



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS**  
Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal

**“CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL ÁCIDO  
NAFTELETILFTALÁMICO SOBRE LA RESPUESTA  
AUXÍNICA Y LA ARQUITECTURA RADICULAR DE  
*Arabidopsis thaliana*”**

**TESIS**

Que presenta:

**Q.F.B. VIRIDIANA MAGAÑA DUEÑAS**

Como requisito para obtener el título de

**MAESTRA EN CIENCIAS  
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**Director de Tesis: D. C. José López Bucio**

**Morelia, Michoacán, febrero de 2016.**

El presente trabajo fue realizado 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 asesoría del D. C. José López Bucio

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado durante la realización de este proyecto.

Al D. C. José López Bucio, por aceptarme en su grupo de trabajo, por mostrarme un mundo que desconocía totalmente, el mundo de la biología del desarrollo vegetal, por contagiarme con el entusiasmo y pasión con los que siempre habla del trabajo que realizamos día a día y por inculcar esa conciencia de que los pequeños o grandes descubrimientos son igual de importantes. De igual manera quiero agradecerle por las enseñanzas de vida, practicando siempre con el ejemplo, por enseñarme que la humildad debe de conservarse ante todo y que aún en los peores momentos siempre se puede salir adelante.

A los revisores de este trabajo: D. C. Elda Beltrán Peña, D. C. Ernesto García Pineda, D. C. Lourdes Macías Rodríguez y D. C. Eduardo Valencia Cantero, por el tiempo dedicado a los seminarios, las recomendaciones y sugerencias al trabajo. Su apoyo y disponibilidad durante el proceso de revisión fueron realmente valiosos.

Al D. C. León Francisco Ruíz Herrera por su colaboración con las técnicas de microscopia confocal, por ayudarme a entender los resultados de algunos experimentos, por sus aportaciones a este trabajo y por enseñarme a ser más analítica.

Para el D. C. Randy Ortiz Castro por enseñarme las técnicas básicas del laboratorio en tan poco tiempo, por resolver mis dudas a distancia y por supuesto tenerme tanta paciencia.

Para los senseis Javy y Ramón, muchas gracias por el tiempo y sobre todo por la paciencia que tuvieron cada momento del día que llegaba a pedirles ayuda, por enseñarme a ser más observadora, por todos los momentos agradables que pasé con ustedes y por esa frase célebre que siempre me sacará de algún apuro “No se sabe”.

Para el resto de mis compañeros del laboratorio: Marina por aguantar más que nadie mis momentos de locura, estrés, mal humor e hiperactividad, por escucharme y estar ahí en tiempos buenos y malos; César por hacerme reír todo el tiempo y cuando más lo necesitaba en pocas palabras por alinear mis chacras; A las chicas Sara, Edith, Amy, Lyz y Lupis por las pláticas tan amenas; Aarón por esas tardes de karaoke; Chava y Jano por ayudarme cuando recurría a ustedes con alguna duda; Gus por esos comentarios tan atinados que hacían reír al resto

aunque a veces creíamos que ya no estabas en el laboratorio. En general gracias porque sin ustedes la estadía en el laboratorio no hubiera sido tan amena, además, en algunos de ustedes encontré excelentes amigos.

A mis hermanas por elección Ruth y Mayte, porque han estado conmigo desde que tengo uso de razón, porque con ustedes aprendí los conceptos de lealtad y amistad, una amistad que se ha mantenido a pesar del tiempo y la distancia, porque hemos compartido nuestro dolor y celebrado nuestras alegrías.

A mis amigos del alma Elvia, Julio, Chela y Lily. Porque con ustedes he vivido momentos de gran tristeza pero también de inmensa alegría. Porque siempre han estado ahí para darme ánimos. Porque a pesar de ser tan diferentes nos aceptamos con todo lo que somos y dejamos de ser, jamás nos juzgamos por nuestros errores y nos acompañamos en nuestros logros y fracasos.

A mi familia, en especial a mi tío Pepe porque desde que inicié esta travesía siempre ha estado pendiente de mis avances y me ha impulsado para continuar diciéndome que no dude de mis capacidades, que aunque no sea sencillo vale la pena seguir; Arturo porque en vida siempre me dijiste lo orgulloso que estabas y siempre creíste en mí y aunque ya no estás a mi lado, sé que en donde quiera que estés sigues apoyándome y cuidándome como siempre; a mi hermano Dany porque eres una de las personas que más amo en el mundo y agradezco que seas tú mi hermano, además de que me diste una hermosa sobrina Sofy que quiero con el corazón, que ha regresado la alegría a nuestra familia y es un motor para salir adelante; A mi hermano Jesús porque aunque no tuve oportunidad de jugar contigo ni de oír tu voz, te adoro y eres un motivo para continuar. Finalmente a mis padres Kike y Gaby las personas que más amo, sus esfuerzos son impresionantes y su amor para mí invaluable, me han educado para forjar la persona que soy ahora, me han enseñado a valorar cada cosa que me han dado, me formaron con reglas y algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

*“La alegría de ver y entender es el más perfecto don de la naturaleza”*

Albert Einstein

# ÍNDICE

Pág.

## RESUMEN

## ABSTRACT

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	3
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio .....	3
2.2. Morfología vegetal.....	4
2.2.1. El sistema radicular .....	5
2.2.1.1. Raíces laterales.....	7
2.3. Reguladores del crecimiento vegetal .....	9
2.3.1. Auxinas .....	10
2.3.1.1. Biosíntesis de auxinas.....	11
2.3.1.2. Transporte de auxinas.....	15
2.4. Inhibidores del transporte de auxinas .....	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	26
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	28
5.1. Objetivo general. ....	28
5.2. Objetivos específicos. ....	28
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
6.1. Material biológico .....	29
6.2. Compuestos químicos.....	29
6.3. Desinfección de las semillas .....	29
6.4. Preparación del medio de cultivo .....	30
6.5. Siembra de las semillas .....	30
6.6. Condiciones de crecimiento .....	31
6.7. Análisis de las variables del crecimiento <i>in vitro</i> .....	31
6.8. Determinación de las etapas del desarrollo de los primordios de raíces laterales .....	32

6.9. Análisis de expresión del gen de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS) .....	32
6.10. Clarificación de tejidos vegetales .....	32
6.11. Preparaciones semipermanentes.....	33
6.12. Microscopía.....	33
6.13. Detección de la proteína verde fluorescente (GFP) y tinción con yoduro de propidio (IP) .....	33
6.14. Análisis de datos .....	34
<b>7. RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
7.1. Curva de estandarización de concentraciones del NEPA y NPA.....	35
7.2. Efecto del NEPA sobre la arquitectura radicular de <i>A. thaliana</i> .....	37
7.3. Efectos del NEPA en la división y elongación celular .....	40
7.4. El NEPA no afecta la señalización de auxinas ni el nivel de proteínas asociadas al mantenimiento del nicho celular.....	43
7.5. El NEPA no afecta la expresión de transportadores de auxinas en el meristemo .....	46
7.6. El NEPA inhibe la formación de raíces laterales .....	48
7.7. El NEPA inhibe la expresión de transportadores de auxinas en la vasculatura.....	50
7.8 Los receptores <i>TIR1</i> , <i>AFB2</i> y <i>AFB3</i> regulan negativamente el efecto del NEPA sobre la raíz primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	52
7.9. El NEPA inhibe la expresión de <i>DR5::uidA</i> de manera dependiente de la concentración en el follaje.....	53
<b>8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>56</b>
<b>9. REFERENCIAS</b> .....	<b>63</b>
<b>10. APÉNDICE</b> .....	<b>74</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Morfología de <i>Arabidopsis</i> .....	4
<b>FIGURA 2.</b> Formación y desarrollo de raíces laterales de <i>Arabidopsis</i> .....	8
<b>FIGURA 3.</b> Reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal .....	10
<b>FIGURA 4.</b> Componentes principales en la percepción y señalización de las auxinas.....	11
<b>FIGURA 5.</b> Metabolismo del AIA en plantas .....	14
<b>FIGURA 6.</b> Transporte de auxinas .....	16
<b>FIGURA 7.</b> Posicionamiento, tráfico y reciclaje de las proteínas PIN .....	22
<b>FIGURA 8.</b> Estructura comparativa de compuestos.....	25
<b>FIGURA 9.</b> Curva de estandarización de NEPA y NPA.....	36
<b>FIGURA 10.</b> Crecimiento de plantas silvestres de <i>Arabidopsis thaliana</i> en medio suplementado con NEPA y NPA.....	37
<b>FIGURA 11.</b> Efecto del NEPA en la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	38
<b>FIGURA 12.</b> Efecto del NEPA en la formación de pelos radiculares.....	40
<b>FIGURA 13.</b> Efecto del NEPA en la división y elongación celular.....	42
<b>FIGURA 14.</b> El NEPA no afecta la señalización de auxinas ni la expresión de genes asociados al mantenimiento del nicho celular .....	45
<b>FIGURA 15.</b> El NEPA regula la expresión de transportadores de auxinas en el meristemo.....	47
<b>FIGURA 16.</b> Efecto del NEPA en la expresión de <i>DR5::uidA</i> y en primordios de raíces laterales.....	49
<b>FIGURA 17.</b> El NEPA disminuye la expresión de transportadores de auxinas en la vasculatura .....	51
<b>FIGURA 18.</b> TIR1, AFB2 y AFB3 regulan negativamente el efecto del NEPA sobre la raíz primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i> . .....	53
<b>FIGURA 19.</b> El NEPA inhibe la expresión de <i>DR5::uidA</i> de manera dependiente de la concentración en el meristemo del follaje.....	55
<b>FIGURA 20.</b> Resumen de los efectos del NEPA sobre la regulación del desarrollo de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	62

