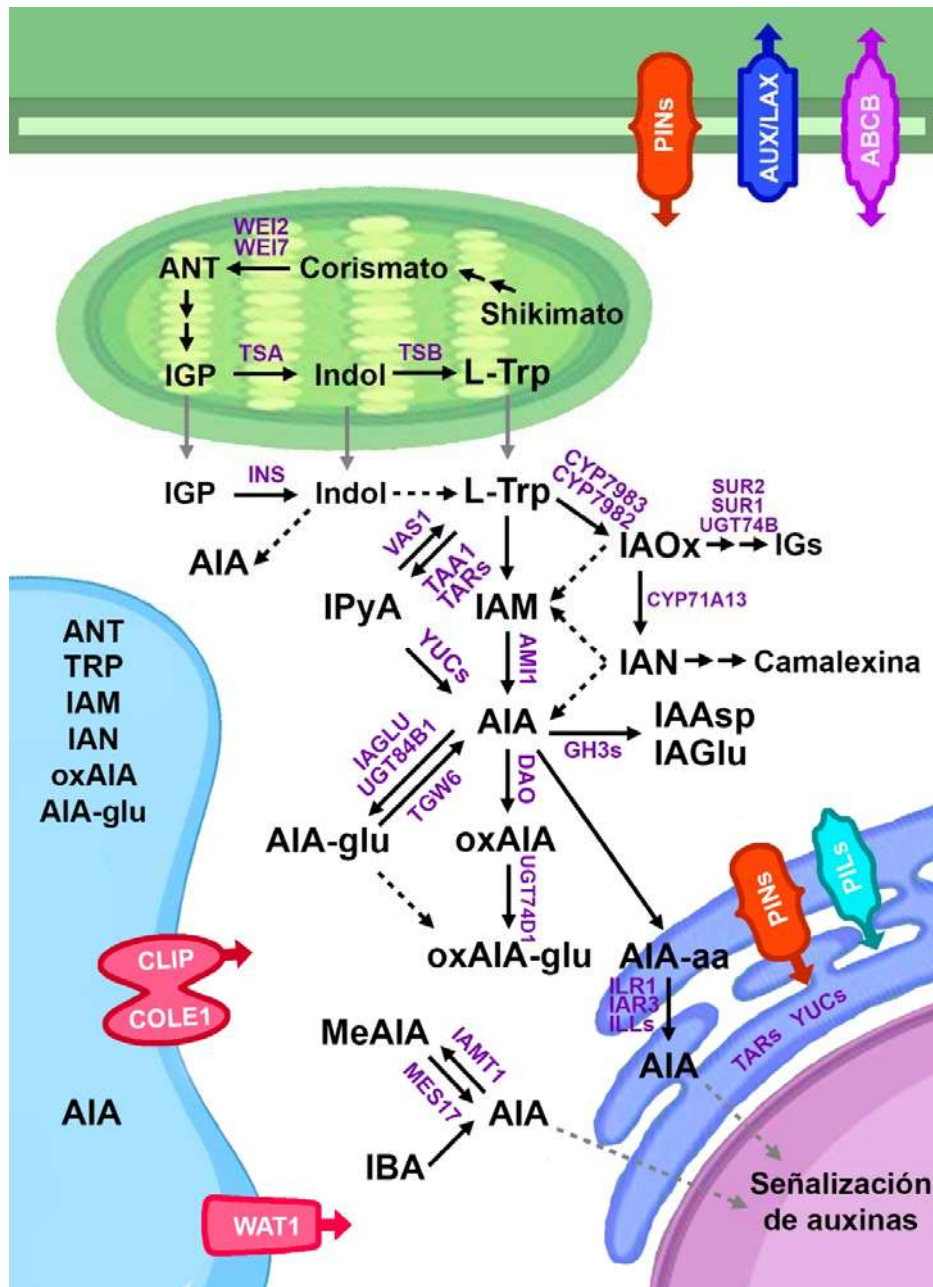


Figura 3. Metabolismo y distribución de las auxinas en células vegetales. En el cloroplasto se lleva a cabo la biosíntesis del precursor principal de del AIA, L-triptófano (L-Trp), y del precursor de AIA específico de la familia *Brassicaceae*, indol acetaldoxima (IAOx). Las vías posteriores de biosíntesis, catabolismo y conjugación del AIA comúnmente operan en el citosol. Se cree que la biosíntesis y la hidrólisis de los conjugados AIA-aminoácido (IAA-aa) se producen en el retículo

endoplásmico. El AIA, sus precursores y metabolitos relacionados se indican en negro. Las enzimas que catalizan las reacciones metabólicas están indicadas en púrpura. Las rutas donde se conocen las enzimas, los genes o los intermedios se indican mediante flechas continuas, mientras que las rutas que aún no están bien definidas se indican mediante flechas punteadas. Las vías específicas de las brassicáceas se indican con un cuadro amarillo discontinuo. Los transportadores de AIA asociados a membranas están representados por óvalos de colores. Abreviaturas: ANT, antranilato; DAO, DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION; GH3, GRETCHEN HAGEN3; IAA, ácido indol-3-acético; IAM, indol-3 acetamida; IAN, indol-3-acetonitrilo; IAOx, indol-3-acetaldoxima; IAR3, IAA ALANINE RESISTANT3; IBA, ácido indol-3-butírico; IGs, indol-glucosinolatos; IGP, indol-3-glicerol fosfato; ILL, ILR1-LIKE; ILR1, IAA-LEUCINE RESISTANT1; INS, indol sintasa; IPyA, ácido indol-3-pirúvico; MeIAA, ácido 1-metil-indol-3-acético; oxIAA, ácido 2-oxindol-3-acético; PILS, PIN-likes; PIN, PIN-FORMED; TAA1, TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1; TARs, TAA1-RELATED; TSA/TSB, triptófano sintasa subunidad A/B; UGTs, UDP-glicosiltransferasas; VAS1, REVERSAL OF SAV3 PHENOTYPE 1; WAT1 WALLS ARE THIN1; YUC, YUCCA, monooxigenasas dependientes de flavina. (Modificado de Casanova-Saez y Voß, 2019).

2.6.1. La ruta de la indol-3-acetaldoxima (IAOx)

La vía de la IAOx vincula la síntesis del AIA con la producción de compuestos de defensa, como son los indol-glucosinolatos y la camalexina. El Trp se convierte en IAOx por las enzimas citocromo P450 monooxigenasas CYP79B2 y CYP79B3 localizadas en cloroplasto (Zhao *et al.*, 2002) (Fig. 3). Las mutantes *cyp79b2* y *cyp79b3* carecen de indol-glucosinolatos y camalexina; siendo más susceptibles a la infección por patógenos (Nafisi *et al.*, 2007). Solo se han encontrado genes *IAOx* y *CYP79B2/3* en especies de la familia *Brassicaceae* (Sugawara *et al.*, 2009). Aún no se comprende completamente cómo IAOx se convierte en IAA. Algunos experimentos han demostrado la conversión de IAOx en indol-3-acetonitrilo (IAN), indol-3-acetamida (IAM) e AIA (Sugawara *et al.*, 2009). CYP71A13 convierte a la IAOx en IAN (Nafisi *et al.*, 2007) y el IAN se convierte tanto en IAM como en AIA *in vitro* por nitrilasas (NIT), además, algunos datos recientes apoyan un papel de las NIT en la síntesis de AIA (Bartel y Fink, 1994; Lehmann *et al.*, 2017). En las raíces de *Arabidopsis*, los patrones de expresión de *CYP79B2/B3* coinciden con los máximos de AIA, lo que sugiere la participación de la vía IAOx en la formación de los gradientes de auxinas en estas estructuras (Ljung *et al.*, 2005).

2.6.2. La ruta de la indol-3-acetamida (IAM)

La vía de la IAM está bien descrita en bacterias productoras de AIA y contribuye a

la virulencia de éstas. La triptófano-2-monooxigenasa (*iaaM*) y la indol-3-acetamida hidrolasa (*iaaH*) realizan la conversión de Trp a IAM y de IAM a AIA, respectivamente (Patten y Glick, 1996) (Fig. 3). Se ha reportado IAM endógeno en angiospermas, incluida *Arabidopsis*; sin embargo, no se han identificado secuencias homólogas a *iaaM* en los genomas de las plantas, solo se han encontrado ortólogos con una significativa similitud de secuencia con la *iaaH* (Mano *et al.*, 2010). Los miembros de la familia AMIDASE1 (*AMI1*) hidrolizan IAM a AIA *in vitro* y en cultivos de células BY-2 de tabaco (Pollmann *et al.*, 2003; Nemoto *et al.*, 2009). Aunque aún no se ha descartado por completo, los datos experimentales disponibles son insuficientes para determinar la contribución de la vía IAM a la biosíntesis de AIA en plantas.

2.6.3. La ruta del ácido indol-3-pirúvico (IPyA)

La vía del IPyA comprende dos pasos y es ruta biosintética de AIA mejor conocida. Las enzimas TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1 (*TAA1*) y *TAA1* RELATED (*TARs*), catalizan la conversión de Trp a IPyA. Posteriormente, IPyA se convierte en AIA por la familia *YUCCA* de monooxigenasas dependientes de flavina (Stepanova *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011). En *Arabidopsis*, las mutantes sencillas *taa1*, *tar1* y *tar2* muestran solo fenotipos sutiles, mientras que las mutantes triples *taa1tar1tar2* muestran defectos en el desarrollo más notables: no forman raíces primarias y la longitud de sus hipocótilos se reduce drásticamente (Won *et al.*, 2011). Del mismo modo, defectos en el crecimiento de la raíz y del hipocótilo, así como reducciones severas en los niveles de AIA se observan en mutantes afectados en múltiples genes *YUCCA* (Chen *et al.*, 2014a), lo que demuestra el requerimiento de AIA producido a partir de esta vía para el desarrollo normal de las plantas. En todo el reino vegetal se pueden encontrar homólogos de *TAA1/YUC* (Mano y Nemoto 2012). A pesar de estar codificadas por una familia de genes, la expresión de las enzimas *TAA1/YUC* están reguladas espaciotemporalmente, y los factores transcripcionales específicos que coordinan la biosíntesis local de AIA están comenzando a dilucidarse (Matthes *et al.*, 2019). Un nivel adicional que regula la producción de AIA se logra por medio de la aminotransferasa piridoxal dependiente de fosfato REVERSAL OF SAV3 PHENOTYPE1 (*VAS1*), que convierte IPyA nuevamente en Trp (Zheng *et al.*, 2013).

Por medio de análisis químicos, se han identificado varios inhibidores específicos de la vía IPyA: el ácido aminooxinaftilpropiónico (Narukawa-Nara *et al.*, 2016) y la *L*-kinurenina (He *et al.*, 2011) inhiben a las TAA1/TAR. Además, el ácido 4-fenoxifenilborónico (Kakei *et al.*, 2015) y yucasin (Nishimura *et al.*, 2014) interfieren con la función de las enzimas YUCCA. Las plantas tratadas con estos químicos muestran un contenido reducido de AIA y fenotipos deficientes en auxinas que se asemejan a los observados en las mutantes *taa/tar* y *yuc* (Chen *et al.*, 2014a). Por lo tanto, estos compuestos proporcionan una herramienta para manipular la síntesis de AIA en una etapa específica del desarrollo. Las consecuencias biológicas de la manipulación genética y química de la vía IPyA en diferentes organismos vegetales, junto con su meticulosa regulación transcripcional, sugieren que esta es una ruta universal para la síntesis de AIA que integra no solo señales de desarrollo sino también ambientales.

2.6.4. La ruta independiente de Trp

Se ha propuesto una ruta que no requiere el Trp como sustrato para la biosíntesis de AIA, ya que en mutantes de *Arabidopsis* y maíz afectadas en la triptófano sintasa (TS), se mantiene la síntesis de AIA (Wright *et al.*, 1991; Normanly *et al.*, 1993) (Fig. 3). También se demostró la producción de indol por una enzima indol sintetasa citosólica (INS), homóloga a la subunidad A de la triptófano sintasa (TSA) del cloroplasto y desempeña un papel específico en la biosíntesis de AIA local durante el desarrollo embrionario temprano (Zhang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015). Sin embargo, aún queda por demostrar experimentalmente si el indol citosólico se convierte en AIA sin previa formación de Trp.

2.7. Conjugación e inactivación del AIA

Los niveles de auxinas en las células vegetales son el resultado de un equilibrio entre su transporte, síntesis, almacenamiento e inactivación. La atenuación de la señalización de auxinas después de la acumulación local, así como la formación regulada de mínimos de auxinas, es de importancia crítica para el desarrollo. De hecho, hasta el 25% del AIA está presente como AIA libre en los tejidos vegetales (Ludwig-Muller *et al.*, 2011). La mayoría del AIA celular se inactiva por la síntesis de sus formas de almacenamiento transitorias o por su degradación catabólica irreversible. Se han identificado varias formas inactivas del AIA en diferentes

especies de plantas (Korasick *et al.*, 2013) (Fig. 3), de las cuales, algunas se pueden volver a convertir en AIA libre, ajustando así los gradientes de AIA.

Los aminoácidos (aa), los péptidos y las proteínas pueden conjugarse con el AIA por medio de enlaces amida. Aunque la función del AIA-péptido y el AIA-proteína queda por esclarecerse, los conjugados IAA-aa se han caracterizado más ampliamente. Los miembros de la familia GRETCHEN HAGEN 3 (GH3) de amido sintetetasas se identificaron por primera vez en la soya como genes de respuesta temprana a auxinas (Hagen y Guilfoyle, 1985). En *Arabidopsis*, los ocho miembros de la familia GH3 del grupo II conjugan el AIA con diferentes aminoácidos. Las mutantes sencillas *gh3* de *Arabidopsis* son ligeramente más sensibles al AIA, pero se comportan como plantas silvestres cuando se cultivan en medios libres de hormonas. Solo las mutantes múltiples en *gh3* muestran contenidos elevados de AIA y fenotipos de sobreproducción de auxinas (Staswick *et al.*, 2005; Porco *et al.*, 2016). Se sabe que algunas GH3 son enzimas promiscuas que pueden conjugar aminoácidos con diferentes hormonas vegetales (Staswick *et al.*, 2005). Por ejemplo, GH3.3, GH3.5 y GH3.6 también conjugan Asp, Met y Trp con ácido jasmónico, lo que influye positivamente en el desarrollo de raíces adventicias (Gutierrez *et al.*, 2012). GH3.5 además conjuga al ácido salicílico con aminoácidos, este doble papel puede explicar el requerimiento de auxinas en las respuestas de defensa de la planta después de la infección por patógenos y en respuestas al estrés abiótico (Westfall *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2007).

Las amidohidrolasas de AIA revierten algunos conjugados AIA-aa a AIA libre y, por lo tanto, contribuyen a regular los niveles auxinas. En *Arabidopsis*, estos incluyen IAA-LEUCINE RESISTANT1 (ILR1), IAA-ALANINE RESISTANT3 (IAR3) y cinco ILR1-LIKE (ILLs). Estas amidohidrolasas presentan actividad *in vitro* hacia una amplia gama de sustratos IAA-aa, incluidos AIA-Leu, AIA-Ala, AIA-Phe y AIA-Gly (Bartel y Fink 1995; Davies *et al.*, 1999; LeClere *et al.*, 2002) (Fig. 3). Las plantas tratadas con estos conjugados muestran una inhibición del crecimiento de las raíces comparable a la causada por la aplicación exógena de AIA, lo que indica que estos conjugados son formas de almacenamiento que regulan el metabolismo de las auxinas (Rampey *et al.*, 2004). Los conjugados AIA-aa más abundantes son IAA-Asp e IAA-Glu y no se consideran formas de almacenamiento reversibles a AIA sino moléculas para catabolismo (Kowalczyk y Sandberg, 2001).

Se han detectado conjugados AIA-azúcares unidos por enlaces éster en

Arabidopsis, soya, maíz y arroz (Bandurski y Schulze, 1977; Kai *et al.*, 2007). Estos conjugados son notablemente abundantes en las semillas de varias especies de cereales y leguminosas, sugiriendo que los conjugados AIA-azúcares son una fuente importante de auxinas durante el establecimiento temprano de las plántulas en algunas especies (Bandurski y Schulze, 1977; Jakubowska y Kowalczyk, 2004). En *Arabidopsis*, AIA-glucosa es el conjugado de AIA por enlace éster más común y el metabolito de AIA más abundante en los tejidos, con niveles particularmente altos en las raíces (Porco *et al.*, 2016). Enzimas UDP-glucosiltransferasas específicas catalizan la conjugación de UDP-glucosa al AIA y se han identificado en maíz y *Arabidopsis* (Szerszen *et al.*, 1994; Jackson *et al.*, 2001). La sobreexpresión de estas enzimas en *Arabidopsis* provoca la acumulación de IAA-glucosa y disminuye la sensibilidad al AIA exógeno (Jackson *et al.*, 2002). Aún falta por conocer las contribuciones de los conjugados de AIA por enlaces éster al metabolismo del AIA y al desarrollo de las plantas.

El éster metílico del AIA (MeIAA) también se considera una forma relevante, es una auxina volátil no polar que se mueve a través de la planta tanto por difusión como por transporte activo. La carboxil metiltransferasa (IAMT) de *Arabidopsis* es una enzima capaz de metilar el grupo carboxilo del AIA *in vitro* (Zubieta *et al.*, 2003). Por otro lado, la interrupción del gen *IAMT1* de *Arabidopsis* causa defectos de desarrollo, incluyendo enanismo y fertilidad reducida (Qin *et al.*, 2005). La aplicación de MeAIA exógeno inhibe el crecimiento de la raíz y el alargamiento de hipocótilo en la oscuridad en un grado comparable con la aplicación de AIA, lo que indica que el MeIAA regula los niveles endógenos de AIA. El propio MeAIA no es reconocido por los co-receptores de auxinas y no interfiere con la percepción del AIA (Abbas *et al.*, 2018), apoyando así la teoría de que los efectos del MeIAA en el desarrollo de la planta son atribuibles al AIA hidrolizado.

El ácido indol-3-butírico (IBA) puede convertirse en AIA mediante enzimas peroxisomales en un proceso similar a la β -oxidación de ácidos grasos (Zolman *et al.*, 2008; Strader *et al.*, 2010) (Fig. 3). Las mutantes en la vía de la β -oxidación del IBA son insensibles al IBA pero sensibles al AIA, lo que indica que el IBA en sí mismo está inactivo y que cualquier respuesta auxínica es completamente atribuible a su conversión a AIA (Strader *et al.*, 2010). Se ha demostrado que el AIA derivado del IBA desempeña funciones específicas en muchos aspectos diferentes del desarrollo de brotes y raíces (Frick y Strader, 2018). Sin embargo,

hasta la fecha no está claro si el IBA es una forma inactiva de almacenamiento o un precursor de AIA. Se espera que el descubrimiento de las enzimas involucradas en la síntesis del IBA aclare su papel en la regulación de los niveles del AIA.

La atenuación del AIA a través de la oxidación por la formación del ácido 2-oxindol-3-acético (oxIAA) y su posterior conjugación a glucosa (IAA-glc) se considera la vía principal para la inactivación del AIA, ya que estos metabolitos oxidativos se encuentran 100 veces más que otros catabolitos del AIA y ambos aumentan rápidamente después de la aplicación de AIA (Kai *et al.*, 2007; Pencik *et al.*, 2013). La cuantificación de los niveles del oxIAA en las raíces de *Arabidopsis* demostró que su distribución coincide con la del AIA donde la enzima UGT74D1 cataliza la glucosilación del oxIAA a IAA-glc (Tanaka *et al.*, 2014).

2.8. Localización celular del AIA

La localización intracelular del AIA influencia los niveles de AIA activos. El descubrimiento de los transportadores de AIA asociados con la membrana del retículo endoplásmico (RE), como PIN5, PIN6, PIN8 y PIN-like (PILS), involucra directamente al RE en la homeostasis intracelular de las auxinas. Las variaciones en la actividad de los PIN y PILS localizados en el RE provocan niveles alterados de AIA y sus compuestos conjugados, e impacta en la señalización nuclear (Mravec, *et al.*, 2008; Dal Bosco *et al.*, 2012; Simon *et al.*, 2016) (Fig. 3). Además, una parte del metabolismo del AIA parece ocurrir en el RE, ya que las amidohidrolasas ILR1, IAR3 e ILL2 se localizan en el lumen de este organelo (Sanchez-Carranza *et al.*, 2016). Recientemente, se demostró que algunos miembros de YUC y TAR también se colocan en la membrana del RE en *Arabidopsis* y maíz, aportando una fracción significativa de AIA (Kriechbaumer *et al.*, 2016). Por lo tanto, el RE juega un papel importante en la regulación del metabolismo del AIA y su abundancia nuclear durante el crecimiento de las plantas mediado por las auxinas.

Inicialmente, las vacuolas se vincularon indirectamente a la homeostasis celular de AIA, ya que se demostró que los transportadores de iones en el tonoplasto afectan el transporte de AIA a través de la modulación del pH apoplástico (Cho *et al.*, 2012). Además, la participación directa de la vacuola en la homeostasis intracelular de AIA fue planteada por el descubrimiento de transportadores activos en el tonoplasto. En *Arabidopsis*, el transportador de auxinas asociado a la vacuola WALLS ARE

THIN1 (WAT1) exporta AIA de la vacuola al citosol. La localización vacuolar del AIA parece ser particularmente relevante para el crecimiento en grosor, ya que la mutante *wat1-1* muestra defectos en la deposición de la pared celular y presenta una longitud reducida del tallo (Ranocha *et al.*, 2013). Del mismo modo, la disminución de la expresión de COLE1, una proteína accesoria CLIP, un transportador vacuolar de AIA, produce una disminución de la longitud del entrenudo y la altura de la planta de arroz (Liu *et al.*, 2016). También se han detectado algunos precursores del AIA, así como los metabolitos oxIAA e IAA-glu en vacuolas de *Arabidopsis*, lo que sugiere un papel adicional de la vacuola en el metabolismo del AIA (Ranocha *et al.*, 2013) (Fig. 3).

2.9. Los genes *YUCCA* en el desarrollo de las plantas

Los genes *YUCCA* (*YUC*) se identificaron en *Arabidopsis* a partir de una línea generada por “activation-tagging” que mostraba cambios en su desarrollo causados por la sobreproducción de auxinas (Zhao *et al.*, 2001). Dado que la mutante tenía las hojas curvadas hacia abajo y un hábito de crecimiento semierecto, que se parecía a la planta conocida como yuca (*Agave* sp.), el gen identificado se denominó *YUCCA* (Zhao *et al.*, 2001). Los genes *YUC* se han identificado en varias especies, incluidos 11 genes en *Arabidopsis thaliana* (Cheng *et al.*, 2006), 9 en *Cucumis melo* (Zheng *et al.*, 2016), 10 en *Cucumis sativus* (Yan *et al.*, 2016), 8 en *Fragaria vesca* (Liu *et al.*, 2014), 14 en *Medicago truncatula* (Wang *et al.*, 2019), 22 en *Glycine max* (Wang *et al.*, 2007), 13 en *Phyllostachys heterocycla* (Wang *et al.*, 2017), 12 en *Populus trichocarpa* (Ye *et al.*, 2009), 14 en *Oryza sativa* (Woo *et al.*, 2007; Yamamoto *et al.*, 2007) y 14 en *Zea mays* (Gallavotti *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2015). Mientras que en otras especies como *Petunia hybrida*, *Pisum sativum*, *Vitis vinifera* y *Solanum lycopersicum* solo se han descrito algunos de sus genes *YUC* (Tobena-Santamaria *et al.*, 2002; Expósito-Rodríguez *et al.*, 2011; Tivendale *et al.*, 2010; Böttcher *et al.*, 2013). Su presencia en todas estas especies indica que los genes *YUC* están conservados en el reino vegetal.

Estudios filogenéticos demuestran que los genes *YUC* comparten ancestros comunes en diversos grupos taxonómicos, incluyendo musgos, monocotiledóneas, dicotiledóneas y plantas vasculares. Sin embargo, el origen de los genes *YUC* e incluso de toda la vía TAA/*YUC* no ha sido esclarecido (Rensing

et al., 2008; Gallavotti *et al.*, 2008). Es posible que la familia YUC se haya diversificado en gran medida debido a la amplia especialización de las eudicotiledóneas y monocotiledóneas en los últimos 150 millones de años y a partir de entonces se han expandido de forma independiente (Matthes *et al.*, 2019).

Las enzimas codificadas por los genes YUC fueron las primeras monooxigenasas dependientes de flavina (FMOs) identificadas en plantas y poseen estructuras típicas y actividades similares a las FMOs de los mamíferos (Cashman *et al.*, 2002). Son óxido-reductasas que catalizan la inserción de grupos hidroxilo a sus sustratos y en mamíferos están involucradas en la oxidación de compuestos para su eliminación (Krueger y Williams, 2005). Se han identificado FMOs en todos los genomas secuenciados de plantas y sus funciones están relacionadas a la biosíntesis de moléculas de señalización, el metabolismo de glucosinolatos y la defensa contra patógenos, a diferencia de sus homólogos de mamíferos que funcionan en la detoxificación (Schlaich, 2007). Los estudios bioinformáticos y bioquímicos han demostrado que las FMOs de plantas generalmente albergan motivos (o residuos de aminoácidos) altamente conservados en secuencia y posición (Krueger *et al.*, 2005; Schlaich *et al.*, 2007). Por ejemplo, el motivo de unión a FAD que se encuentra cerca del extremo N-terminal y el motivo de unión a NADPH que se ubica en la región media, presentan ambos una secuencia GxGxxG altamente conservada (Cashman *et al.*, 1995). Un motivo GG (ExxxxxGG) muy cerca del motivo de unión a FAD estabiliza la unión al dinucleótido y un motivo ATG1 (DxxxxATG) funciona probablemente para conectar los sitios FAD y NADPH (Vallon *et al.*, 2000). El motivo de identificación de las FMOs (FxGxxxHxxxY) se encuentra justo antes del dominio de unión a NADPH y también contribuye a dicha unión (Fraaije *et al.*, 2002). Finalmente, el motivo ATG2 en la parte C-terminal tiene una secuencia de aminoácidos característica llamada FATGY (Vallon *et al.*, 2000).

Por medio de ensayos bioquímicos en proteínas YUCCA recombinantes se dilucidó el mecanismo de reacción para la conversión de IPA a AIA: el primer paso es la reducción del cofactor FAD a FADH⁻ por NADPH, subsecuentemente, el FADH⁻ reacciona con el oxígeno para formar el intermediario flavin-C4a-(hidro)peroxi, que finalmente oxigena al sustrato electrofílico IPyA dando como resultado su conversión a AIA (Dai *et al.*, 2013).

La biosíntesis local ayuda a establecer un gradiente crítico de auxinas dentro de

la raíz, lo que resulta en cambios en la homeostasis de esta hormona y la arquitectura radicular (Olatunji *et al.*, 2017). En *Arabidopsis*, los cambios en la expresión de los genes *YUC* afectan los niveles auxinas (Mashiguchi *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011). En particular, las mutantes quintuples *yuc3yuc5yuc7yuc8yuc9* muestran un crecimiento de raíces y gravitropismo perturbados (Chen *et al.*, 2014a). Además, la expresión antisentido de *YUC1* resulta en una raíz defectuosa que se asemeja al fenotipo de la raíz de una mutante insensible a auxinas (Yamamoto *et al.*, 2007).

Las auxinas promueven la formación de raíces adventicias. Está demostrado que la familia de genes *YUC* orquesta la biosíntesis de auxinas endógenas necesarias para la inducción de raíces adventicias, entre los cuales *YUC1* y *YUC4* parecen desempeñar el papel más importante (Chen *et al.*, 2016; Sang *et al.*, 2016). Varios factores ambientales que incluyen a la luz (Suzuki *et al.*, 2016), la disponibilidad de azúcar (Sairanen *et al.* 2012), y los ritmos circadianos (Pan *et al.*, 2019), están involucrados en la regulación de la actividad de los genes *YUC* para el desarrollo de novo de raíces adventicias. Los genes *YUC* también participan en la regulación del crecimiento de la raíz primaria y el crecimiento del hipocótilo durante las respuestas al estrés por altas temperaturas y por exceso de aluminio (Franklin *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2016). Además, los genes *YUC* juegan un papel en la regulación del crecimiento la raíz durante las interacciones planta-microorganismo o planta-planta al regular los niveles de auxinas (Ishida *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2019).

La delección de múltiples genes *YUC* causa plantas con fenotipos de hojas estrechas deficientes en auxinas (Zhao *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2007), mientras que la sobreproducción de auxinas resulta en hojas curvadas (Kim *et al.*, 2007). La polaridad adaxial-abaxial de la hoja está mediada por varios genes *YUC*, ya que implica la acumulación local de auxinas en las células del margen de la hoja (Wang *et al.*, 2011a). La mutante *yuc1yuc2yuc4yuc6* mostó un número reducido de venas foliares y haces vasculares, fenotipo altamente dependiente de la cantidad de genes afectados, lo que sugiere que las auxinas producidas localmente son importantes para la formación de haces vasculares y el desarrollo de la hoja (Cheng *et al.*, 2006). En los órganos florales, el inicio de los primordios se correlaciona bien con los niveles transcripcionales de *YUC1* y *YUC4* (Cheng *et al.*, 2006). Mientras que en las plantas con flores, el patrón de los gametofitos

femeninos depende de una distribución asimétrica y una acumulación local de auxinas mediada por genes *YUC* (Pagnussat *et al.*, 2009). Los genes *YUC* también son necesarios para el control de la biosíntesis de auxinas localizada durante la embriogénesis de las plantas (Cheng *et al.*, 2007; Robert *et al.*, 2013; Stone *et al.*, 2018). Por otro lado, varios estudios han mostrado que la expresión de varios genes *YUC* es alta en tejidos de varias semillas sugiriendo que la biosíntesis de auxinas a través de la vía TAA/*YUC* es fundamental para la reproducción de las plantas (Gallavotti *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2016; Feng *et al.*, 2019; Bai *et al.*, 2013).

La biosíntesis de auxinas genera las concentraciones requeridas para reprogramar la expresión de los genes involucrados en las respuestas a estímulos o ante situaciones de estrés (Bielach, *et al.*, 2017). Se ha resaltado la importancia de la síntesis de auxinas mediada por los genes *YUC* en la regulación del estrés, la arquitectura de la raíz, la adaptación a la sequía, la contención de las especies reactivas de oxígeno o para mejorar el estado nutricional (Cao *et al.*, 2019).

2.10. Identificación y generación de la mutante *threadlyucca4*

Zhao y col. (2001), analizaron mutantes con ganancia de función generadas por la técnica de “*activation tagging*” (Weigel *et al.* 2000), y determinaron que las inserciones de los potenciadores de la expresión estaban aproximadamente tres kilobases río-abajo de la región codificante del primer gen identificado como *YUCCA*, el cual posteriormente se colocó bajo el control del promotor 35S completo, y observaron que las plantas imitaban el fenotipo mostrado por la mutante de “*activation tagging*”. Estas últimas mutantes fueron empleadas para estudios posteriores (Zhao *et al.*, 2001). Además de los hipocótilos alargados, las mutantes denominadas *yucca* presentaron un fenotipo característico de elevados niveles de auxinas durante su desarrollo: en la parte aérea, las plántulas tuvieron cotiledones epinásticos y peciolo elongados. Dicho fenotipo fue similar al de las mutantes sobreproductoras de auxinas como *sur1*, *sur2*, y las plantas transgénicas que sobreexpresan el gen bacteriano *iaaM* de síntesis de AIA (Zhao *et al.*, 2001). Las raíces de *yucca* presentaron un mayor número y longitud de pelos radiculares con relación a las plántulas silvestres. Las plántulas crecidas en oscuridad desarrollaron hipocótilos más cortos sin el gancho apical. Las hojas maduras de *yucca* fueron más pequeñas, estrechas, epinásticas y con peciolo

alargados. Finalmente, las plantas *yucca* adultas mostraron dominancia apical incrementada y crecieron de manera semi-erecta (Zhao *et al.*, 2001).

La mutante *thread*, posteriormente renombrada *yucca4* (*yuc4*), es una mutante de ganancia de función que se encuentra en el fondo genético Wassilewskija (Ws), generada por la técnica de “*activation tagging*” usando como vehículo el elemento transponible de maíz *En-1*, y como inductor de la transcripción a cuatro potenciadores o “enhancers” provenientes del promotor 35S del CaMV. La mutante fue aislada por Marsch-Martínez y colaboradores en el Plant Research International, Wageningen, Holanda, y presentaba un fenotipo similar al reportado en las mutantes sobreproductoras de auxinas. Se mapeó el gen involucrado y se encontró que la inserción del elemento activador ocurrió 828 bp río-arriba del codón de inicio del gen *YUCCA4* (Marsch-Martínez *et al.*, 2002). Sin embargo, los autores antes mencionados no caracterizaron fisiológicamente a la mutante, por lo que en el presente trabajo se planteó realizar la transformación de *A. thaliana* con el gen *YUCCA4* bajo el control del promotor 35S completo y analizar las consecuencias fisiológicas de su sobreexpresión.

3. JUSTIFICACIÓN

La participación de las auxinas en diferentes procesos celulares se debe a la diversidad de factores de transcripción y represores que participan en la vía de señalización, así como a los genes que codifican enzimas que participan en la síntesis de esta hormona, entre los que se encuentran los genes *YUCCA*. La importancia de estos genes se puede analizar mediante diferentes enfoques; en este trabajo se aborda la caracterización fisiológica y bioquímica de las mutantes con sobreexpresión del gen *YUCCA4*.

4. HIPÓTESIS

La sobreexpresión del gen *YUCCA4* en *Arabidopsis thaliana* incrementa la cantidad de auxinas en la planta alterando su homeostasis e impacta en la interacción con otros reguladores del crecimiento vegetal.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar los efectos fenotípicos de la sobreexpresión del gen *YUCCA4* y su impacto sobre la producción, distribución, señalización y transporte de auxinas, así como la interacción con otros reguladores del crecimiento.

5.2. Objetivos específicos

- a) Realizar la sobreexpresión de *YUCCA4* y analizar la subsecuente sobreproducción de auxinas en *Arabidopsis*.
- b) Determinar la influencia de la sobreexpresión del gen *YUCCA4* sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas.
- c) Caracterizar el efecto de la sobreproducción de auxinas sobre su transporte, distribución y señalización.
- d) Establecer si la sobreproducción de auxinas influye en la interacción con otros reguladores del crecimiento vegetal.


6. RESULTADOS

6.1 Artículo de investigación indizado: *YUCCA4* overexpression modulates auxin biosynthesis and transport and influences plant growth and development via crosstalk with abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*.

Aceptado en la revista *Genetics and Molecular Biology*.



YUCCA4* overexpression modulates auxin biosynthesis and transport and influences plant growth and development via crosstalk with abscisic acid in *Arabidopsis thaliana

Aarón Giovanni Munguía-Rodríguez^{1,6}, Jesús Salvador López-Bucio², León Francisco Ruiz-Herrera¹, Randy Ortiz-Castro³, Ángel Arturo Guevara-García⁴, Nayelli Marsch-Martínez⁵, Yazmín Carreón-Abud⁶, José López-Bucio^{1*} and Miguel Martínez-Trujillo^{6*} 

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria. C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México.

²CONACYT-Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria. C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México.

³CONACYT-Red de Estudios Moleculares Avanzados, Instituto de Ecología A. C. Carretera antigua a Coatepec 351, Colonia El Haya. C.P. 91070 Xalapa, Veracruz, México.

⁴Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, México.

⁵Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Unidad Irapuato, Libramiento Norte Carretera Irapuato-León Kilómetro 9.6, C.P. 36824, Irapuato, Guanajuato, México.

⁶Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Edificio R, Ciudad Universitaria, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México.

Abstract

Auxin regulates a plethora of events during plant growth and development, acting in concert with other phytohormones. *YUCCA* genes encode flavin monooxygenases that function in tryptophan-dependent auxin biosynthesis. To understand the contribution of the *YUCCA4* (*YUC4*) gene on auxin homeostasis, plant growth and interaction with abscisic acid (ABA) signaling, *35S::YUC4* seedlings were generated, which showed elongated hypocotyls with hyponastic leaves and changes in root system architecture that correlate with enhanced auxin responsive gene expression. Differential expression of PIN1, 2, 3 and 7 auxin transporters was detected in roots of *YUC4* overexpressing seedlings compared to the wild-type: PIN1 was down-regulated whereas PIN2, PIN3 and PIN7 were up-regulated. Noteworthy, *35S::YUC4* lines showed enhanced sensitivity to ABA on seed germination and post-embryonic root growth, involving ABI4 transcription factor. The auxin reporter genes *DR5::GUS*, *DR5::GFP* and *BA3::GUS* further revealed that abscisic acid impairs auxin responses in *35S::YUC4* seedlings. Our results indicate that *YUC4* overexpression influences several aspects of auxin homeostasis and reveal the critical roles of ABI4 during auxin-ABA interaction in germination and primary root growth.

Keywords: *Arabidopsis*, auxin, abscisic acid, *YUCCA4*, root growth, germination.

Received: July 11, 2019; Accepted: November 18, 2019.

Introduction

The phytohormone auxin (indole-3-acetic acid, IAA) plays a role in many aspects of plant growth and development, including cell division, growth and differentiation. It also mediates adaptation to biotic and abiotic stress (Gha-

nashyam and Jain, 2009; Rahman, 2013). These functions require coordinated IAA biosynthesis, degradation, conjugation, transport and signaling for which specific genes and proteins have been identified in *Arabidopsis* and crops. Auxin biosynthesis mainly occurs in developing tissues such as cotyledons, expanding leaves and root tips (Ljung *et al.*, 2001), and arises via tryptophan (Trp)-independent and Trp-dependent pathways (Zhao, 2010). In the second case, Trp is first converted into indole-3-pyruvic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABI-

Send correspondence to Miguel Martínez-Trujillo. Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio R, Ciudad Universitaria, C.P. 58030 Morelia, Michoacán, México. E-mail: codigogenetico@gmail.com.

DOPSIS1/TRYPHTOPHAN AMINOTRANSFERASE RELATED (TAA1/TAR) enzymes (Kasahara, 2015). Subsequently, enzymes of the YUCCA family of flavin-containing mono-oxygenases (FMOs) catalyze the conversion of indole-pyruvic acid (IPA) into IAA. This two-step auxin biosynthesis pathway is highly conserved throughout the plant kingdom and is essential for almost all of the major developmental transitions and whole plant functioning (Zhao, 2012).

The *YUC* gene family has been identified in several plant species, it includes eleven members in *Arabidopsis* (Cheng *et al.*, 2006), seven in rice (Yamamoto *et al.*, 2007), six in tomato (Exposito-Rodríguez *et al.*, 2011), eight in strawberry (Liu *et al.*, 2014), twelve in poplar (Ye *et al.*, 2009) and ten in cucumber (Yan *et al.*, 2016). Disruption of a single *YUC* gene in *Arabidopsis* shows no obvious phenotypical alterations, which implicates functional redundancy. However, double, triple and quadruple mutants show abnormalities in different developmental and tissue specific contexts (Cheng *et al.*, 2006). On the other hand, gain-of-function *YUC* plants exhibit phenotypes consistent with auxin overproduction. From the 11 *YUC* homologues in *Arabidopsis*, overexpression of YUCA1,3,5,6,7,8, 9 has been studied under different contexts (Zhao *et al.*, 2001; Woodward *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2012; Hentrich *et al.*, 2013a; Hentrich *et al.*, 2013b; Chen *et al.*, 2014a; Cha *et al.*, 2015). However, overexpression of YUCCA4 gene and its impact on plant development has not been studied to date; a previous work only reports a line called *thread*, generated by activation tag inserts in *Arabidopsis* using the maize (*Zea mays*) En-I transposon system (Marsch-Martinez *et al.*, 2002).

Auxin is distributed via two spatially separated transport pathways: in the phloem it moves by mass flow (Michniewicz *et al.*, 2007; Muday and DeLong, 2001), while in other tissues, it is transported cell-to-cell through the PINFORMED (PIN) proteins, distributed differentially within cell membranes of transporting tissues (Galweiler *et al.*, 1998; Krecek *et al.*, 2009; Muller *et al.*, 1998). These transport systems ensure auxin redistribution according to the cell physiological and developmental status, and at the same time enable rapid growth and patterning responses.

Auxin is perceived by TIR1 and related AFB1, AFB2 and AFB3 protein receptors, associated with the SCF complex (Benjamins and Scheres, 2008). Auxin-responsive genes are commonly activated by specific transcription factors termed auxin-response factors (ARFs) through binding to auxin response elements (AREs) present in their promoters (Chandler, 2016). By contrast, the AUX/IAA repressors, negatively regulate auxin responses via interaction with ARFs (Hagen and Guilfoyle, 2002). Auxin acts as a glue to attach the AUX/IAA proteins with SCFTIR1, resulting in ubiquitination and degradation of the AUX/IAA repressors via the proteasome (Quint and Gray, 2006).

In addition to its importance towards understanding hormonal-dependent regulation of plant growth and development, how auxin interacts with abscisic acid (ABA) is a question of growing interest owing its role in adaptation to environmental stress (Kim *et al.*, 2013; Ke *et al.*, 2015; Tiwari *et al.*, 2017). ABA regulates embryo and seed development, seed dormancy, germination, senescence, vegetative growth, lateral root development, and drought tolerance (De Smet *et al.*, 2003; Finkelstein *et al.*, 2002). ABA synthesis takes place in vasculature, stomata and in seeds, where it promotes dormancy and blocks germination (Boursiac *et al.*, 2013). The cells perceive ABA through various receptor families, some of them localized into the nucleus. Currently, the best established ABA signaling model involves the soluble PYR/PYL/RCAR receptors, and downstream acting PP2C phosphatases that directly regulate SnRK2 kinases, controlling the transcription factors that finally regulate expression of ABA responsive genes (Cutler *et al.*, 2010).

Here, we generated and characterized *Arabidopsis thaliana* lines that overexpress the *YUC4* gene under transcriptional control of the CaMV 35S promoter (35S::*YUC4*). An analysis of these lines enabled not only to establish the functionality of the corresponding coding sequence, but also to perform a detailed investigation on growth and development related to auxin biosynthesis and transport, and characterization of the auxin-ABA crosstalk that influences germination and early plant growth.

Materials and methods

Generation of *YUCCA4* overexpressing lines

The *YUC4* coding sequence was amplified by PCR and then cloned into the vector pENTR/D-TOPO® according to the manufacturer's protocol. Primers for cDNA amplification were forward 5'-CAC CAT GGG CAC TTG TAG AGA A-3 and reverse 5'-TCA CAT ATA CAT ATA CAC ATT GAC-3. PCR product clones were confirmed by nucleotide sequencing and mobilized by recombination into the binary vector pEarleyGate100. The resulting vector was transferred to the *Agrobacterium tumefaciens* strain pGV2260 to perform *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis* (ecotype Col-0) plants using the modified floral dip method (Martinez-Trujillo *et al.*, 2004). T1 seedlings were selected on MS medium containing 50 µg/mL of glufosinate ammonium (BASTA). BASTA-resistant T1 seedlings were transferred to soil and allowed to self-pollinate to generate T2 plants. The resistant T2 seedlings with 3:1 segregation of resistance were transferred to soil to obtain homozygous T3 seedlings from individual lines.

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana lines used were Col-0 (WT), the transgenic *Arabidopsis* lines *DR5::GUS* (Ulmasov *et al.*,

1997), *BA3::GUS* (Oono *et al.*, 1998), *HS::AXR3NT-GUS* (Gray *et al.*, 2001), *ABI4::GUS* (Shkolnik-Inbar and Bar-Zvi, 2010), *PIN1::PIN1-GFP* (Benková *et al.*, 2003), *PIN2::PIN2-GFP*, *PIN3::PIN3-GFP*, *PIN7::PIN7-GFP* (Blilou *et al.*, 2005) and the mutant line *abi4* (Finkelstein, 1994). Crosses were made between reporter lines and *35S::YUC4*; F3 populations from the crosses were screened for auxin overproducing phenotypes in shoots of plants harboring the marker constructs; homozygous lines were used in subsequent experiments. Seeds were surface sterilized with 95% ethanol (v/v) for 5 min and 20% bleach (v/v) for 7 min and washed five times in 1 ml of sterile distilled water. Seeds were vernalized for 2 days at 4 °C and placed into plates containing 0.2x solidified MS medium prepared with MS basal salts (Murashige and Skoog Basal Salts Mixture, Sigma Aldrich), 1% agar (Phytagar Gibco-BRL), and 1% sucrose (Sigma-Aldrich). Plates were vertically placed at an angle of 65° to allow root growth along the agar surface and to allow aerial growth of the hypocotyls, into a plant growth chamber (Percival AR-95L) with a photoperiod of 16 h of light/8 h of darkness, light intensity of 105 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and temperature of 22 °C.

Chemicals

NPA and ABA were purchased from Sigma and dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). In control treatments, DMSO was used in equal amounts as present in the greatest concentration of each compound tested.

Analysis of growth

Arabidopsis roots and hypocotyls were analyzed using a stereoscopic microscope (Leica MZ6). Images were captured with a Samsung SCC 131-A digital color camera adapted to the microscope. Primary root length was determined for each root using a ruler. Lateral root number was determined by counting the lateral roots per seedling, and lateral root density was calculated by dividing the lateral root number by the primary root length for each analyzed seedling. Hypocotyl length was determined from images using the software NIH ImageJ version 1.48 (Schneider *et al.*, 2012). For all experiments with WT and transgenic lines, the overall data were statistically analyzed using the SPSS 10 program.

Free IAA determination

Whole seedlings were grown on agar solidified 0.2x MS medium for 10 d, then collected and frozen in liquid N₂. 100 mg of tissue was pooled per sample. IAA was quantified using the Varian Saturn 2000 GC-MS/MS system as previously described (Pollmann *et al.*, 2009).

Histochemical analysis

For histochemical analysis of β -glucuronidase, *Arabidopsis* seedlings were incubated overnight at 37 °C in a GUS reaction buffer (0.5 mg mL⁻¹ 5-bromo-4-chloro-3-

indolyl- β -D-glucuronide in 100 mM sodium phosphate, pH7). The stained plants were cleared with 0.24 N in 20% HCl (v/v) methanol and incubated for 60 min at 62 °C. The solution was substituted by 7% NaOH (w/v) in 60% ethanol (v/v) for 20 min at room temperature. Plants were hydrated with ethanol treatments at 40, 20 and 10% (v/v) for 24 h each, and fixed in 50% glycerol (v/v). The processed roots were placed on glass slides and sealed with commercial nail varnish. For each marker line and for each treatment, at least 15 transgenic plants were analyzed.

Seed germination assays

For germination assay, seeds from WT, *35S::YUCCA4*, *abi4* and *abi4/35S::YUCCA4* were disinfected and placed into 0.2x MS medium supplemented with DMSO, 0.5, 1 and 2 μM ABA, and incubated in a plant growth chamber to register germination at the time when radicle was completely emerged.

Northern blotting

For RNA hybridization analysis, 10 d seedlings were grinded in liquid N₂, total RNA was extracted from 50 mg of grinded tissue using TRIzol according to the manufacturers protocol (Invitrogen). RNA (10 μg) was separated in 1.2% formaldehyde agarose gel electrophoresis according to the protocol adapted from Rneasy Mini Handbook (QIAGEN), transferred to Hybond-N nylon membrane (GE, Healthcare) and fixed in an UV crosslinker at 70,000 microjoules/cm². Probes were ³²P radiolabeled with α -³²P dCTP (Perkin Elmer Life Science Inc.) using Klenow DNA polymerase I according to the protocol of the manufacturer (New England Biolabs). Membranes containing RNA were hybridized for 4 h with the probes tested and washed with a sodium chloride solution (7.5 mM)/sodium citrate (8.75 mM). The probe was detected after 8 h of exposure in an X-Ray film (GE, Healthcare). The assayed probes were amplified by PCR reactions from DNA using the indicated oligonucleotides, YUC4 forward 5' GGAAATTCCGGTATGGAGGT 3' and reverse 5' GCTCAATTGGTCCGGTCTTA 3'.

Data materials availability

Plant lines reported are available for research purposes.

Results

35S::YUC4 Arabidopsis plants show phenotypes related to auxin overproduction

The cDNA of *YUC4* gene was cloned under control of the constitutive CaMV 35S promoter (Fig. 1A). Seventeen transformed plants from independent transformation events were selected from glufosinate ammonium (Fig. 1B) and five of them were molecularly characterized (Fig. 1C). To corroborate the *YUC4* overexpression in all five lines RNA

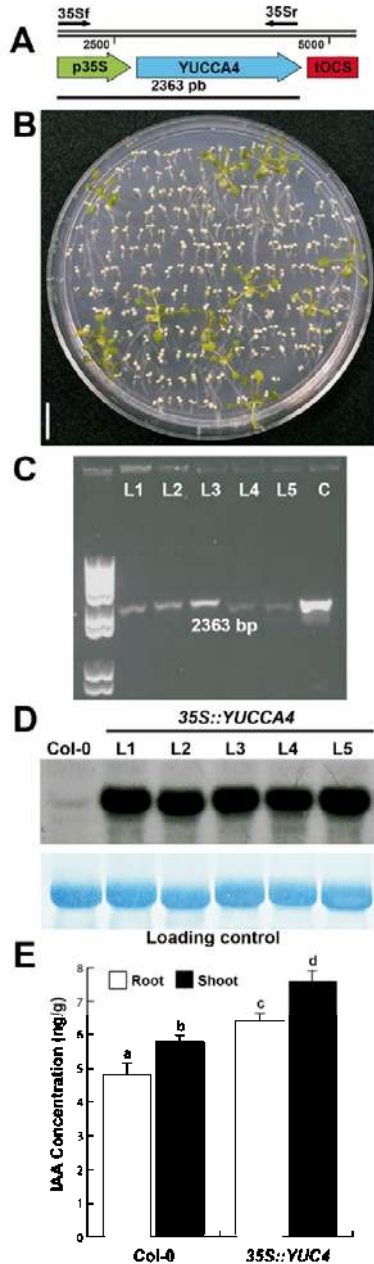


Figure 1 - Generation of *35S::YUCCA4* transgenic plants. (A) Fragment of plasmid map carrying *YUCCA4* sequence under CaMV35S promoter. Location of forward primer on 35S and reverse on *YUCCA4* are shown as well as length of flanking sequence. (B) Plants grown on MS media supplemented with glufosinate-ammonium and showing resistance. Bar = 1 cm. (C) PCR gel of five transformed plants (L1-5) showing bands of 2363 bp corresponding to *YUCCA4* gene and 35S promoter. Line C shows a band from a PCR using cloned plasmid as control. (D) Northern Blot indicating transcription levels of *YUCCA4* in Col-0 and five *35S::YUCCA4* (L1-5) lines. (E) IAA levels in roots and shoots of Col-0 and *35S::YUCCA4* 1.1 in 10 dag plants determined by GC-MS. Bars in (E) show standard errors and different letters indicate statistical differences at $P = 0.05$.

hybridization via Northern blotting was performed; all selected lines showed higher levels of *YUCCA4* expression than the WT (Fig. 1D). Quantification of free IAA content in seedlings of WT and the now denominated *35S::YUCCA4* line indicated a roughly 25% increase of IAA level in both roots and shoots (Fig. 1E). The determined IAA proportion was conserved in all the lines used in this work (Figure S1).

Noteworthy, the *35S::YUCCA4* transgenic plants exhibited auxin-related phenotypes including epinastic cotyledons and elongated hypocotyls. Adult plants showed characteristic twisted cauline leaves, narrow rosette leaves with long petioles and increased apical dominance and this phenotype was common to the initially identified seventeen lines (Data not shown). *35S::YUCCA4* seedlings also developed longer and narrower primary roots, and produced more lateral roots than the WT. Due to this combined situation, the lateral root density of the WT and *YUCCA4* overexpressing seedlings was comparable (Figure S2). Thus, overexpression of *YUCCA4* promotes hypocotyl and root elongation and lead plants to develop more exploratory root systems, all consistent with changes in auxin homeostasis.

Overexpression of *YUCCA4* enhances auxin responsiveness and modulates auxin transporters

To investigate if the observed changes in *35S::YUCCA4* seedlings could be related to an altered auxin response and/or transport, different genetic markers were mobilized into *35S::YUCCA4*, via outcrossing. The auxin reporter gene *DR5::GFP* showed a higher expression in primary root tips of *35S::YUCCA4* seedlings than in the WT (Fig. 2A, 2B). Next, we evaluated the effect of overexpression of *YUCCA4* on Aux/IAA degradation. WT and *35S::YUCCA4* seedlings expressing the *HS::AXR3NT-GUS* (Gray *et al.*, 2001) gene construct were heat shocked at 37 °C for 2 h. After heat shock, seedlings were incubated with and without IAA for a subsequent GUS histochemical detection. In WT seedlings, blue coloration was observed showing AXR3 localization in petioles, root vasculature and root meristem; such coloration was decreased in control treatment with IAA; a similar behavior was observed in the case of *HS::AXR3NT-GUS/35S::YUCCA4* and the expression was further decreased with IAA (Fig. 2C), those results suggest an increased degradation of AXR3 in *35S::YUCCA4*.

PIN auxin transporters mediate IAA distribution within root tissues (Adamowski and Friml, 2015). To evaluate whether PIN auxin transporters are influenced by auxin overproduction, we crossed *35S::YUCCA4* plants with pollen of plants carrying PIN-GFP protein fusions (Benková *et al.*, 2003; Vieten *et al.*, 2005), and the expression was analyzed in roots. *PIN1* is expressed at the basal side of stele and endodermis in the WT, and a reduction of its expression is observed in *35S::YUCCA4* seedlings (Fig. 3A). *PIN2* expression is localized in membranes of cortical and epidermal cells in WT plants and it was induced in *35S::YUCCA4* seedlings; similarly both *PIN3* and *PIN7* that

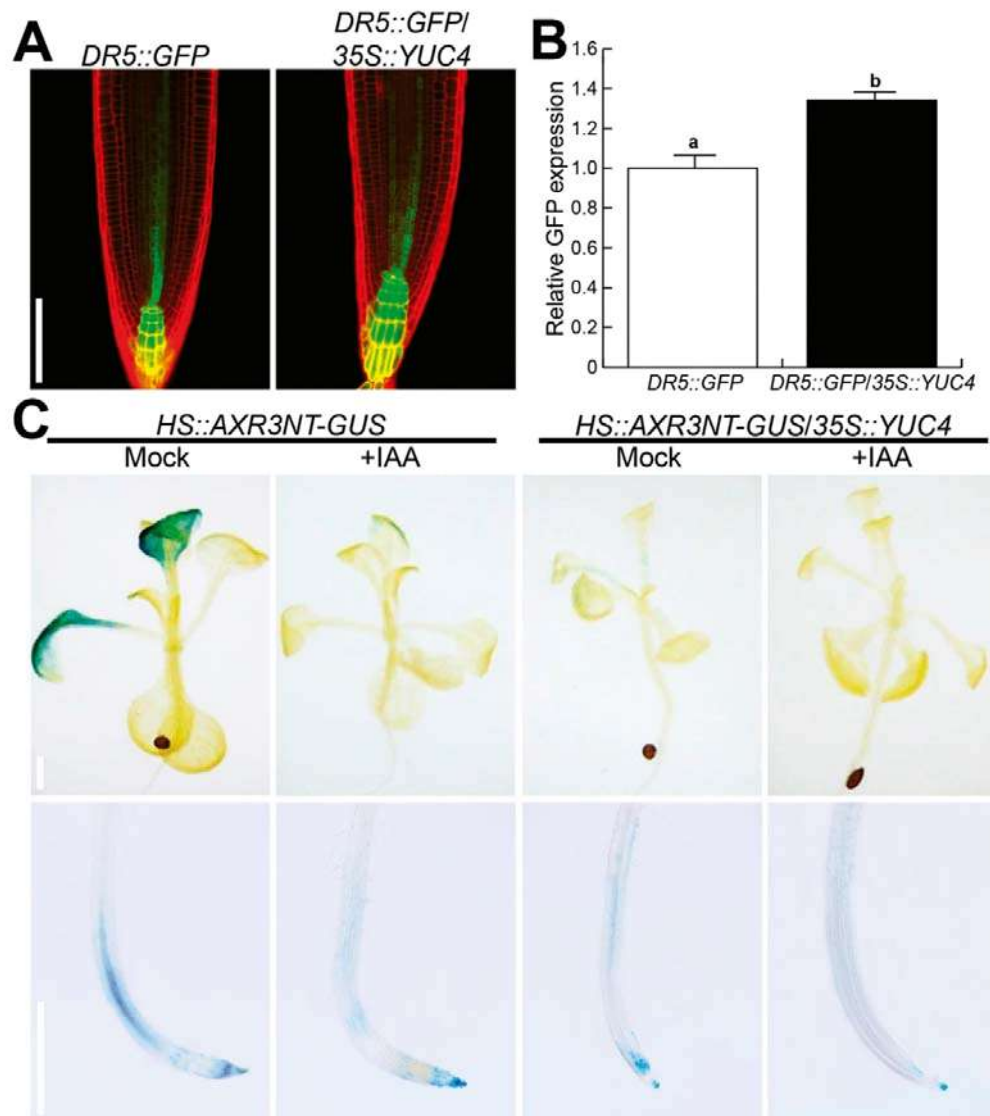


Figure 2 - The *Arabidopsis thaliana* *35S::YUC4* seedlings show increased auxin response. (A) *DR5::GFP* in root tips of WT and *DR5::GFP/35S::YUC4* seedlings, (B) Relative quantification of GFP fluorescence ($n = 10$ / standard error), different letters indicate statistical differences at $P = 0.05$. (C) *HS::AXR3NT-GUS* expression in shoots and roots of WT and *YUC4* overexpressing seedlings. Seedlings were germinated and grown 10d on 0.2X MS medium, transferred to 0.2X MS liquid medium and heat shocked for 2 h at 37 °C to induce expression of the transgene. Seedlings then were transferred to 20 °C medium containing mock and 2 μ M IAA and incubated for 1 hr before staining for β -glucuronidase activity. Photographs show representative individuals from at least 10 stained seedlings. Scale bar in A 100 μ m; scale bars in C 500 μ m. The experiment was repeated three times with similar results.

are expressed in columella and stele of the elongation zone of the primary root showed an enhanced expression in *35S::YUC4* transgenic line (Fig. 3A, 3B). From these results, we conclude that overexpression of *YUC4* and its consequent auxin overproduction differentially modulate expression of PIN proteins in the *Arabidopsis* primary root.

Inhibition of auxin transport normalizes hypocotyl elongation and auxin accumulation in *35S::YUC4* seedlings

To correlate auxin overproduction and hypocotyl elongation with auxin redistribution as a possible consequence of *YUC4* overexpression, a pharmacological strategy was employed. The response to the auxin transport inhibitor 1-naphthylphthalamic acid (NPA) was compared

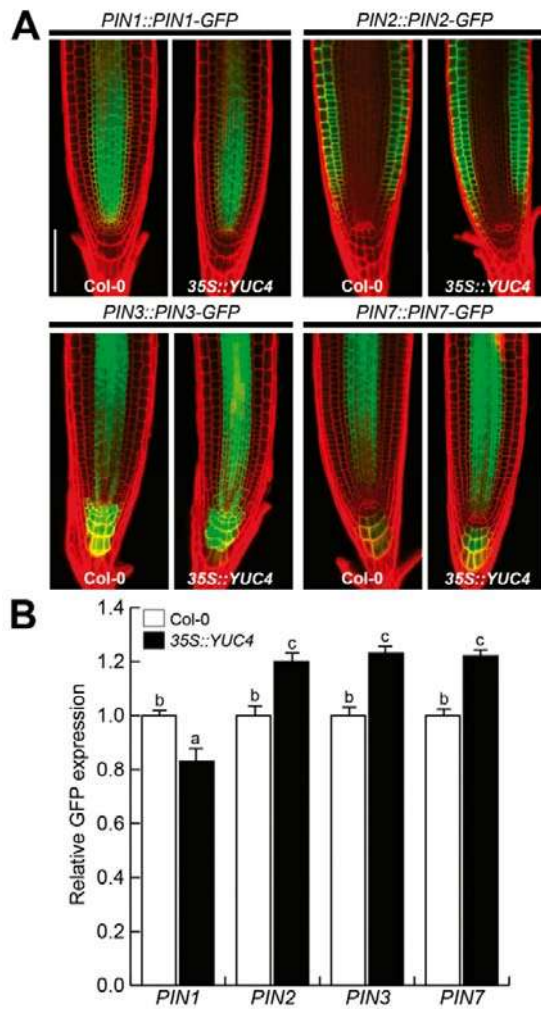


Figure 3 - Expression of PIN auxin transporters in WT and *35S::YUC4* seedlings. (A) Confocal microscopy images of WT and *35S::YUC4* seedlings showing *PIN1::PIN1-GFP*, *PIN2::PIN2-GFP*, *PIN3::PIN3-GFP* and *PIN7::PIN7-GFP* fluorescence. Bar = 100 μ M. (B) Quantification of relative GFP expression of PIN transporters in WT and *35S::YUC4* backgrounds. Plants were grown on MS 0.2X and analyzed at 10 d. Bars in graphics indicate standard error and different letters indicate statistical differences at $P = 0.05$. The analysis was repeated three times with similar results.

between WT (Col-0) and *35S::YUC4* seedlings grown side by side in Petri plates containing agar solidified MS 0.2x medium supplemented with DMSO (solvent control) or 1, 2, 4 and 8 μ M NPA. After 10 d, the hypocotyl length in WT seedlings remained practically equal in control and NPA treatments. However, in *35S::YUC4* seedlings a dose-dependent shortening of hypocotyls occurred, and at 8 μ M NPA *35S::YUC4* hypocotyls were similar to the WT (Fig. 4A, 4B). These results suggest that the higher hypocotyl elongation observed in *35S::YUC4* correlates with more auxin being transported to growth zones.

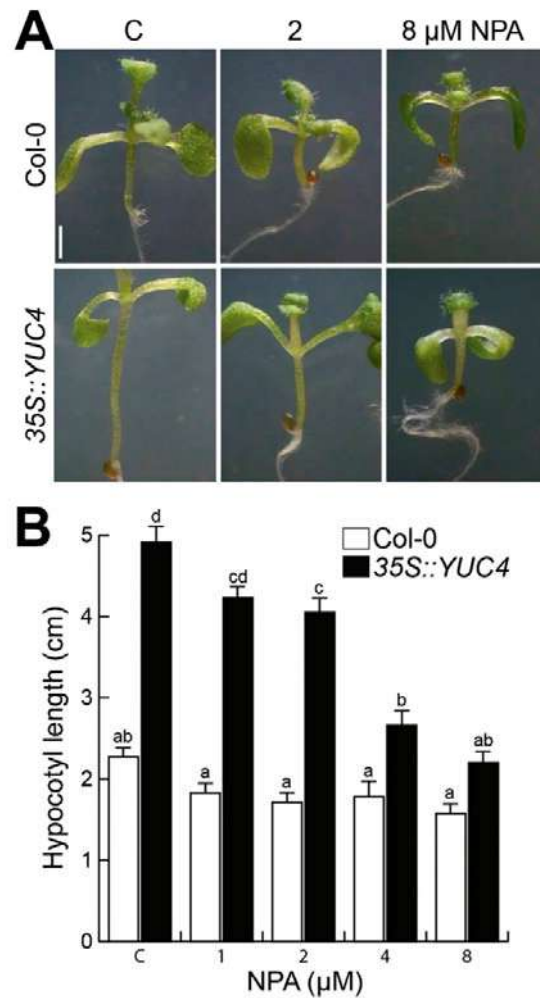


Figure 4 - NPA decreases hypocotyl length in *35S::YUC4* seedlings. A) WT (Col-0) and *35S::YUC4* seedlings were germinated and grown in MS 0.2X media supplemented with different NPA concentrations, representative images of control, 2 and 8 μ M of NPA are shown. Bar = 1 mm. (B) Mean hypocotyl length. Error bars represent standard error from 30 seedlings analyzed. Different letters indicate means that are statistically different ($P = 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results.

To understand how NPA could be affecting overall auxin response and/or distribution, we next compared the expression of *DR5::GUS* reporter construct in leaves and in root tips of WT and *35S::YUC4* seedlings. NPA led to an increased auxin-responsiveness in leaves and root tip of WT seedlings, which was exacerbated in *35S::YUC4* (Fig. 5, Figure S3, Figure S4). Another auxin responsive promoter construct, *BA3::GUS* normally expressed in petioles, hypocotyl and slightly in vascular tissues of WT seedlings was also up-regulated in *35S::YUC4* background in a dose-dependent manner (Figure S5). Taken together, these

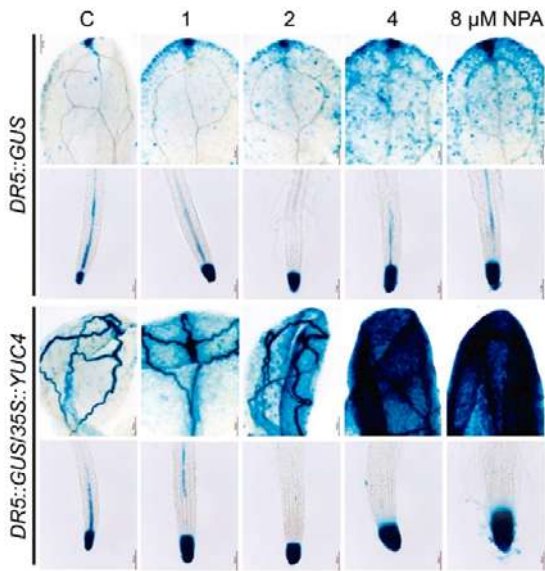


Figure 5 - Auxin responsive gene expression is exacerbated in shoots and roots of *35S::YUC4* seedlings upon NPA treatment. *DR5::GUS* expression in WT and *DR5::GUS/35S::YUC4* seedlings germinated and grown for 10 d on MS 0.2x medium supplemented with indicated NPA concentrations. Images show representative seedlings for each treatment (n = 15). The seedlings were processed for histochemical detection of GUS expression, cleared, and photographed. Note the dose-dependent exacerbated expression of the marker in *35S::YUC4* seedlings treated with NPA. The experiment was repeated three times with similar results.

data reinforce the idea that overall auxin accumulation increases as a consequence of *YUC4* overexpression.

35S::YUC4 expression up-regulates the *ABI4* transcription factor

ABA signaling mediates adaptation to several stressing conditions and also accounts for growth and root architecture modulation (Tiwari *et al.*, 2017). To assess the possible interaction of auxin overproduction in *35S::YUC4* seedlings and ABA signaling, the expression of *ABI4::GUS*, an ABA-related reporter gene that reflects the endogenous *ABI4* transcript level (Bossi *et al.*, 2009; Soderman *et al.*, 2000) was evaluated. GUS expression was monitored 1 to 7 d after germination on *ABI4::GUS* and *35S::YUC4/ABI4::GUS* seedlings grown under standard conditions. GUS expression was evident in WT seedlings since the first day, reaching a maximum by day 2, then gradually decreasing in the subsequent days until practically disappearing on day 7. Interestingly, in *35S::YUC4* seedlings GUS expression was increased during the kinetic experiment and remained detectable even at day 7 on cotyledons and hypocotyl. In root tips, *ABI4::GUS* expression was also stronger in *35S::YUC4* seedlings than in the WT. However, in both cases it decreased and even disappeared at comparable times (4 and 7 days, respectively; Fig. 6). These observations suggest that overexpression of *YUC4* affect ABA signaling through *ABI4* at early stages of plant development.

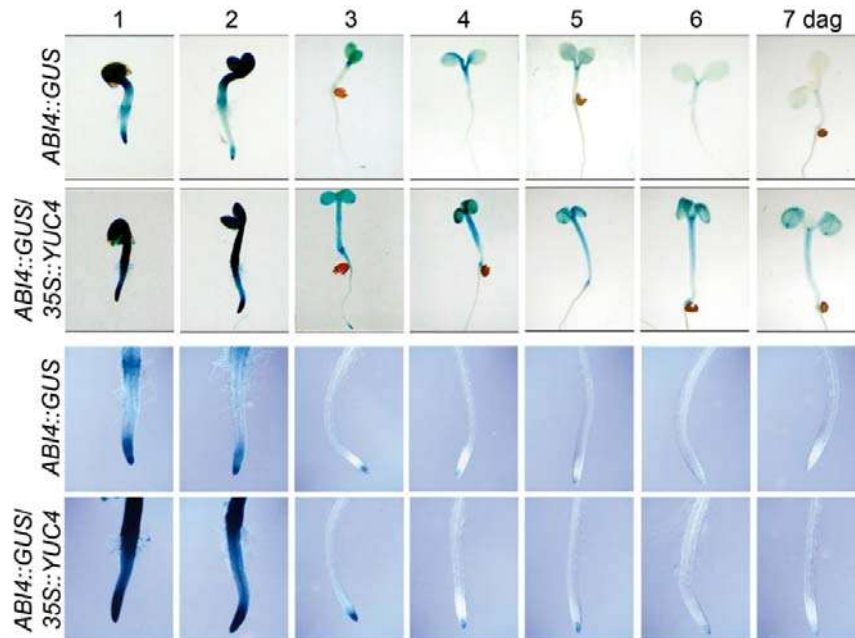


Figure 6 - *ABI4::GUS* expression in WT and *35S::YUC4* seedlings. *ABI4::GUS* and *ABI4::GUS/35S::YUC4* seedlings were grown for 7 days and histochemical detection of GUS activity performed daily. Photographs show representative hypocotyls and roots of at least 15 stained seedlings. The experiment was repeated three times with similar results.