## RESUMEN

Diversos aspectos del desarrollo vegetal son dependientes de la distribución del ácido indol-3-acético (AIA), sus precursores y moléculas relacionadas estructuralmente, conocidas como auxinas. El AIA se transporta desde el follaje hacia la raíz mediante dos mecanismos: 1) a través del floema siguiendo el flujo de fotosintatos, y 2) mediante transporte célula-célula en el que participan diferentes transportadores membranales. Un sitio de biosíntesis adicional ocurre en el meristemo de la raíz, el cual redistribuye el AIA hacia las células de los diferentes tejidos para regular procesos de diferenciación.

Los inhibidores del transporte de auxinas, han sido herramientas esenciales en la investigación sobre estos reguladores y sus efectos en el desarrollo de las plantas. Uno de los más usados es el ácido 1-naftilftalámico (NPA), el cual actúa como un inhibidor del eflujo del AIA a través de los transportadores ABCB. Sin embargo, debido a los efectos pleiotrópicos del NPA en el sistema radicular como la inhibición del crecimiento de la raíz primaria, agravitropismo e inhibición en la formación de las raíces laterales, la identificación de genes o proteínas que regulan procesos celulares específicos mediados por auxinas es limitado. Por lo anterior, encontrar moléculas naturales o sintéticas, que sean capaces de afectar la homeostasis de las auxinas en un tejido u órgano de manera específica, podría ayudar a entender los mecanismos de acción de las auxinas en la regulación del desarrollo vegetal. En este trabajo se realizó un escrutinio de moléculas similares en estructura al NPA para encontrar compuestos con menos efectos pleiotrópicos en la arquitectura de la raíz. En nuestra investigación identificamos al ácido naftiletilftalámico (NEPA), que difiere del NPA por tener un carbono y un grupo etilo adicional. A diferencia de los efectos observados por el NPA, las plantas tratadas con NEPA no muestran raíces agravitropicas y el crecimiento de la raíz primaria es menos inhibido. Interesantemente, el NEPA afecta la formación de raíces laterales de manera dependiente de la dosis, indicando que la iniciación y elongación de raíces laterales es un blanco particular de este compuesto.

**Palabras clave:** auxinas, transporte, desarrollo vegetal, tropismos, inhibidoras.

## ABSTRACT

Many aspects of plant development are dependent upon the distribution of the phytohormone indole-3 acetic acid (IAA), their precursors and related molecules known as auxins. IAA is transported from shoots to roots following at least two pathways: I) It occurs via the phloem together with photosynthesis products or II) It is transported cell-to-cell via membrane transporters. Another site of auxin biosynthesis occurs at the root meristem, in which an additional auxin transport mechanism redirects IAA to adjacent tissues for differentiation processes.

Auxin transport inhibitors are essential tools for investigating auxin transport and its effects on plant development. One of the most widely used inhibitors is 1-naphthylphthalamic acid (NPA), which acts as a specific IAA efflux blocker via targeting the ABCB transporters. However, because of the pleiotropic effects of NPA on the root systems, affecting primary root growth, gravitropic responses, and lateral root development, it is difficult to identify particular cellular targets of auxin transport and its local gradients. Therefore, the use of synthetic or natural molecules, which are capable of affecting auxin homeostasis in a tissue or organ specific manner, may help to better understand the molecular mechanism of auxin action. In this work, we performed a screen of molecules similar to NPA to find out compounds with less pleiotropic effects on root architecture. Our research identified naphthylethylphthalamic acid (NEPA), which differs structurally from NPA due to an additional carbon and an ethyl group. Unlike the effects observed when using NPA, plants treated with NEPA did not show agravitropic roots and the primary root growth was less inhibited. Interestingly, NEPA affected lateral root formation in a dose dependent manner, indicating that both lateral root initiation and elongation are targets of this compound.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos eucariontes, pluricelulares, con gran capacidad adaptativa, las cuales cumplen con un papel fundamental en la existencia de la vida en el planeta ya que son los productores primarios de los ecosistemas terrestres. Las plantas presentan diferentes estructuras altamente especializadas que les permiten crecer, desarrollarse y reproducirse, formando así un sistema integrado con la capacidad de modificar su arquitectura y su desarrollo en respuesta a los factores bióticos o abióticos del medio a través de la producción de compuestos de diferente identidad química. Estos últimos, son denominados hormonas vegetales o reguladores del crecimiento, que actúan a bajas concentraciones y modulan múltiples aspectos del desarrollo vegetal a través de complejas redes de señalización que regulan la expresión génica. Las funciones que ejercen cada una de las fitohormonas han sido dilucidadas 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 (Valladares *et al.*, 2007; Fonseca *et al.*, 2014).

Las auxinas son un grupo importante de fitohormonas que modulan la división y elongación celular y activan eventos específicos de diferenciación durante el desarrollo embrionario, así como la diferenciación del sistema vascular, la dominancia apical y las respuestas a luz y a la gravedad (Hayashi, 2012). La actividad de las auxinas está regulada a tres niveles: biosíntesis, transporte y señalización (Zhao, 2010; Ludwig-Muller, 2011; Sauer *et al.*, 2013). La principal auxina en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA), el cual se sintetiza principalmente en el ápice del follaje, hojas jóvenes y meristemo de la raíz (Ljung *et al.*, 2001, 2005). Desde los sitios de síntesis, el IAA se distribuye a los tejidos blanco donde ejerce su acción, afectando la formación de raíces laterales, la dominancia apical, el desarrollo de hojas y flores y las respuestas a estímulos ambientales (Ljung *et al.*, 2005), para lo cual requieren un mecanismo de

transporte sofisticado, conocido como transporte polar de auxinas (TPA) (Michniewicz *et al.*, 2007)

El TPA es crucial para el desarrollo vegetal. Además de la difusión pasiva a través del floema, existe un transporte célula a célula que requiere de proteínas transportadoras. Mientras que la familia de transportadores de eflujo PIN-FORMED (PIN) determinan principalmente la direccionalidad, las proteínas de transporte de influjo AUXIN RESISTANT 1/ LIKE-AUX1 (AUX1/LAX) y la subfamilia ABC-B/resistente a multidroga/P-glicoproteínas (ABCB/MDR/PGP) controlan el transporte local de auxinas a través de la formación de gradientes de concentración (Benková *et al.*, 2003). Los inhibidores del transporte de auxinas (ITA) han tenido una aplicación histórica en la investigación sobre los efectos de las auxinas en el desarrollo vegetal (Ma y Robert, 2013). Uno de los inhibidores mejor caracterizados es el ácido naftilftalámico (NPA), que bloquea el eflujo de auxinas actuando sobre su principal blanco los transportadores ABCB (Thomson *et al.*, 1973; Nagashima *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a los efectos pleiotrópicos de los ITA sobre el sistema radicular, se ha incrementado la dificultad para identificar nuevos componentes implicados en la formación de órganos *de novo*, es por ello que encontrar moléculas sintéticas o de origen natural capaces de afectar la homeostasis de auxinas en un tejido u órgano de manera específica, proporcionaría una herramienta valiosa para entender los mecanismos moleculares de la acción de las auxinas en la regulación de procesos específicos del desarrollo vegetal.

## 2. ANTECEDENTES

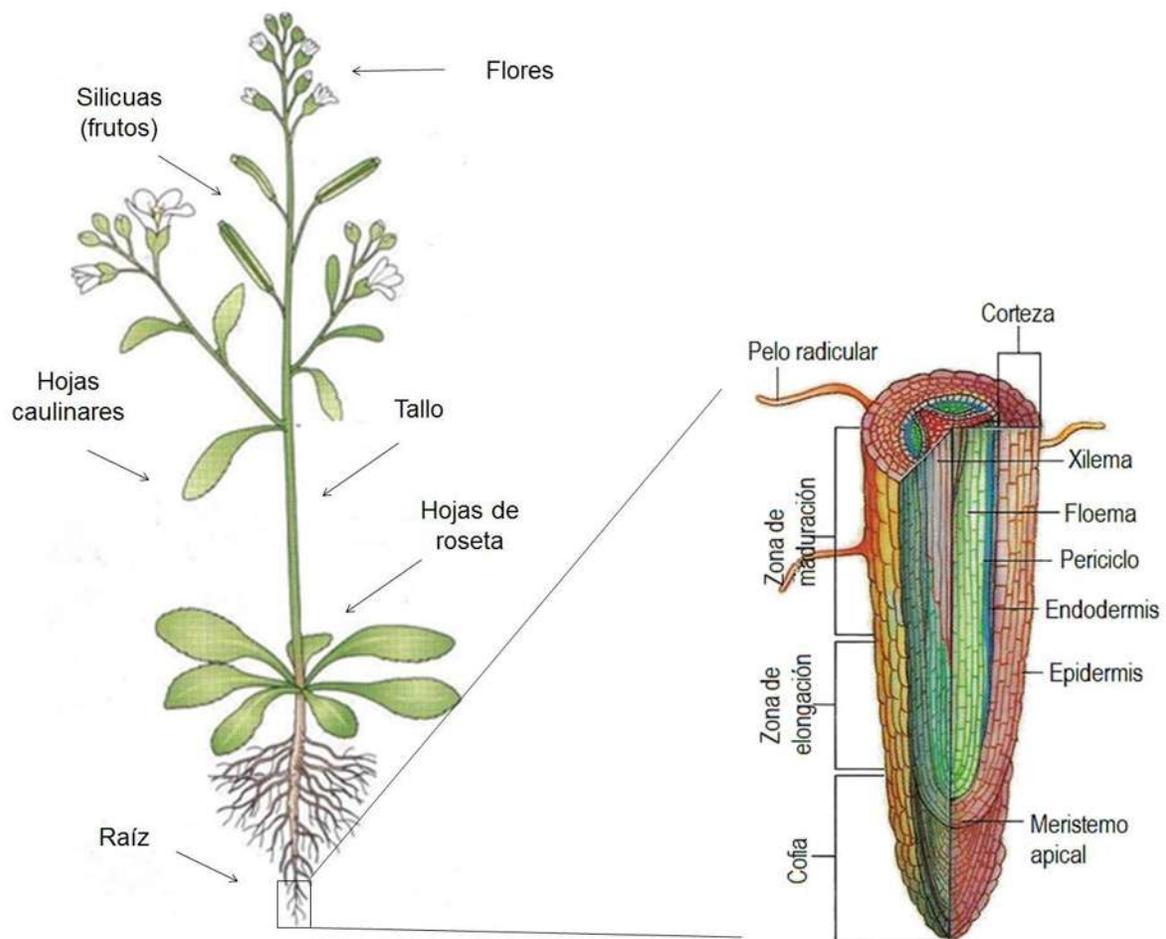
### 2.1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

*Arabidopsis thaliana* es un excelente modelo para el estudio de los procesos fisiológicos y moleculares de las plantas, es una especie dicotiledónea, miembro de la familia *Brassicaceae* donde se incluyen plantas de importancia económica como la coliflor (*Brassica oleracea*) y la canola (*Brassica napus*); no obstante que *Arabidopsis* carece de importancia económica, ha sido el modelo de estudio más utilizado en genética, bioquímica y fisiología vegetal por más de 20 años (NSF, 2002).

*Arabidopsis thaliana* presenta requerimientos básicos como cualquier otro organismo autótrofo, incluyendo luz, agua y nutrientes; se la utilizado ampliamente para dilucidar los posibles mecanismos moleculares de acción y/o funciones de gran variedad de compuestos producidos por las plantas ya que posee un ciclo de vida corto de entre seis y ocho semanas; produce una gran cantidad de semillas, requiere un espacio pequeño para su crecimiento, por lo que es fácil de cultivar en invernaderos o cámaras de crecimiento. La raíz de *Arabidopsis* tiene características que la hacen un modelo ideal para estudiar procesos fisiológicos, entre ellas la simplicidad de su organización celular. Además, tiene la ventaja de que se ha secuenciado su genoma, el cual consta de 120 megapares de bases, distribuidos en cinco cromosomas, que se sabe contienen alrededor de 25,000 genes. Su genoma es relativamente pequeño, comparado con el de otras especies como el maíz o el trigo, que presentan duplicación de genes por eventos de poliploidía. Todas estas características han permitido la identificación de un gran número de genes de *Arabidopsis* que participan en diferentes programas de desarrollo (NSF, 2002).

## 2.2. Morfología vegetal

Los dos sistemas principales de una planta son el aéreo formado por tallos, hojas, flores y frutos durante la etapa reproductiva; y el radicular que consiste de una raíz primaria, raíces laterales (RL), pelos radiculares y en ocasiones raíces adventicias (Fig. 1).



**FIGURA 1. Morfología de *Arabidopsis*.** Los dos sistemas que conforman un organismo vegetal: el aéreo y el radicular. Se muestra un acercamiento a la punta de la raíz primaria con sus tres zonas principales: meristemática, de elongación y de diferenciación (Modificado de Taiz y Zeiger, 2002).

En el sistema aéreo, después de la germinación se forma el hipocotilo y los cotiledones, posteriormente ocurre la formación de las hojas verdaderas. El follaje se encuentra adaptado para la realización de la fotosíntesis, principalmente en las hojas, cuyas células contienen cloroplastos, donde la clorofila se especializa en la absorción de luz. Durante la fotosíntesis, la planta utiliza la energía solar y el CO<sub>2</sub> que capta del ambiente, para oxidar el agua que es absorbida en las raíces, liberando O<sub>2</sub> y reduciendo el CO<sub>2</sub> para formar ATP, glucosa y otros carbohidratos que utilizará durante su desarrollo (Taiz y Zeiger, 2002).

### **2.2.1. El sistema radicular**

El sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* consiste de una raíz primaria derivada del embrión a partir de la cual se producen continuamente raíces laterales. Este esquema reiterativo puede generar una elaborada arquitectura radicular, la cual determina la eficacia de la planta para anclarse, captar agua y adquirir nutrientes (Vilches-Barro y Maizel, 2015).

La raíz se diferencia del tallo por su estructura, el modo en que se forma y la falta de apéndices como yemas y hojas. La primera raíz de la planta se conoce como radícula, la cual se origina después de la germinación de la semilla y a partir de ella se forma la raíz primaria. Las raíces desarrolladas a partir de la raíz primaria se denominan raíces laterales (RL). Las raíces que crecen a partir de otras partes de la planta, como el tallo, se denominan adventicias (Scheres *et al.*, 2002). Además este sistema cuenta con pelos radiculares, que son proyecciones de células especializadas de la epidermis (tricoblastos) que proveen a la planta una mayor superficie para la captación de agua y nutrientes (Fig. 1).

Debido a que las plantas son sésiles, su estrategia para una mejor adaptación es la plasticidad en los programas de desarrollo que modifican su arquitectura. De acuerdo a López-Bucio *et al.* (2003). Se distinguen tres procesos principales que pueden afectar la arquitectura de la raíz: i) la división celular en los

meristemas formando nuevas células, ii) la formación de raíces laterales lo que aumenta la capacidad exploratoria y iii) la formación de pelos radiculares incrementando el área de absorción. Estos procesos son particularmente sensibles a cambios internos y externos tanto bióticos como abióticos. De igual forma en respuesta a estos estímulos, el sistema aéreo puede modificar el tamaño del hipocotilo, peciolo, hojas y tallos (Franklin *et al.*, 2003).