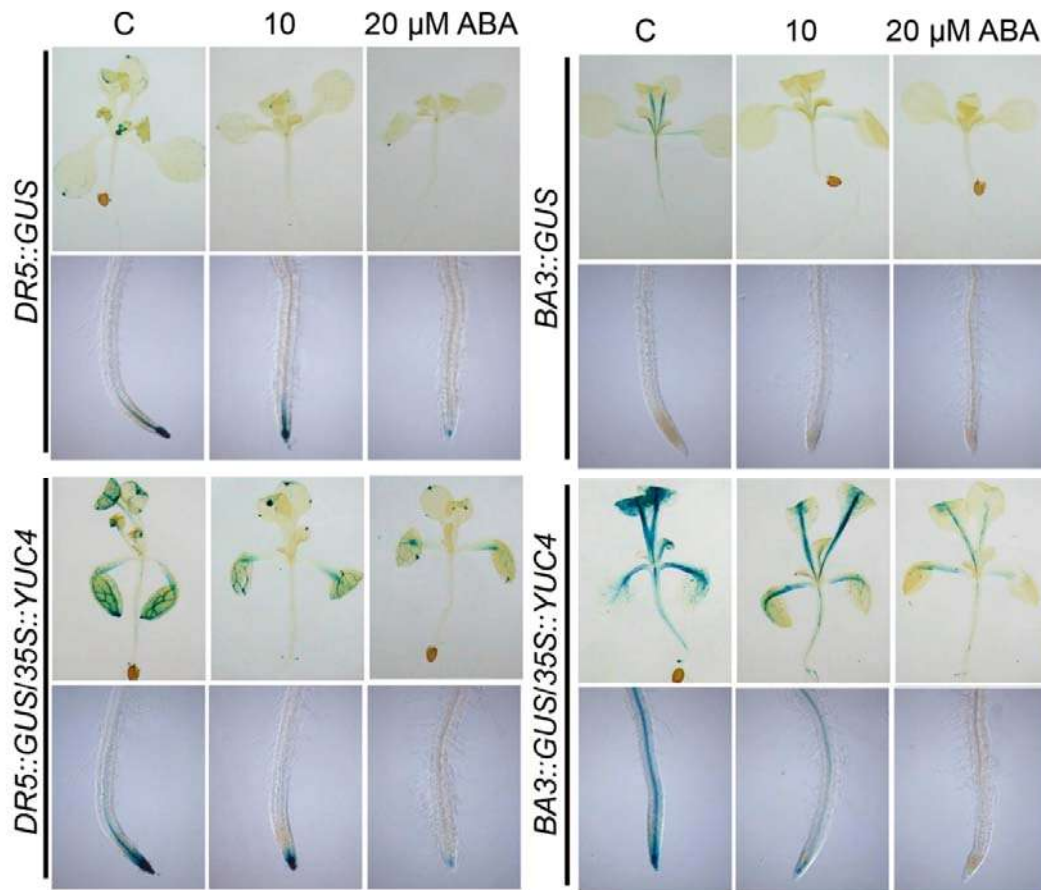


Figure 7 - ABA impairs auxin-inducible gene expression in shoots and roots. *DR5::GUS* and *BA3::GUS* gene expression in WT and *35S::YUC4* seedlings germinated and grown for 5 d in agar solidified 0.2x MS medium, then transferred for 5 additional days to fresh medium supplemented with the solvent, 10 or 20 μ M ABA. Seedlings were stained for GUS activity and cleared for microscopical analysis. Photographs show representative shoots and roots from at least 15 stained plants. The experiment was repeated three times with similar results.

ABA antagonizes auxin response in WT and *35S::YUC4* seedlings

ABA antagonizes auxin signaling during the formation of lateral roots (De Smet *et al.*, 2003). To test if ABA could affect auxin-inducible gene expression in the shoot and roots systems, the expression of *DR5::GUS* and *BA3::GUS* was assessed in transfer experiments of WT and *35S::YUC4* seedlings grown in medium supplemented with DMSO (control), 10 or 20 μ M ABA. An ABA-dependent inhibition of *DR5::GUS* and *BA3::GUS* was clearly observed in the WT and *35S::YUC4* (Fig. 7), suggesting that ABA antagonizes auxin responsive gene expression in shoots and in roots.

35S::YUC4 seedlings are hypersensitive to ABA

ABA inhibits both germination and primary root growth (Gimeno-Giles *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2014), mak-

ing these responses useful to characterize its potential interaction with auxin via *YUC4*. So, we outcrossed *35S::YUC4* with the *abi4* mutant to further analyze a possible genetic relationship between auxin and ABA signaling mediated by *YUC4*. WT, *35S::YUC4*, *abi4* and *abi4/35S::YUC4* seedlings were grown side by side over agar-solidified 0.2x MS medium, supplemented with DMSO or increasing ABA concentrations. Six days after germination plants were analyzed and found that when germinated and grown on control medium, all genotypes behaved similarly (Fig. 8A). However, *35S::YUC4* seedlings are hypersensitive to 1 and 2 μ M ABA that inhibited primary root growth in the WT, (Fig. 8A). As expected, *abi4* mutants were less sensitive to ABA and developed longer primary roots than the WT, whereas *abi4/35S::YUC4* displayed a root length comparable to the WT at higher ABA concentrations.

To examine the impact that ABA could have on the WT and *35S::YUC4* seedlings on germination, one hundred

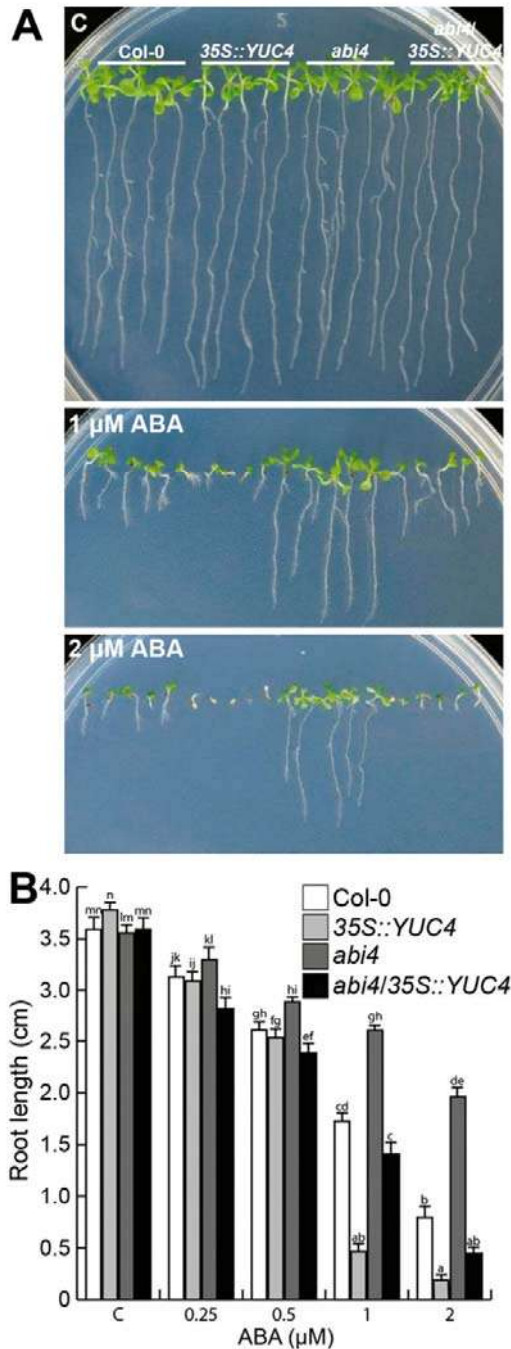


Figure 8 - *ABI4* loss of function reduces *35S::YUC4* root hypersensitivity to ABA. (A) Representative images of plates with *Arabidopsis* lines Col-0, *35S::YUC4*, *abi4* and *abi4/35S::YUC4* sown on MS media supplemented with the solvent or indicated ABA concentrations. (B) Root length of 6 dag WT, *35S::YUC4*, *abi4* and *abi4/35S::YUC4* at 0, 0.25, 0.5, 1 and 2 μM ABA. Error bars represent standard errors from 15 seedlings analyzed and letters indicate means that are statistically different ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results.

seeds of WT, *35S::YUC4*, *abi4* and *abi4/35S::YUC4* were sown on MS plates containing DMSO, or 0.5, 1 and 2 μM of ABA. Plates were placed in darkness and radicle protrusion was evaluated every eight hours until all seeds germinated. In control medium, WT, *abi4* and *abi4/35S::YUC4* germinated in around 56 h meanwhile *35S::YUC4* showed a slight delay in germination (Fig. 9A). When seeds were sown in medium supplemented with 0.5, 1 and 2 μM ABA, a delayed germination in all four lines already occurred, but interestingly *abi4* and *35S::YUC4* had the opposite performance, germinating earlier or later, respectively, when compared to the WT and *abi4/35S::YUC4* (Fig. 9B-D). These results demonstrate the critical role of *ABI4* in mediating an auxin-ABA crosstalk for primary root growth and germination.

Discussion

In this work, five *35S::YUC4 Arabidopsis* lines were characterized, which showed elevated transcript of *YUC4* and up to 25% greater IAA levels than the WT, similar to previous reports in which other members of the *YUC* family were overexpressed (Hentrich *et al.*, 2013a; Zhao *et al.*, 2001). The phenotype observed in *35S::YUC4* included changes in shoots and roots, and were typified by an enhancement of growth. The alterations in root architecture included the formation of longer primary roots with more lateral roots, and to the best of our knowledge, have been not previously reported. Thus, via increasing the endogenous auxin pool more exploratory root systems can be developed.

The auxin-inducible *DR5::GUS* gene construct is expressed in the quiescent center, the adjacent columella cells and root cap (Sabatini *et al.*, 1999). Such expression pattern was found in WT, but in *35S::YUC4* seedlings there was an increased *DR5* induction. In addition, the *HS::AXR3NT-GUS* construct was more rapidly degraded in *35S::YUC4* seedlings. Altogether, these results demonstrate the relationship of the *35S::YUC4* phenotype, degradation of the *AUX/IAA AXR3* repressor and the underlying auxin-response in roots and in shoots.

Auxin regulates PIN levels and re-localization (Omyanchuk *et al.*, 2016; Vieten *et al.*, 2005). In our research, a decreased *PIN1::PIN1-GFP* expression in *35S::YUC4* lines, indicates that auxin overproduction down-regulates *PIN1*; in contrast, *PIN2*, *PIN3* and *PIN7* were up-regulated in *35S::YUC4* seedlings in a tissue-specific context, in concordance with the induction already reported for these transporters by auxin treatment (Lewis *et al.*, 2011; Vieten *et al.*, 2005). A dual role for auxin in the regulation of both *PIN* transcription and degradation has been proposed, since application of high auxin concentrations decreases *PIN7::GFP* and *PIN2::GFP* signal intensity, whereas at low concentrations, the *PIN2* and *PIN7* protein amounts are increased (Vieten *et al.*, 2005). Our results show that the

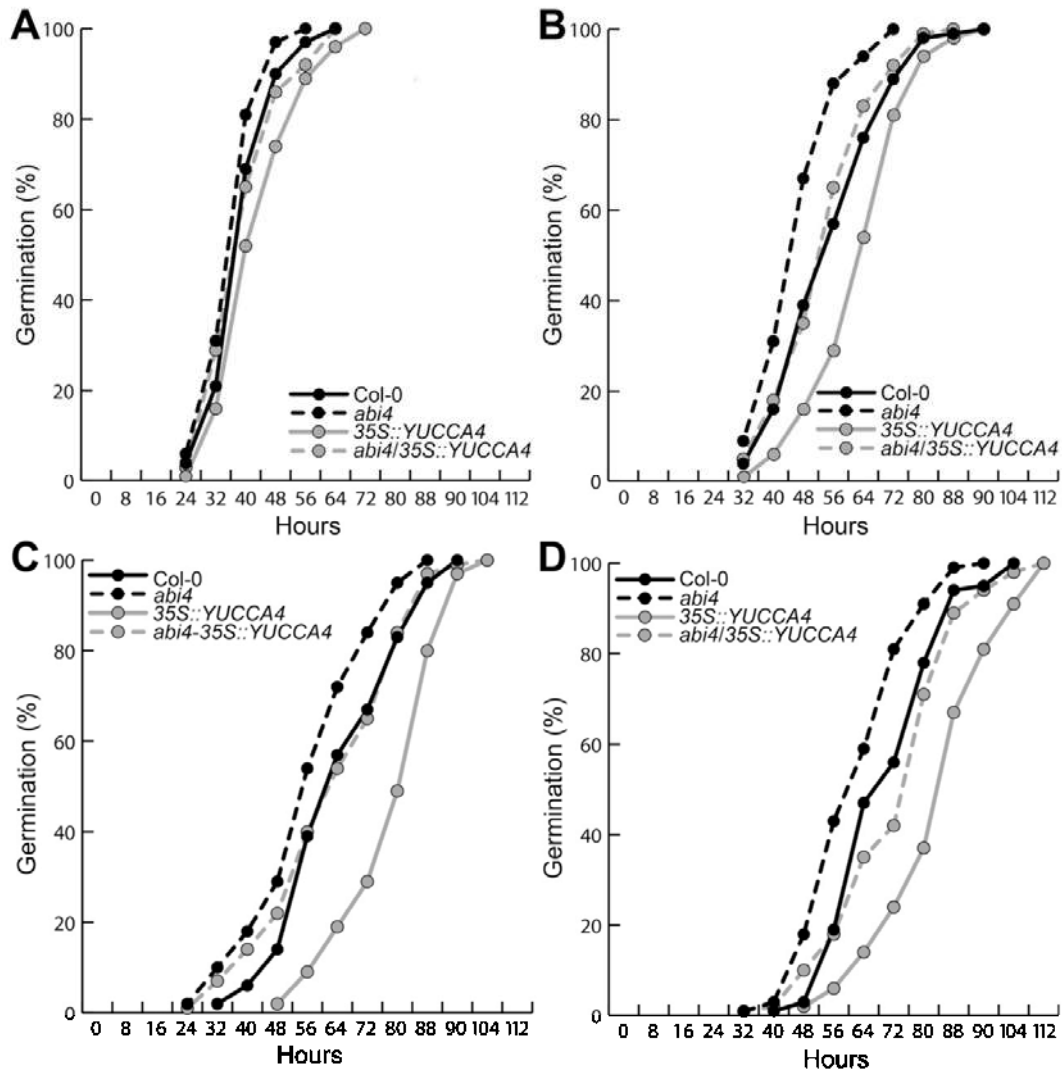


Figure 9 - Effects of ABA on germination. *Arabidopsis* seeds of Col-0, *abi4*, 35S::YUCCA4 and *abi4/35S::YUCCA4* were sown on MS plates containing different ABA concentrations: (A) Mock, (B) 0.5 μ M, (C) 1 μ M and (D) 2 μ M ABA. Radicle protrusion of 100 seedlings of each line was registered every 8 hours. Note the contrasting effects of the ABA over 35S::YUCCA4 and *abi4* seedlings. The experiment was repeated three times with similar results.

35S::YUCCA4 significantly increases the endogenous auxin pool, which in roots is high enough to differentially regulate PIN proteins.

Auxin is mainly synthesized in the shoot apex and then transported to the stem and root systems where it regulates growth and tropisms (Spalding, 2013). Although plants that overproduce auxin have long hypocotyls, this effect cannot be mimicked by exogenous application of IAA or synthetic analogs to WT plants. The possibility that an increased auxin transport could be responsible for greater hypocotyl elongation in 35S::YUCCA4 seedlings is supported from data obtained from the use of NPA, an auxin transport

inhibitor, which diminished hypocotyl length in the YUCCA overexpressors in a dose-dependent manner until the plants attained similar hypocotyl lengths to the untreated WT seedlings. These data suggests that the increased auxin production in the 35S::YUCCA4 lines inherently changes auxin redistribution, causing elongation of hypocotyls. Consistently, in a recent report NPA antagonized the shade-induced hypocotyl elongation in *Arabidopsis*, presumably because free IAA is prevented from being transported to the growth zones (Zhao, 2018), but also causes IAA accumulation in shoot and root apical meristems (Casimiro *et al.*, 2001; Himanen *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2012).

To clarify how auxins are distributed before and after the application of NPA in WT and *35S::YUC4* seedlings, the *DR5::GUS*, *DR5::GFP* and *BA3::GUS* construct were used. Auxin-driven expression of these constructs was more evident in leaf margins as well as root meristems as a response to NPA treatments, as such *DR5::GUS* histochemical detection was most remarkable in the *35S::YUC4* seedlings, suggesting that auxin accumulates in vascular bundles until filling the whole leaf at high NPA concentrations. Moreover, in the root meristem a characteristic widening of the root was caused by NPA consistent with previous reports (Casimiro *et al.*, 2001; Sabatini *et al.*, 1999), being this more noticeable for *35S::YUC4* seedlings. *BA3::GUS* expression also increased in the *35S::YUC4* lines principally in vascular tissues, and under NPA treatment auxin response exacerbated in leaf veins and root meristem.

The *ABI4* gene encodes an AP2/ERF transcription factor that is expressed in discrete developmental windows, mainly during seed maturation and in young seedlings after germination, during the establishment of autotrophic growth (Arroyo *et al.*, 2003; Finkelstein *et al.*, 1998; Shkolnik-Inbar and Bar-Zvi, 2011; Soderman *et al.*, 2000). Noteworthy, we found an increased expression of *ABI4::GUS* in *35S::YUC4* seedlings. Although it was described that *ABI4* expression is repressed by auxin in roots (Bossi *et al.*, 2009; Shkolnik-Inbar and Bar-Zvi, 2010), the difference with our work is probably due to the different experimental conditions employed; while others exposed plants to high exogenous auxin concentrations during few hours, we tested *ABI4* expression in *35S::YUC4* lines, with moderate and sustained increase in endogenous concentrations of auxin.

Increasing evidence shows that ABA possesses dual functions acting as a growth inhibitor at high concentrations and as a growth promoter at low concentrations. ABA treatment appears to reduce auxin biosynthesis or reduce auxin signaling via decreasing *IAA2*, and concomitantly, *DR5* expression is reduced (He *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011). We observed that ABA dramatically decreases *DR5::GUS* and *BA3::GUS* expression in shoots and roots of *35S::YUC4* seedlings. This result reinforces the notion of an antagonist role of ABA decreasing auxin biosynthesis, signaling or both these processes.

ABA regulates root elongation through the activities of auxin and ethylene in *Arabidopsis* (Rowe *et al.*, 2016; Thole *et al.*, 2014). An ABA element involved in root architecture regulation is *ABI4*; *abi4* mutants develop increased numbers of lateral roots, and *ABI4*-overexpressing plants have a reduced number of lateral roots (Shkolnik-Inbar and Bar-Zvi, 2010). In our experiments, increasing ABA concentrations, delay primary root growth in a dose-dependent manner in WT plants. Moreover a strong hypersensitivity to ABA on seedling growth was observed in *35S::YUC4*, indicating that increased content of endogenous auxin acts

in a synergic manner with ABA to repress root growth. On the other hand, *abi4* mutants showed resistance to ABA inhibitory effect, while *abi4/35S::YUC4* showed similar root elongation to the WT, demonstrating that *35S::YUC4* hypersensitivity to ABA during early root growth involves the *ABI4* transcription factor.

The increased expression of *ABI4::GUS* in *35S::YUC4* seedlings could be an important factor for delayed germination in the auxin overproducing line; to test this, we performed germination assays under increasing ABA concentrations, observing that *35S::YUC4* germinated at a later time in agreement with a previous report, where *Arabidopsis* plants overexpressing *YUC* genes from wheat also underwent delayed germination (Li *et al.*, 2014). Besides, when ABA concentrations increased, delayed germination was more noticeable in *35S::YUC4*; in contrast *abi4* showed resistance to ABA on germination. Previously, *abi4* was shown to be insensitive to auxin and resistant to its combination with ABA during germination (Chen *et al.*, 2014b). Accordingly, in our work, *abi4/35S::YUC4* showed similar germination times to the WT, indicating that *ABI4* is a required factor for ABA hypersensitivity of *35S::YUC4* during germination, being a convergence element in ABA and auxin mediated control of germination.

The mechanism of interaction between auxins and the ABA is still not fully understood. Previous studies indicate that ABA inhibits seedling growth through enhancing auxin signaling, and the role of auxin signaling elements in ABA responses had been described (Wilson *et al.*, 1990; Fukaki *et al.*, 2002; Tiryaki and Staswick, 2002; Belin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Rinaldi *et al.*, 2012; Thole *et al.*, 2014). On the other hand, high levels of auxinic compounds enhance the ABA inhibition of germination; besides, ABA elements including *ABI3*, *ABI4* and *ABI5* are important regulators of auxin-mediated inhibition of seed germination (Tognetti *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014b; Chen *et al.*, 2014c).

Here, we generated a new *35::YUCCA* line to provide more information about physiology of auxin producer plants and we use it as a tool to address the auxin-ABA interaction. Our data strengthen the notion that elevated endogenous auxin levels influence the regulation of seed dormancy, germination and post-embryonic growth in *Arabidopsis*, and functional evidence is provided that *ABI4* is involved in an ABA-auxin interaction important for germination and root growth. The generation and management of knowledge about phytohormone biosynthesis, homeostasis and interactions should assist in developing new tools towards a much needed improvement of certain agronomic traits.

Acknowledgments

This work was financially supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT,

México, Grant No. 177775) and the Consejo de la Investigación Científica UMSNH (CIC 2.26) to J.L.B. A-G.M.R. is indebted to CONACYT for a Ph. D. fellowship.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

Authors Contributions

AGMR, JLB, NMM, JSLB, AAGG and MMT designed experiments; AGMR, JSLB, ROC and LFRH performed experiments; MMT, NMM, and JLB analyzed data; AGMR, JLB and MMT wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

References

- Adamowski M and Friml J (2015) PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *Plant Cell* 27:20-32.
- Arroyo A, Bossi F, Finkelstein RR and Leon P (2003) Three genes that affect sugar sensing (*abscisic acid insensitive 4*, *abscisic acid insensitive 5*, and *constitutive triple response 1*) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133:231-242.
- Belin C, Megies C, Hauserova E and Lopez-Molina L (2009) Abscisic acid represses growth of the Arabidopsis embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell* 21:2253-2268.
- Benjamins R and Scheres B (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 59:443-465.
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G and Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591-602.
- Bilhou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K and Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433:39-44.
- Bossi F, Cordoba E, Dupre P, Mendoza MS, Roman CS and Leon P (2009) The Arabidopsis ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of ABI5 and SBE2.2 genes during sugar signaling. *Plant J* 59:359-374.
- Boursiac Y, Leran S, Corratge-Faillie C, Gojon A, Krouk G and Lacombe B (2013) ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci* 18:325-333.
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ *et al.* (2001) Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell* 13:843-852.
- Cha JY, Kim WY, Kang SB, Kim JI, Baek D, Jung II, Kim MR, Li N, Kim HJ, Nakajima M *et al.* (2015) A novel thiol-reductase activity of Arabidopsis YUC6 confers drought tolerance independently of auxin biosynthesis. *Nat Commun* 6:8041.
- Chandler JW (2016) Auxin response factors. *Plant Cell Environ* 39:1014-1028.
- Chen Q, Dai X, De-Paoli H, Cheng Y, Takebayashi Y, Kasahara H, Kamiya Y and Zhao Y (2014a) Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in Arabidopsis roots. *Plant Cell Physiol* 55:1072-1079.
- Chen C, Twito S and Miller G (2014b) New cross talk between ROS, ABA and auxin controlling seed maturation and germination unraveled in APX6 deficient Arabidopsis seeds. *Plant Signal Behav* 9:e976489.
- Chen C, Letnik I, Hacham Y, Dobrev P, Ben-Daniel BH, Vanková R, Amir R and Miller G (2014c) ASCORBATE PEROXIDASE6 protects Arabidopsis desiccating and germinating seeds from stress and mediates cross talk between reactive oxygen species, abscisic acid, and auxin. *Plant Physiol* 166:370-383.
- Cheng Y, Dai X and Zhao Y (2006) Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in Arabidopsis. *Genes Dev* 20:1790-1799.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR and Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu Review Plant Biol* 61:651-679.
- De Smet L, Signora L, Beeckman T, Inze D, Foyer CH and Zhang H (2003) An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis. *Plant J* 33:543-555.
- Exposito-Rodriguez M, Borges AA, Borges-Perez A and Perez JA (2011) Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding YUCCA-like flavin monooxygenases: the ToFZY gene family. *Plant Physiol Biochem* 49:782-791.
- Finkelstein RR (1994) Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J* 5:765-771.
- Finkelstein RR, Gampala SS and Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14:S15-S45.
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S and Goodman HM (1998) The Arabidopsis abscisic acid response locus AB14 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* 10:1043-1054.
- Fukaki H, Tameda S, Masuda H and Tasaka M (2002) Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/JAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J* 29:153-168.
- Galweiler L, Guan C, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A and Palme K (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* 282:2226-2230.
- Ghanashyam C and Jain M (2009) Role of auxin-responsive genes in biotic stress responses. *Plant Signal Behav* 4:846-848.
- Gimeno-Gilles C, Lelièvre E, Viau L, Malik-Ghulam M, Ricoult C, Niebel A, Leduc N and Limami AM (2009) ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture-modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Mol Plant* 2:108-119.
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O and Estelle M (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414:271-276.
- Hagen G and Guilfoyle T (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* 49:373-385.

- He J, Duan Y, Hua D, Fan G, Wang L, Liu Y, Chen Z, Han L, Qu LJ and Gong Z (2012) DEXH box RNA helicase-mediated mitochondrial reactive oxygen species production in Arabidopsis mediates crosstalk between abscisic acid and auxin signaling. *Plant Cell* 24:1815-1833.
- Hentrich M, Böttcher C, Düchting P, Cheng Y, Zhao Y, Berkowitz O, Masle J, Medina J and Pollmann S (2013a) The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression. *Plant J* 74:626-637.
- Hentrich M, Sánchez-Parra B, Pérez Alonso MM, Carrasco Loba V, Carrillo L, Vicente-Carbajosa J, Medina J and Pollmann S (2013b) YUCCA8 and YUCCA9 overexpression reveals a link between auxin signaling and lignification through the induction of ethylene biosynthesis. *Plant Signal Behav* 8:e26363.
- Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D and Beeckman T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14:2339-2351.
- Kasahara H (2015) Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Biosci Biotechnol Biochem* 80:34-42.
- Kim JJ, Sharkhuu A, Jin JB, Li P, Jeong JC, Baek D, Lee SY, Blakeslee JJ, Murphy AS, Bohnert HJ *et al.* (2007) *yucca6*, a dominant mutation in Arabidopsis, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiol* 145:722-735.
- Kim JJ, Murphy AS, Baek D, Lee SW, Yun DJ, Bressan RA and Narasimhan ML (2011) YUCCA6 over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* 62:3981-3992.
- Kim JJ, Baek D, Park HC, Chun HJ, Oh DH, Lee MK, Cha JY, Kim WY, Kim M and Chung WS (2013) Overexpression of Arabidopsis YUCCA6 in potato results in high auxin developmental phenotypes and enhanced resistance to water deficit. *Mol Plant* 6:337-349.
- Kc Q, Wang Z, Ji CY, Jeong JC, Lee HS, Li H, Xu B, Deng X and Kwak SS (2015) Transgenic poplar expressing Arabidopsis YUCCA6 exhibits auxin-overproduction phenotypes and increased tolerance to abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 94:19-27.
- Krecek P, Skupa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J and Zazimalova E (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* 10:249.
- Lee M, Jung JH, Han DY, Seo PJ, Park WJ and Park CM (2012) Activation of a flavin monooxygenase gene YUCCA7 enhances drought resistance in Arabidopsis. *Planta* 235:923-938.
- Lewis DR, Negi S, Sukumar P and Muday GK (2011) Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development* 138:3485-3495.
- Li N, Yin N, Niu Z, Hui W, Song J, Huang C, Wang H, Kong L and Feng D (2014) Isolation and characterization of three TaYUC10 genes from wheat. *Gene* 546:187-194.
- Liu H, Xie WF, Zhang L, Valpuesta V, Ye ZW, Gao QH and Duan K (2014) Auxin biosynthesis by the YUCCA6 flavin monooxygenase gene in woodland strawberry. *J Int Plant Biol* 56:350-363.
- Liu X, Zhang H, Zhao Y, Feng Z, Li Q, Yang HQ, Luan S, Li J and He ZH (2013) Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:15485-15490.
- Ljung K, Bhalerao RP and Sandberg G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant J* 28:465-474.
- Luo X, Chen Z, Gao J and Gong Z (2014) Abscisic acid inhibits root growth in Arabidopsis through ethylene biosynthesis. *Plant J* 79:44-55.
- Marsch-Martinez N, Greco R, Van Arkel G, Herrera-Estrella L and Pereira A (2002) Activation tagging using the En-1 maize transposon system in Arabidopsis. *Plant Physiol* 129:1544-1556.
- Martinez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL and Herrera-Estrella L (2004) Improving transformation efficiency of Arabidopsis thaliana by modifying the floral dip method. *Plant Mol Biol Rep* 22:63-70.
- Michniewicz M, Brewer PB and Friml J (2007) Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *Arabidopsis Book* 5:e0108.
- Muday GK and DeLong A (2001) Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends Plant Sci* 6:535-542.
- Müller A, Guan C, Gälweiler L, Tänzler P, Huijser P, Marchant A, Parry G, Bennett M, Wisman E and Palme K (1998) AtPIN2 defines a locus of Arabidopsis for root gravitropism control. *EMBO J* 17:6903-6911.
- Nishimura T, Matano N, Morishima T, Kakinuma C, Hayashi K, Komano T, Kubo M, Hasebe M, Kasahara H, Kamiya Y *et al.* (2012) Identification of IAA transport inhibitors including compounds affecting cellular PIN trafficking by two chemical screening approaches using maize coleoptile systems. *Plant Cell Physiol* 53:1671-1682.
- Omelyanchuk NA, Kovrizhnykh VV, Oshchepkova EA, Pasternak T, Palme K and Mironova VV (2016) A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in Arabidopsis thaliana root. *BMC Plant Biol* 16 Suppl 1:5.
- Oono Y, Chen QG, Overvoorde PJ, Kohler C and Theologis A (1998) *age* Mutants of Arabidopsis exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 10:1649-1662.
- Pollmann S, DUCHTING P and Weiler EW (2009) Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry* 70:523-531.
- Quint M and Gray WM (2006) Auxin signaling. *Curr Opin Plant Biol* 9:448-453.
- Rahman A (2013) Auxin: a regulator of cold stress response. *Physiol Plant* 147:28-35.
- Rinaldi MA, Liu J, Enders TA, Bartel B and Strader LC (2012) A gain-of-function mutation in IAA16 confers reduced responses to auxin and abscisic acid and impedes plant growth and fertility. *Plant Mol Biol* 79:359-373.
- Rowe JH, Topping JF, Liu J and Lindsey K (2016) Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytol* 211:225-239.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Benfey P, Leyser O, Bechtold N, Weisbeek P *et al.* (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99:463-472.

- Schneider CA, Rasband WS and Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671-675.
- Shkolnik-Inbar D and Bar-Zvi D (2010) ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22:3560-3573.
- Shkolnik-Inbar D and Bar-Zvi D (2011) Expression of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4 (ABI4) in developing *Arabidopsis* seedlings. *Plant Signal Behav* 6:694-696.
- Soderman EM, Brocard IM, Lynch TJ and Finkelstein RR (2000) Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol* 124:1752-1765.
- Spalding EP (2013) Diverting the downhill flow of auxin to steer growth during tropisms. *Amer J Bot* 100:203-214.
- Thole JM, Beisner ER, Liu J, Venkova SV and Strader LC (2014) Abscisic acid regulates root elongation through the activities of auxin and ethylene in *Arabidopsis thaliana*. *G3 (Bethesda)* 4:1259-1274.
- Tiryaki I and Staswick PE (2002) An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiol* 130:887-894.
- Tiwari S, Lata C, Chauhan PS, Prasad V and Prasad M (2017) A functional genomic perspective on drought signalling and its crosstalk with phytohormone-mediated signalling pathways in plants. *Curr Genomics* 18:469-482.
- Tognetti VB, Van Aken O, Morreel K, Vandenbroucke K, van de Cotte B, De Clercq J, Chiwocha S, Fenske R, Prinsen E, Boerjan W *et al.* (2010) Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *Plant Cell* 22:2660-2679.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G and Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9:1963-1971.
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C and Friml J (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132:4521-4531.
- Wang L, Hua D, He J, Duan Y, Chen Z, Hong X and Gong Z (2011) Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene HB33 mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *PLoS Genet* 7:e1002172.
- Wilson AK, Pickett FB, Turner JC and Estelle M (1990) A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol Gen Genet* 222:377-383.
- Woodward C, Bemis SM, Hill EJ, Sawa S, Koshiba T and Torii KU (2005) Interaction of auxin and ERECTA in elaborating *Arabidopsis* inflorescence architecture revealed by the activation tagging of a new member of the YUCCA Family putative flavin monooxygenases. *Plant Physiol* 139:192-203.
- Yamamoto Y, Kamiya N, Morinaka Y, Matsuoka M and Sazuka T (2007) Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. *Plant Physiol* 143:1362-1371.
- Yan S, Che G, Ding L, Chen Z, Liu X, Wang H, Zhao W, Ning K, Zhao J, Tesfamichael K *et al.* (2016) Different cucumber CsYUC genes regulate response to abiotic stresses and flower development. *Sci Rep* 6:20760.
- Ye X, Kang BG, Osburn LD, Li Y and Zong-Ming C (2009) Identification of the flavin-dependent monooxygenase-encoding YUCCA gene family in *Populus trichocarpa* and their expression in vegetative tissues and in response to hormone and environmental stresses. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 97:271-283.
- Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D and Chory J (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291:306-309.
- Zhao Y (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 61:49-64.
- Zhao Y (2012) Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Mol Plant* 5:334-338.
- Zhao Y (2018) Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes. *Annu Rev Plant Biol* 69:417-435.

Supplementary material

The following online material is available for this article:
 Figure S1 - IAA levels in roots and shoots of different lines and their crosses with 35S::YUC4.
 Figure S2 - Root architecture of 35S::YUC4.
 Figure S3 - Quantification of relative GUS expression of DR5::GUS in WT and 35S::YUC4 backgrounds.
 Figure S4 - Auxin responsive gene expression is exacerbated in shoots and roots of 35S::YUC4 seedlings upon NPA treatment.
 Figure S5 - Auxin-inducible BA3::GUS expression in response to NPA treatment.

Associate Editor: Hong Luo

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (type CC-BY), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original article is properly cited.

7. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

Las auxinas son reguladores del crecimiento ubicuos en todo el reino vegetal y contribuyen a regular una amplia variedad de procesos fisiológicos, actuando en interacción con otras fitohormonas (Vanstraelen y Benková, 2012). En *Arabidopsis*, se propone que la biosíntesis del AIA se realiza principalmente a través de la vía Trp-IPyA-AIA donde las enzimas YUC desempeñan un papel clave (Zhao, 2012). El mecanismo catalítico de YUC para convertir IPyA en AIA se describió utilizando enzimas recombinantes de YUC de *Arabidopsis* (Dai *et al.*, 2013). Hay 11 miembros de la familia YUC en el genoma de *Arabidopsis*; los estudios de expresión revelaron que cada gen *YUC* tiene un patrón de expresión distinto; sin embargo, se observan patrones de expresión superpuestos que sugieren que los genes *YUCCA* tienen funciones redundantes (Chen *et al.*, 2014a; Cheng *et al.*, 2006, 2007). El análisis de los genes *YUCCA* indica que *YUC1*, *YUC2* y *YUC4* se expresan a niveles relativamente altos en hojas jóvenes y tejidos vasculares y que *YUC3*, *YUC5*, *YUC7*, *YUC8* y *YUC9* se expresan en tejidos radiculares, incluidos el meristemo proximal y la punta de la raíz en *Arabidopsis*. La expresión de *YUC1*, *YUC2*, *YUC4* y *YUC6* también se observa en flores. Consistente con un papel importante de los genes *YUC* en la embriogénesis, *YUC1*, *YUC4*, *YUC10* y *YUC11* se expresan en los embriones (Kasahara, 2015). La interrupción de un solo gen *YUC* en *Arabidopsis* no causa un fenotipo aparente, mientras que las mutantes triples o cuádruples muestran defectos graves en diversos procesos de desarrollo, lo que sugiere que la biosíntesis de auxinas regulada espacial y temporalmente por múltiples genes *YUC* es esencial para el desarrollo de las plantas (Cheng *et al.*, 2006, 2007).