La raíz de *Arabidopsis* representa un modelo muy sencillo y adecuado para las investigaciones sobre procesos morfogenéticos. Un número pequeño de células madre generan todos los tejidos a través de una alta actividad proliferativa, seguidas de una expansión y diferenciación celular. Debido a que el crecimiento de la raíz primaria es indeterminado, estos procesos son continuos. El crecimiento de la raíz primaria ocurre en el meristemo apical de la raíz (RAM, *root apical meristem*, por sus siglas en inglés). El RAM produce células en dos direcciones, formándose una capa de tejido llamado cofia, que abarca el extremo distal de las raíces y protege la punta de la raíz a medida que crece a través del suelo y a su vez percibe y procesa los estímulos ambientales, modulando la dirección del crecimiento de la raíz en función de la gravedad (gravitropismo), la luz (fototropismo), obstáculos (tigmotropismo), gradientes de temperatura (termotropismo), humedad (hidrotropismo), nutrientes y otras sustancias químicas (alelopatía o quimiotropismo) (Ishikawa y Evans, 1990; Okada y Shimura, 1990).

El sistema radicular es una estructura formada por diferentes tejidos: la epidermis, el córtex, la endodermis, el periciclo y los haces vasculares (Fig. 1). Las células que forman los diferentes tejidos se producen a partir de cuatro células madre (células iniciales) localizadas en el ápice de la raíz (Dolan *et al.*, 1993). Internamente y en contacto con las células iniciales se encuentra el centro quiescente (QC, *quiescent center*). El QC presenta poca actividad mitótica y su función principal es la de mantener la organización de células adyacentes. Los factores transcripcionales como PLETHORA1 (PLT1), WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5), SHORTROOT (SHR) y SCARECROW (SCR) son esenciales para el mantenimiento del RAM y el desarrollo de la raíz primaria, para

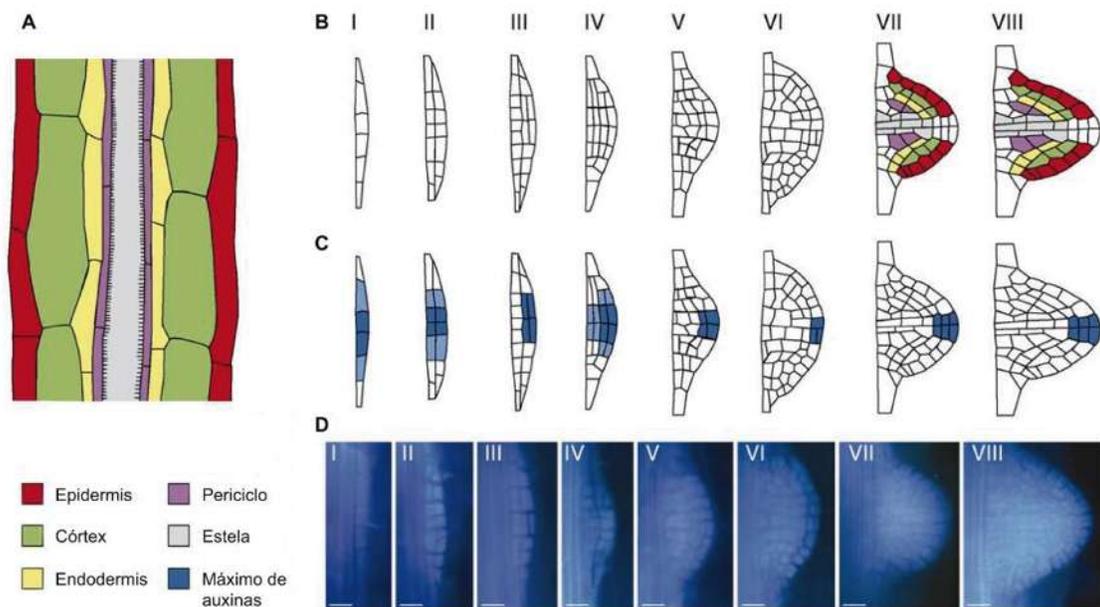
lo cual se requiere de altas concentraciones de auxinas (Tian *et al.*, 2014). *WOX5* se expresa en las células del QC de embriones y raíces maduras y mantiene a las células fuente circundante. Además se ha demostrado que *WOX5* es necesario para prevenir las divisiones celulares en el QC por represión de *CYCD3;3* (Forzani *et al.*, 2014). Los *PLTs* son expresados en el meristemo del embrión y de la raíz adulta, traslapando sus dominios de expresión principalmente en y alrededor del QC a manera de gradiente, en donde los niveles de proteína decrecen en donde están la células más diferenciadas (Galinha *et al.*, 2007).

A medida que va creciendo la raíz, la zona de división celular (meristemática) dará paso a una fase de expansión celular que marca el final de la zona meristemática y el inicio de la zona de diferenciación (Fig. 1). Una vez que incrementan su tamaño, las células se diferencian en forma y función, este proceso está evidenciado por la aparición de pelos radiculares, que son células epidérmicas especializadas en la captura de agua y nutrientes. Por otra parte, mediante eventos de división celular en el periciclo, se forman las raíces laterales, órganos que incrementan la superficie total de exploración del suelo y contribuyen a un mejor anclaje.

### **2.2.1.1. Raíces laterales**

La mayor parte del sistema radicular está formado por RL, originadas a partir de la raíz primaria. El desarrollo de los primordios de raíces laterales (PRL) puede ser inducido o reprimido en respuesta a cambios ambientales y así provee un mecanismo a la planta para hacer frente a los cambios de las condiciones edáficas (Malamy, 2005). La formación de RL implica la especificación de células fundadoras, su división coordinada y diferenciación para producir PRL, las células fundadoras se derivan a partir de células del periciclo, un tejido interno que rodea la vasculatura (Vilches-Barro y Maizel, 2015).

Malamy y Benfey (1997), clasifican las siguientes etapas para la formación de PRL: Etapa I: iniciación del primordio en un plano longitudinal con aproximadamente 8 divisiones a partir de una célula del periciclo. Etapa II: el primordio consta de dos capas celulares formadas por una división periclinal de la primera. Etapa III: se lleva a cabo otra división periclinal para dar lugar a la formación de una tercera capa de células. Etapa IV: el primordio consta de cuatro capas de células. Etapa V: el primordio alcanza el córtex de la raíz. Etapa VI: el primordio forma un domo que alcanza la epidermis. Etapa VII: ocurre la emergencia de la raíz, formándose una raíz lateral (Fig. 2)

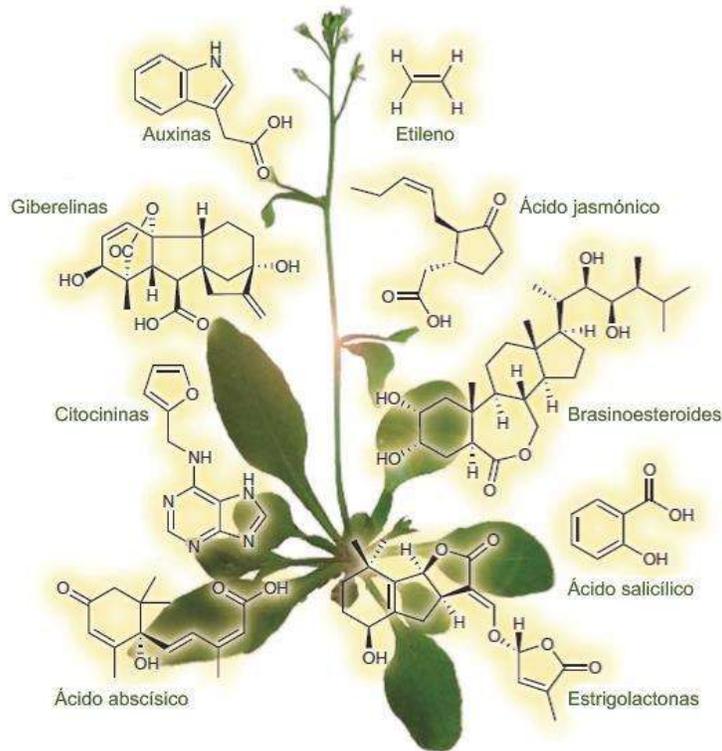


**FIGURA 2. Formación y desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis*.** (A) Las raíces laterales se originan de la raíz primaria a partir de células del periciclo. (B) Los siete estadios del desarrollo de primordios de raíces laterales (Malamy y Benfey, 1997). (C) Establecimiento de los máximos de auxinas, mostrado por el color azul en la línea reportera *DR5::uidA* (D) Las barras de error representan 20 µm (Modificado de Péret *et al.*, 2009).

Bajo condiciones controladas, las raíces de *Arabidopsis* crecen en forma de serpentina, flexionándose de lado a lado a medida que atraviesan el medio de cultivo. Existe un giro natural de la raíz debido a la reorientación del crecimiento en respuesta a la gravedad combinado con la reorientación basada en respuesta al tacto (Olivia y Dunand, 2007). El desarrollo de los PRL y la emergencia de las raíces laterales coincide con el borde exterior de estas curvas, sugiriendo una relación entre el patrón de formación de raíces laterales y el gravitropismo (Fortin *et al.*, 1989).