Los análisis funcionales y filogenéticos sugieren que la familia de genes *YUC* se ha expandido tanto en eudicotiledóneas como en monocotiledóneas con una amplia diversificación funcional en diferentes especies (Gallavotti *et al.*, 2008). Los genes *YUCCA* han sido ampliamente estudiados, no solo en *Arabidopsis* sino también en varias especies agrícolas y de ornato (Exposito-Rodriguez *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Pan *et al.*, 2015; Tobefía-Santamaria *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2016; Yamamoto *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2016). Hasta ahora, de los 11 homólogos de *YUC*, la sobreexpresión de *YUCCA1,3,5,6,7,8,9,10* se ha estudiado en diferentes contextos en *Arabidopsis*

(Cha *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2014a; Hentrich *et al.*, 2013a; Hentrich *et al.*, 2013b; Kim *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2012; Woodward *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2001). La sobreexpresión del gen *YUC4* no se ha estudiado hasta la fecha, solo hay un informe anterior en el que se genera una línea denominada *thread* generada mediante inserciones de “*activation tagging*” en *Arabidopsis* utilizando el sistema de transposón *En-1* de maíz (Marsch-Martínez *et al.*, 2002). Se ha demostrado que *YUC4* es blanco de varios factores de transcripción, lo que resulta en un aumento de la biosíntesis de auxinas. *STYLISH1* activa la transcripción de *YUC4* (Sohlberg *et al.*, 2006; Ståldal *et al.*, 2008) presumiblemente cooperando con *NGATHA* y *FUSCA3* (Tang *et al.*, 2017; Trigueros *et al.*, 2009). *YUC4* también parece ser un objetivo de transcripción directa de *LEAFY COTYLEDON2* (Stone *et al.*, 2008).

La expresión de *YUC4* es regulada por empalme alternativo a nivel tisular, lo que resulta en dos isoformas, *YUC4.1* presente en todos los tejidos y *YUC4.2* restringido a flores. Ambas isoformas tienen actividad enzimática, pero el empalme alternativo hace que 72 pb del tercer intrón reemplacen al exón final en *YUC4.2*, introduciendo un dominio transmembranal hidrofóbico C-terminal de 24 aminoácidos. En consecuencia, *YUC4.2* se inserta en ER con la proteína frente al citosol, lo que sugiere un papel para la acumulación intracelular de auxinas (Kriechbaumer *et al.*, 2012). El cDNA de *Arabidopsis* se obtuvo y amplificó utilizando cebadores específicos para toda la secuencia. El producto se secuenció antes de clonarse en un vector bajo la influencia del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). Después de la transformación de *Arabidopsis*, se obtuvieron cinco transformantes, los cinco fueron genotipificadas para la inserción de T-ADN y se realizó un Northern Blot que indicó elevados productos de transcripción de *YUC4*. Seleccionamos una línea y la nombramos *35S::YUC4*. Cuando se determinaron los niveles libres de AIA en *35S::YUC4*, detectamos alrededor del 25% más que el ecotipo silvestre, cantidad que es ligeramente menor a la registrada en otras líneas de sobreexpresión de *YUC* previamente caracterizadas (Hentrich *et al.*, 2013a; Zhao *et al.*, 2001). Estos resultados confirmaron que *35S::YUC4* tiene aumentada la transcripción de *YUC4*, lo que conlleva a una posterior sobreproducción de auxinas, de las cuales el AIA puede estar siendo convertido a otras formas, almacenado o metabolizado para su degradación. El fenotipo observado en *35S::YUC4* es el característico de las

mutantes de *Arabidopsis* sobreproductoras de auxinas, que incluye dominancia apical incrementada, pecíolos alargados, hojas caulinares retorcidas, hojas de roseta largas y estrechas e hipocótilos alargados (Lee *et al.*, 2012). La línea 35S::*YUC4* mostró márgenes de hojas anormales y hojas menos expandidas que Col-0 como se muestra en mutantes que sobreexpresan otros *YUCCA*. Se ha descrito que los márgenes de las hojas de estas mutantes contienen menos hidátodos y un mayor número de parches celulares, además los patrones de las células epidérmicas se parecen a los de los hidátodos (Wang *et al.*, 2011a). Las mutantes con sobreexpresión de genes *YUC* en *Arabidopsis* exhiben fenotipos similares, pero no idénticos (Kim *et al.*, 2007). Se propuso que los fenotipos específicos observados en diferentes líneas que sobreexpresan *YUC* son causados por la activación relativa e inespecífica conducida por el promotor 35S, lo que resulta en diferentes niveles de auxinas endógenas en órganos, tejidos o incluso células específicas. Es posible que pequeñas diferencias en la expresión del gen *YUC* en tejidos o células específicas podrían afectar dramáticamente los fenotipos (Kim *et al.*, 2007). En *Arabidopsis*, los trabajos donde los genes *YUC* están sobreexpresados no informan un efecto obvio en la arquitectura de la raíz cuando se cultivan en medios MS (Chen *et al.*, 2014a; Kim *et al.*, 2007). Sin embargo, el crecimiento de las raíces laterales se promovió significativamente en las mutantes sobreexpresoras de *YUC7* cuando se cultivaron en condiciones de sequía (Lee *et al.*, 2012). En el caso de 35S::*YUC4*, se observa un ligero aumento tanto en el número de raíces laterales como en la longitud de la raíz; además, detectamos que las raíces primarias de 35S::*YUC4* tienen un diámetro más pequeño en comparación con el tipo silvestre, indicando que aumentar el contenido de auxinas endógenas puede modificar ligeramente la arquitectura raíz de *Arabidopsis*.

El gradiente de auxinas a menudo se visualiza usando los reporteros de auxinas con el promotor sintético DR5 controlado la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) o de la β -glucuronidasa (GUS). La inactivación de los genes *YUC* en *Arabidopsis* conduce a la reducción de la tinción en DR5::GUS (Cheng *et al.*, 2006). Por el contrario, en la línea sobreproductora de auxinas *yucca6-1D*, se usó el reportero DR5::GUS para indicar un aumento de los niveles endógenos de AIA (Kim *et al.*, 2007). Primero, usamos el reportero DR5::GFP para visualizar el gradiente de auxinas en 35S::*YUC4*, durante la etapa de plántula, DR5::GFP se

expresa altamente en el centro quiescente, las células de columnela adyacentes y en la cubierta de la raíz (Sabatini *et al.*, 1999). Encontramos que *35S::YUC4* mostró un aumento de la fluorescencia en las zonas mencionadas anteriormente del meristemo de la raíz en comparación con las plántulas de tipo silvestre.

La señalización de las auxinas involucra un número de genes que codifican proteínas AUX/IAA que retroalimentan negativamente su propia regulación. En presencia de auxinas, las proteínas represoras AUX/IAA se degradan por una vía mediada por el proteasoma 26S, liberando así factores de transcripción. Usando el reportero *HS::AXR3NT-GUS* (Gray *et al.*, 2001), encontramos que la línea de superproducción de auxinas *35S::YUC4* muestra una mayor degradación de la proteína represora AXR3. El gen AXR3 codifica para uno de los represores AUX/IAA en la vía de transducción de señales de auxinas cuya degradación por el proteasoma aumenta con la aplicación de auxinas. En conjunto, estos resultados sugieren que la sobreproducción de auxinas en *35S::YUC4* conduce a un aumento de la respuesta de auxinas con una posterior degradación continua de los represores AUX/IAA.

El establecimiento y el mantenimiento de gradientes de auxinas en los tejidos son el resultado del movimiento de las auxinas entre las células a través de la difusión y el transporte activo. Los transportadores de eflujo de auxinas pertenecientes a la familia PIN son reguladores clave para la distribución de auxinas (Adamowski y Friml, 2015). Se reportó que las auxinas pueden regular los niveles de PIN y su localización, dicha retroalimentación puede contribuir a las propiedades compensatorias de la red de distribución de auxinas (Vieten *et al.*, 2005). Se describió previamente una dependencia entre la dosis de auxinas exógenas y los cambios en el nivel de expresión de PIN1. Se observaron diferencias entre *PIN1::PIN1-GFP* y *PIN1::GUS* en respuesta a las auxinas, concluyendo que las auxinas activan la expresión de PIN1 a nivel de promotor, mientras que la inhibe a nivel postranscripcional (Omelyanchuk *et al.*, 2016). De acuerdo con el reporte anterior, observamos una expresión disminuida de *PIN1::PIN1-GFP* que indica que la sobreproducción de auxinas está disminuyendo la regulación de PIN1 post-transcripcionalmente. La degradación de las proteínas PIN dependiente del proteasoma es una regulación post-transcripcional regulada por auxinas (Ruiz Rosquete *et al.*, 2012). Además, encontramos que PIN2, PIN3 y PIN7 están incrementados en *35S::YUC4*, se ha

reportado que las plantas transgénicas PIN1,2,3,4,6,7::GUS responden al tratamiento con auxinas mediante el aumento de su expresión tejido-específica (Vieten *et al.*, 2005). Otros estudios informan que el tratamiento con AIA aumenta la abundancia transcripcional de AUX1, PIN3 y PIN7 (Lewis *et al.*, 2011). Además, se sugirió un doble papel para las auxinas en la regulación de la transcripción y degradación del PIN, ya que la aplicación de altas concentraciones de auxinas disminuye la intensidad de la señal de PIN7-GFP y PIN2-GFP, mientras que, a bajas concentraciones, las cantidades de proteínas PIN2 y PIN7 aumentaron (Vieten *et al.*, 2005). Según estos informes, las cantidades endógenas de auxina en las raíces 35S::YUC4 son lo suficientemente altas como para regular de manera diferencial a las proteínas PIN. Aún no está claro si los otros transportadores están regulados para compensar la disminución de PIN1 o si esta regulación ocurre de manera independiente de PIN1.

Los hipocótilos largos en plantas sobreproductoras de auxinas se asocian a un aumento de la elongación celular en lugar de a un mayor número de células en la epidermis como el córtex (Lee *et al.*, 2012; Woodward *et al.*, 2005). Las auxinas se sintetizan principalmente en el ápice de los brotes y luego se transportan hacia la raíz a través de los hipocótilos, donde pueden regular la expansión celular de manera diferencial durante los tropismos (Spalding, 2013). La capacidad de las auxinas para inducir el alargamiento del hipocótilo se ha explicado por la reducción del pH apoplástico, promoviendo así la extensión de la pared celular (Takahashi *et al.*, 2012). Si bien, las plantas que producen una cantidad excesiva de auxinas tienen hipocótilos largos, este efecto de elongación no puede simularse mediante la aplicación exógena de AIA o análogos sintéticos. La elongación del hipocótilo en la planta intacta se promueve cuando las auxinas se suministran exógenamente en forma de proauxinas permeables a la membrana (Savaldi-Goldstein *et al.*, 2008) o cuando se aplican diariamente altas concentraciones de AIA en condiciones específicas de luz y del desarrollo (Covington y Harmer, 2007). Sin embargo, algunas condiciones que aumentan los niveles de auxinas endógenas también promueven el alargamiento del hipocótilo, por ejemplo, cuando las plantas se cultivan a altas temperaturas (Franklin *et al.*, 2011; Gray *et al.*, 1998) o cuando se incrementa la sacarosa (Lilley *et al.*, 2012). La sombra también induce la producción rápida de auxinas en los cotiledones por la vía TAA/YUC, y las auxinas recién producidas se transportan al hipocótilo para

inducir su alargamiento (Zhao, 2018). Debido a que el aumento del transporte de auxinas podría ser el responsable del alargamiento del hipocótilo en *35S::YUC4*, probamos el inhibidor de transporte de auxinas NPA encontrando que el bloqueo del transporte conduce a la reducción de la longitud del hipocótilo de una manera dependiente de la dosis hasta alcanzar una longitud similar del ecotipo silvestre no tratado. El aumento de la producción de auxinas podría provocar un aumento en su transporte y el alargamiento de los hipocótilos en *35S::YUC4*. Se reportó que el NPA puede inhibir completamente el alargamiento del hipocótilo inducido por la sombra en *Arabidopsis*, presumiblemente porque se evita que el AIA libre en los cotiledones se transporte a los hipocótilos (Zhao, 2018).

Para averiguar cómo se distribuyen las auxinas antes y después de la aplicación de NPA en *35S::YUC4*, utilizamos los reporteros *DR5::GUS* y *BA3::GUS* para la localización de auxinas. Los informes anteriores que utilizan NPA indican que la actividad de *DR5::GUS* fue más fuerte en los cotiledones y meristemas, lo que indica que el NPA bloqueó el transporte de auxinas causando su acumulación en estos tejidos (Casimiro *et al.*, 2001; Himanen *et al.*, 2002; Nishimura *et al.*, 2012). En nuestros experimentos, observamos una acumulación de auxinas en las puntas y los márgenes de las hojas, así como en los meristemas de la raíz de una manera dependiente de la concentración de NPA. Los informes indican que el NPA provoca la acumulación de auxinas en y cerca de las fuentes de auxina, lo que aumenta el número de venas secundarias, así como su tamaño (Huang *et al.*, 2017a). Sin embargo, la tinción *DR5::GUS* fue más notable en el fondo *35S::YUC4*, las auxinas comienzan a acumularse en los haces vasculares hasta llenar toda la hoja en altas concentraciones de NPA. Además, en el meristemo de la raíz podemos observar un ensanchamiento característico causado por NPA, mientras que el aumento del máximo de auxinas en esta zona es más dramático para *35S::YUC4*. El engrosamiento del meristemo de la raíz causado por la acumulación atípica de auxinas endógenas es presumiblemente causado por una nueva especificación del tipo de celular (Casimiro *et al.*, 2001; Sabatini *et al.*, 1999). La línea reportera *BA3::GUS* también se usa para la localización de auxinas y normalmente se expresa en pecíolos, hipocótilo y discretamente en tejidos vasculares, cuando *BA3::GUS* se movilizó al fondo *35S::YUC4*, la expresión aumenta en toda la planta principalmente en tejidos vasculares. Bajo el efecto del NPA, las auxinas se acumularon en tejidos vasculares de las hojas

y meristemo de la raíz de una manera dependiente de la dosis. Es importante destacar que a concentraciones aumentadas de NPA, la expresión de *BA3::GUS* en los hipocótilos de *35S::YUC4* desaparece, lo que indica que NPA impide que las auxinas alcancen esta zona normalizando la longitud del hipocótilo.

Ambos reporteros, *DR5::GUS* y *BA3::GUS* se usan ampliamente para mostrar los niveles de auxina *in situ*, sin embargo, muestran patrones de expresión diferentes en condiciones control y cuando se movilizan a *35S::YUC4*, este comportamiento podría explicarse debido al origen de la construcción del promotor; *DR5::GUS* contiene un promotor formado por elementos de respuesta de auxinas sintéticas multimerizadas (AuxRE) de un gen GH3 de soya (Ulmasov *et al.*, 1997). Por otro lado, el promotor de *BA3::GUS* se construyó utilizando dos dominios sensibles a la auxina (AuxRD) encontrados en el promotor de los genes *IAA4/5* de *Pisum sativum* (Oono *et al.*, 1998), ambos se describen como genes de respuesta temprana a auxinas (Hagen y Guilfoyle, 2002). En conjunto, estos resultados confirman que las plantas *35S::YUC4* tienen niveles aumentados de auxinas que causan su fenotipo característico y en base a la intensidad y el patrón de expresión mostrado por ambos genes en el fondo *35S::YUC4*, podemos sugerir que las auxinas podrían estar presentes en otras formas, además del AIA, como resultado de su propia homeostasis. En la mayoría de los tejidos, las respuestas a auxinas dependen de la concentración y diferentes tejidos responden de manera distinta a cantidades variables de auxinas exógenas (Thimann, 1937). Las concentraciones más altas de auxinas pueden ser inhibitorias, por lo tanto, el nivel endógeno óptimo debe ser fuertemente controlado. Durante la regulación de la homeostasis de las auxinas, se emplean diversos mecanismos, como la biosíntesis, la degradación, el transporte y la formación de conjugados (Ludwig-Muller, 2011).

Las auxinas y el ABA interactúan para modular varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, así como las respuestas al estrés biótico y abiótico (Verslues y Zhu, 2007). El ABA se acumula en el embrión y regula el desarrollo, maduración y la latencia de las semillas, además de inhibir la germinación y el crecimiento post-germinativo (Guan *et al.*, 2014; Verslues y Zhu, 2007). Se requiere ABA para el crecimiento normal, ya que las mutantes deficientes en ABA reducen el vigor celular y generalmente son más pequeñas (Xiong y Zhu, 2003). Se han identificado loci insensibles a ABA: *ABI3*, *ABI4* y *ABI5*, que

codifican factores de transcripción que desempeñan funciones críticas que regulan numerosos genes específicos en las semillas y afectan numerosos procesos después de la germinación (Finkelstein, 2013). *ABI4* codifica un factor de transcripción AP2/ERF, que se expresa en ventanas de desarrollo discretas principalmente durante la maduración de las semillas y en las plántulas después de la germinación durante el establecimiento del crecimiento autótrofo (Arroyo *et al.*, 2003; Finkelstein *et al.*, 1998; Shkolnik-Inbar & Bar-Zvi, 2010; Soderman *et al.*, 2000). Además, *ABI4* se expresa en niveles bajos, aunque detectables, durante las etapas posteriores del desarrollo, que probablemente participan en diversas vías de señalización (Arroyo *et al.*, 2003; Soderman *et al.*, 2000). Por ejemplo, *ABI4* está involucrado en las respuestas a carbohidratos (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Arroyo *et al.*, 2003; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Ramon *et al.*, 2007), movilización de lípidos en el embrión (Penfield *et al.*, 2006) y señalización retrógrada de plástido a núcleo (Koussevitzky *et al.*, 2007). *ABI4* puede reconocer los elementos cis CE1 (motivo CACCG y CCAC) en genes blanco para controlar su propia transcripción actuando como activador o represor (Koussevitzky *et al.*, 2007; Shu *et al.*, 2013; Wind *et al.*, 2013). En consecuencia, *ABI4* regula directamente su propia expresión, así como la de *ABI5* y *SBE2.2* para mediar en la señalización en respuesta a azúcares (Bossi *et al.*, 2009). *ABI4* puede regular la latencia de la semilla al reprimir a *CYP707A1* y *CYP707A2* aumentando la biosíntesis de ABA y promoviendo la degradación del ácido giberélico al activar a *GA2ox7*, además de reprimir los elementos de señalización de citocininas ARR6, 7 y 15 (Huang *et al.*, 2017b; Shu *et al.*, 2016; Shu *et al.*, 2013). Al disminuir la expresión de *HKT1;1*, *ABI4* es capaz de afectar la tolerancia a la sal en *Arabidopsis* (Shkolnik-Inbar, Adler, y Bar-Zvi, 2013).

Se ha reportado que el patrón de expresión del reportero GUS en *ABI4::GUS* se correlaciona con el perfil de expresión del transcrito de *ABI4* y con los datos públicos de microarreglos disponibles sobre la expresión de *ABI4* (Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009). Trabajos anteriores indican la dinámica de expresión de *ABI4::GUS*, donde *ABI4* se limita al embrión y se detecta en todos los tejidos visibles durante la germinación (Bossi *et al.*, 2009; Penfield *et al.*, 2006). Los autores indican que en el día 1 después de la germinación, se observa una expresión elevada de *ABI4::GUS* en los cotiledones incluso antes de que emergieran de la cubierta de la semilla. En el día 2, hay una fuerte tinción de

GUS en los cotiledones y el hipocótilo. Los niveles de GUS se reducen el día 3 y la punta de la raíz se tiñe. Los picos de expresión de *ABI4* alrededor del día 6 se restringen a los cotiledones, hipocótilos y la punta de la raíz y se reducen lentamente con el desarrollo de las plántulas. Finalmente, en plántulas de 10 o más días, la actividad GUS es indetectable (Arroyo *et al.*, 2003; Bossi *et al.*, 2009; Shkolnik-Inbar & Bar-Zvi, 2011). La descripción de la expresión de *ABI4::GUS* corresponde a lo observado en nuestras condiciones experimentales para las plántulas silvestres, sin embargo, encontramos un aumento en la expresión de *ABI4::GUS* en plántulas *35S::YUC4* durante todos los estadios mencionados anteriormente. Sin embargo, los reportes indican que las auxinas afectan la expresión de *ABI4*, se describió que su expresión es reprimida por las auxinas en las raíces, mientras que ABA y las citocininas la inducen (Bossi *et al.*, 2009; Shkolnik-Inbar & Bar-Zvi, 2010). Además, el tratamiento con AIA produce una disminución del 75% en el nivel de transcrito de *ABI4* en las raíces, mientras que la aplicación del inhibidor del transporte de auxinas ácido 2,3,5-triyodobenzóico (TIBA) produjo un aumento de los niveles de transcripción de *ABI4* (Shkolnik-Inbar & Bar-Zvi, 2010). La diferencia con esos informes probablemente se deba a diferentes condiciones experimentales, mientras que ellos expusieron las plantas a altas concentraciones de auxinas durante unas pocas horas, nosotros exploramos la expresión de *ABI4* bajo el efecto de altas concentraciones de auxinas endógenas.

Se ha reportado que el ABA posee funciones duales como un inhibidor del crecimiento en altas concentraciones y como promotor de crecimiento en bajas concentraciones. En presencia de ABA exógeno, el desarrollo de las raíces laterales se inhibe y el crecimiento general se retrasa (Harris, 2015). Además, el tratamiento con ABA parece reducir la biosíntesis de auxinas o su señalización, evidenciada por la disminución de *IAA2::GUS* y *DR5::GUS*, señalando la importancia en la inhibición del crecimiento radicular inducida por ABA (He *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011b). Observamos que las altas concentraciones de ABA disminuyen drásticamente a *DR5::GUS* y *BA3::GUS* en plántulas silvestres hasta que casi desaparece la expresión de ambos marcadores en el brote y la raíz, en *35S::YUC4* también se observa esta reducción, sin embargo, la expresión todavía es claramente detectable, especialmente en los brotes. Este resultado refuerza la teoría de que el ABA disminuye la señal o la biosíntesis de

auxinas y muestra que *35S::YUC4* es resistente al efecto del ABA debido a una mayor tasa biosintética de auxinas.

La arquitectura del sistema radicular mantiene el crecimiento de la planta y permite su adaptación a las condiciones ambientales en constante cambio. Las hormonas vegetales son reguladores importantes que influyen en el desarrollo de la raíz. Además de regular muchos otros aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, se sabe que el ABA regula el alargamiento de la raíz a través de las auxinas y el etileno en *Arabidopsis* (Rowe *et al.*, 2016; Thole *et al.*, 2014). Las plántulas de *Arabidopsis* muestran una respuesta diferente a ABA dependiendo de la etapa de desarrollo. La etapa de germinación de las semillas y el crecimiento posterior a la germinación son más sensibles al ABA que aquellas en otros estadios, más de 3 μ M ABA bloquea la germinación y el crecimiento post-germinativo (Belin *et al.*, 2009; Meyer *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2011b). Además de su participación en la elongación de la raíz primaria, se ha descubierto que el ABA desempeña un papel clave en la formación de las raíces laterales (De Smet *et al.*, 2003; De Smet *et al.*, 2006). Un elemento de la señalización de ABA involucrado en la regulación de la arquitectura de la raíz es *ABI4* ya que las mutantes *abi4* desarrollan un mayor número de raíces laterales mientras que las plantas que sobreexpresan *ABI4* tienen un número reducido. *ABI4* se expresa en células del floema, y su expresión regula el nivel del transportador de eflujo de auxinas PIN1 lo que afecta la distribución y los niveles de auxinas en las raíces (Shkolnik-Inbar & Bar-Zvi, 2010). Cuando las plantas fueron crecidas en concentraciones altas de ABA, el crecimiento de Col-0 se retrasó de manera dependiente de la dosis, además, se observó una fuerte hipersensibilidad al ABA en en la línea *35S::YUC4*, lo que indica que un mayor contenido de auxina endógena actúa en una manera sinérgica con el ABA para reprimir el crecimiento radicular. Por otro lado, *abi4* mostró resistencia al efecto inhibitorio de ABA. Se seleccionó la mutante *abi4* debido a la relación observada entre la sobreproducción de auxinas y la expresión de *ABI4::GUS*. Cabe destacar que la cruce *abi4/35S::YUC4* mostró una elongación de la raíz similar a Col-0. Así, la hipersensibilidad de *35S::YUC4* al ABA en el crecimiento post-germinativo requiere elementos de señalización de ABA como el factor de transcripción *ABI4*. Estudios previos han demostrado que las auxinas regulan la germinación de las semillas, pero aún no está claro cómo interactúan las auxinas con las vías de

biosíntesis/señalización de ABA y GA (Shuai *et al.*, 2017). En soya y tabaco, tratamientos con AIA regulan negativamente la germinación al promover ABA y/o reprimir las giberelinas (Li *et al.*, 2016; Shuai *et al.*, 2017). La evidencia genética emergente ha demostrado que las auxinas promueven y regulan la latencia de las semillas, junto con la vía de señalización del ABA. La acción de las auxinas en la latencia de las semillas requiere la vía de señalización del ABA (y viceversa), lo que indica que las funciones de las auxinas y el ABA son interdependientes (Liu *et al.*, 2013).

Los altos niveles de IBA, IBA-Glc o AIA mejoran la inhibición de la germinación por ABA, así como del desarrollo de las plántulas (Tognetti *et al.*, 2010). Además, otro grupo de investigación demostró que las semillas de las mutantes *abi4* y *abi5* de *Arabidopsis* son insensibles al tratamiento con auxinas durante la germinación, lo que indica que ABI4 y ABI5 son reguladores importantes de la inhibición de la germinación de semillas mediada por auxinas (Chen *et al.*, 2014b; Chen *et al.*, 2014c). Las mutantes de señalización del ABA; *abi3*, *abi4* y *abi5* exhibieron un fenotipo de germinación más rápido en comparación con la línea silvestre, mientras que las mutantes que sobreexpresan *ABA2* o *ABI4* exhibieron un fenotipo de germinación retardada (Shuai *et al.*, 2017). El aumento de *ABI4::GUS* en *35S::YUC4* podría ser un factor importante para la germinación retardada en la línea de sobreproductora de auxinas. Para probar esto, realizamos ensayos de germinación con concentraciones crecientes de ABA, en las condiciones control observamos que *35S::YUC4* germinó en una fecha posterior, lo que coincide con un informe anterior donde las plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan genes de *YUCCA* del trigo también experimentaron una germinación retardada (Li *et al.*, 2014). Cuando aumentaron las concentraciones de ABA, la germinación retardada fue más notoria en *35S::YUC4*, de forma contraria, *abi4* mostró resistencia al ABA en la germinación. Anteriormente, se demostró que *abi4* es insensible a las auxinas y resistente a su combinación con ABA durante la germinación (Chen *et al.*, 2014b). Curiosamente, *abi4/35S::YUC4* mostró tiempos de germinación similares a los de la línea silvestre, lo que indica que ABI4 es un factor requerido para la hipersensibilidad de *35S::YUC4* al ABA durante la germinación, siendo un elemento de convergencia en el control de la germinación mediado por ABA y auxinas. ABI3 también es un elemento importante para esta respuesta, un informe anterior indicó que la hipersensibilidad al ABA de la

línea *iaaM-OX* también se vio comprometida en la doble mutante *iaaM-OX/abi3* (Liu *et al.*, 2013). En este trabajo, apoyamos que las auxinas endógenas inhiben la germinación de semillas de una manera dependiente de ABA, lo que indica que las auxinas y el ABA actúan de manera sinérgica para inhibir la germinación de semillas.

Las auxinas son fitohormonas cruciales ampliamente distribuidas en todo el reino vegetal y contribuyen a la regulación de varios procesos del desarrollo durante el ciclo de vida de las plantas, actuando como integradoras de las actividades de múltiples hormonas vegetales para controlar el crecimiento de la planta en respuesta al ambiente. Aquí estudiamos la interacción auxinas-ABA centrada en las líneas sobreproductoras de auxinas, herramientas útiles para dilucidar los mecanismos del ciclo de vida de la planta. Nuestros datos refuerzan la noción de la importancia de las auxinas endógenas en la regulación de la latencia de las semillas, la germinación y el crecimiento posgerminativo. Los niveles incrementados de auxinas mejoran el efecto inhibitorio del ABA sobre la germinación y el desarrollo de las plántulas en *Arabidopsis* y proporcionamos evidencia adicional de que ABI4 está involucrado en esta inhibición controlada por ABA y auxinas. La generación y gestión del conocimiento sobre la biosíntesis de las fitohormonas, su homeostasis e interacciones podrían permitir desarrollar nuevas herramientas para controlar las respuestas de las plantas para mejorar finalmente ciertas características agronómicas.

8. LITERATURA CITADA

Abbas M, Hernández-García J, Pollmann S, Samodelov SL, Kolb M, Friml J, Hammes UZ, Zurbriggen MD, Blázquez MA, Alabadí D. (2018). Auxin methylation is required for differential growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci.* 115: 6864-6869.

Abel S, Theologis A. (1996). Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* 111: 9-17.

Abu-Zaitoon YM, Bennett K, Normanly J, Nonhebel HM. (2012). A large increase in IAA during development of rice grains correlates with the expression of tryptophan aminotransferase *OsSTAR1* and a grain specific *YUCCA*. *Physiol Plant.* 146: 487-499.

Adamowski M, Friml J. (2015). PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *Plant Cell.* 27(1): 20-32.

Adie BA, Perez-Perez J, Perez-Perez MM, Godoy M, Sanchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R. (2007). ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19(5). 1665-1681.

Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, Leon P. (2000). Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev.* 14(16): 2085-2096.

Arroyo A, Bossi F, Finkelstein R R, Leon P. (2003). Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 133(1): 231-242.

Bandurski RS, Schulze A. (1977). Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. *Plant Physiol.* 60: 211-213.

Bai B, Su YH, Yuan J, Zhang XS. (2013). Induction of somatic embryos in *Arabidopsis* requires local *YUCCA* expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis. *Mol Plant.* 6: 1247-1260.

Barbez E, Kubeš M, Rolčík J, Béziat C, Pěňčík A, Wang B, Rosquete M, Zhu J, Dobrev P, Lee Y, Zažímalová E, Petrášek J, Geisler M, Friml J, Kleine-Vehn J. (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature.* 485: 119-122.

- Bargmann BO, Vanneste S, Krouk G, Nawy T, Efroni I, Shani E, Choe G, Friml J, Bergmann DC, Estelle M, et al. (2013).** A map of cell type-specific auxin responses. *Mol Syst Biol.* 9: 688.
- Bartel B, Fink GR. (1994).** Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 6649-6653.
- Bartel B, Fink GR. (1995).** ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science.* 268: 1745-1748.
- Belin C, Megies C, Hauserova E, Lopez-Molina L. (2009).** Abscisic acid represses growth of the *Arabidopsis* embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell.* 21(8): 2253-2268.
- Benjamins R, Scheres B. (2008).** Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol.* 59: 443-465.
- Benkova E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J. (2003).** Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell.* 115(5): 591-602.
- Bielach A, Hrtyan M, Tognetti VB. (2017).** Plants under stress: Involvement of auxin and cytokinin. *Int. J Mol Sci.* 18: 1427.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Scheres B. (2005).** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature.* 433(7021): 39-44.
- Bossi F, Cordoba E, Dupre P, Mendoza MS, Roman CS, Leon P. (2009).** The *Arabidopsis* ABA-INSENSITIVE (ABI) 4 factor acts as a central transcription activator of the expression of its own gene, and for the induction of *ABI5* and *SBE2.2* genes during sugar signaling. *Plant J.* 59(3): 359-374.
- Bowman J. (1994).** *Arabidopsis: an atlas of morphology and development*. Ed. Springer-Verlag. pp 450.
- Böttcher C, Burbidge CA, Boss PK, Davies C. (2013).** Interactions between ethylene and auxin are crucial to the control of grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening. *BMC Plant Biol.* 13: 222.
- Calderón-Villalobos L, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard L, Tan X, Parry G, Mao H, Zheng N, Napier R, Kepinski S, Estelle M. (2012).** A

combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol.* 8: 477-485.

Cao X, Yang H, Shang C, Ma S, Liu L, Cheng J. (2009). The Roles of Auxin Biosynthesis YUCCA Gene Family in Plants. *Int J Mol Sci.* 20: 6343.

Casanova-Saez R, Voß U. (2019). Auxin Metabolism Controls Developmental Decisions in Land Plants. *Trends plant sci.* 24: 741-754.

Cashman JR. (1995). Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chem Res Toxicol.* 8: 166-181.

Cashman JR. (2002). Human and plant flavin-containing monooxygenase N-oxygenation of amines: detoxication vs. bioactivation. *Drug Metab Rev.* 34: 513-521.

Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Bennett M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell.* 13(4): 843-852.

Covington MF, Harmer SL. (2007). The circadian clock regulates auxin signaling and responses in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 5(8): e222.

Cha JY, Kim WY, Kang SB, Kim JI, Baek D, Jung IJ, Yun DJ. (2015). A novel thiol-reductase activity of *Arabidopsis* YUC6 confers drought tolerance independently of auxin biosynthesis. *Nature Commun.* 6: 8041.

Chapman EJ, Estelle M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet.* 43: 265-285.

Chen Q., Dai X., De-Paoli H., Cheng Y., Takebayashi Y., Kasahara H., Kamiya Y., Zhao Y. (2014a). Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol.* 55:1072-1079.

Chen C, Letnik I, Hacham Y, Dobrev P, Ben-Daniel BH, Vankova R, Miller G. (2014b). ASCORBATE PEROXIDASE6 protects *Arabidopsis* desiccating and germinating seeds from stress and mediates cross talk between reactive oxygen species, abscisic acid, and auxin. *Plant Physiol.* 166(1): 370-383.

Chen C, Twito S, Miller G. (2014c). New cross talk between ROS, ABA and auxin controlling seed maturation and germination unraveled in APX6 deficient *Arabidopsis* seeds. *Plant Signal Behav.* 9(12): e976489.

- Chen L, Tong J, Xiao L, Ruan Y, Liu J, Zeng M, Huang H, Wang JW, Xu L. (2016).** YUCCA-mediated auxin biogenesis is required for cell fate transition occurring during de novo root organogenesis in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 67: 4273-4284.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y. (2006).** Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20: 1790-1799.
- Cheng Y, Dai X, Zhao Y. (2007).** Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 19(8): 2430-2439.
- Cho D, Villiers F, Kroniewicz L, Lee S, Seo YJ, Hirschi KD, Leonhardt N, Kwak JM. (2012).** Vacuolar CAX1 and CAX3 influence auxin transport in guard cells via regulation of apoplastic pH. *Plant Physiol.* 160: 1293-1302.
- Ciesielski T. (1872).** Untersuchungen über die Abwärtskrümmung der Wurzel. *Beitr Biol Pflanzen.* 1: 1-30.
- Dal Bosco C, Dovzhenko A, Liu X, Woerner N, Rensch T, Eismann M, Eimer S, Hegermann J, Paponov IA, Ruperti B, Heberle-Bors E, Touraev A, Cohen JD, Palme K. (2012).** The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen-specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis. *Plant J.* 71: 860-870.
- Dai X, Mashiguchi K, Chen Q, Kasahara H, Kamiya Y, Ojha S, DuBois J, Ballou D, Zhao Y. (2013).** The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an *Arabidopsis* YUCCA flavin-containing monooxygenase. *J Biol Chem* 288: 1448-1457.
- Darwin C, Darwin F. (1881).** The power of movement in plants. Appleton and Company.
- Davies RT, Goetz DH, Lasswell J, Anderson MN, Bartel B. (1999).** IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 11: 365-376.
- De Smet I, Signora L, Beeckman T, Inze D, Foyer CH, Zhang H. (2003).** An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant J.* 33(3): 543-555.
- De Smet I, Zhang H, Inze D, Beeckman T. (2006).** A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends Plant Sci.* 11(9): 434-439.

- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M. (2005).** Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell.* 9: 109-119.
- Dreher KA, Brown J, Saw RE, Callis J. (2006).** The *Arabidopsis* Aux/IAA protein family has diversified in degradation and auxin responsiveness. *Plant Cell.* 18: 699-714.
- Expósito-Rodríguez M, Borges AA, Borges-Perez A, Perez JA. (2011).** Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding YUCCA-like flavin monooxygenases: the *ToFZY* gene family. *Plant Physiol Biochem.* 49(7): 782-791.
- Feng J, Dai C, Luo H, Han Y, Liu Z, Kang C. (2019).** Reporter gene expression reveals precise auxin synthesis sites during fruit and root development in wild strawberry. *J Exp Bot.* 70: 563-574.
- Finkelstein R. (2013).** Abscisic Acid Synthesis and Response. *Arabidopsis Book*, e0166.
- Finkelstein RR. (1994).** Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant J.* 5(6): 765-771.
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM. (1998).** The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell.* 10(6): 1043-1054.
- Fraaije MW, Kamerbeek NM, van Berkel WJH, Janssen DB. (2002).** Identification of a Baeyer-Villiger monooxygenase sequence motif. *FEBS Lett.* 518: 43-47.
- Franklin KA, Lee SH, Patel D, Kumar SV, Spartz AK, Gu C, Ye S, Yu P, Breen G, Cohen JD, et al. (2011).** PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc Natl Acad Sci.* 108: 20231-20235.
- Frick EM, Strader LC. (2018).** Roles for IBA-derived auxin in plant development. *J Exp Bot.* 69: 169-177.
- Gallavotti A, Barazesh S, Malcomber S, Hall D, Jackson D, Schmidt RJ, McSteen P. (2008).** *sparse inflorescence1* encodes a monocot-specific YUCCA-like gene required for vegetative and reproductive development in maize. *Proc Natl Acad Sci.* 105(39): 15196-15201.
- Gray WM. (2004).** Hormonal regulation of plant growth and development. *PLoS Biol.* 2: e311.

Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M. (2001). Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*. 414(6861): 271-276.

Gray WM, Östin A, Sandberg G, Romano CP, Estelle M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*. 95(12): 7197-7202.

Guan C, Wang X, Feng J, Hong S, Liang Y, Ren B, Zuo J. (2014). Cytokinin antagonizes abscisic acid-mediated inhibition of cotyledon greening by promoting the degradation of abscisic acid insensitive5 protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 164(3): 1515-1526.

Guilfoyle T, Hagen G. (2007). Auxin response factors. *Curr Opin Chem Biol*. 10: 453-60.

Gutierrez L, Mongelard G, Floková K, Pacurar DI, Novák O, Staswick P, Kowalczyk M, Pacurar M, Demailly H, Geiss G, Bellini C. (2012). Auxin controls *Arabidopsis* adventitious root initiation by regulating jasmonic acid homeostasis. *Plant Cell*. 24: 2515-2527.

Hagen G, Guilfoyle T. (1985). Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol Cell Biol*. 5: 1197-1203.

Harris JM. (2015). Abscisic Acid: Hidden Architect of Root System Structure. *Plants (Basel, Switzerland)*. 4(3): 548-572.

He W, Brumos J, Li H, Ji Y, Ke M, Gong X, Zeng Q, Li W, Zhang X, An F, Wen X, Li P, Chu J, Sun X, Yan C, Yan N, Xie DY, Raikhel N, Yang Z, Stepanova AN, Alonso JM, Guo H. (2011). A small-molecule screen identifies L-kynurenine as a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in ethylene-directed auxin biosynthesis and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23: 3944-3960.

He J, Duan Y, Hua D, Fan G, Wang L, Liu Y, Gong Z. (2012). DEXH box RNA helicase-mediated mitochondrial reactive oxygen species production in *Arabidopsis* mediates crosstalk between abscisic acid and auxin signaling. *Plant Cell*. 24(5): 1815-1833.

Hentrich M, Bottcher C, Duchting P, Cheng Y, Zhao Y, Berkowitz O, Pollmann S. (2013a). The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of *YUCCA8* and *YUCCA9* gene expression. *Plant J*. 74(4): 626-637.

Hentrich M, Sánchez-Parra B, Pérez Alonso MM, Carrasco Loba V, Carrillo L, Vicente-Carbajosa J, Pollmann S. (2013b). *YUCCA8* and *YUCCA9* overexpression

reveals a link between auxin signaling and lignification through the induction of ethylene biosynthesis. *Plant Signal Behav.* 8(11).

Himanen K, Boucheron E, Vanneste S, de Almeida Engler J, Inzé D, Beeckman T. (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell.* 14(10): 2339-2351.

Huang CF, Yu CP, Wu YH, Lu MYJ, Tu SL, Wu SH, Li WH. (2017a). Elevated auxin biosynthesis and transport underlie high vein density in C(4) leaves. *Proc Natl Acad Sci.* 114(33): E6884-E6891.

Huang X, Zhang X, Gong Z, Yang S, Shi Y. (2017b). ABI4 represses the expression of type-A ARRs to inhibit seed germination in *Arabidopsis*. *Plant J.* 89(2): 354-365.

Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeekens S. (2000). The *Arabidopsis* *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J.* 23(5): 577-585.

Ishida JK, Wakatake T, Yoshida S, Takebayashi Y, Kasahara H, Wafula E, dePamphilis CW, Namba S, Shirasu K. (2016). Local auxin biosynthesis mediated by a YUCCA flavin monooxygenase regulates haustorium development in the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Cell.* 28: 1795-1814.

Jackson RG, Lim EK, Li Y, Kowalczyk M, Sandberg G, Hoggett J, Ashford DA, Bowles DJ. (2001). Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *J Biol Chem.* 276: 4350-4356.

Jackson RG, Kowalczyk M, Li Y, Higgins G, Ross J, Sandberg G, Bowles DJ. (2002). Over-expression of an *Arabidopsis* gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *Plant J.* 32: 573-583.

Jakubowska A, Kowalczyk S. (2004). The auxin conjugate 1-O-indole-3-acetyl-beta-D-glucose is synthesized in immature legume seeds by IAGlc synthase and may be used for modification of some high molecular weight compounds. *J Exp Bot* 55: 791-801.

Takei Y, Yamazaki C, Suzuki M, Nakamura A, Sato A, Ishida Y, Kikuchi R, Higashi S, Kokudo Y, Ishii T, Soeno K, Shimada Y. (2015). Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *Plant J.* 84: 827-837.

- Kai K, Wakasa K, Miyagawa H. (2007).** Metabolism of indole-3-acetic acid in rice: identification and characterization of N-beta-D-glucopyranosyl indole-3-acetic acid and its conjugates. *Phytochemistry*. 68: 2512-2522.
- Kai K, Horita J, Wakasa K, Miyagawa H. (2007).** Three oxidative metabolites of indole-3-acetic acid from *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry*. 68: 1651-1663.
- Kasahara H. (2015).** Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Biosci Biotechnol Biochem*. 80(1): 34-42.
- Kim JI, Sharkhuu A, Jin JB, Li P, Jeong JC, Baek D, Bressan RA. (2007).** *yucca6*, a dominant mutation in *Arabidopsis*, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiol*. 145(3): 722-735.
- Kim JI, Murphy AS, Baek D, Lee SW, Yun DJ, Bressan RA, Narasimhan ML. (2011).** *YUCCA6* over-expression demonstrates auxin function in delaying leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*. 62(11): 3981-3992.
- Kim JI, Baek D, Park HC, Chun HJ, Oh DH, Lee MK, Cha JY, Kim WY, Kim MC, Chung WS, et al. (2013).** Overexpression of *Arabidopsis YUCCA6* in potato results in high-auxin developmental phenotypes and enhanced resistance to water deficit. *Mol Plant*. 6: 337-349.
- Korasick DA, Enders TA, Strader LC. (2013).** Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* 64: 2541-2555.
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Chory J. (2007).** Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science*. 316(5825): 715-719.
- Kowalczyk M, Sandberg G. (2001).** Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 127: 1845-1853.
- Kögl F, Smit A. (1931).** Über die Chemie desWuchsstoffs. *Proc Kon Akad Wetensch*. 34: 1411-1416.
- Kriechbaumer V, Wang P, Hawes C, Abell BM. (2012).** Alternative splicing of the auxin biosynthesis gene *YUCCA4* determines its subcellular compartmentation. *Plant J*. 70(2): 292-302.
- Kriechbaumer V, et al. (2016).** Localization and interactions between *Arabidopsis* auxin biosynthetic enzymes in the TAA/ YUC-dependent pathway. *J Exp Bot* 67: 4195-4207.

- Krueger SK, Williams DE. (2005).** Mammalian flavin-containing monooxygenases: Structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol Ther.* 106: 357-387.
- Laby RJ, Kincaid MS, Kim D, Gibson SI. (2000).** The *Arabidopsis* sugar- insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J.* 23(5): 587-596.
- Le CS, Schmelz EA, Chourey PS. (2010).** Sugar levels regulate tryptophan-dependent auxin biosynthesis in developing maize kernels. *Plant Physiol.* 153(1): 306-318.
- LeClere S, Tellez R, Rampey RA, Matsuda SP, Bartel B. (2002).** Characterization of a family of IAAmino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 277: 20446-20452.
- Lee M, Jung JH, Han DY, Seo PJ, Park WJ, Park CM. (2012).** Activation of a flavin monooxygenase gene *YUCCA7* enhances drought resistance in *Arabidopsis*. *Planta.* 235(5): 923-938.
- Lehmann T, Janowitz T, Sánchez-Parra B, Alonso MP, Trompeter I, Piotrowski M, Pollmann S. (2017).** *Arabidopsis* NITRILASE 1 contributes to the regulation of root growth and development through modulation of auxin biosynthesis in seedlings. *Front Plant Sci.* 8: 36.
- Lewis DR, Negi S, Sukumar P, Muday GK. (2011).** Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development.* 138(16): 3485-3495.
- Leyser O. (2018).** Auxin Signaling. *Plant Physiol.* 176(1): 465-479.
- Li N, Yin N, Niu Z, Hui W, Song J, Huang C, Feng D. (2014).** Isolation and characterization of three *TaYUC10* genes from wheat. *Gene.* 546(2): 187-194.
- Li W, Zhao X, Zhang X. (2015).** Genome-wide analysis and expression patterns of the *YUCCA* genes in maize. *J Genet Genom.* 42: 707-710.
- Li Z, Zhang J, Liu Y, Zhao J, Fu J, Ren X, Wang J. (2016).** Exogenous auxin regulates multi-metabolic network and embryo development, controlling seed secondary dormancy and germination in *Nicotiana tabacum* L. *BMC Plant Biol.* 16: 41.
- Lilley JLS, Gee CW, Sairanen I, Ljung K, Nemhauser JL. (2012).** An Endogenous Carbon-Sensing Pathway Triggers Increased Auxin Flux and Hypocotyl Elongation.

Plant Physiol. 160(4): 2261-2270.

Liu G, Gao S, Tian H, Wu W, Robert HS, Ding Z. (2016). Local transcriptional control of YUCCA regulates auxin promoted root-growth inhibition in response to aluminium stress in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 12: e1006360.

Liu H, Xie, WF, Zhang L, Valpuesta V, Ye ZW, Gao QH, Duan K. (2014). Auxin biosynthesis by the YUCCA6 flavin monooxygenase gene in woodland strawberry. *J Integr Plant Biol.* 56(4): 350-363.

Liu X, Zhang H, Zhao Y, Feng Z, Li Q, Yang HQ, He ZH. (2013). Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF- mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci.* 110(38): 15485-15490.

Liu F, Zhang L, Luo Y, Xu M, Fan Y, Wang L. (2016). Interactions of *Oryza sativa* OsCONTINUOUS VASCULAR RING-LIKE 1 (OsCOLE1) and OsCOLE1-INTERACTING PROTEIN reveal a novel intracellular auxin transport mechanism. *New Phytol.* 212: 96-107.

Ljung K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development.* 140: 943-50.

Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G. (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28(4): 465-474.

Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell.* 17: 1090-1104.

Ludwig-Muller J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot.* 62(6): 1757-1773.

Ma Q, Grones P, Robert S. (2017). Auxin signaling: A big question to be addressed by small molecules. *J Exp Bot.* 69: 313-328.

Maeda H, Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 63: 73-105.

Mano Y, Nemoto K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot.* 63: 2853-2872.

Mano Y, Nemoto K, Suzuki M, Seki H, Fujii I, Muranaka T. (2010). The *AMI1* gene family: indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot.* 61: 25-32.

- Maraschin FdosS, Memelink J, Offringa R. (2009).** Auxin-induced, SCF(TIR1)-mediated poly-ubiquitination marks AUX/IAA proteins for degradation. *Plant J.* 59: 100-109.
- Marsch-Martinez N, Greco R, Van Arkel G, Herrera-Estrella L, Pereira A. (2002).** Activation tagging using the *En-I* maize transposon system in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 129(4): 1544-1556.
- Martinez-Trujillo M, Limones-Briones V, Cabrera-Ponce JL, Herrera-Estrella L. (2004).** Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Mol Biol Rep.* 22(1): 63-70.
- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., et al. (2011).** The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci.* 108: 18512-18517.
- Matthes MS, Best NB, Robil JM, Malcomber S, Gallavotti A, McSteen P. (2019).** Auxin evodevo: conservation and diversification of genes regulating auxin biosynthesis, transport, and signaling. *Mol Plant.* 12: 298-320.
- Meinke D, Cherry J, Dean C, Rounsley S, Koornneef M. (1998).** *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science.* 282: 662-682.
- Meyer K, Leube MP, Grill E. (1994).** A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 264(5164): 1452-1455.
- Meyerowitz E. Pruitt R. (1985).** *Arabidopsis thaliana* and Plant Molecular Genetics. *Science.* 229: 1214-1218.
- Mironova VV, Omelyanchuk NA, Wiebe DS, Levitsky VG. (2014).** Computational analysis of auxin responsive elements in the *Arabidopsis thaliana* L. genome. *BMC Genomics* (Suppl 12). 15: S4.
- Mockaitis K, Estelle M. (2008).** Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 24: 55-80.
- Moss BL, Mao H, Guseman JM, Hinds TR, Hellmuth A, Kovenock M, Noorassa A, Lanctot A, Villalobos LI, Zheng N, et al. (2015).** Rate motifs tune auxin/indole-3-acetic acid degradation dynamics. *Plant Physiol.* 169: 803-813.

Nafisi M, Goregaoker S, Botanga CJ, Glawischnig E, Olsen CE, Halkier BA, Glazebrook J. (2007). *Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell*. 19: 2039-2052

Narukawa-Nara M, Nakamura A, Kikuzato K, Kakei Y, Sato A, Mitani Y, Yamasaki-Kokudo Y, Ishii T, Hayashi K, Asami T, Ogura T, Yoshida S, Fujioka S, Kamakura T, Kawatsu T, Tachikawa M, Soeno K, Shimada Y. (2016). Aminoxy-naphthylpropionic acid and its derivatives are inhibitors of auxin biosynthesis targeting I-tryptophan aminotransferase: structure-activity relationships. *Plant J*. 87: 245-257.

Nemoto K, Hara M, Suzuki M, Seki H, Muranaka T, Mano Y. (2009). The NtAMI1 gene functions in cell division of tobacco BY-2 cells in the presence of indole-3-acetamide. *FEBS Lett*. 583: 487-492.

Nishimura T, Matano N, Morishima T, Kakinuma C, Hayashi K, Komano T, Koshiha T. (2012). Identification of IAA Transport Inhibitors Including Compounds Affecting Cellular PIN Trafficking by Two Chemical Screening Approaches Using Maize Coleoptile Systems. *Plant Cell Physiol*. 53(10): 1671-1682.

Nishimura T, Hayashi K, Suzuki H, Gyohda A, Takaoka C, Sakaguchi Y, Matsumoto S, Kasahara H, Sakai T, Kato J, Kamiya Y, Koshiha T. (2014). Yucasin is a potent inhibitor of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis. *Plant J*. 77: 352-366.

Normanly J, Cohen JD, Fink GR. (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proc Natl Acad Sci*. 90: 10355-10359.

Mravec J, Skůpa P, Bailly A, Hoyerová K, Krecek P, Bielach A, Petrásek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof YD, Dobrev PI, Schwarzerová K, Rolcík J, Seifertová D, Luschnig C, Benková E, Zazimalová E, Geisler M, Friml J. (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*. 459: 1136-1140.

Olatunji D., Geelen D., Verstraeten I. (2017). Control of endogenous auxin levels in plant root development. *Int J Mol Sci*. 18: 2587.

Omelyanchuk NA, Kovrizhnykh VV, Oshchepkova EA, Pasternak T, Palme K, Mironova VV. (2016). A detailed expression map of the PIN1 auxin transporter in *Arabidopsis thaliana* root. *BMC Plant Biol*. 16(1): 5.

- Oono Y, Chen QG, Overvoorde PJ, Kohler C, Theologis A. (1998).** *age* Mutants of *Arabidopsis* exhibit altered auxin-regulated gene expression. *Plant Cell*. 10(10): 1649-1662.
- Pagnussat GC, Alandete-Saez M, Bowman JL, Sundaresan V. (2009).** Auxin-dependent patterning and gamete specification in the *Arabidopsis* female gametophyte. *Science*. 324: 1684-1689.
- Pan J, Zhao F, Zhang G, Pan Y, Sun L, Bao N, Qin P, Chen L, Yu J, Zhang Y, et al. (2019).** Control of *de novo* root regeneration efficiency by developmental status of *Arabidopsis* leaf explants. *J Genet Genom*. 46: 133-140.
- Pan L, Zeng W, Niu L, Lu Z, Liu H, Cui G, Wang Z. (2015).** *PpYUC11*, a strong candidate gene for the stony hard phenotype in peach (*Prunus persica* L. Batsch), participates in IAA biosynthesis during fruit ripening. *J Exp Bot*. 66(22): 7031-7044.
- Paponov IA, Paponov M, Teale W, Menges M, Chakrabortee S, Murray JA, Palme K. (2008).** Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in *Arabidopsis*. *Mol Plant*. 1: 321-337.
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF. (2007).** Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science*. 318: 113-116.
- Patten CL, Glick BR. (1996).** Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol*. 42: 207-220.
- Pencik A, Simonovik B, Petersson SV, Henyková E, Simon S, Greenham K, Zhang Y, Kowalczyk M, Estelle M, Zazimalová E, Novák O, Sandberg G, Ljung K. (2013).** Regulation of auxin homeostasis and gradients in *Arabidopsis* roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole 3-acetic acid. *Plant Cell*. 25: 3858-3870.
- Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA. (2006).** *Arabidopsis* ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *Plant Cell*. 18(8): 1887-1899.
- Pollmann S, Neu D, Weiler EW. (2003).** Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry*. 62: 293-300.

Pollmann S, Duchting P, Weiler EW. (2009). Tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis by 'IAA-synthase' proceeds via indole-3-acetamide. *Phytochemistry*. 70(4): 523-531.

Porco S, Pěňčík A, Rashed A, Voß U, Casanova-Sáez R, Bishopp A, Golebiowska A, Bhosale R, Swarup R, Swarup K, Peňáková P, Novák O, Staswick P, Hedden P, Phillips AL, Vissenberg K, Bennett MJ, Ljung K. (2016). Dioxygenase-encoding *AtDAO1* gene controls IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*. 113: 11016-11021.

Qin G, Gu H, Zhao Y, Ma Z, Shi G, Yang Y, Pichersky E, Chen H, Liu M, Chen Z, Qu LJ. (2005). An indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase regulates *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* 17: 2693-2704.

Rademacher EH, Lokerse AS, Schlereth A, Llavata-Peris CI, Bayer M, Kientz M, Freire Rios A, Borst JW, Lukowitz W, Jürgens G, et al. (2012). Different auxin response machineries control distinct cell fates in the early plant embryo. *Dev Cell*. 22: 211-222.

Ramon M, Rolland F, Thevelein JM, Van Dijck P, Leyman B. (2007). ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Mol Biol*. 63(2): 195-206.

Rampey RA, LeClere S, Kowalczyk M, Ljung K, Sandberg G, Bartel B. (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during *Arabidopsis* germination. *Plant Physiol*. 135: 978-988.

Ranocha P, Dima O, Nagy R, Felten J, Corratgé-Faillie C, Novák O, Morreel K, Lacombe B, Martinez Y, Pfrunder S, Jin X, Renou JP, Thibaud JB, Ljung K, Fischer U, Martinoia E, Boerjan W, Goffner D. (2013). *Arabidopsis* WAT1 is a vacuolar auxin transport facilitator required for auxin homeostasis. *Nat Commun*. 4: 2625.

Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A., Shapiro H., Nishiyama T., Perroud P.-F., Lindquist E.A., Kamisugi Y., et al. (2008). The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*. 319:64-69.

Robert HS, Grones P, Stepanova AN, Robles LM, Lokerse AS, Alonso JM, Weijers D, Friml J. (2013). Local auxin sources orient the apical-basal axis in *Arabidopsis* embryos. *Curr Biol*. 23: 2506-2512.

- Ruiz Rosquete M, Barbez E, Kleine-Vehn J. (2012).** Cellular Auxin Homeostasis: Gatekeeping Is Housekeeping. *Mol Plant.* 5(4): 772-786.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, Malamy J, Scheres B. (1999).** An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell.* 99(5): 463-472.
- Sairanen I, Novak O, Pencik A, Ikeda Y, Jones B, Sandberg G, Ljung K. (2012).** Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 24: 4907-4916.
- Sanchez-Carranza AP, Singh A, Steinberger K, Panigrahi K, Palme K, Dovzhenko A, Cristina Dal Bosco C. (2016).** Hydrolases of the ILR1like family of *Arabidopsis thaliana* modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Sci Rep.* 6: 24212.
- Sang YL, Cheng ZJ, Zhang XS (2016).** Endogenous auxin biosynthesis and *de novo* root organogenesis. *J Exp Bot.* 67: 4011-4013.
- Santner A, Estelle M. (2009).** Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature.* 459: 1071-1078.
- Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J. (2013).** Auxin: Simply complicated. *J Exp Bot.* 64: 2565-2577.
- Savaldi-Goldstein S, Baiga TJ, Pojer F, Dabi T, Butterfield C, Parry G, Chory J. (2008).** New auxin analogs with growth-promoting effects in intact plants reveal a chemical strategy to improve hormone delivery. *Proc Natl Acad Sci.* 105(39): 15190-15195.
- Schlauch NL. (2007).** Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox. *Trends Plant Sci.* 12: 412-418.
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. (2012).** NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9(7): 671-675.
- Shkolnik-Inbar D, Adler G, Bar-Zvi D. (2013).** ABI4 downregulates expression of the sodium transporter *HKT1;1* in *Arabidopsis* roots and affects salt tolerance. *Plant J.* 73(6): 993-1005.
- Shkolnik-Inbar D, Bar-Zvi D. (2010).** ABI4 mediates abscisic acid and cytokinin inhibition of lateral root formation by reducing polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 22(11): 3560-3573.

- Shkolnik-Inbar D, Bar-Zvi D. (2011).** Expression of *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 4* (*ABI4*) in developing *Arabidopsis* seedlings. *Plant Signal Behav.* 6(5): 694-696.
- Shu K, Chen Q, Wu Y, Liu R, Zhang H, Wang P, Xie Q. (2016).** ABI4 mediates antagonistic effects of abscisic acid and gibberellins at transcript and protein levels. *Plant J.* 85(3): 348-361.
- Shu K, Zhang H, Wang S, Chen M, Wu Y, Tang S, Xie Q. (2013).** ABI4 Regulates Primary Seed Dormancy by Regulating the Biogenesis of Abscisic Acid and Gibberellins in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 9(6): e1003577.
- Shuai H, Meng Y, Luo X, Chen F, Zhou W, Dai Y, Shu K. (2017).** Exogenous auxin represses soybean seed germination through decreasing the gibberellin/abscisic acid (GA/ABA) ratio. *Sci Rep.* 7(1): 12620.
- Simon S, Skůpa P, Viaene T, Zwiewka M, Tejos R, Klíma P, Čarná M, Rolčik J, De Rycke R, Moreno I, Dobrev PI, Orellana A, Zažímalová E, Friml J. (2016).** PIN6 auxin transporter at endoplasmic reticulum and plasma membrane mediates auxin homeostasis and organogenesis in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 211: 65-74.
- Smalle J, Vierstra RD. (2004).** The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol.* 55: 555-590.
- Soderman EM, Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR. (2000).** Regulation and function of the *Arabidopsis* ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiol.* 124(4): 1752-1765.
- Sohlberg JJ, Myrenas M, Kuusk S, Lagercrantz U, Kowalczyk M, Sandberg G, Sundberg E. (2006).** STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant J.* 47(1): 112-123.
- Spalding EP. (2013).** Diverting the downhill flow of auxin to steer growth during tropisms. *Am J Bot.* 100(1): 203-214.
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W. (2005).** Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17: 616-627.
- Ståldal V, Sohlberg JJ, Eklund DM, Ljung K, Sundberg E. (2008).** Auxin can act independently of CRC, LUG, SEU, SPT and STY1 in style development but not apical-basal patterning of the *Arabidopsis* gynoecium. *New Phytologist.* 180(4): 798-808.

- Stepanova AN, Yun J, Robles LM, Novak O, He W, Guo H, Ljung K, Alonso JM. (2011).** The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *Plant Cell*. 23: 3961-3973.
- Stone SL, Braybrook SA, Paula SL, Kwong LW, Meuser J, Pelletier J, Hsieh TF, Fischer RL, Goldberg RB, Harada JJ. (2008).** *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 105: 3151-3156.
- Strader LC, Culler AH, Cohen JD, Bartel B. (2010).** Conversion of endogenous indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid drives cell expansion in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiol*. 153: 1577-1586.
- Sun J, Qi L, Li Y, Chu J, Li C. (2012).** PIF4-mediated activation of *YUCCA8* expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating *Arabidopsis* hypocotyl growth. *PLoS Genet*. 8: e1002594.
- Sugawara S, Hishiyama S, Jikumaru Y, Hanada A, Nishimura T, Koshiba T, Zhao Y, Kamiya Y, Kasahara H. (2009).** Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*. 106: 5430-5435.
- Suzuki H, Yokawa K, Nakano S, Yoshida Y, Fabrissin I, Okamoto T, Baluska F, Koshiba T. (2016).** Root cap-dependent gravitropic U-turn of maize root requires light-induced auxin biosynthesis via the YUC pathway in the root apex. *J Exp Bot*. 67: 4581-4591.
- Szemenyei H, Hannon M, Long J. (2008).** TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science*. 319: 1384-1386.
- Szerszen JB, Szczyglowski K, Bandurski RS. (1994).** *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science* 265: 1699-1701.
- Takahashi K, Hayashi K, Kinoshita T. (2012).** Auxin Activates the Plasma Membrane H⁺-ATPase by Phosphorylation during Hypocotyl Elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 159(2): 632-641.
- Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N. (2007).** Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature*. 446: 640-645.

- Tanaka K, Hayashi K, Natsume M, Kamiya Y, Sakakibara H, Kawaide H, Kasahara H. (2014).** UGT74D1 catalyzes the glucosylation of 2-oxindole-3-acetic acid in the auxin metabolic pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 55: 218-228.
- Tang LP, Zhou C, Wang SS, Yuan J, Zhang XS, Su YH. (2017).** FUSCA3 interacting with LEAFY COTYLEDON2 controls lateral root formation through regulating *YUCCA4* gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 213(4): 1740-1754.
- Teale W., Paponov I. y Palme K. (2006).** Auxin in action: Signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 847-859.
- Thimann KV. (1937).** On the Nature of Inhibitions Caused by Auxin. *Am J Bot.* 24(7): 407-412.
- Thole JM, Beisner ER, Liu J, Venkova SV, Strader LC. (2014).** Abscisic acid regulates root elongation through the activities of auxin and ethylene in *Arabidopsis thaliana*. *G3 (Bethesda).* 4(7): 1259-1274.
- Thomson K, Hertel R, Miller S. (1973).** 1-N-naphthylphthalamic acid and 2,3,5-triodobenzoic acid: in-vitro binding to particulate cell fractions and action on auxin transport in corn coleoptiles. *Planta.* 109: 337-52.
- Tivendale N, Davies N, Molesworth P, Davidson S, Smith J, Lowe E, Reid J, Ross J. (2010).** Reassessing the role of N-hydroxytryptamine in auxin biosynthesis. *Plant Physiol.* 154: 1957-1965.
- Tobeña-Santamaria R, Bliiek M, Ljung, K, Sandberg G, Mol JN, Souer E, Koes R. (2002).** FLOOZY of petunia is a flavin mono-oxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture. *Genes Dev.* 16(6): 753-763.
- Tognetti VB, Van Aken O, Morreel K, Vandenbroucke K, van de Cotte B, De Clercq I, Van Breusegem F. (2010).** Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates *Arabidopsis* architecture and water stress tolerance. *Plant Cell.* 22(8): 2660-2679.
- Topping JF, Liu J, Lindsey K. (2016).** Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist.* 211(1): 225-239.

- Trigueros M, Navarrete-Gomez M, Sato S, Christensen SK, Pelaz S, Weigel D, Ferrandiz C. (2009).** The *NGATHA* genes direct style development in the *Arabidopsis* gynoecium. *Plant Cell*. 21(5): 1394-1409.
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ. (1997).** Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell*. 9(11): 1963-1971.
- Vallon O. (2000).** New sequence motifs in flavoproteins: Evidence for common ancestry and tools to predict structure. *Proteins*. 38: 95-114.
- Vanstraelen M, Benková, E. (2012).** Hormonal Interactions in the Regulation of Plant Development. *Annu Rev Cell and Dev Biol*. 28(1): 463-487.
- Vernoux T, Brunoud G, Farcot E, Morin V, Van den Daele H, Legrand J, Oliva M, Das P, Larrieu A, Wells D, et al. (2011).** The auxin signalling network translates dynamic input into robust patterning at the shoot apex. *Mol Syst Biol*. 7: 508.
- Verslues PE, Zhu JK. (2007).** New developments in abscisic acid perception and metabolism. *Curr Opin Plant Biol*. 10(5): 447-452.
- Vieten A, Vanneste S, Wiśniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Friml J. (2005).** Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development*. 132(20): 4521-4531.
- Wang W, Xu B, Wang H, Li J, Huang H, & Xu L. (2011a).** *YUCCA* genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. *Plant Physiol*. 157(4): 1805-1819.
- Wang L, Hua D, He J, Duan Y, Chen Z, Hong X, Gong Z. (2011b).** Auxin Response Factor2 (ARF2) and its regulated homeodomain gene *HB33* mediate abscisic acid response in *Arabidopsis*. *PLoS Genet*. 7(7): e1002172.
- Wang B, et al. Wang B, Chu J, Yu T, Xu Q, Sun X, Yuan J, Xiong G, Wang G, Wang Y, Li J. (2015).** Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci*. 112: 4821-4826.
- Wang H, Cheng H, Wang W, Liu J, Hao M, Mei D, Zhou R, Fu L, Hu Q. (2016).** Identification of *BnaYUCCA6* as a candidate gene for branch angle in *Brassica napus* by QTL-seq. *Sci Rep*. 6: 38493.

- Wang W, Gu L, Ye S, Zhang H, Cai C, Xiang M, Gao Y, Wang Q, Lin C, Zhu Q. (2017).** Genome-wide analysis and transcriptomic profiling of the auxin biosynthesis, transport and signaling family genes in moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *BMC Genom.* 18: 870.
- Wang Y, Liu H, Wang S, Li H. (2017).** Genome-wide identification and expression analysis of the *YUCCA* gene family in soybean (*Glycine max* L.) *Plant Growth Regul.* 81: 265-275.
- Wang Y, Yang W, Zuo Y, Zhu L, Hastwell AH, Chen L, Tian Y, Su C, Ferguson BJ, Li X. (2019).** *GmYUC2a* mediates auxin biosynthesis during root development and nodulation in soybean. *J Exp Bot.* 70: 3165-3176.
- Weigel D, Ahn J, Blazquez M, Borevitz J, Christensen S, Fankhauser C, Ferrandiz C, Kardailsky I, Malancharuvil E, Neff M, Nguyen J, Sato S, Wang Z, Xia Y, Dixon R, Harrison M, Lamb C, Yanofsky M, Chory J. (2000).** Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 1003-1013.
- Weissbach H, King W, Sjoerdsma A, Udenfriend S. (1959).** Formation of indole-3-acetic acid and tryptamine in animals: a method for estimation of indole-3-acetic acid in tissues. *J Biol Chem.* 234: 81-86.
- Westfall CS, et al. Westfall CS, Sherp AM, Zubieta C, Alvarez, Schraft E, Marcellin R, Ramirez L, Jez JM. (2016).** *Arabidopsis thaliana* GH3.5 acyl acid amido synthetase mediates metabolic crosstalk in auxin and salicylic acid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci.* 113: 13917-13922.
- Weyers J, Patterson N. (2001).** Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytol.* 152: 375-407.
- Wind JJ, Peviani A, Snel B, Hanson J, Smeekens SC. (2013).** ABI4: versatile activator and repressor. *Trends Plant Sci.* 18(3), 125-132.
- Won C, Shen X, Mashiguchi K, Zheng Z, Dai X, Cheng Y, Kasahara H, Kamiya Y, Chory J, Zhao Y. (2011).** Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci.* 108: 18518-18523.
- Woo YM, Park HJ, Su'udi M, Yang JI, Park JJ, Back K, Park YM, An G. (2007).** *Constitutively wilted 1*, a member of the rice *YUCCA* gene family, is required for

maintaining water homeostasis and an appropriate root to shoot ratio. *Plant Mol. Biol.* 65: 125-136.

Woodward C, Bemis SM, Hill EJ, Sawa S, Koshiba T, Torii KU. (2005). Interaction of Auxin and ERECTA in Elaborating *Arabidopsis* Inflorescence Architecture Revealed by the Activation Tagging of a New Member of the YUCCA Family Putative Flavin Monooxygenases. *Plant Physiol.* 139(1): 192-203.

Wright AD, Sampson MB, Neuffer MG, Michalczuk L, Slovin JP, Cohen JD. (1991). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science.* 254: 998-1000.

Xiong L, Zhu JK. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 133(1): 29-36.

Yamamoto Y, Kamiya N, Morinaka Y, Matsuoka M, Sazuka T. (2007). Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. *Plant Physiol.* 143(3): 1362-1371.

Yan S, Che G, Ding L, Chen Z, Liu X, Wang H, Zhang X. (2016). Different cucumber CsYUC genes regulate response to abiotic stresses and flower development. *Sci Rep.* 6: 20760.

Ye X, Kang BG, Osburn LD, Li Y, Zong-Ming C. (2009). Identification of the flavin-dependent monooxygenase-encoding YUCCA gene family in *Populus trichocarpa* and their expression in vegetative tissues and in response to hormone and environmental stresses. *Plant Cell Tiss Org.* 97: 271-283.

Zenser N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J. (2001). Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 98: 11795-11800.

Zhang Z, Li Q, Li Z, Staswick PE, Wang M, Zhu Y, He Z. et al. (2007). Dual regulation role of GH3.5 in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis*-*Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiol.* 145: 450-464.