### **2.3. Reguladores del crecimiento vegetal**

El crecimiento y desarrollo vegetal, así como su adaptación al medio ambiente requiere de la integración de diversas señales endógenas y ambientales que junto con el programa genético intrínseco, determinan la capacidad adaptativa de la planta. Las fitohormonas son un grupo de moléculas que ejercen sus efectos biológicos a bajas concentraciones e incluyen a las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, ácido salicílico, ácido jasmónico y estrigolactonas, éstas regulan múltiples aspectos del desarrollo, defensa y adaptación vegetal (Fonseca *et al.*, 2014).

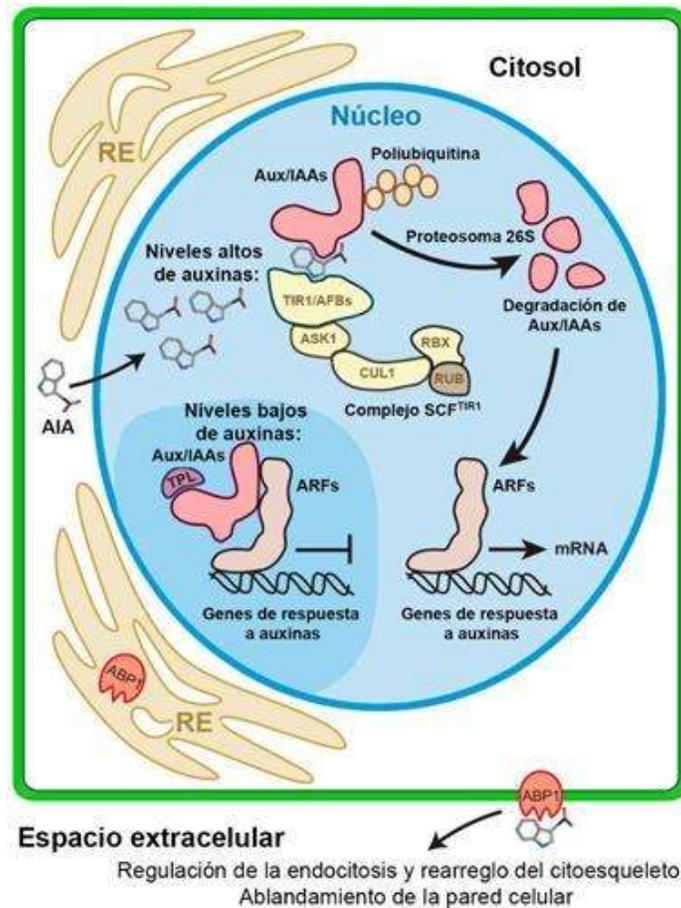


**FIGURA 3. Reguladores del crecimiento y desarrollo vegetal.** Las fitohormonas regulan los procesos del crecimiento y desarrollo vegetal activando cascadas de señalización que afectan la expresión de los genes (Adaptado de Santner *et al.*, 2009).

### 2.3.1. Auxinas

Las auxinas regulan la división y elongación celular y activan eventos específicos de diferenciación, como el establecimiento de la polaridad embrionaria, la diferenciación vascular, la dominancia apical y las respuestas trópicas a luz y a la gravedad (Hayashi, 2012).

La principal auxina producida de forma natural en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA). La actividad de las auxinas está regulada a tres niveles: biosíntesis, transporte y señalización (Fig. 4) (Zhao, 2010; Ludwig-Muller, 2011; Sauer *et al.*, 2013).



**FIGURA 4. Componentes principales en la percepción y señalización de las auxinas.** La unión del AIA a los receptores TIR1/AFB se lleva a cabo en el núcleo. Cuando los niveles de AIA son bajos (fondo azul oscuro), los represores Aux/IAAs forman heterodímeros con los factores de respuesta a auxinas ARFs reprimiendo la transcripción. Sin embargo, a niveles altos de AIA (fondo azul claro), la unión del AIA al receptor provoca el marcaje de los represores y degradación por el proteosoma 26S, liberando así los ARFs y permitiendo la expresión de genes de respuesta a auxinas. Las proteínas ABP1, localizadas en el retículo endoplásmico (RE) o en la membrana celular, funcionan también como receptores del AIA, mediando respuestas rápidas a auxinas como la regulación de la endocitosis, el rearreglo del citoesqueleto y el ablandamiento de la membrana que permite la expansión celular (Modificado de Ljung, 2013).

### 2.3.1.1. Biosíntesis de auxinas

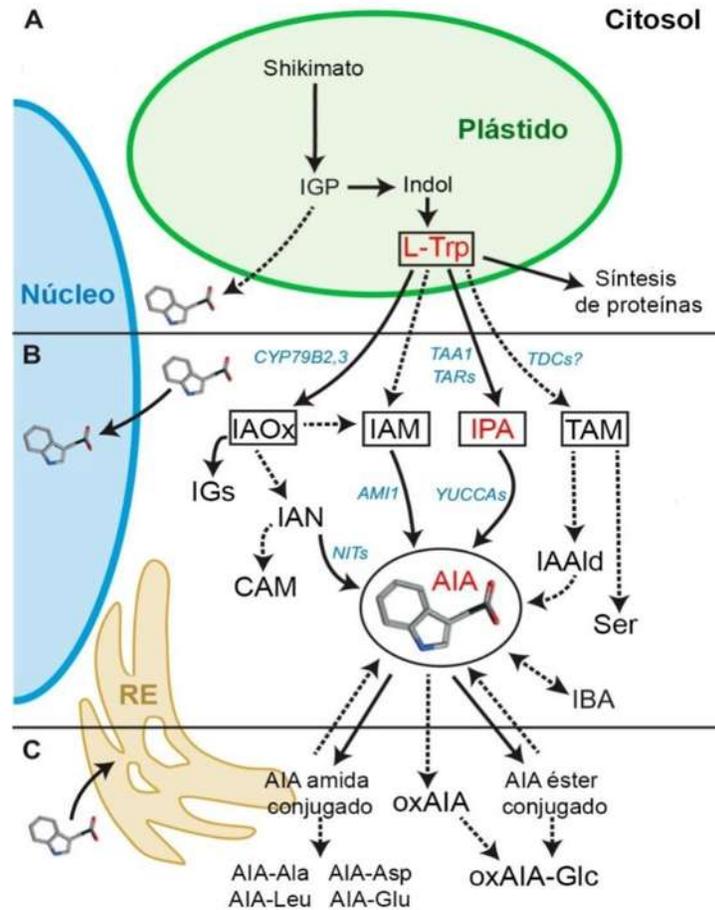
Las auxinas se sintetizan en el ápice del follaje, hojas jóvenes y meristemo de la raíz (Ljung *et al.*, 2001, 2005). Se ha evidenciado que el AIA se produce a

partir de precursores generados en la ruta del ácido shikímico (Fig. 5). Esta vía localizada en los plástidos produce precursores para la biosíntesis de diferentes compuestos indólicos, aminoácidos aromáticos (L-Trp, fenilalanina y tirosina), además de alcaloides, ligninas y flavonoides. El precursor del AIA es el L-Trp que principalmente es utilizado en la biosíntesis de proteínas, debido a ello la cantidad de Trp en el citosol es mayor comparada con la de AIA, sugiriendo una regulación estricta de los pasos intermedios en la biosíntesis del AIA para evitar su sobreproducción (Sairanen *et al.*, 2012).

Se sabe que las rutas de biosíntesis del AIA dependientes de L-Trp son las principales fuentes de auxinas libres, así como de sus precursores y conjugados en plantas. Sin embargo, existen evidencias de la existencia de una ruta de biosíntesis independiente de Trp proveniente del precursor indol-3-glicerol fosfato (IGP) (Ouyang *et al.*, 2000) (Fig. 5). Los genes y enzimas involucrados en la ruta independiente de Trp aún no se conocen por completo y la existencia de esta ruta se ha sugerido por el uso de precursores radiomarcados y mutantes en la biosíntesis de L-Trp. Estudios de este tipo, realizados en una gran variedad de especies de plantas, han demostrado la utilización diferencial de las vías de síntesis Trp-dependiente y Trp-independiente en momentos críticos del desarrollo de la planta incluyendo la embriogénesis (Ribnicky *et al.*, 2002), la maduración del fruto (Epstein *et al.*, 2002), en respuestas a cambios de temperatura (Rapparini *et al.*, 2002), durante la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas (Ljung *et al.*, 2001) y en respuesta a heridas (Sztein *et al.*, 2002).