Zhang R, Wang B, Ouyang J, Li J, Wang Y. (2008). *Arabidopsis* indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. *J Integr Plant Biol.* 50: 1070-1077.

Zhao Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu Rev Plant Biol.* 61: 49-64.

- Zhao Y. (2012).** Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Mol Plant.* 5(2): 334-338.
- Zhao Y. (2018).** Essential Roles of Local Auxin Biosynthesis in Plant Development and in Adaptation to Environmental Changes. *Annu Rev Plant Biol.* 69: 417-435.
- Zhao Y, Christensen SK, Fankhauser C, Cashman JR, Cohen JD, Weigel D, Chory J. (2001).** A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science.* 291(5502): 306-309.
- Zhao Y. Hull AK, Gupta NR, Goss KA, Alonso J, Ecker JR, Normanly J, Chory J, Celenza JL. (2002).** Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.* 16: 3100-3112.
- Zheng Z, Guo Y, Novák O, Dai X, Zhao Y, Ljung K, Noel JP, Chory J. (2013).** Coordination of auxin and ethylene biosynthesis by the aminotransferase VAS1. *Nat Chem Biol.* 9: 244-246.
- Zheng L, Zhang L, Duan K, Zhu ZP, Ye ZW, Gao QH. (2016).** YUCCA type auxin biosynthesis genes encoding flavin monooxygenases in melon: Genome-wide identification and developmental expression analysis. *S Afr J Bot.* 102: 142-152.
- Zolman BK, Martinez N, Millius A, Adham AR, Bartel B. (2008).** Identification and characterization of *Arabidopsis* indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. *Genetics* 180: 237-251.
- Zubieta C, Ross JR, Koscheski P, Yang Y, Pichersky E, Noel JP. (2003).** Structural basis for substrate recognition in the salicylic acid carboxyl methyltransferase family. *Plant Cell* 15: 1704-1716.

9. PRODUCTOS ADICIONALES.

9.1. Artículo de investigación indizado: Chromium differentially affects hydrogen peroxide distribution in primary and adventitious roots of *Arabidopsis thaliana* L.

Aceptado en la revista *Phyton*.

Chromium Differentially Affects Hydrogen Peroxide Distribution in Primary and Adventitious Roots of *Arabidopsis thaliana* L.

Aarón Giovanni Munguía-Rodríguez^{1,2}, José López-Bucio¹, Gerardo Rangel Sánchez^{1,2}, León Francisco Ruiz-Herrera¹, Yazmín Carreón-Abud², Miguel Martínez-Trujillo^{2,*}

¹Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, C. P. 58030, Morelia, Michoacán, México.

²Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio R, Ciudad Universitaria, C. P. 58030 Morelia, Michoacán, México.

*Corresponding Author: Miguel Martínez-Trujillo. Email: codigogenetico@gmail.com.

Abstract: The post-embryonic growth of the *Arabidopsis thaliana* root system can be modified by different types of stress, such as sublethal concentrations of metals, which may induce the production of reactive oxygen species (ROS). In this study, the effects of different concentrations of potassium chromate (K_2CrO_4) on the distribution and relative quantity of hydrogen peroxide (H_2O_2) were determined in primary and adventitious roots in *A. thaliana* HyPer line seedlings. This line has a biosensor that specifically reports H_2O_2 levels within tissues as fluorescence. Primary root growth was inhibited at $100 \mu M$ Cr (VI); in contrast, adventitious root formation was induced over the main root growth axis. These structures proliferated from 100 - $160 \mu M$ Cr (VI), and much higher concentrations (180 - $200 \mu M$) of K_2CrO_4 were required to affect their growth. The H_2O_2 distributions were observed in the columella and lateral root cap of primary roots of plants grown in medium lacking dichromate, but following the development of toxicity symptoms, H_2O_2 changed its distribution to the meristem and differentiation zones. Conversely, adventitious roots had comparable H_2O_2 distribution patterns in untreated plants and those exposed to Cr (VI) supplementation. Thus, differential H_2O_2 distribution correlates with the resistance of adventitious roots, but not primary roots, to dichromate and underlies cell reorganization at the apex to support growth.

Keywords: Chromate; hydrogen peroxide; root growth; meristem; ion toxicity; adaptation

1 Introduction

The sessile nature of plants, coupled with changing environmental conditions, enabled regulatory mechanisms to be established during evolution, allowing plants to generate diverse adaptive responses to survive. These responses may include changes in growth and development, adjustments in metabolism, and modifications of gene expression [1]. Because the root is the organ responsible for the uptake of nutrients and water, local cues sensing may induce profound changes in root morphology [2].

In dicotyledonous plants, such as *Arabidopsis thaliana*, a primary root is developed from the embryo. Its growth depends on a group of stem cells with intense mitotic activity located at the apex that gives rise to all tissues, including the vasculature, pericycle, endodermis, cortex, epidermis, lateral root cap and the columella [3]. Gradually, lateral roots are formed, which extends soil exploration for water and nutrient acquisition and allows an improved anchorage to the substrate [4,5]. Lateral roots are derived from the pericycle, an inner cell layer surrounding the vascular tissues of the primary root, through reactivation of the cell cycle, giving rise to a primordium that emerges and grows and retains a similar organization to the primary root [6-8]. Occasionally, adventitious roots can be formed, which are roots developed from the stem upon genetic cues or as responses to damage or hormonal or environmental stimuli [9-11].

The root system architecture (RSA) consists of the spatial arrangement of different root types and determines the volume of soil that a plant can exploit [12-14]. For example, primary root growth is inhibited and lateral root formation is stimulated in media with low phosphate concentrations, which involves a tight interrelation with iron nutrition, auxin response and mitogen-activated protein kinase signaling [15-18].

Nonessential elements, such as chromium (Cr), lead (Pb) and arsenic (As), among others, can be found in the biosphere in the form of ions that interact in many ways with biological systems. Chromium is the seventh most abundant element in the earth and is found at highly variable concentrations in the soil [19,20]. However, its utilization in the automotive industry and leather tanning has increased its concentration, and it has become an important contaminant [21,22]. The most stable and abundant forms of Cr are the trivalent Cr (III) and the hexavalent Cr (VI) forms, whereas the other valence states are unstable and short-lived in biological systems [23]. Cr (VI) can react with oxygen, forming chromate (CrO_4^{2-}) or dichromate ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) oxyanions, whereas Cr (III) can form oxides or hydroxides [24]. The toxicity of Cr is mainly related to the reduction of Cr (VI) to Cr (III) in the cytoplasm, both by enzymatic and nonenzymatic reactions, leading to unstable intermediaries that produce reactive oxygen species (ROS) [25]. In addition, Cr (III) affects cell functions by binding the DNA phosphate backbone and carboxyl and sulfhydryl groups in proteins [26].

The effects of Cr (VI) in plants include the inhibition of germination, shoot and root growth restriction, and leaf chlorosis, drastically compromising plant productivity [19,22]. The maximum allowed limit of Cr (VI) in the soil for agricultural purposes in Mexico is 280 mg kg^{-1} [27]. To unravel the molecular mechanisms of Cr toxicity, previous reports employed the model plant *A. thaliana*, showing that phenotypic modifications depended upon metal concentration and the auxin response mediated by the *IAA14/SOLITARY ROOT* gene [28,29]. Of note, Cr (VI) affected iron (Fe), sulfur (S) and phosphorus (P) uptake, and its toxic effects could be reverted by application of sulphate or phosphate, suggesting that membrane protein transporters of these macronutrients may also internalize chromate [30].

The incomplete reduction of molecular oxygen in aerobic organisms generates highly reactive derivatives, such as superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and the hydroxyl radical (OH^\cdot), collectively known as reactive oxygen species (ROS) [31]. ROS are produced as byproducts during mitochondrial electron transport or by oxidoreductase enzymes and metal catalyzed oxidations, and ROS excess can lead to protein denaturation and lipid peroxidation. In addition, ROS can react with redox-sensitive signaling proteins under physiological conditions, acting as second messengers by mediating cellular signal transduction [31]. The mechanisms that maintain ROS at an adequate cellular level include the antioxidants ascorbic acid and glutathione as well as ROS-detoxifying enzymes, such as superoxide dismutases (SODs), which transform O_2^- to H_2O_2 following its conversion to H_2O by catalases (CATs) [32,33]. Chromium promotes the expression of genes encoding ROS-detoxifying enzymes in *A. thaliana* [28] and rice [34], opening the possibility of ROS acting as mediators of metal toxicity.

The superoxide anion is neither membrane-permeable nor long-lasting in cells, whereas H_2O_2 is considerably more stable and can cross the plasma membrane, thus functioning as a long-range cell-to-cell signal [36]. The higher stability of H_2O_2 is useful for analyzing its levels in root tissues, especially when using the *A. thaliana* HyPer transgenic line, which harbors a highly specific molecular biosensor for H_2O_2 [36,37].

To better understand the ROS mechanisms that underlie the responses of the root system to Cr (VI), H_2O_2 distribution was analyzed in *A. thaliana* primary and adventitious roots using the HyPer transgenic line. The results unravel the differential sensitivity of the primary and adventitious roots to Cr (VI) that correlates with H_2O_2 levels in growth zones.

2 Materials and Methods

2.1 Plant Material

In this study, we used plants of *A. thaliana* expressing HyPer, a biosensor for intracellular H_2O_2 .

Hyper consists of a *circularly* permuted YFP (cpYFP) inserted into the regulatory domain of the *Escherichia coli* H₂O₂-binding protein (OxyR). H₂O₂ shifts the excitation peak of cpYFP from 420 to 500 nm, while the emission peak remains unchanged at 516 nm. Because Hyper is reversibly modified, it is possible to register increases and decreases in H₂O₂ levels and its distribution in plant tissues [36,38].

2.2 Plant Growth Conditions

Seeds were treated superficially with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% chloride solution for 7 min, washed five times with sterile distilled water and refrigerated in the dark at 4°C for 48 h. Seeds were sown in Petri dishes with 0.2x MS medium [39], at pH 5.7, with plant agar 1% (w/v) (Phytotechnology Laboratories) and sucrose 0.6%. Media were supplemented with different K₂CrO₄ concentrations, referred to as Cr (VI). Petri plates were placed vertically to avoid root penetration into the media and to facilitate seedling analysis. Plates were incubated in a plant growth chamber (Percival AR-95 L) with a 16 h light /8 h dark photoperiod and a light intensity of 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at 23°C.

2.3 Analysis of Fluorescence

Before confocal analysis, seedlings with intact root systems were incubated in propidium iodide solution at 10 mg ml⁻¹ for 3 min. A confocal microscope (Olympus FV1000) was used with a filter wheel to switch between two different excitation wavelengths, 440 nm for the H₂O₂-independent signal and 495 nm for the H₂O₂-dependent signal, and all emission spectra were registered using an emission filter at 530/20 nm; the two images were merged to produce the final image. Fluorescence was measured by calculating the green pixels in an area consisting of 100 cells above the apex using ImageJ software. Means calculated from control conditions were given a value of 1, and the means corresponding to treatments were adjusted relative to control, and thus were referred to as relative fluorescence.

2.4 Statistical Analysis

Averages and confidence intervals were calculated using the Microsoft Office Excel 2010 program. Analysis of variance (ANOVA) and Tukey significance tests were performed using the statistical software SPSS 19.0 for Windows ($p < 0.05$) [40].

3 Results

3.1 Effect of Cr (VI) on Primary Root and Adventitious Root Growth in Hyper Seedlings

To determine the effect of Cr (VI) on H₂O₂ distribution and its correlation with the growth and development of primary and adventitious roots, the *A. thaliana* HyPer line was used. The HyPer seedlings report H₂O₂ levels and distribution with higher precision than techniques based on chemical approaches. Seeds of the HyPer line were germinated under *in vitro* conditions, and plants were grown for 10 days after germination in media with different Cr (VI) concentrations. Primary root growth was stimulated by 30% in 20-40 μM Cr (VI) when compared to the control; adventitious roots were not developed in media with 20-80 μM Cr (VI) and in controls without the metal. Adventitious roots were formed in media with 100-200 μM Cr (VI); in parallel, primary root growth was inhibited by 90% at 100 μM Cr (VI). In each plant, one or two adventitious roots were developed, and when their length was determined, it was found that one was longer than the other. In 100-120 μM Cr(VI), the adventitious root growth was approximately 70% of the primary root of the control plants, whereas in 140-160 μM Cr(VI), the growth was reduced to 30%; in 180-200 μM Cr(VI), growth was almost completely inhibited Fig. 1.

Supplementation of ascorbic acid stimulated primary root growth, in contrast with the ROS-producing agent paraquat, which had an inhibitory effect Fig. 1. Thus, the root system architecture of *A. thaliana* was modified by exposition to Cr (VI), ranging from stimulation of primary root growth under low Cr (VI) concentrations to growth inhibition upon increased Cr (VI) supplementation; concomitantly, adventitious root formation was stimulated, likely as an adaptive response.

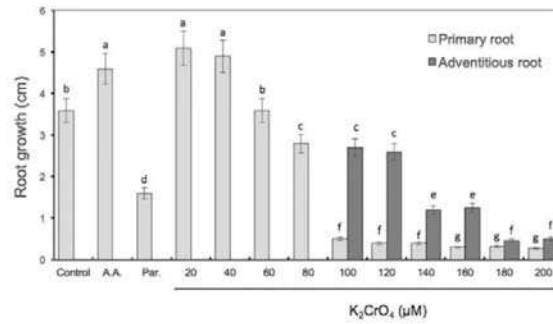


Figure 1: Effects of Cr (VI) on the growth of primary and adventitious roots of *A. thaliana*. Seeds of the *A. thaliana* HyPer line were germinated, and plants were grown for 10 days in MS media supplemented with ascorbic acid (A. A.) and paraquat (Par) treatments, included for comparison, or increasing concentrations of K_2CrO_4 . The confidence interval is indicated for $\alpha = 0.05$. The different letters indicate significant differences with the Tukey test ($p < 0.05$; $n = 30$). The experiment was repeated 3 times with similar results.

3.2 Effect of Cr (VI) on H_2O_2 Distribution in Primary and Adventitious Roots

Paraquat and ascorbic acid increased or decreased, respectively, the fluorescence in the root, consistent with the reports that these compounds modify the amounts of ROS, including H_2O_2 , thus confirming the reliability of our system using the HyPer transgenic line. In plants grown in media without Cr (VI), H_2O_2 was detected in the columella and lateral root cap cells in the primary root. This pattern was conserved in plants grown in media with 20-60 μM Cr (VI), while H_2O_2 distribution was extended to the elongation zone at 80 μM Cr (VI) Fig. 2. In 100 μM Cr (VI) or higher concentrations, the H_2O_2 distribution was extended to the elongation and differentiation zone, which correlated with the disorganization of the root apex Figs. 2 and 3.

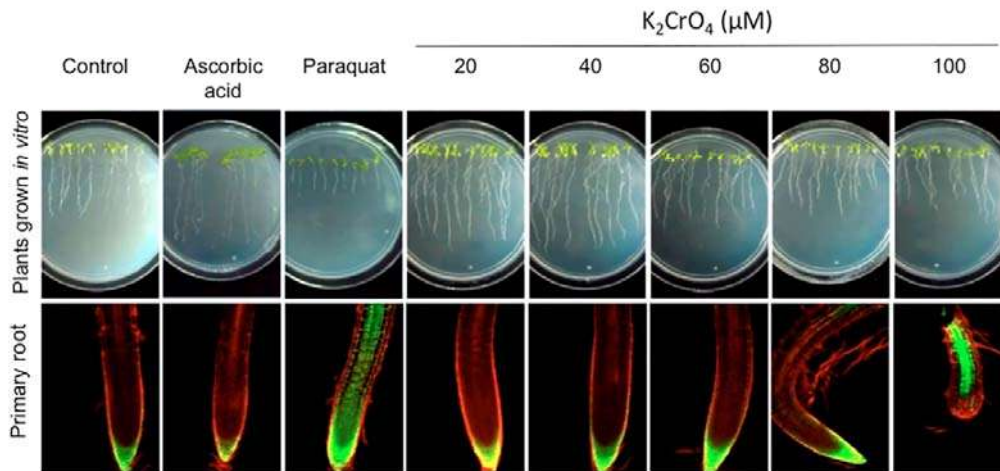


Figure 2: Effect of Cr (VI) on the H_2O_2 distribution in the primary root of *A. thaliana*. Seeds of the HyPer line of *A. thaliana* were sown and grown for 10 days in media supplemented with ascorbic acid, paraquat or increasing concentrations of K_2CrO_4 . Roots were analyzed, and H_2O_2 distribution was determined as described in the Materials and Methods section. Photographs are representative of 10 plants analyzed. The experiment was repeated 3 times with similar results.

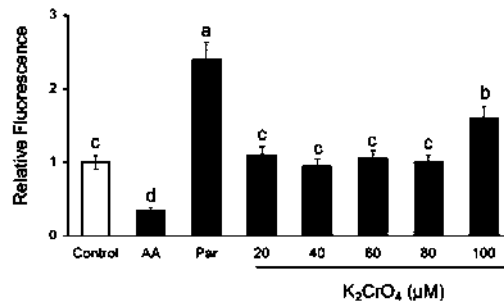


Figure 3: Effect of Cr (VI) on the hydrogen peroxide quantity in the primary root of the *A. thaliana* HyPer line. Fluorescence was measured by quantifying pixels in an area consisting of 100 cells above the apex using ImageJ software. The confidence interval is indicated for alpha = 0.05. The different letters indicate significant differences with the Tukey test ($p < 0.05$; $n = 3$). The experiment was repeated 3 times with similar results

The adventitious roots formed in plants grown in media supplied with 100-200 µM Cr (VI) showed H₂O₂ distribution in columella and lateral root cap cells, comparable to the primary root of control plants (Fig. 4). However, inhibition of adventitious root growth required higher Cr (VI) supplementation (180-200 µM), and the cell organization in the apex was less affected than that in primary roots. In addition, the amount of fluorescence did not decrease at higher Cr (VI) concentrations (Fig. 5). These data indicate that primary and lateral roots differ in not only their sensitivity to Cr (VI) but also H₂O₂ distribution, which coincides with changes in root tip integrity.

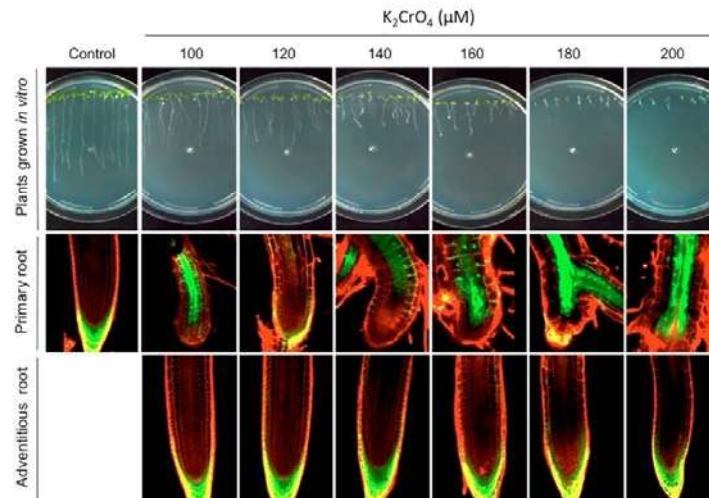


Figure 4: Effect of Cr (VI) on the H₂O₂ distribution in the primary root and adventitious roots of *A. thaliana*. Seeds of the *A. thaliana* HyPer line were sown and grown for 10 days in media with ascorbic acid, paraquat or increasing concentrations of K₂CrO₄. Adventitious roots were analyzed by confocal microscopy, and fluorescence distribution was determined as described in the Materials and Methods section. Photographs are representative of 10 plants analyzed. The experiment was repeated 3 times with similar results.

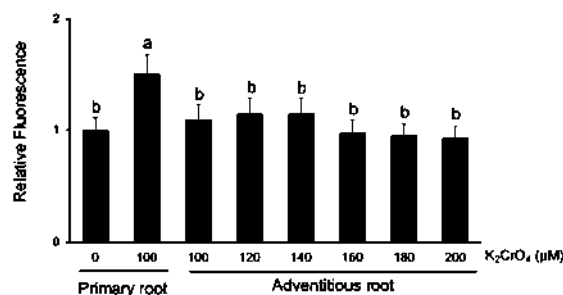


Figure 5: Effect of Cr (VI) on the relative hydrogen peroxide quantity in adventitious roots of the *A. thaliana* HyPer line. Fluorescence was measured using ImageJ software by quantifying pixels in an area consisting of 100 cells above the apex in primary and adventitious roots. The confidence interval is indicated for $\alpha = 0.05$. Different letters indicate significant differences with the Tukey test ($p < 0.05$; $n = 3$). The experiment was repeated 3 times with similar results.

4 Discussion

The primary root growth inhibition by Cr (VI) analyzed in this study and reported previously [41] seems to be a general response to different stressing factors, such as low nutrient availability [42] or sublethal concentrations of metals [43]. Here, we showed that Cr (VI) not only inhibited primary root growth, but one or two adventitious roots were simultaneously developed from the hypocotyl. Those roots were able to grow in media with 100-160 μM Cr (VI) and their growth was delayed at higher Cr (VI) concentrations. Accordingly, when *A. thaliana* seedlings were germinated and grown in darkness, primary root growth stopped at day six and adventitious roots were generated; this process needed sucrose or glucose as an energetic source [44]. These results suggest that in *A. thaliana*, adventitious root formation likely occurs as response to tolerate the stress caused by an effect on photosynthesis resulting from either Cr (VI) or darkness to maintain a functional root system. This hypothesis may explain why adventitious roots presented higher tolerance to stress, including maintenance of the normal cell organization at the root apex.

Primary roots displayed a higher concentration of superoxide anion and a lower H_2O_2 concentration in the meristem; the inverse distribution already occurs in the differentiation zone [45]. Furthermore, by experimentally decreasing H_2O_2 in the elongation zone, cell differentiation was delayed, which correlates with the higher H_2O_2 concentration during cell differentiation (op. cit.). This is consistent with our results showing changes in H_2O_2 distribution and quantity in the primary roots of plants grown in media supplemented with 100 μM Cr (VI) or higher concentrations; thus, the increased levels of H_2O_2 in the meristem may be related to the path to differentiation. The inhibition of primary root growth of *A. thaliana* and the decrease in meristem size could be detected following exogenous H_2O_2 application [46].

Modification in the H_2O_2 distribution by cellular uptake of Cr (VI) would be explained by the combined action of glutathione transferase and superoxide dismutase enzymes that produce H_2O_2 [47,48]. This notion is consistent with the transcriptional induction of three genes encoding peroxidases in *A. thaliana* plants exposed to Cr (VI) [28].

We previously demonstrated that supplementation of 100-200 μM Cr (VI) caused root system modifications related to the distribution of the auxin hormone and two of its polar transporters (PIN1 and PIN2). In that case, adventitious roots showed normal expression of auxin transporters, while primary roots were highly sensitive and halted their growth [29]; furthermore, when adventitious root growth was inhibited in the higher Cr (VI) concentration (200 μM), the auxin response still remained, which is comparable to the Cr (VI) effect on H_2O_2 distribution found in this study. Notably, modification of the H_2O_2 patterns occurred in primary roots but not in adventitious roots, which is reminiscent of their different sensitivity/tolerance to Cr (VI) and possibly other environmental stressors. It is necessary to speculate that either the auxin response

induced the shift from cell division to differentiation via ROS, or oxidative stress following metal exposure caused alterations in auxin response and/or transport. Tsukagoshi et al. [45] demonstrated that the induction of ROS-detoxifying enzymes in *A. thaliana* is independent of auxin and cytokinin signaling. This response implies that Cr (VI) has possibly modified the H₂O₂ distribution independently of auxin, but the disturbance in both auxin responsiveness and endogenous H₂O₂ then leads to the inhibition of primary root growth upon loss of meristem activity. Regarding the latter hypothesis, it has been reported that exogenous H₂O₂ inhibits primary root growth and decreases the expression levels of the auxin transporters PIN1 and PIN2, and, as a consequence, the normal distribution of auxin cannot be accomplished [49]; thus, the primary messenger during root sensing of Cr (VI) would be a ROS-derived signal.

5 Conclusions

Taken together, our results support the following findings: i) in root system responses to Cr (VI) exposition, changes in the H₂O₂ distribution may explain the growth inhibition of the primary root and the cell disorganization at the apex, and ii) the generated adventitious roots are more tolerant to Cr (VI), being able to maintain normal H₂O₂ homeostasis. We conclude that adventitious roots are more tolerant to Cr (VI), likely via a ROS-detoxifying mechanism, protecting macromolecules from damage and improving plant survival.

References

1. Atkinson, N. J., Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany*, 63, 3523-3543.
2. Smith, S., De Smet, I. (2012). Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 367, 1441-1452.
3. Aichinger, E., Komet, N., Friedrich, T., Laux, T. (2012). Plant stem cell niches. *Annual Review of Plant Biology*, 6, 615-636.
4. Fukaki, H., Tameda, S., Masuda H., Tasaka M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 29, 153-168.
5. Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benkova, E., Swarup, R. et al. (2009). *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science*, 14, 399-408.
6. Malamy, J. E., Benfey P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 124, 33-44.
7. Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell and Environment*, 28, 67-77.
8. Stoeckle, D., Thellmann, M., Vermeer, J. E. M. (2018). Breakout-lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology*, 41, 67-72.
9. Bellini, C., Pacurar, D., Perrone, I. (2014). Adventitious roots and lateral roots: similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 639-666.
10. Velocchia, A., Fattorini, L., Rovere, F. D., Sofo, A., D'Angeli, S. et al. (2016). Ethylene and auxin interaction in the control of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 67, 6445-6458.
11. Lakehal, A., Bellini, C. (2019). Control of adventitious root formation: insights into synergistic and antagonistic hormonal interactions. *Physiologia Plantarum*, 165, 90-100.
12. Osmont, K. S., Sibout, R., Hardtke, C. S. (2007). Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 93-113.
13. Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarch, S., Lucas, M. et al. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science*, 18, 450-458.
14. Moite H., Vanneste, S., Beeckman, T. (2019). Molecular and environmental regulation of root development. *Annual Review of Plant Biology*, 70, 465-488.

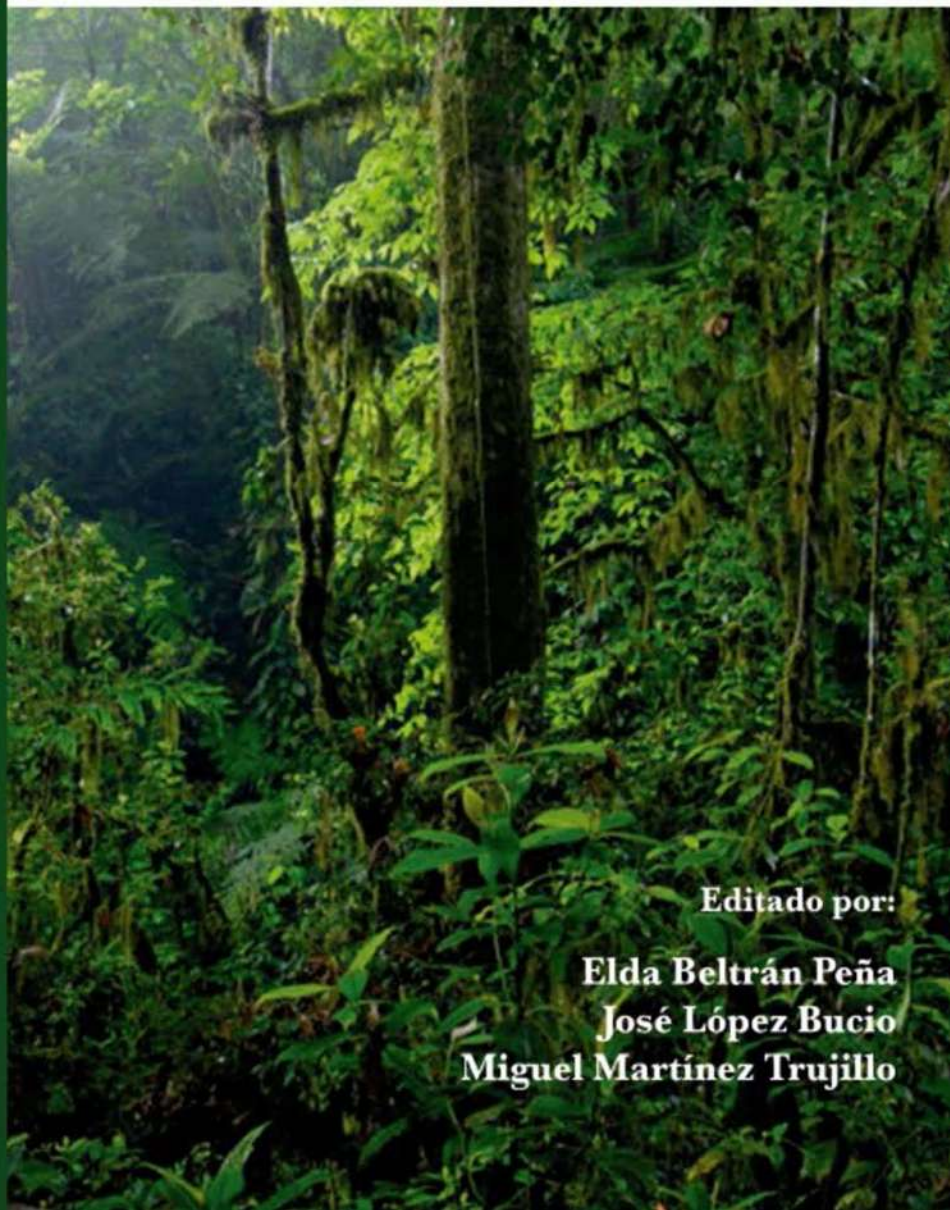
15. López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M. F., Simpson, J. et al. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology*, *129*, 244-256.
16. Sánchez-Calderón, L., López-Bucio, J., Chacón-López, A., Cruz-Ramírez, A., Nieto-Jacobo, M. F. et al. (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *46*, 174-184.
17. Pérez-Torres C. A., López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S. et al. (2008). Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell*, *20*, 3258-3272.
18. López-Bucio, J. S., Salmerón-Barrera, G. J., Ravelo-Ortega, G., Raya-González, J., León, P. et al. (2019). Mitogen-activated protein kinase 6 integrates phosphate and iron responses for indeterminate root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* doi.org/10.1007/s00425-019-03212-4.
19. Shanker, A. K., Cervantes, C., Loza-Tavera, H., Avudainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environmental International*, *31*, 739-753.
20. Shahid, M., Shamshad, S., Rafiq, M., Khalid, S., Bibi, I. et al. (2017). Chromium speciation, bioavailability, uptake, toxicity and detoxification in soil-plant system: a review. *Chemosphere*, *178*, 513-533.
21. Armienta-Hernández, M. A., Rodríguez-Castillo, R. (1995). Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, Mexico. *Environmental Health Perspectives*, *103*, 47-51.
22. Sinha, V., Pakshirajan, K., Chaturvedi, R. (2018). Chromium tolerance, bioaccumulation and localization in plants: an overview. *Journal of Environmental Management*, *206*, 715-730.
23. Shupack, S. I. (1991). The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environmental Health Perspectives*, *92*, 7-11.
24. Shanker, A. K., Djanaguiraman, M., Sudhagar, R., Chandrashekar, C. N., Pathmanabhan, G. (2004). Differential antioxidative response of ascorbate glutathione pathway enzymes and metabolites to chromium speciation stress in green gram (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek. cv CO4) roots. *Plant Science*, *166*, 1035-1043.
25. Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Tavera, H. L. et al. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, *25*, 335-347.
26. Cervantes, C., Campos-García, J. (2007). Reduction and efflux of chromate in bacteria. In: Nies DH, Silver S (Eds.) *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. Springer-Verlag, Berlin.
27. Sieve, C. (2004). *Norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004*. Concentraciones de remediación de suelos contaminados.
28. Martínez-Trujillo, M., Méndez-Bravo, A., Ortiz-Castro, R., Hernández-Madrigal, F., Ibarra-Laclette, E. et al. (2014). Chromate alters root system architecture and activates expression of genes involved in iron homeostasis and signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, *86*, 35-50.
29. López-Bucio, J., Ortiz-Castro, R., Ruiz-Herrera, L. F., Vargas-Juárez, C., Hernández-Madrigal, F. et al. (2015). Chromate induces adventitious root formation via auxin signaling and SOLITARY ROOT/IAA14 gene function in *Arabidopsis thaliana*. *Biomaterials*, *28*, 353-365.
30. López-Bucio, J., Hernández-Madrigal, F., Cervantes, C., Ortiz-Castro, R., Carreón-Abud, Y. et al. (2014). Phosphate relieves chromium toxicity in *Arabidopsis thaliana* plants by interfering with chromate uptake. *Biomaterials*, *27*, 363-370.
31. Noctor, G., Reichheld, J. P., Foyer, C. H. (2017). ROS-related redox regulation and signaling in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology*: S1084-9521(17)30246-X.
32. Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. G. et al. (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends in Plant Science*, *16*, 300-309.
33. Karuppanapandian, T., Moon, J. C., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W. (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Australian Journal of Crop Sciences*, *5*, 709-725.
34. Dubey, S., Misra, P., Sanjay, S., Chatterjee, S., Bag, S. K. et al. (2010). Transcriptomic and metabolomics shifts in rice roots in response to Cr (VI) stress. *BMC Genomics*, *11*, 648-667.
35. Allan, A. C., Fluhr, R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell*, *9*, 1559-1572.

36. Hernández-Barrera, A., Quinto, C., Johnson, E. A., Wu, H. M., Chung, A.Y. et al. (2013). Using HyPer as a molecular probe to visualize hydrogen peroxide in living plant cells. *Methods in Enzymology*, 527, 275-290.
37. Hernández-Barrera, A., Velarde-Buendía, A., Zepeda, I., Sánchez, F., Quinto, C. et al. (2015) Hyper, a hydrogen peroxide sensor, indicates the sensitivity of the Arabidopsis root elongation zone to aluminum treatment. *Sensors (Basel)*, 15, 855-867.
38. Belousov, V. V., Fradkov, A. F., Lukyanov, K. A., Staroverov, D. B., Shakhbazov, K. S. et al. (2006). Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature Methods*, 3, 281-286.
39. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
40. Altman, D. G. (1991) *Practical statistics for medical research*. pp. 210-211, Chapman and Hall, London.
41. Ortiz-Castro, R., Martínez-Trujillo, M., López-Bucio, J., Cervantes, C., Dubrovsky, J. (2007). Effects of dichromate on growth and root system architecture of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Science*, 172, 684-691.
42. López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 280-287.
43. Potters, G., Pasternak, P. T., Guisez, Y., Palmé K. J., Jansen, A. K. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*, 12, 98-105.
44. Takahashi, F., Sato-Nara, K., Kobayashi, K., Suzuki, M., Suzuki, H. (2003). Sugar-induced adventitious roots in Arabidopsis seedlings. *Journal of Plant Research*, 116, 83-91.
45. Tsukagoshi, H., Busch, W., Benfey, P. N. (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell*, 143, 606-616.
46. Mabuchi, K., Makia, H., Itayab, T., Suzuki, T., Nomoto, M. et al. (2018). MYB30 links ROS signaling, root cell elongation and plant immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 115(20), E4710-E4719.
47. Hopkins, Z. (2016). Superoxide in biology and medicine: an overview. *ROS*, 1, 103-109.
48. Hu, G., Zheng, P., Feng, H., Jia, G. (2017). Imbalance of oxidative and reductive species involved in chromium (VI) -induced toxic effects. *Reactive Oxygen Species*, 3, 1-11.
49. Zhou, L., Hou, H., Yang, T., Lian, Y., Sun, Y. et al. (2018). Exogenous hydrogen peroxide inhibits primary root gravitropism by regulating auxin distribution during Arabidopsis seed germination. *Plant Physiology and Biochemistry*, 128, 126-133.