Las vías de biosíntesis del AIA propuestas en plantas no han sido completamente dilucidadas, escasamente se conocen las enzimas involucradas y aún no está claro si las vías se encuentran en todas las especies vegetales (Ljung, 2013). Sin embargo, se han realizado avances considerables en cuanto a la identificación de las rutas de biosíntesis y los genes involucrados en ellas. Ejemplo son las rutas de biosíntesis dependientes del L-Trp que operan en angiospermas que fueron nombradas de acuerdo al primer metabolito formado a partir del L-Trp (Ljung, 2013) (Fig. 5).

Desde los sitios de síntesis, las auxinas son redistribuidas a través del cuerpo de la planta donde son requeridas para una gran variedad de procesos de desarrollo como la formación de raíces laterales, la dominancia apical, el desarrollo de hojas y flores y respuestas a estímulos ambientales (Ljung *et al.*, 2005), para lo cual requieren un mecanismo de transporte altamente regulado, conocido como transporte polar de auxinas (TPA) (Michniewicz *et al.*, 2007)

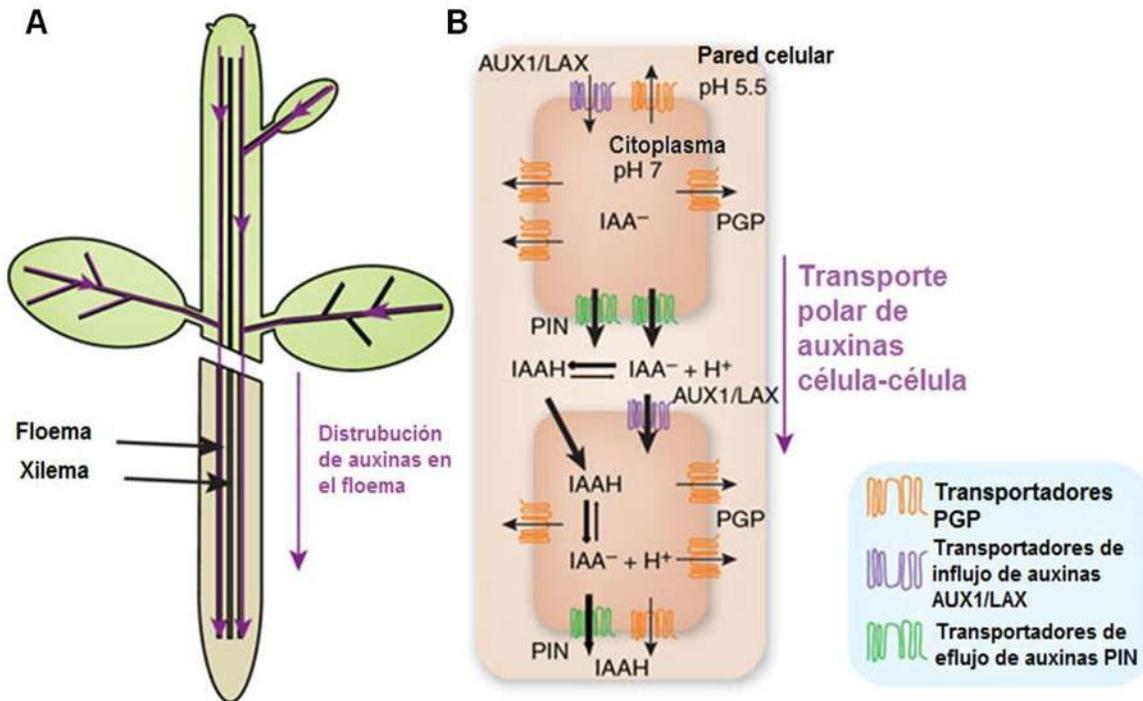


**FIGURA 5. Metabolismo del AIA en plantas superiores. (A)** La biosíntesis de los precursores del AIA como el IGP y el L-Trp se lleva a cabo en los plástidos, el L-Trp, principal precursor del AIA es generado por la vía del shikimato. **(B)** Las subsecuentes rutas de biosíntesis del AIA dependiente de Trp se efectúa en el citosol. Se muestran las cuatro vías posibles de biosíntesis del AIA en plantas superiores: IAox, IAM, IPA y TAM. Las enzimas cuya función se conoce se muestran en azul. **(C)** Rutas de degradación y conjugación del AIA. El AIA puede ser conjugado a aminoácidos y azúcares o catabolizado para formar oxAIA. Las flechas continuas indican rutas donde las enzimas, genes o intermediarios son conocidos y las discontinuas indican rutas menos definidas. IGP, indol-3-glicerol fosfato; L-Trp, L-triptófano; IAox, indol-3-acetaldoxima; IAM, indol-3-acetamida; IPA, ácido indol-3-pirúvico; TAM, triptamina; IGs, indol glucosinolatos; IAN, indol acetonitrilo; CAM, camalexina; IAAld, indol acetaldehído; Ser, serotonina; IBA, ácido indol-3-butírico; oxAIA, ácido 2-oxoindol-3-acético; oxAIA-Glc, ácido 2-oxoindol-3-acético conjugado a glucosa; AIA-Ala, AIA-Leu, AIA-Asp, AIA-Glu, ácido indol-3-acético conjugado a alanina, leucina, aspartato y glutamato, respectivamente (Modificado de Ljung, 2013).

### 2.3.1.2. Transporte de auxinas

El transporte, metabolismo y distribución de las auxinas controla los niveles de la fitohormona para establecer gradientes en ciertos tejidos o zonas de la planta. La distribución de auxinas está coordinada por múltiples procesos que involucran la biosíntesis, almacenaje, degradación y transporte de entrada (influjo) y salida (eflujo) de la célula (Petrásek y Friml, 2009). Aunque las auxinas pueden ser sintetizadas en varios tejidos (Ljung *et al.*, 2005), el principal sitio de síntesis son las hojas jóvenes y los cotiledones (Ljung *et al.*, 2001). Para transportar a las auxinas recién sintetizadas a los diferentes órganos, las plantas han desarrollado dos tipos de sistemas de transporte: i) a través del floema, es decir, transporte no polar o pasivo, que no requiere de energía y ii) un transporte célula a célula, conocido como transporte polar de auxinas (TPA) o transporte activo (Michniewicz *et al.*, 2007).

La redistribución de auxinas a larga distancia ocurre a través del floema debido a la gran capacidad y velocidad del transporte en dicho tejido (Michniewicz *et al.*, 2007) (Fig. 6A). Las auxinas, junto con otros metabolitos son transportados de esta manera a diferentes órganos y tejidos, donde las primeras son redistribuidas de forma regulada mediante el TPA. El transporte a larga distancia por el floema es importante para controlar procesos como las divisiones de las células del cambium y la ramificación de la raíz. La conexión entre el transporte a través del floema y el TPA ha sido establecida por experimentos en chícharo, en donde se mostró que las auxinas marcadas que fueron transportadas a través del floema, se detectaron más tarde en el sistema del TPA. Esta transferencia tiene lugar principalmente en los tejidos inmaduros del ápice del follaje (Cambridge y Morris, 1996).



**FIGURA 6. Transporte de auxinas.** **A)** Distribución de auxinas a través del floema desde los tejidos fuente – hojas jóvenes y brotes florales – hacia el ápice radicular. **B)** Transporte polar de auxinas. Las auxinas protonadas -ácido indol acético sin disociar (IAAH) – pueden difundir a través de la membrana plasmática, mientras que la forma aniónica es transportada dentro de la célula por transportadores de influjo AUX1/LAX. En el citosol, el IAAH es disociado en su forma aniónica (AIA) y por lo tanto atrapado dentro de la célula. El AIA solamente puede salir de la célula a través de los transportadores de eflujo PGP, PIN y PIL. La localización de los transportadores determina la direccionalidad del flujo intracelular de auxinas (Modificado de Robert y Friml, 2009).

El TPA es fundamental para la distribución de las auxinas a través de distancias cortas y largas, ocurre célula a célula y está mediado por diversas familias de transportadores. La familia AUXIN RESISTANT 1/ LIKE-AUX1 (AUX1/LAX) funciona como transportadores de influjo, mientras que los transportadores de eflujo están constituidos por la familia PIN-FORMED (PIN) y la subfamilia ABC-B/resistente a multidroga/P-glicoproteínas (ABCB/MDR/PGP) (Petrásek, 2009). Estos transportadores establecen los gradientes de auxinas, regulados por la expresión y localización subcelular de las proteínas antes

mencionadas, en respuesta a señales ambientales y del desarrollo (Friml, 2010). El TPA puede ser regulado a tres niveles: i) por la abundancia de los transportadores (mediadas a nivel de transcripción, traducción y/o degradación); ii) por el tráfico subcelular y posicionamiento de los transportadores en lugares específicos de la membrana plasmática y iii) por la actividad del transporte que puede variar por modificaciones postraduccionales, inhibidores endógenos, regulación del pH e interacciones entre los transportadores (Petrásek *et al.*, 2009). Debido a que el AIA es un ácido débil con pKa de 4.75, puede adquirir dos formas químicas dependiendo del pH del ambiente: una protonada (AIAH) a pH ácido y otra aniónica (AIA<sup>-</sup>) a pH neutro. El pH en la pared celular es de 5.5, por tal razón aproximadamente el 15% del AIA está en forma protonada y puede difundir a través de la membrana. Mientras que en el citosol, cuyo pH es aproximadamente de 7, se favorece la estructura aniónica del AIA. Debido a que esta última está eléctricamente cargada y no puede ser transportada a través de la membrana hacia las células vecinas (Rubery y Sheldrake, 1974). La membrana plasmática presenta proteínas transportadoras requeridas para el influjo y eflujo de auxinas (Bohn-Courseau, 2010) (Fig. 6B).

Aunque las auxinas en un determinado porcentaje pueden entrar libremente a la célula por difusión a través de la membrana plasmática (Tanaka *et al.*, 2006) (Fig. 6B), se ha demostrado que las proteínas de influjo son requeridas para la distribución de auxinas durante los tropismos y la organogénesis mediante inhibidores específicos como el ácido 1-naftoxiacético (1-NOA) y el ácido 3-cloro-4-hidroxifenilacético (CHPAA) (Imhoff *et al.*, 2000). El primer transportador de influjo identificado fue AUX1. En *Arabidopsis*, *AUX1* pertenece a una familia de cuatro genes altamente conservados, incluyendo *AUX1* y genes parecidos a los *AUX1* (*LAX*), *LAX1*, *LAX2* y *LAX3* que forman una subfamilia específica (Péret *et al.*, 2012; Swarup y Péret, 2012). Las proteínas AUX1/LAX actúan como simportadores, que permiten la entrada de la forma aniónica del AIA con ayuda de un gradiente de protones (Yang *et al.*, 2006). Aunque los miembros de la familia AUX/LAX tienen similitudes, cada uno regula un proceso del desarrollo dependiente de auxinas. Por ejemplo, diversos estudios apoyan la idea de que

AUX1 funciona en programas de desarrollo mediados por auxinas como el gravitropismo (Swarup *et al.*, 2001, 2004), el crecimiento de los pelos radiculares (Grebe *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2009), y la distribución del AIA en el tallo (Reinhard *et al.*, 2003; Bainbridge *et al.*, 2008), mientras que AUX1 y LAX3 son requeridos para el desarrollo de raíces laterales (De Smet *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2008) y la formación del gancho apical (Vandenbussche *et al.*, 2010). Mientras que LAX2 regula el desarrollo vascular, LAX1 y LAX2 están involucrados en el patrón de distribución de las hojas en el tallo (Bainbridge *et al.*, 2008).

Debido a que en el citosol se favorece la forma aniónica de las auxinas, las proteínas transportadoras de eflujo son esenciales para que éstas pasen a través de la membrana celular. Dos tipos de transportadores de eflujo han sido identificados, la familia de los transportadores PIN y ABCB/MDR/PGP. En plantas, los transportadores *ATP-binding cassette* (ABC/MDR/PGP) (Fig. 6B), originalmente se identificaron por la caracterización de proteínas que participan en procesos de detoxificación (Martinoia *et al.*, 1993). Dichas proteínas están involucradas en respuesta a patógenos, acumulación de fitato en las semillas y el transporte de auxinas y del ácido abscísico. Por lo tanto, los transportadores ABC/MDR/PGP desempeñan una función importante en el crecimiento de órganos, nutrición de las plantas, desarrollo vegetal, respuesta a estrés abiótico y la interacción de las plantas con su ambiente (Kang *et al.*, 2011). La familia (ABCB/ MDR/ PGP), incluye 21 miembros divididos en tres grupos (Cho y Cho, 2013): ABCB 1, ABCB 4 y ABCB 19 bien caracterizados como transportadores de auxinas (Titapiwatanakun y Murphy, 2009b), teniendo como característica particular que se encuentran ubicados de manera no polar. MDR 1 también conocido como PGP 19 o ABCB 19, fue originalmente identificado en un escrutinio en *Arabidopsis* para aislar genes con funciones relacionados a canales de aniones. Sin embargo, el análisis de las mutantes simples *pgp1* y *pgp19* mostraron epinastía de los cotiledones y hojas verdaderas, así como ondulaciones en los hipocotilos y raíces, por lo cual, dichas proteínas se involucraron con el transporte de auxinas (Noh *et al.*, 2001). Defectos en el transportador *ABCB 4* presentaron un fenotipo de plántulas con pelos radiculares más grandes respecto al silvestre

(Cho *et al.*, 2007), por lo que se sugirió que esta proteína participa en el transporte de auxinas en la raíz. Además, *ABCB 4* también ha sido implicada en la exportación y la captación de auxinas producidas por los microorganismos del suelo, esto último debido a su localización epidérmica (Santelia *et al.*, 2005; Terasaka *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007; Yang y Murphy, 2009). Se ha observado que *AtABCB 19* confiere resistencia a la kanamicina cuando dicha proteína es sobre-expresada en plantas (Kang *et al.*, 2010). Estudios recientes han mostrado que las proteínas *ABCB 14* y *ABCB 15* están asociadas con el transporte polar de auxinas (Kaneda, 2011) y se localizan principalmente en el tejido vascular de la inflorescencia del tallo, afectando el transporte polar en estos tejidos. *ABCB 19* se localiza en la parte apical de la célula sugiriendo una función en el transporte de auxinas a las puntas de la raíz y del follaje (Zazimalova *et al.*, 2010). *ABCB 1* se expresa en la columela y el meristemo apical de la raíz y en las células corticales y epidérmicas de la raíz en donde está involucrada en el transporte de auxinas desde el ápice de la raíz hacia el follaje (Geisler *et al.*, 2005). Por otra parte, *ABCB 4*, se expresa en la epidermis de la raíz y también media el transporte de auxinas hacia el follaje (Lewis *et al.*, 2007). Reportes recientes sugieren que *ABCB 19* afecta el transporte de auxinas a través de las proteínas PIN. *ABCB 19* se localiza en la parte de la membrana plasmática resistente a los detergentes. *ABCB 19* no altera la localización polar de PIN 1, pero estabiliza a PIN 1 proporcionando una plataforma para su localización estable y de esta manera afecta el tráfico de auxinas y la función de este transportador. La desestabilización de PIN 1 por la pérdida de *ABCB 19* ocasiona una inactivación de la actividad del transporte polar de auxinas, mayor aún que la mostrada por la mutante *pin 1* (Titapiwatanakun *et al.*, 2009a). En algunos tejidos, los transportadores *ABCB 19* y PIN 1 pueden interactuar formando un complejo, sus respectivas mutaciones causan un efecto sinérgico y las plantas son más sensibles a los inhibidores (Blakeslee *et al.*, 2007).