9.2. Capítulo de libro. Vías de señalización de las hormonas vegetales.

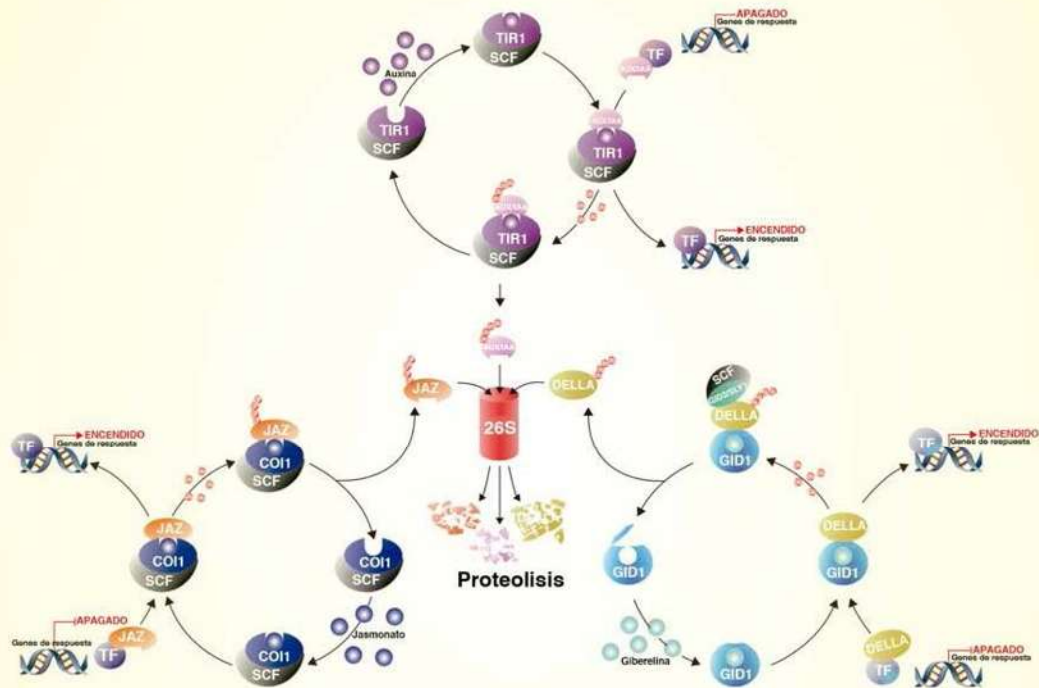
FRONTERAS EN LA BIOLOGÍA: SEÑALIZACIÓN Y COMUNICACIÓN DE LAS PLANTAS

Fronteras en la biología: señalización y comunicación de las plantas



Editado por:

**Elda Beltrán Peña
José López Bucio
Miguel Martínez Trujillo**



CAPÍTULO 1

Vías de señalización de las hormonas vegetales

Vías de señalización de las hormonas vegetales

Aarón G. Munguía Rodríguez, José López Bucio, Miguel Martínez Trujillo y Elda Beltrán Peña

La regulación del crecimiento y desarrollo vegetal, se lleva a cabo por un grupo de moléculas estructuralmente diversas denominadas fitohormonas. Durante las últimas décadas se han hecho grandes avances en la comprensión de la percepción y los mecanismos de acción de estas fitohormonas, utilizando principalmente a *Arabidopsis thaliana* como planta modelo. Aunque algunas respuestas hormonales no están necesariamente relacionadas con la regulación génica, todas las fitohormonas están implicadas en la modulación de la expresión de genes controlando la abundancia o actividad de factores o represores transcripcionales a través de modificaciones post-traduccionales. En este capítulo se ofrece un panorama simple, actual y comparativo de los mecanismos de la percepción hormonal y de las vías de señalización posteriores que conducen a la regulación de la expresión génica en respuesta al estímulo hormonal en las plantas.

Introducción

Debido a su estilo de vida sésil las plantas deben integrar diversos estímulos tanto bióticos como abióticos para responder al ambiente siempre cambiante y sobrevivir. Entre los factores bióticos se encuentran los organismos polinizadores, herbívoros, patógenos, parásitos, simbiosites y otras plantas, mientras que los abióticos incluyen: la gravedad, la luz, el viento, la temperatura, los gases, la humedad ambiental, el pH del suelo y la disponibilidad de agua y nutrientes. Todos estos factores son percibidos por las plantas como señales externas, que junto con las internas (péptidos y metabolitos) convergen en la activación de moléculas pequeñas derivadas del metabolismo secundario conocidas como fitohormonas, fitoreguladores, hormonas vegetales o reguladores del crecimiento vegetal. Las fitohormonas son percibidas por receptores capaces de activar rutas de señalización que finalizan en la expresión de genes específicos, dando como resultado una respuesta fisiológica en la planta. Los investigadores han utilizado plantas modelo para dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen a la acción de las fitohormonas, considerando inicialmente los efectos que cada fitohormona produce por su aplicación exógena a las plantas. Recientemente, se han descifrado algunos de los mecanismos detrás de la acción de las fitohormonas, mediante el análisis molecular y bioquímico de mutantes alteradas en la biosíntesis, transporte, metabolismo y respuesta hormonal, complementados con los estudios de expresión génica y la identificación de genes blanco. Los biólogos vegetales han estado investigando desde hace tiempo la capacidad reguladora de las fitohormonas con el propósito de manipular los niveles o respuestas hormonales para mejorar las características vegetales deseadas. A la fecha se han identificado varias moléculas que actúan como fitohormonas: auxinas, ácido jasmónico (JA), ácido giberélico (GA), estrigolactonas (SL), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), citocininas (CK), brasinosteroides (BR), etileno (ET), óxido nítrico (NO), karrikinas (KAR), poliaminas y algunos péptidos reconocidos ahora como una nueva familia de hormonas vegetales (Pandey *et al.*, 2016). En el presente capítulo se revisarán los descubrimientos recientes de nueve familias de fitohormonas, en las cuales se han caracterizado los receptores y las vías de señalización implicadas en su función (Fig. 1).

1. La actividad de las auxinas, del JA, el GA, las SL, el ABA y el SA comprende la señalización a través de receptores citoplasmáticos y/o nucleares

1.1. Funciones del complejo SCF

El complejo SCF está formado por las proteínas: S-PHASE KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 1 (SKP1), CULLIN 1 (CUL1), RING BOX PROTEIN 1 (RBX1) y una F-Box ligasa E3 de ubiquitina que controla la ubiquitinación de proteínas en organismos eucariotes (Dharmasiri y Estelle, 2004). La ubiquitina es un polipéptido que al unirse covalentemente a las proteínas las marca para su degradación por el complejo macromolecular denominado proteosoma; en este complejo se degradan las proteínas mal formadas, dañadas o innecesarias. Tal proceso de degradación selectivo es vital en el control del ciclo celular, la regulación transcripcional, la respuesta a patógenos, la fotomorfogénesis, la regulación de la estructura de la cromatina, las respuestas a cambios ambientales y la señalización hormonal (Vierstra, 2009). En la ubiquitinación participan tres clases de enzimas que actúan secuencialmente para añadir una o varias unidades de ubiquitina a una proteína blanco. El proceso comienza cuando una enzima activadora de ubiquitina E1, une la glicina del C-terminal de la ubiquitina a una de sus cisteínas. Posteriormente, la ubiquitina es transferida a la conjugasa E2 y finalmente la ubiquitina es unida a la proteína blanco mediante la ligasa E3, que también recluta a la proteína sustrato (Smalle y Vierstra, 2004). En *Arabidopsis*, se han descrito dos enzimas E1, treinta y siete E2 y más de ciento cuarenta E3 (Vierstra, 2009).

1.2. Vía de señalización de las auxinas y del ácido jasmónico (JA)

El estudio de las auxinas es uno de los campos más antiguos de la investigación en plantas, en 1880 Charles y Francis Darwin al estudiar el fenómeno de fototropismo descubrieron una señal que al transportarse desde el ápice de la planta hacia el tallo, era capaz de provocar una flexión de la plántula hacia la fuente de iluminación. Esta señal se identificó posteriormente como la auxina ácido indol-3-acético (AIA), la primera hormona vegetal conocida que se sintetiza a partir del triptófano. Las auxinas están involucradas en prácticamente todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas incluyendo la embriogénesis, organogénesis, los patrones tisulares, las respuestas trópicas a la luz y gravedad, el mantenimiento de

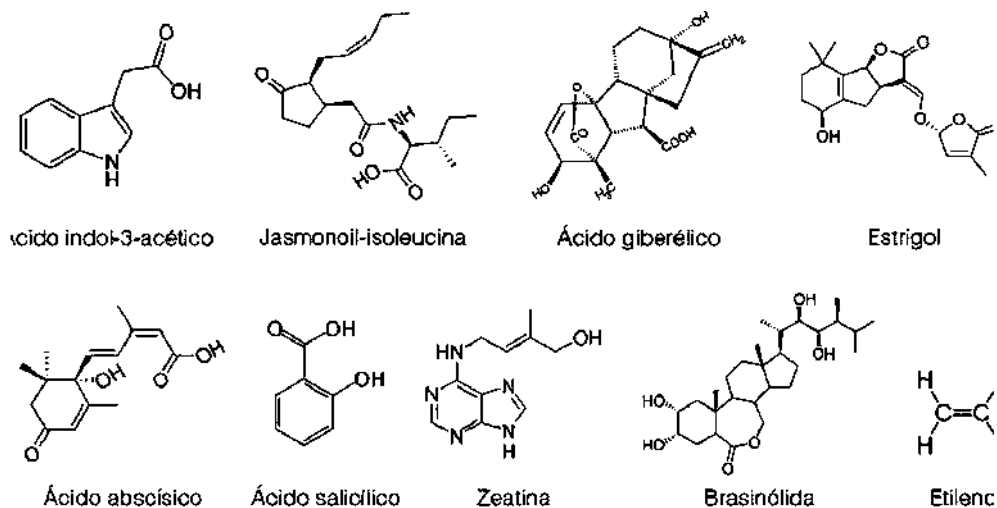


Figura 1. Estructura química de los principales fitorreguladores vegetales.

la dominancia apical, la formación vascular, la emergencia de los órganos laterales del brote y el desarrollo de las raíces laterales y adventicias (Woodward y Bartel, 2005). El JA y sus derivados conocidos colectivamente como jasmonatos regulan numerosos procesos fisiológicos como las respuestas a heridas, la síntesis de metabolitos secundarios y la defensa contra los estreses bióticos y abióticos (Wasternack y Hause, 2013).

Los jasmonatos se sintetizan a partir de ácidos grasos tri-insaturados provenientes de la membrana de los plástidos, donde se lleva a cabo la primera parte de su síntesis, y después de varias reacciones enzimáticas, el producto se transfiere a los peroxisomas donde finaliza la biosíntesis del JA. El JA puede ser transformado a metil jasmonato, un compuesto volátil que se difunde por contacto o con ayuda del aire a otras partes de la planta o a plantas cercanas para alertar sobre una amenaza. Otros metabolitos del JA son los conjugados, siendo el jasmonoil-isoleucina (Ja-Ile) el principal jasmonato que es percibido por su receptor (Fonseca *et al.*, 2009).

Las auxinas y el JA tienen una ruta de señalización notablemente similar, donde el IAA y el JA actúan como un "pegamento molecular" entre las proteínas receptoras y los co-receptores que actúan además como represores transcripcionales (Tan *et al.*, 2007; Sheard *et al.*, 2010) (Fig. 2). En *Arabidopsis* se han reportado seis receptores para las auxinas localizados en el núcleo: TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR

RESPONSE 1) y las AFB1/2/3/4/5 (AUXIN SIGNALLING F-BOX PROTEIN 1, 2, 3, 4 y 5), mientras que para los jasmonatos sólo existe el receptor nuclear COI1 (CORONATINE INSENSITIVE 1), los cuales son proteínas F-box que forman parte de los complejos SCF^{TIR1/AFB5} y SCF^{COI1}. Los represores transcripcionales en la señalización de las auxinas están codificados por la familia de genes conocidos como *Aux/IAA* (AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID PROTEINS), mientras que los represores del JA son miembros de la familia *JAZ* (JASMONATE ZIM DOMAIN) (Gray *et al.*, 2001; Thines *et al.*, 2007). Las proteínas *Aux/IAA* regulan negativamente la actividad de los factores de transcripción ARF (AUXIN RESPONSE FACTORS), mientras que las *JAZ* reprimen entre otros, a los factores bHLH (BASIC HELIX-LOOP-HELIX) (Ulmasov *et al.*, 1997; Lorenzo *et al.*, 2004). En *Arabidopsis* existen 23 ARFs, algunos de ellos se clasifican como activadores transcripcionales, mientras que otros funcionan como represores en la ruta de señalización las auxinas (Guilfoyle y Hagen, 2007). Los blancos de las proteínas *JAZ* de *Arabidopsis* son los factores de transcripción: MYC2/3/4 (MYELOCYTOMATOSIS PROTEIN 2, 3 y 4), MYB21/24 (MYELOBLASTOSIS PROTEIN 21 y 24), TT8 (TRANSPARENT TESTA 8), GLABRA1 (GL1), GL3 y EGL3 (ENHANCER OF GLABRA3) entre otros, que interactúan con *JAZ* y regulan las respuestas al JA (Pérez y Goossens, 2013).

En ausencia de la señal hormonal, las proteínas Aux/IAA y JAZ reprimen la transcripción con la asistencia del co-represor transcripcional TOPLESS (TPL) (Long *et al.*, 2006). Las Aux/IAAs y algunas JAZ pueden reclutar directamente al co-represor TPL, mientras que otros JAZ requieren interactuar con otras proteínas como NINJA (NOVEL INTERACTOR OF JAZ) (Pauwels *et al.*, 2010). Los represores Aux/IAA y JAZ no se unen a sus fitohormonas respectivas, sino que interactúan con los receptores TIR1 y COI1 a través de un dominio específico. Cuando los niveles de auxinas y JA aumentan en la célula, estas moléculas se unen al complejo receptor, estabilizando de esta manera la unión de los complejos SCF^{TIR1/AFB1} y SCF^{COI1} con las proteínas Aux/IAAs y JAZ respectivamente, lo que permite la poliubiquitinación de los represores y su posterior degradación por el proteosoma,

liberando así a los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes de respuesta a auxinas y JA (Dos Santos Maraschin *et al.*, 2009) (Fig. 2).

1.3. Señalización del ácido giberélico (GA) y las estrigolactonas (SL)

La principal giberelina es el GA o giberelina A3, que estructuralmente es un ácido diterpénico tetracíclico identificado originalmente como una toxina fúngica de *Gibberella fujikuroi* causante del alargamiento inusual de los brotes del arroz. El GA se sintetiza en el meristemo apical y se transporta a la raíz a través del floema; este fitorregulador promueve la germinación de la semilla, la división y elongación celular, el alargamiento del tallo, la iniciación floral así como el establecimiento y desarrollo del fruto (Yamaguchi, 2008). Por otra parte, las SL son lactonas terpenoides derivadas de

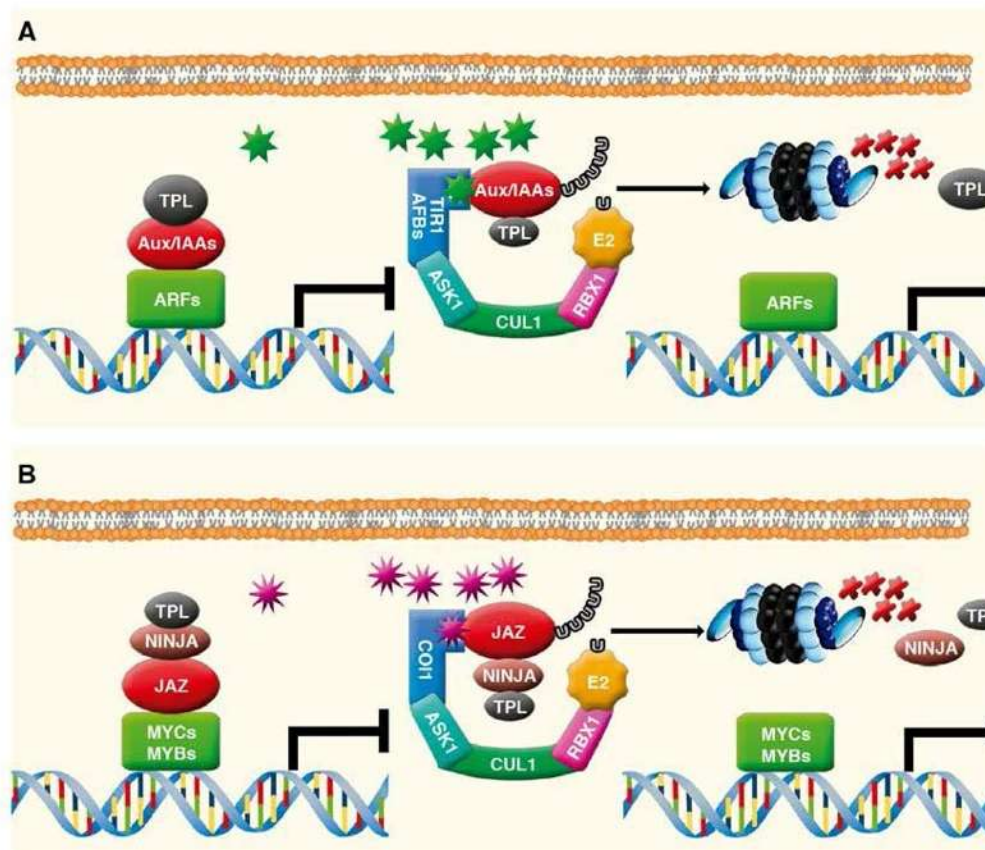


Figura 2. Vías de señalización (A) de las auxinas y (B) de los jasmonatos. Ambas rutas presentan receptores que forman parte del complejo SCF, el cual dirige la degradación de los represores transcripcionales para así liberar a los factores de transcripción que regulan la expresión de genes de respuesta para cada hormona.

los carotenoides, que se identificaron por primera vez en exudados de la raíz de diferentes especies que promueven la germinación de las plantas parasitarias del género *Striga*. Se ha reportado que estas fitohormonas también estimulan la ramificación de las hifas en hongos micorrízicos arbusculares permitiendo la simbiosis con micorrizas (Al-Babili y Bouwmeester, 2015).

Mientras que los receptores de auxinas y JA son proteínas F-Box que forman parte de un complejo proteico, los receptores y las proteínas F-Box en la señalización del GA y de las SL se encuentran separados (Fig. 3). Las vías de señalización de estos dos fitoreguladores implican interacciones proteína-proteína adicionales, especialmente a

través de proteínas adaptadoras que conducen a la rápida degradación de las proteínas blanco a través del complejo SCF. Como la mayor parte de las investigaciones sobre la señalización del GA y de las SL se realizaron en arroz, los genes y su función fueron primeramente reportados en este cultivo, aunque los genes homólogos ya se han descrito en *Arabidopsis*. El GA es percibido por el receptor soluble localizado en el núcleo, GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1), mientras que D14 (DWARF14) es el único receptor de las SL hasta ahora identificado. En *Arabidopsis* existen tres genes *GID1* homólogos (*GID1a*, *GID1b* y *GID1c*) y al menos un homólogo del receptor de las SL, también denominado

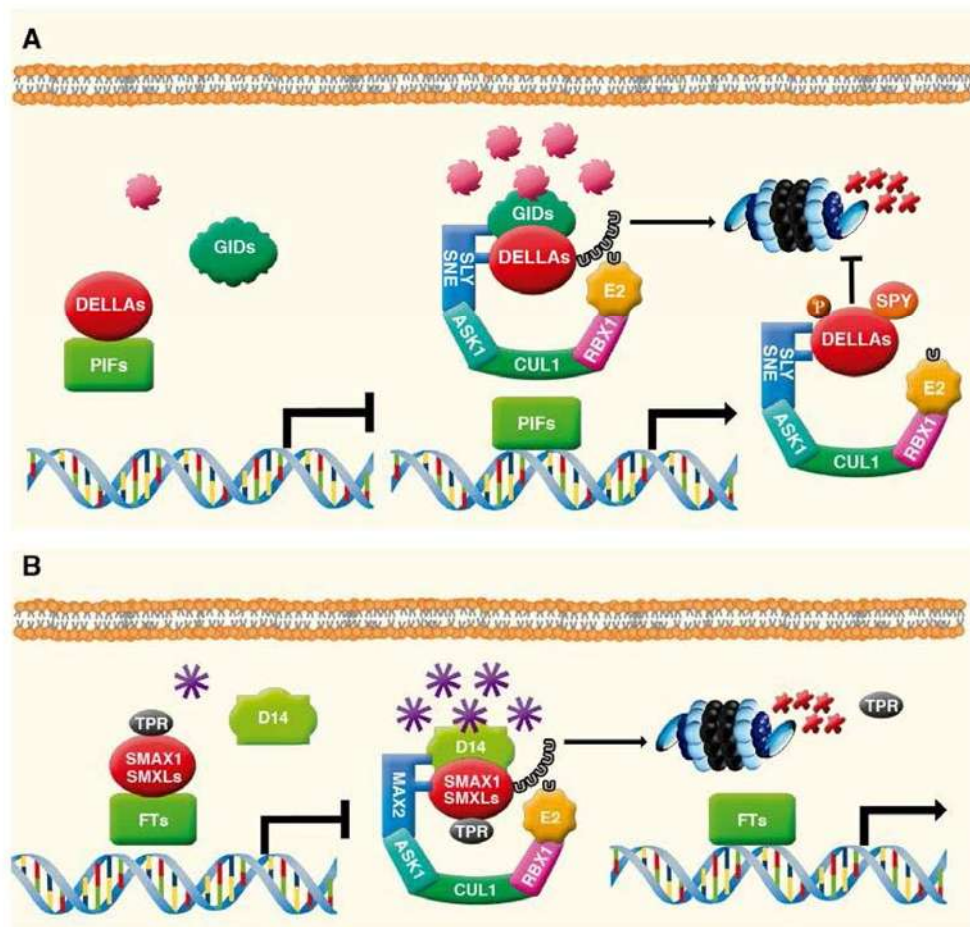


Figura 3. Rutas de señalización (A) de las giberelinas y (B) las estrigolactonas. Sus receptores no forman parte de un complejo SCF, pero al unirse con la hormona son capaces de interactuar con el complejo de ubiquitinación y los represores transcripcionales para facilitar su degradación. Los nombres de las proteínas son los reportados en *Arabidopsis thaliana*.

DWARF14 (Ueguchi-Tanaka *et al.*, 2005; Nakamura *et al.*, 2013). Se ha demostrado que el acoplamiento del GA con GID1 promueve un cambio conformacional que permite la interacción directa de GID1 con la proteína DELLA (D-E-L-L-A DOMAIN) denominada SLENDER RICE 1 (SLR1) que funciona como un represor en la vía de señalización del GA (Sasaki *et al.*, 2003). El complejo GID1-GA-SLR1 interactúa con la proteína F-Box GID2 (GIBBERELIN INSENSITIVE DWARF 2), desencadenando la ubiquitinación de SLR1 por SCF^{GID2} y su posterior degradación vía proteosoma (Fig. 3A). Después de la degradación de los represores DELLA, varios efectores de la señalización del GA, como los PIF (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS) se unen al DNA para modular la expresión de los genes de respuesta al GA (Feng *et al.*, 2008). En este aspecto, la expresión génica inducida por el GA es similar a la de auxinas y del JA, debido a que todas ellas degradan a sus respectivos represores transcripcionales a través de la vía ubiquitina-proteosoma. Por otra parte, aunque todavía existe una gran cantidad de eventos por dilucidar en la señalización de las SL, la unión de estos fitoreguladores al receptor D14, permite al complejo SL-D14 interactuar con la ligasa D3 (DWARF3) y con el represor nuclear D53 (DWARF53), el cual está unido al co-represor TPR (TOPLESS-RELATED PROTEIN). Esta interacción induce la poliubiquitinación de D53 por el complejo SCF^{D3} y su degradación por el proteosoma, lo que conduce a la activación de factores de transcripción (FTs) que controlan los genes de respuesta a las SL (Fig. 3B). En *Arabidopsis* se ha descrito un gen homólogo para D3: *MAX2* (*MORE AXILLARY BRANCHES 2*), y ocho homólogos para D53 conocidos como: *SMAX1* (*SUPPRESSOR OF MAX2 1*) y *SXML2/3/4/5/6/7/8* (*SMAX1 LIKE 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8*) (Jiang *et al.*, 2013). Además, es importante señalar que las karrikinas (KAR) que son compuestos químicos encontrados en el humo generado por la combustión de materia vegetal, promueven la germinación de las semillas en varias especies, incrementan la respuesta de las plántulas de *Arabidopsis* a la luz y mejoran el vigor de los cultivos. El receptor putativo de las KAR, *KAI2* (*KARRIKIN INSENSITIVE2*), es una hidrolasa cercanamente relacionada al receptor D14 de las SL, e interesantemente la señal de ambas hormonas depende de la actividad de *MAX2*, por lo que es clave establecer los demás elementos blanco de *MAX2*, para dilucidar las

diferencias en los mecanismos de señalización entre las SL y las KAR (Soundappan *et al.*, 2015).

1.4. Señalización del ácido abscísico (ABA)

El ABA es una molécula derivada de los carotenoides, y desempeña un papel importante en la abscisión de órganos, la germinación, el control de la dormancia de las semillas, el crecimiento de los brotes, la emergencia de las raíces laterales, la apertura de los estomas y la respuesta a estreses bióticos y abióticos, sobre todo en sequía (De Smet *et al.*, 2006). Cuando las raíces perciben una disminución de la humedad del suelo, se induce la biosíntesis de ABA en el meristemo de la raíz y su transporte a las hojas donde estimula su síntesis en los tejidos vasculares. Las concentraciones elevadas de ABA en las hojas inducen el cierre de los estomas (Cutler *et al.*, 2010), mientras que los niveles basales de ABA son necesarios para mantener el crecimiento normal de las raíces, sin embargo, a concentraciones altas actúa como un inhibidor del crecimiento (De Smet *et al.*, 2006).

La percepción y señalización del ABA es compleja, debido a que utiliza varios receptores, algunos unidos a la membrana plasmática mientras que otros se localizan en el citosol o el núcleo (Fig. 4). Actualmente, la vía de percepción del ABA mejor caracterizada involucra a una familia de receptores solubles núcleo/citoplasmáticos conocidos como PYR/PYL/RCARs (PYRABACTIN RESISTANCE/PYRABACTIN RESISTANCE-LIKE/REGULATORY COMPONENT OF ABA RECEPTOR) (Cutler *et al.*, 2010). Cuando los niveles de ABA son bajos, la fosfatasa PP2C (PROTEIN PHOSPHATASES TYPE 2C) mantiene a la cinasa SnRK (SNF1-RELATED KINASES) desfosforilada e inactiva (Rodríguez *et al.*, 1998), mientras que cuando los niveles aumentan, la hormona se une a los PYR/PYL/RCARs, con lo cual reprime la señalización negativa de PP2C. La inactivación de PP2C conduce a la acumulación de la SnRK fosforilada, que a su vez activa a los factores de transcripción bZIP (BASIC LEUCINE ZIPPER), los cuales regulan la expresión de genes en respuesta al ABA que incluye entre otros a: *ABRE* (*ABA-RESPONSIVE PROMOTER ELEMENTS*), *ABF* (*ABA BINDING FACTORS*), *AREB* (*ABA RESPONSE ELEMENT BINDING*), *SLAC1* (*SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1*) y *KATI* (*POTASSIUM CHANNEL IN Arabidopsis thaliana 1*) (Fujii *et al.*, 2009).

El ABA también puede unirse al receptor *ABAR/CHLH* (*ABA RECEPTOR/H*

SUBUNIT OF THE CHLOROPLAST Mg^{2+} CHELATASE) localizado en el cloroplasto (Shen *et al.*, 2006) y a los receptores GTG1 y GTG2 (GPCR TYPE G PROTEIN 1 y 2) de la membrana plasmática (Pandey *et al.*, 2009). La unión de ABA a ABAR/CHLH recluta en el núcleo a las proteínas WRKY40, WRKY18 y WRKY60 que pertenecen a la familia W-R-K-Y DOMAIN, reguladores negativos de la señalización del ABA, lo que ocasiona la activación de los factores de transcripción de respuesta al ABA, entre los que se encuentran: ABI5 (ABA INSENSITIVE 5), ABI4 y ABF4 (Shang *et al.*, 2010). Los receptores de membrana GTG1 y GTG2 presentan

actividad GTPasa y su unión con el ABA se ve potenciada por GDP, la proteína GPA1 (G PROTEIN ALPHA SUBUNIT 1), la cual interactúa con dichos receptores, reprimiendo su actividad GTPasa pero no la unión del ABA (Pandey *et al.*, 2016). Se ha sugerido que GTG1 y GTG2 regulan la respuesta a ABA mediante la modulación de la actividad de canales iónicos, sin embargo, los componentes de señalización río abajo de esta vía no se han identificado (Geiger *et al.*, 2009). Además, se ha implicado a la proteína AIP2 (ABI3 INTERACTING PROTEIN2), en la señalización del ABA, en la degradación mediada por el proteosoma. También se ha reportado

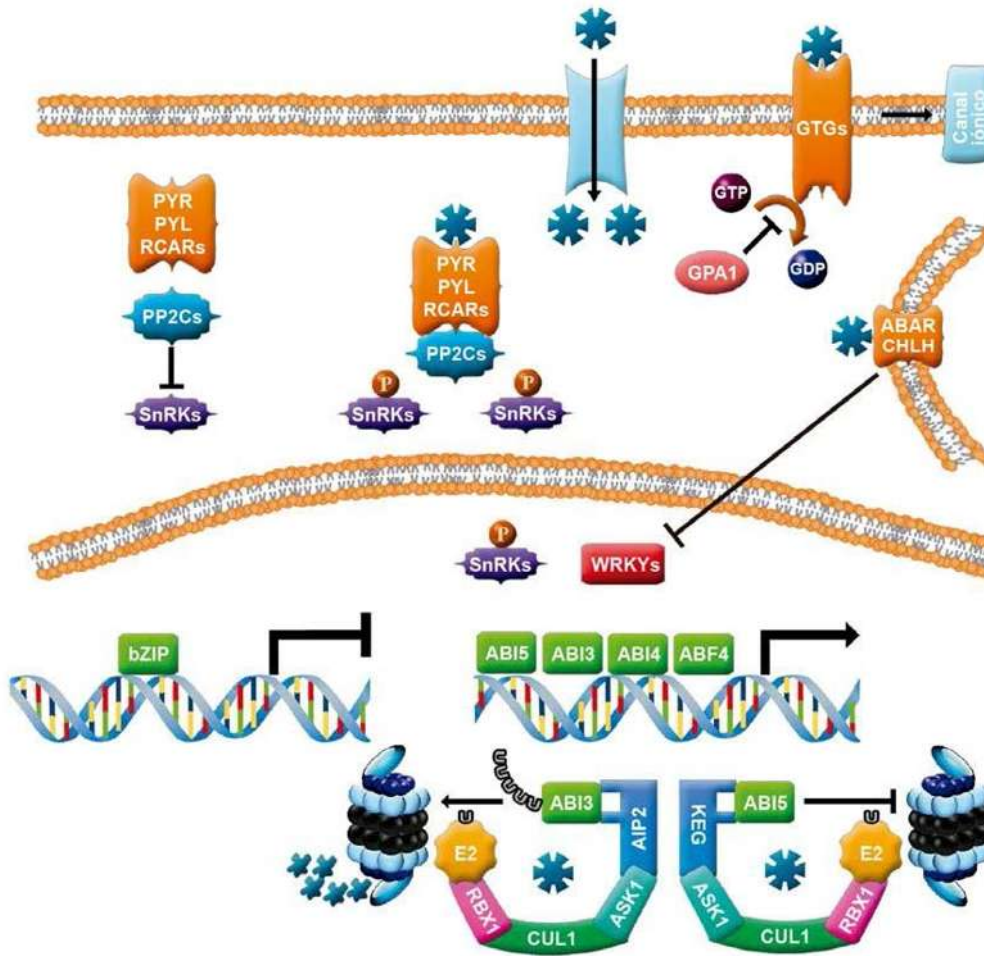


Figura 4. Ruta de señalización del ácido abscisico. Esta vía comprende receptores núcleo/citoplasmáticos y receptores localizados en la membrana citoplasmática y del cloroplasto, lo que contribuye a las diferentes respuestas celulares a esta hormona. La señalización del ácido abscisico además involucra la regulación de los factores de transcripción a través de los complejos SCF.

que GPA1 y KEG (KEEP ON GOING) regulan respectivamente la abundancia de los factores transcripcionales ABI3 y ABI5. El ABA mejora la ubiquitinación y la degradación de ABI3 mediada por AIP2 y también protege a ABI5 de la ubiquitinación mediada por KEG. Sin embargo, no se conocen los eventos intermedios entre la percepción del ABA y la actividad de estas ligasas E3 (Santner y Estelle, 2010) (Fig. 4).

1.5. Señalización del ácido salicílico (SA)

El SA es un ácido monohidroxibenzoico llamado así por el sauce (género *Salix*) cuyas hojas y corteza ricas en SA, antiguamente se masticaban para aliviar la fiebre, el dolor y la inflamación. En 1897 el farmacéutico alemán Hoffman obtuvo el derivado sintético del SA, la aspirina o ácido acetilsalicílico. En las plantas, el SA se sintetiza en los cloroplastos a partir del corismato, o de la fenilalanina en el citoplasma a través de diferentes vías. El SA regula el crecimiento celular, la respiración, la apertura de los estomas, la senescencia, el rendimiento del fruto, la germinación de las semillas, el desarrollo de las plántulas y está implicado en las respuestas al estrés abiótico inducido por enfriamiento, calor, toxicidad de los metales pesados, sequía, estrés osmótico o salinidad (Boatwright y Pajeroska-Mukhtar, 2013). No obstante, el papel central del SA radica en las respuestas de defensa de las plantas: por ejemplo, las mutantes de *Arabidopsis* deficientes en la síntesis de SA son más susceptibles

a los patógenos (Ding *et al.*, 2014).

Aunque, recientemente se han hecho importantes avances en la comprensión de la señalización del SA, la vía de transducción de señales para este fitorregulador no ha podido ser dilucidada. En dos estudios, se demostró en *Arabidopsis* que tres proteínas relacionadas, NPR1, NPR3 y NPR4 (NON-EXPRESSION OF PATHOGENESIS-RELATED GENES 1, 3 y 4) son los receptores del SA (Fu *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012). En el primer trabajo se reportó que las proteínas NPR3 y NPR4 se unen al SA con diferente afinidad y controlan los niveles de NPR1 en el núcleo reclutando a dicha proteína a la ligasa E3 de ubiquitina CUL3 (CULLIN3) para ser ubiquitinada (Fu *et al.*, 2012). En el segundo estudio se observó que la unión de la NPR1 al SA, permite la unión del NPR1 al ADN y con ello la regulación de la expresión génica (Wu *et al.*, 2012). Dependiendo de su concentración, el SA estimula o disminuye la degradación de NPR1: i) a niveles bajos, NPR1 interactúa con NPR4 aumentando el reclutamiento del primero a CUL3 y por lo tanto su degradación, ii) las concentraciones elevadas de SA promueven la degradación del NPR1 mediada por NPR3, y iii) cuando los niveles de SA son intermedios, NPR1 tiende a acumularse, lo que generalmente ocurre cuando existe una infección por patógenos, generando la reprogramación transcripcional mediada por SA (Scyfferth y Tsuda, 2014) (Fig. 5).

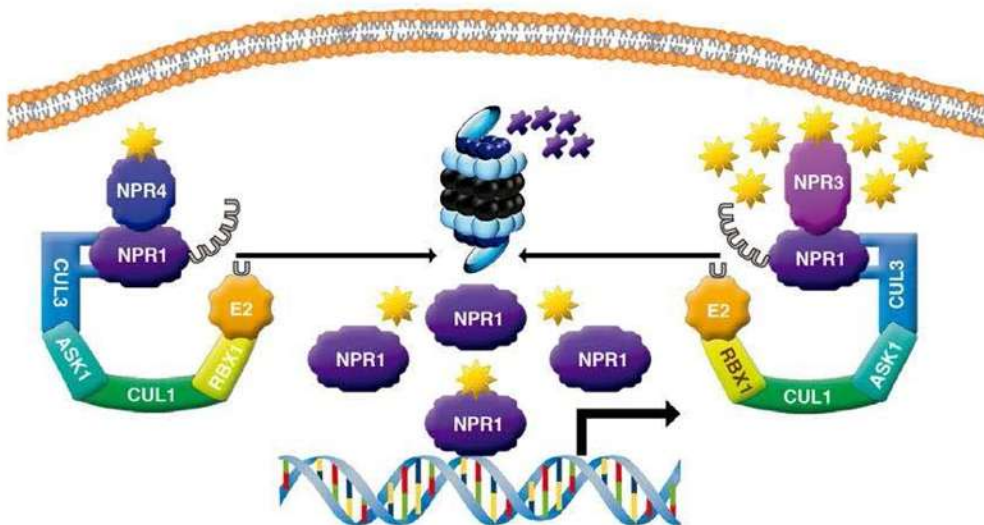


Figura 5. Ruta de señalización del ácido salicílico. El ácido salicílico puede unirse a diferentes receptores dependiendo de su concentración y mediar así distintas respuestas a esta hormona.

2. Citocininas (CK), brasinoesteroides (BR) y etileno (ET): señalización a través de receptores transmembranales

Los receptores de las CK y los BR pertenecen a dos clases diferentes de receptores tipo cinasas. Las histidinas cinasas controlan la señalización de las CK, mientras que las cinasas de serina/ treonina modulan la señalización de los BR. Ambas fitohormonas activan una cascada reversible de fosforilaciones desde la membrana, ya sea la del retículo endoplásmico (RE) o la membrana plasmática. La cascada finaliza en el núcleo, donde los efectores de cada vía regulan la expresión de los genes blanco. El etileno tiene una ruta de señalización compleja de varios pasos, que se basa tanto en la fosforilación como en la degradación controlada y mediada por proteínas F-Box de proteínas específicas semejante a la de las auxinas, el JA, el GA, las SL, el ABA y el SA (Larrieu y Vernoux, 2015).

2.1. Señalización de las citocininas (CK)

Las CK son derivados de adenina sintetizados en raíces, brotes y semillas inmaduras; están implicados en el control de varios aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas como: la actividad de los meristemos, la diferenciación vascular, la biogénesis de cloroplastos y las respuestas a estreses bióticos y abióticos. Junto con las auxinas, las CK controlan el ciclo celular, además de determinar la arquitectura de una planta, debido a que en el desarrollo de las yemas laterales del tallo, las auxinas funcionan como represores y las CK como promotores y participan de manera inversa en la formación de las raíces laterales. Las CK predominantes en plantas superiores son la trans-zeatina, isopenteniladenina y la dihidrozeatina (Perilli *et al.*, 2010). En *Arabidopsis*, las CK son percibidas por los receptores de histidina cinasa AHK2/3/4 (ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASES 2, 3 y 4) que se localizan principalmente en el RE, pero también se pueden encontrar en la membrana

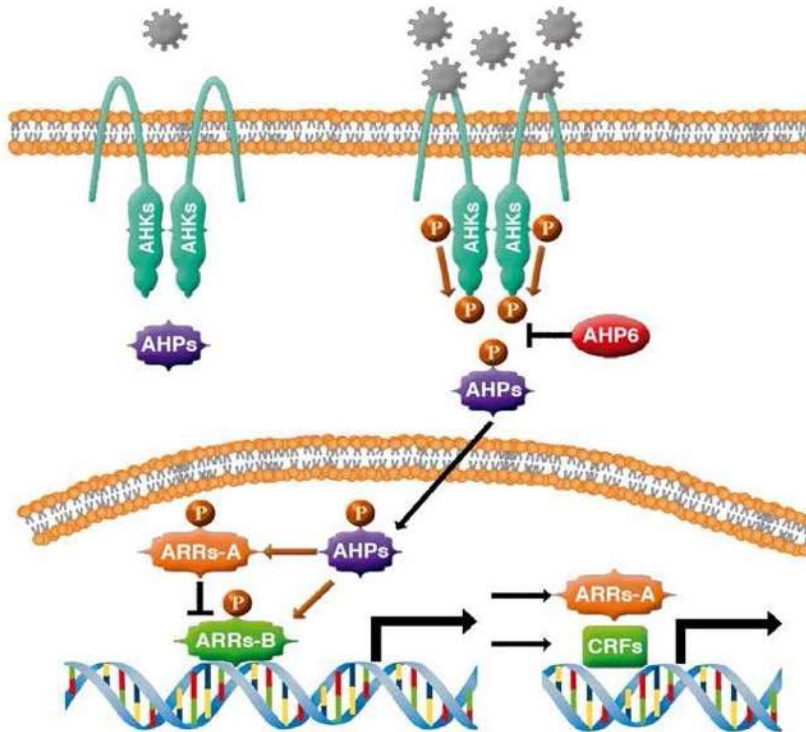


Figura 6. Señalización de las citocininas. Esta vía involucra receptores de dos componentes histidina cinasa, acoplados a la membrana del retículo endoplásmico o del citoplasma. Después de la unión de la hormona, dichos receptores se autofosforilan y transmiten la señal hasta activar reguladores positivos y/o negativos de la vía.

plasmática (Hwang y Sheen, 2001) (Fig. 6). Los receptores AHK están formados por un dominio extra membranal de unión a CK llamado CHASE (CYCLASE/HIS KINASE-ASSOCIATED SENSING EXTRACELLULAR), un dominio HK (HISTIDINE KINASE) y otro citoplasmático (To y Kieber, 2008). Tras la unión de las CK, el receptor AHK autofosforila los residuos conservados de histidina en su dominio HK, subsecuentemente el grupo fosfato es transferido a un residuo aspartato conservado en el dominio citoplasmático y posteriormente es transferido a un residuo de histidina conservado en las proteínas AHP1/2/3/4/5 (ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFERASE 1, 2, 3, 4 y 5) localizadas en el citoplasma (Hutchison *et al.*, 2006). Las AHP actúan como reguladores positivos de la señalización de las CKs, existe además la AHP6 que funciona como un regulador negativo de la señalización (Mähönen *et al.*, 2006). Las AHPs fosforiladas se transportan del citoplasma al núcleo donde fosforilan a los factores de transcripción ARRr (ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATORS) tipo B. Una vez fosforilados, los ARRr tipo B controlan la

expresión de genes de respuesta a las CK que incluyen a los CRF (CYTOKININ RESPONSE FACTORS) y a los ARRr tipo A. Estos últimos también pueden ser fosforilados por las AHPs funcionando como reguladores negativos de la vía, proporcionando así una retroalimentación negativa sobre la señalización de las CK (To *et al.*, 2007) (Fig. 6).

2.2. Señalización de brasinoesteroides (BR)

La brasinolida es el BR más activo aislado de la canola (*Brassica napus*) y el primero en ser descubierto, desde entonces se han identificado más de 50 análogos naturales en varias especies de plantas. Los brasinoesteroides son triterpenoides polihidroxilados esenciales para el crecimiento de las plantas, participan en la elongación celular, la germinación de las semillas, la fertilidad masculina, el desarrollo vascular, la maduración de los frutos, el tiempo de floración, la senescencia y en las respuestas de la planta a la luz, temperatura, sal y patógenos (Wang, 2012). La transducción de la señal de los BR implica una cascada compleja de fosforilación/desfosforilación, que inicia cuando

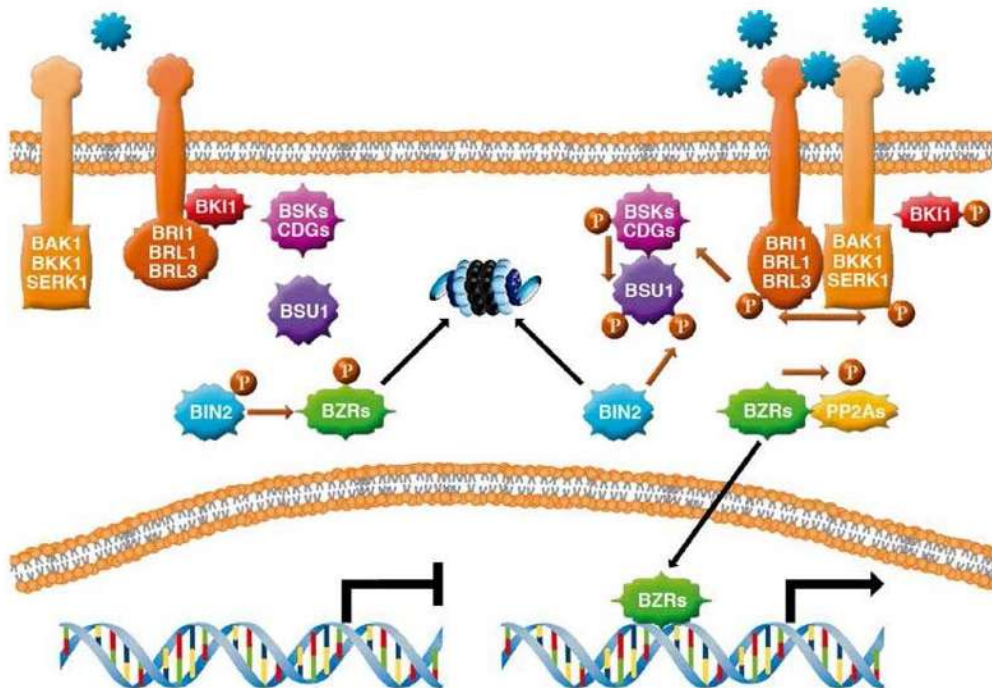


Figura 7. Señalización de los brasinoesteroides. Esta vía inicia con la unión de la hormona al receptor cinasa de la membrana y el reclutamiento de un co-receptor para activar una cascada de fosforilación/desfosforilación que culmina en la activación de factores de transcripción.

son percibidos por el receptor de membrana tipo cinasa BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1). BRI1 es el principal receptor de BRs en *Arabidopsis*, cuya unión permite la activación de la cinasa y el reclutamiento del co-receptor BAK1 (BRI1 ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1) o sus homólogos BKK1 (BAK1 LIKE 1) y SERK1 (SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1). Como el caso de las auxinas y el JA, los BR actúan como un “pegamento molecular” que une a BRI1 con BAK1 (Wang *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002). La activación de BRI1 estimula la transfosforilación entre los dominios cinasa de BRI1 y del co-receptor BAK1, lo que permite la fosforilación y el desprendimiento del regulador negativo BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR1) (Kim y Wang, 2010). Estos cambios estimulan que BRI1 fosfore y libere a dos cinasas citoplasmáticas ancladas

a la membrana: BKI1 (BR SIGNALLING KINASE 1) y CDG1 (CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH 1). Entonces, las BKIs y CDGs fosforiladas se unen y fosforilan y activan a la fosfatasa citoplasmática BSU1 (BRI1 SUPPRESSOR 1) (Mora-García *et al.*, 2004). BSU1 a su vez, inactiva desfosforilando a la cinasa soluble BIN2 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2). En ausencia o niveles bajos de BR, la BIN2 activa fosforila a los factores de transcripción homólogos: BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT) y BZR2 también conocido como BES1 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR1). La fosforilación de estos factores causa su retención en el citoplasma y posterior degradación vía proteosoma. Cuando los niveles de BR son altos, BIN2 es desfosforilado por BSU1 y degradado por el proteosoma, lo que permite que los BZR sean desfosforilados por la

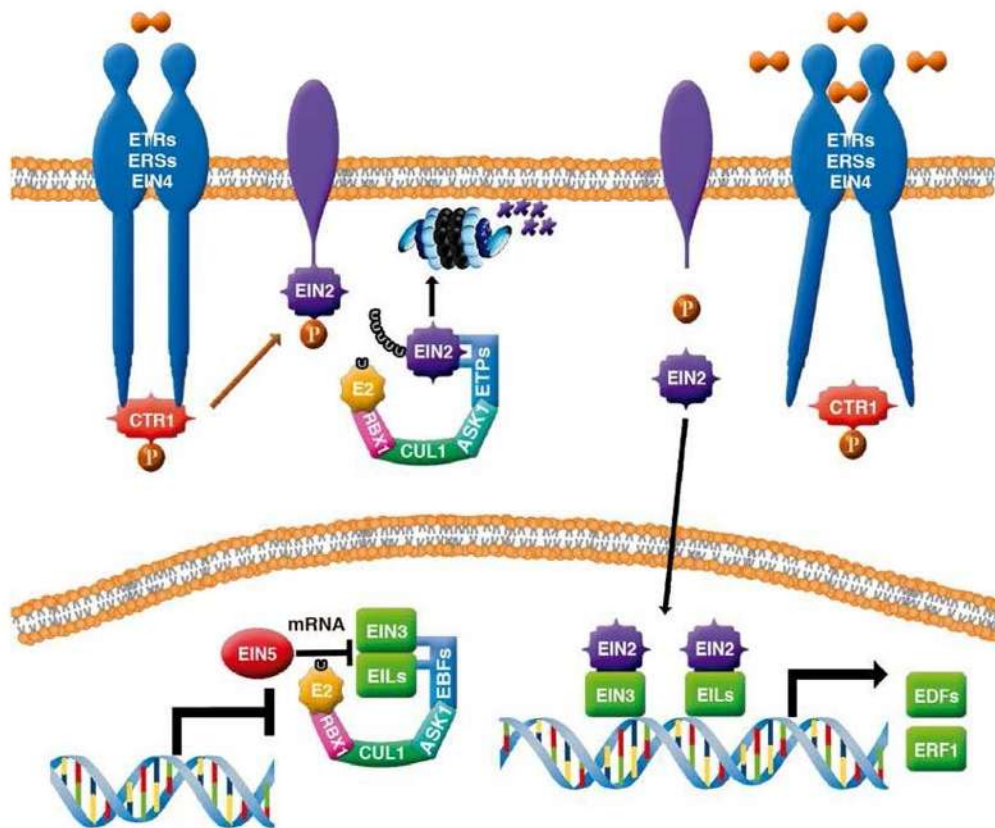


Figura 8. Ruta de señalización del etileno. La señalización del etileno involucra receptores de dos componentes histidina cinasa, localizados en la membrana del retículo endoplásmico y que funcionan como reguladores negativos de la señalización. Además la vía presenta una regulación de elementos de la señalización a través de los complejos SCF y del proteosoma.

fosfatasa PP2A y de esta manera se desplazan al núcleo, donde se unen a los promotores de sus genes blanco para activar la transcripción (Zhu *et al.*, 2013) (**Fig. 7**).

2.3. Señalización de etileno (ET)

El ET es un componente del gas emitido por las lámparas del alumbrado, cuya actividad fue identificada por primera vez en 1901 al observar que causaba senescencia prematura, abscisión y maduración en las plantas. El ET se produce en todos los tejidos aunque sus niveles se incrementan en tejidos en maduración o en los que sufren estrés físico o químico. El etileno está implicado en la germinación de las semillas, la iniciación y el alargamiento de la raíz, el crecimiento de pelos radiculares, la elongación del hipocótilo, la epinastia, el desarrollo floral, la determinación del sexo, la abscisión, la maduración del fruto y la senescencia (Stepanova y Alonso, 2009). La percepción del etileno ocurre a través de receptores de membrana localizados en el RE; en *Arabidopsis* existen cinco receptores de etileno: ETR1 y ETR2 (ETHYLENE RESPONSE 1 y 2), ERS1 y ESR2 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1 y 2) y EIN4 (ETHYLENE INSENSITIVE 4) que al igual que los receptores de CK, son del tipo histidina cinasa. Existen estudios que indican que a diferencia de los receptores de otras hormonas vegetales que funcionan como reguladores positivos, los del etileno son reguladores negativos de la señalización (Qu *et al.*, 2007). Dichos receptores en ausencia de etileno, activan a una cinasa de serina/reonina denominada CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1), que a su vez fosforila al extremo C-terminal de EIN2 (Qiao *et al.*, 2012). En respuesta a una señal de etileno, CTR1 se libera del receptor y se inactiva reduciendo así la fosforilación de EIN2, esto provoca que el dominio C-terminal de EIN2 se traslade al núcleo, donde participa en la estabilización de los principales factores de transcripción en la señalización del etileno, EIL1, EIL2 y EIL3 (EIN3 y EIN3LIKE 1 a 3) que a su vez activan la expresión de genes de respuesta a etileno (Ju *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2012) (**Fig. 8**). Se han reportado niveles adicionales en la regulación de la señalización de etileno; primero, la estabilidad de la proteína EIN2 se regula por dos proteínas F-Box, ETP1 y ETP2 (EIN2 TARGETING PROTEIN 1 y 2) las cuales provocan en ausencia de etileno, la degradación de EIN2 vía proteosoma (Qiao *et al.*, 2009). Segundo, los niveles de las proteínas EIN3 y EIL1

también están regulados por dos proteínas EBF1 y EBF2 (F-Box, EIN3 BINDING F-BOX 1 y 2), que igualmente desencadenan la degradación de EIN3 y EIL1 en ausencia de etileno (Guo y Ecker, 2003). Por otra parte, los transcritos de los genes *EBF1* y *EBF2* son degradados por la exoribonucleasa EIN5 (ETHYLENE INSENSITIVE 5) (Gregory *et al.*, 2008). EIN3 y EIL1 activan además a otros factores de transcripción como ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1) y EDF1/2/3/4 (ETHYLENE RESPONSE DNA BINDING FACTOR), que regulan adicionalmente la expresión de genes de respuesta al etileno (Kendrick y Chang 2008) (**Fig. 8**). La complejidad que subyace en estas interacciones sigue siendo en gran medida desconocida, no obstante, tal complejidad permite la integración de múltiples señales para ajustar finamente las respuestas de etileno.

Conclusiones

Durante las últimas décadas, se han realizado grandes progresos en el descubrimiento de los mecanismos moleculares que subyacen en las respuestas hormonales. Han sido bien caracterizados algunos receptores y sus mecanismos de percepción, así como detalles de la vía de transducción de señales. Sin embargo, debido a que además de su señalización, también están implicados el transporte, la biosíntesis y el metabolismo de cada fitohormona aún quedan por dilucidar varios procesos para poder obtener una mejor comprensión del control hormonal. Aunque cada hormona vegetal tiene un papel específico e indispensable en la regulación de los procesos fisiológicos de las plantas, cada respuesta suele estar modulada por la acción de más de un fitorregulador. La comunicación cruzada entre las hormonas determina la activación de genes esenciales para las respuestas de las plantas, sin embargo, apenas se están estableciendo los mecanismos de esta comunicación entre las redes de señalización hormonales, así como con otras vías de señalización ambientales y del desarrollo. La combinación de la genética, bioquímica, proteómica, genómica, biología celular y otros enfoques avanzados serán muy importantes en la disección de cada ruta hormonal y su integración en redes de señalización que permitan entender la coordinación en la regulación del crecimiento y desarrollo de las plantas.

- the response to brassinosteroids in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 18: 448-460.
- Nakamura H, Xue YL, Miyakawa T, Hou F, Qiu HM, Fukui K, Shi X, Ito E, Ito S, Park SH, Miyauchi Y, Asano A, Totsuka N, Ueda T, Tanokura M, Asami T** (2013) Molecular mechanism of strigolactone perception by DWARF14. *Nat Commun* 4: 2613.
- Pandey A, Sharma M, Pandey GK** (2016) Emerging roles of strigolactones in plant responses to stress and development. *Front Plant Sci* 7: 434.
- Pandey S, Nelson DC, Assmann SM** (2009) Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 136: 136-148.
- Pauwels L, Barbero GF, Geerinck J, Tilleman S, Grunewald W, Pérez AC, Chico JM, Bossche RV, Sewell J, Gil E, Garcia-Casado G, Witters E, Inzé D, Long JA, De Jaeger G, Solano R, Goossens A** (2010) NINJA connects the co-repressor TOPILESS to jasmonate signalling. *Nature* 464: 788-791.
- Pérez A.C.L., Goossens A.** (2013) Jasmonate signalling: a copycat of auxin signalling? *Plant Cell Environ* 36: 2071-2084.
- Perilli S, Moubayidin L, Sabatini S** (2010) The molecular basis of cytokinin function. *Curr Opin Plant Biol* 13: 21-26.
- Qiao H, Chang KN, Yazaki J, Ecker JR** (2009) Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 23: 512-521.
- Qiao H., Shen Z., Huang S.C., Schmitz R.J., Urich M.A., Briggs, S.P., Ecker J.R.** (2012) Processing and subcellular trafficking of ER- tethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science* 338: 390-393.
- Qu X, Hall BP, Gao ZY, Schaller GE** (2007) A strong constitutive ethylene-response phenotype conferred on *Arabidopsis* plants containing null mutation in the ethylene receptors ETR1 and ERS1. *BMC Plant Biol* 7: 3.
- Rodriguez PL, Benning G, Grill E** (1998) ABI2, a second protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 421: 185-190.
- Santner A, Estelle M** (2010) The ubiquitin proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J* 61: 1029-1040.
- Sasaki A, Itoh H, Gomi K, Ueguchi-Tanaka M, Ishiyama K, Kobayashi M, Jeong DH, An G, Kitano H, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M** (2003) Accumulation of phosphorylated repressor for gibberellin signaling in an F-box mutant. *Science* 299: 1896-1898.
- Seyfferth C, Tsuda K** (2014) Salicylic acid signal transduction: the initiation of biosynthesis, perception and transcriptional reprogramming. *Front Plant Sci* 5: 697.
- Shang Y, Yan L, Liu ZQ, Cao Z, Mei C, Xin Q, Wu FQ, Wang XF, Du SY, Jiang T, Zhang XF, Zhao R, Sun HL, Liu R, Yu YT, Zhang DP** (2010) The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition. *Plant Cell* 22: 1909-1935.
- Sheard LB, Tan X, Mao H, Withers J, Ben-Nissan G, Hinds TR, Kobayashi Y, Hsu FF, Sharon M, Browse J, He SY, Rizo J, Howe GA, Zheng N** (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* 468: 400-405.
- Shen YY, Wang XF, Wu FQ, Du SY, Cao Z, Shang Y, Wang XL, Peng CC, Yu XC, Zhu SY, Fan RC, Xu YH, Zhang DP** (2006) The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443: 823-826.
- Smalle J, Vierstra RD** (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 55: 555-590.
- Soundappan I, Bennett T, Morffy N, Liang Y, Stanga JR, Abbas A, Leyser O, Nelson DC** (2015). SMAX1-LIKE/D53 family members enable distinct MAX2-dependent responses to strigolactones and karrikins in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 27: 3143-3159.
- Stepanova AN, Alonso JM** (2009) Ethylene signaling and response: Where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol* 12: 548-555.
- Tan X, Calderon-Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N** (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446: 640-645.
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661-665.
- To JPC, Deruère J, Maxwell BB, Morris VF, Hutchison CE, Ferreira FJ, Schaller GE, Kieber JJ** (2007) Cytokinin regulates type-A *Arabidopsis* response regulator activity and protein stability via two-component Phosphorelay. *Plant Cell* 19: 3901-3914.
- To JPC, Kieber JJ** (2008) Cytokinin signaling: two-components and more. *Trends Plant Sci* 13: 85-92.
- Ueguchi-Tanaka M, Ashikari M, Nakajima M, Itoh H, Katoh E, Kobayashi M, Chow TY, Hsing YIC, Kitano H, Yamaguchi I** (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature* 437: 693-698.
- Umasov T, Hagen G., Guilfoyle, T.J.** (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* 276: 1865-1868.
- Vierstra RD** (2009) The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 385-397.
- Wang ZY, Sero H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J** (2001) BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410: 380-383.

- Wang ZY** (2012) Brassinosteroids modulate plant immunity at multiple levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 7-8.
- Wasternack C, Hause B** (2013) Jasmonates: Biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *annals of botany*. *Ann Bot* 111: 1021-1058.
- Wen X, Zhang C, Ji Y, Zhao Q, He W, An F, Jiang L, Guo H** (2012) Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Res* 22: 1613-1616.
- Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95:707-735.
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C** (2012) The *Arabidopsis* NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep*. 1: 639-647.
- Yamaguchi S** (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59: 225-251.
- Zhu JY, Sae-Seaw J, Wang ZY** (2013) Brassinosteroid signaling. *Development* 140: 1613-1620.

9.3. Artículo de divulgación. Fitohormonas: su función en las semillas.

ARTÍCULO

Fitohormonas: su función en las semillas

Aarón Giovanni Munguía Rodríguez



El M.C. Aarón Giovanni Munguía Rodríguez es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias Biológicas en la Opción de Conservación y Manejo de Recursos Naturales, en la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. juifrewq@gmail.com

Las plantas son organismos que pasan toda su vida en un mismo sitio, donde obtienen lo que necesitan para vivir como la luz proveniente del sol y los nutrientes y agua a partir del suelo; con eso es suficiente para que ellas realicen diversos procesos como la fotosíntesis o el transporte del agua y los diferentes elementos orgánicos y minerales, esenciales para elaborar otros compuestos útiles para su crecimiento y desarrollo.

Todos los órganos de una planta como las raíces, los tallos, las hojas, las flores y los frutos, son importantes para su desarrollo y crecimiento, pero las semillas en particular son las que además de servir como una estructura para perpetuar la especie, son indispensables para aumentar su población y

son las unidades de dispersión que les permite establecerse en otros lugares que presenten condiciones adecuadas para su supervivencia.

Las semillas, unidad reproductiva en plantas

Las plantas con flores o conos (angiospermas y gimnospermas, respectivamente), forman las semillas por reproducción sexual, un proceso complejo y de gran coordinación en el que los granos de polen, que contienen los gametos masculinos se transportan directa o indirectamente desde el órgano masculino de la flor (el estambre) hasta el femenino (el pistilo). Cuando el polen llega al estigma, se activa el desarrollo un tubo polínico que crece hasta el ovario, donde se depositan los gametos masculinos para fecundar a los óvulos dando lugar a la formación del embrión.

Generalmente, las semillas están constituidas por el embrión, una planta en miniatura, rodeado por tejidos nutritivos (endospermo) y envuelto en una capa protectora (testa). Podemos encontrar semillas desde un microgramo en algunas orquídeas hasta más de 20 kg como el coco de ciertas palmeras. En función de su viabilidad, las semillas se pueden clasificar en ortodoxas o recalcitrantes: las semillas ortodoxas son capaces de sobrevivir a largos periodos de desecación o congelación, como el caso una semilla ortodoxa de palma que logró germinar después de 2000 años. Por otro lado, las semillas recalcitrantes son sensibles a los efectos prolongados de la sequedad o bajas temperaturas; por tanto, su almacenamiento no es habitual ya que requieren condiciones muy específicas. Dependiendo del tipo de semilla, para que el embrión reanude

su crecimiento y se establezca una planta autosuficiente, las semillas almacenan compuestos que le proporcionan energía (carbohidratos y lípidos), así como otros necesarios para su funcionamiento (proteínas y minerales).

¡Hay algo más! Las fitohormonas

Para que una planta desempeñe sus funciones adecuadamente, necesita además otros compuestos que se encarguen de coordinar su desarrollo, entre los cuales se encuentran las fitohormonas, también conocidas como fitorreguladores, hormonas vegetales o reguladores del crecimiento vegetal.

Estas fitohormonas controlan cada aspecto del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluyendo las respuestas a señales internas y ambientales; se definen como moléculas que son producidas en un tejido específico dentro de un organismo y que pueden viajar para ejercer su función en otro sitio, donde son percibidas por otras moléculas (receptores) capaces de transmitir esa señal en varios pasos (rutas de señalización), que generalmente finalizan en la expresión de genes específicos dando como resultado una respuesta fisiológica.

Después de que oficialmente se propusiera la existencia de hormonas en las plantas a mediados del siglo XIX, la identidad y mecanismo de acción de cada hormona vegetal se ha estudiado extensivamente. Recientemente, por el empleo de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, que facilitan el manejo de técnicas moleculares y bioquímicas, se han esclarecido varios misterios que subyacen en la actividad de las fitohormonas.

Se han identificado varias moléculas o grupo



de moléculas que actúan como fitohormonas entre las que tenemos al ácido abscísico, el ácido salicílico, las auxinas como el ácido indolacético, los brasinosteroides, las citocininas

como la zeatina, las estrigolactonas, el etileno, las giberelinas, los jasmonatos, las karrikinas, el óxido nítrico, las poliaminas y algunos péptidos. Estas moléculas son sintetizadas como derivados del metabolismo intermediario de las plantas, su biosíntesis, transporte y lugar de acción varía según la fitohormona. Cuando finalmente han ejercido su función son degradadas o almacenadas en sitios determinados para su posterior empleo, como es el caso de las semillas.

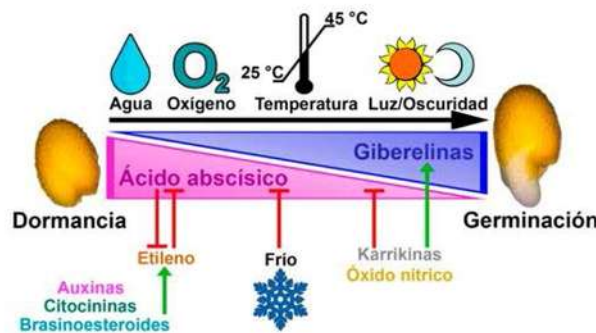
Acción de las fitohormonas en las semillas

El desarrollo de las semillas en la planta va acompañado de cambios en los niveles de las principales hormonas vegetales. En la mayoría de las semillas, los niveles de citocininas son más altos durante la formación del embrión, ya que esta hormona favorece la división celular; posteriormente, los niveles de citocininas disminuyen para dar paso a un aumento en los niveles de auxinas y giberelinas que son responsables del crecimiento y diferenciación de las células. En las últimas etapas del desarrollo del embrión, los niveles de giberelinas y auxinas disminuyen y los niveles de ácido abscísico aumentan hasta que el embrión alcanza su tamaño máximo y se terminan de acumular las reservas. El ácido abscísico previene la germinación precoz de las semillas, también regula el crecimiento vegetativo y las respuestas al estrés.

Fitohormonas y Germinación

La germinación es la reanudación del crecimiento embrionario dentro de la semilla, y para que sea exitosa requiere de una serie de factores: agua suficiente para rehidratar los tejidos y aumentar el volumen del embrión, disponibilidad de oxígeno para promover la respiración, un rango de temperatura óptima que para la mayoría de las semillas es de 25 a 45 °C y la presencia o ausencia de luz.

Las semillas de muchas especies no germinan a pesar de ser viables y estar expuestas a con-



diciones óptimas para su germinación, debido a que tienen su germinación bloqueada como resultado de un fenómeno conocido como dormancia o dormición y germinarán hasta que se cumplan con-

diciones especiales, lo que provee tiempo adicional a la semilla para su dispersión o para evitar que germine en circunstancias desfavorables.

La germinación se considera completa cuando la radícula emerge de la cubierta de la testa lo que permite establecer un contacto directo con el agua y los nutrientes requeridos para mantener el crecimiento de las plántulas.

Las fitohormonas están involucradas en la regulación de la germinación y la dormancia. Se sabe que el ácido abscísico tiene efectos inhibitorios sobre la germinación y las giberelinas la estimulan. Sin embargo, el ácido abscísico y las giberelinas no son las únicas hormonas que regulan este proceso de la semilla: el etileno, la hormona gaseosa responsable de la maduración de los frutos y la abscisión (caída de hojas y frutos), interfiere con la habilidad del ácido abscísico de inhibir la germinación; el ácido abscísico inhibe a su vez la síntesis de etileno, mientras que las citocininas, los brasinosteroides y las auxinas la promueven.

La exposición de algunas semillas al frío disminuye las cantidades de ácido abscísico y ayuda a romper la dormancia, es por ello que las plantas lo emplean como mecanismo regulatorio para garantizar que las semillas no germinen durante el invierno y lo hagan en un clima más favorable.

La cubierta de la semilla también puede influir en la dormancia: en plantas de regiones tropicales húmedas actúa impidiendo la entrada de agua, mientras que las semillas típicas de climas áridos generalmente contienen sustancias inhibitorias de la germinación solubles en agua, que se eliminan luego de una lluvia intensa. La dormancia impuesta por la cubierta de la semilla puede suprimirse mediante la escarificación, que consiste en la eliminación mecánica o química de esta estructura. Las formas naturales de escarificación incluyen: la abrasión por arena, la acción microbiana o el paso de la semilla a través del tracto digestivo de un animal. La ruptura de la cubierta por calor

es una estrategia en muchas especies que asegura la repoblación de un ambiente con menos competencia después de un incendio. Conjuntamente, el humo también estimula la germinación al portar las fitohormonas karrikinas que al igual que el óxido nítrico, otra hormona gaseosa presente en plantas y animales, son capaces de romper la dormancia disminuyendo la cantidad de ácido abscísico o afectando su señalización y aumentando la síntesis o señalización de las giberelinas.

Por otro lado, existen plantas vivíparas, cuyas semillas germinan estando aún en la planta madre, esto se observa en los mangles de manera natural o en plantas que han sido modificadas genéticamente para ser deficientes en ácido abscísico; en otros casos, los frutos principalmente en descomposición llegan a emular las condiciones del suelo provocando la germinación de sus semillas.

Importancia de la manipulación de las semillas

Debido a que las semillas proveen más del 50% de la ingesta calórica mundial humana y animal, la germinación y la dormancia son procesos importantes a considerar en la producción de los cultivos ante la creciente demanda mundial.

Las hormonas vegetales afectan la germinación de la semilla de manera individual o interactuando entre sí, por lo que conociendo los principios que rigen el comportamiento de la semilla se pueden ajustar los niveles hormonales de manera endógena por modificaciones genéticas o aplicando sustancias exógenamente. Esto, con el objetivo de acelerar o retrasar la germinación para aumentar la productividad o el tiempo de almacenamiento de las semillas en especies de interés agrícola, forestal, científico, medicinal u ornamental.



Doria, J. (2010). Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31(1): 74-85.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000100011

Matilla, A.J. (2008). Desarrollo y germinación de las semillas. pp. 537-558. En: Azcón-Bieto, J. y M. Ta-

lón (eds.). *Fundamentos de la fisiología vegetal*. McGraw-Hill Interamericana de España, Madrid.
<https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2016/08/Matilla-2008.pdf>

Taiz, L. y Zeiger E. (2015). *Plant Physiology and Development*. Sinauer Associates, Inc. 6ª Edición. Capítulos 15 y 18.