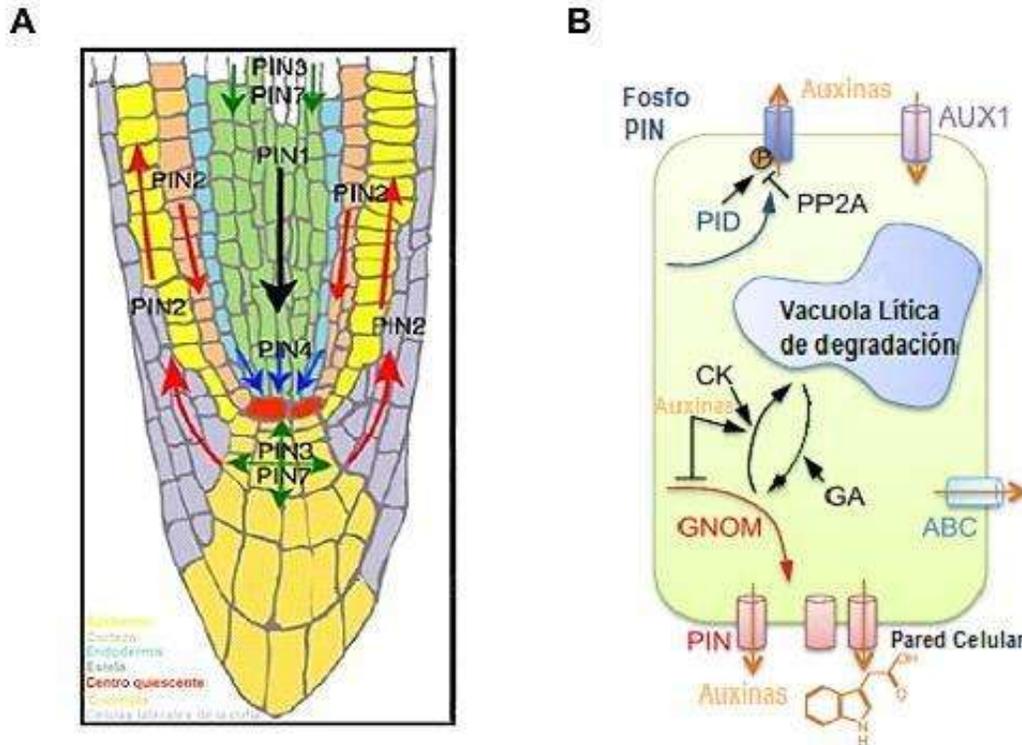
Las proteínas PIN-FORMED (PIN) pertenecen a una familia de proteínas transmembranales específicas de plantas, que transportan las auxinas y están constituidas por ocho miembros (Krecek, 2009; Friml, 2010), los cuales se

subdividen en dos subfamilias con base en la presencia o ausencia de un dominio hidrofílico central: i) La subfamilia de PINs grandes, que presentan un dominio hidrofílico central que separa a dos dominios hidrofóbicos transmembranales e incluye todos los miembros definidos como transportadores de eflujo de auxinas localizados en la membrana plasmática: PIN 1-PIN 4 y PIN 7. PIN 6 también forma parte de este grupo, con base en su secuencia altamente similar en las regiones transmembranales y la reducción parcial en el dominio hidrofílico (Petrásek *et al.*, 2006; Wisniewska *et al.*, 2006). ii) La subfamilia de PINs cortos, codifican proteínas con el dominio hidrofílico central ausente y comprende a las proteínas PIN 5 y PIN 8, que se localizan en el retículo endoplásmico y por lo tanto no están directamente involucradas en el transporte de auxinas entre células, pero si median la homeostasis intracelular de las auxinas (Mravec *et al.*, 2009). La proteína PIN 8, se expresa específicamente en el gametofito masculino (Dal Bosco *et al.*, 2012a; Ding *et al.*, 2012) y junto con PIN 5 regula el transporte intracelular de auxinas en el polen (Dal Bosco *et al.*, 2012b). En *Arabidopsis*, PIN 1 media la organogénesis y diferenciación del tejido vascular, PIN 2 y 3 el crecimiento gravitrópico de la raíz, PIN 4 la actividad del meristemo radicular y PIN 6 modifica el transporte de auxinas en procesos requeridos para el crecimiento de la raíz y el desarrollo reproductivo (Cazzonelli *et al.*, 2013). PIN 7 está involucrado en el desarrollo temprano del embrión (Vieten *et al.*, 2005).

En la figura 7A se muestra la ubicación de las proteínas PIN en la punta de la raíz de *Arabidopsis*. La localización de las proteínas PIN en la membrana plasmática regula la dirección del movimiento de auxinas y consecuentemente determina su distribución local. La localización celular de las proteínas PIN está regulada por fitohormonas, señales ambientales y del desarrollo (Hayashi, 2012). Un factor determinante en la polaridad de las proteínas PIN es su tráfico endocítico, ya que son secretadas de una manera no polar y su subsecuente endocitosis y reciclamiento establece su localización en la parte basal de la célula (Dhonukshe *et al.*, 2008) (Fig. 7B). Este reciclamiento es dependiente de la proteína endosomal GNOM (GN). La fosforilación de PIN por diversas cinasas como PINOID (PID), lleva a estos transportadores de auxinas a una vía de

reciclamiento independiente de GN, dirigiéndola al polo apical de la célula (Kleine-Vehn *et al.*, 2009). Esta actividad es antagonizada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A). La endocitosis y el reciclamiento también controlan la cantidad de proteínas PIN en la membrana plasmática por regulación del balance de la proteína que es reciclada de vuelta a la membrana plasmática o dirigida a la vacuola lítica para su degradación (Fig. 7B) (Finet y Jaillais, 2012). Se ha observado que la biosíntesis local de auxinas puede contribuir al establecimiento de los gradientes dependientes de GN en tejidos específicos (Guo *et al.*, 2014). Por otra parte, el receptor de auxinas, la proteína *Auxin Binding Protein 1* (ABP 1) está involucrada en la modulación del reciclamiento intracelular de las proteínas, controlando la tasa de transporte de las auxinas a través de la membrana plasmática y la cantidad y dinamismo de transportadores PIN (Conanová *et al.*, 2013). La señalización de auxinas a través de ABP 1 inhibe la internalización de las proteínas PIN mediada por clatrina (Fig. 7B) (Dhonukshe *et al.*, 2007a; Robert *et al.*, 2010). Los componentes del endosoma temprano BFA- *visualized endocytic trafficking defective 1* y 2 (BEN 1 y BEN 2) están involucrados en distintos pasos del tráfico endosomal temprano y son requeridos para la localización polar de PIN, su repolarización dinámica y consecuentemente la formación de gradientes de auxinas (Tanaka *et al.*, 2013). El tráfico de proteínas PIN también puede ser regulado por fitohormonas, las auxinas por sí mismas, inhiben la internalización de las proteínas PIN desde la membrana plasmática, controlando de esta manera los niveles de auxinas (Geldner *et al.*, 2001). Por otra parte, las citocininas controlan la endocitosis de las proteínas PIN induciendo su degradación en la vacuola lítica (Fig. 7B) (Marhavy *et al.*, 2011). Altas concentraciones de jasmonato también inducen la degradación y endocitosis de PIN 2 (Sun *et al.*, 2011). Las giberelinas limitan el tráfico de PIN a la vacuola lítica al igual que los péptidos de la familia GOLVEN (Whitford *et al.*, 2012; Willige *et al.*, 2011) (Fig. 7B), mientras que el etileno incrementa la expresión de *PIN 3* y *PIN 7* (Lewis *et al.*, 2011). En un escrutinio *in silico*, para aislar proteínas con homología y topología similar a los miembros de la familia PIN en *Arabidopsis* se encontraron siete proteínas

parecidas a las PIN (PILS), que se localizaron en el retículo endoplásmico y poseen actividad de transportadores de auxinas (Habets y Offringa, 2014).



**FIGURA 7. Posicionamiento, tráfico y reciclaje de las proteínas PIN. A)** La localización polar de las proteínas PIN es la clave para el flujo de auxinas y el establecimiento local de concentraciones de auxinas en la punta de la raíz. **B)** Un factor determinante para la polaridad de las proteínas PIN es el tráfico endocítico, el modelo propone que las proteínas PIN son secretadas en una manera no polar y que su subsecuente endocitosis y reciclamiento establece su localización polar en el polo basal de la célula (Adaptado de Michniewicz *et al.*, 2007; Finet y Jaillais, 2012).

## 2.4. Inhibidores del transporte de auxinas

Un grupo de sustancias producidas naturalmente que actúan como inhibidores del transporte de auxinas son los flavonoides, los cuales son metabolitos secundarios polifenólicos de las plantas cuya síntesis es tejido

específica, regulada por el desarrollo y dependiente de las condiciones ambientales como luz y temperatura. Además, los flavonoides controlan la fertilidad del polen y llevan a cabo funciones para proteger a las plantas contra estreses bióticos y abióticos (Thompson *et al.*, 2010; Hichri *et al.*, 2011). Algunos flavonoides como la quercetina y el kempferol causan inhibición del TPA y por consiguiente la acumulación de auxinas en las plantas. Las mutantes de *Arabidopsis*, *TRANSPARENT TESTA 3, 4 y 7 (TT 3, TT 4 y TT 7)*, que carecen de enzimas de la ruta biosintética de flavonoides, han sido usadas para elucidar la función de los flavonoides endógenos en el transporte de auxinas. Al agregar flavonoides, a las mutantes y a las plantas tipo silvestre se observó que los flavonoides afectan el transporte polar de auxinas (Peer y Murphy, 2007). Algunos sitios de acción de los flavonoides han sido identificados como proteínas membranales, mejor conocidas como proteínas de unión al NPA, la subunidad reguladora NBP (*NPA-binding protein*) (Hernández-Mata *et al.*, 2010).

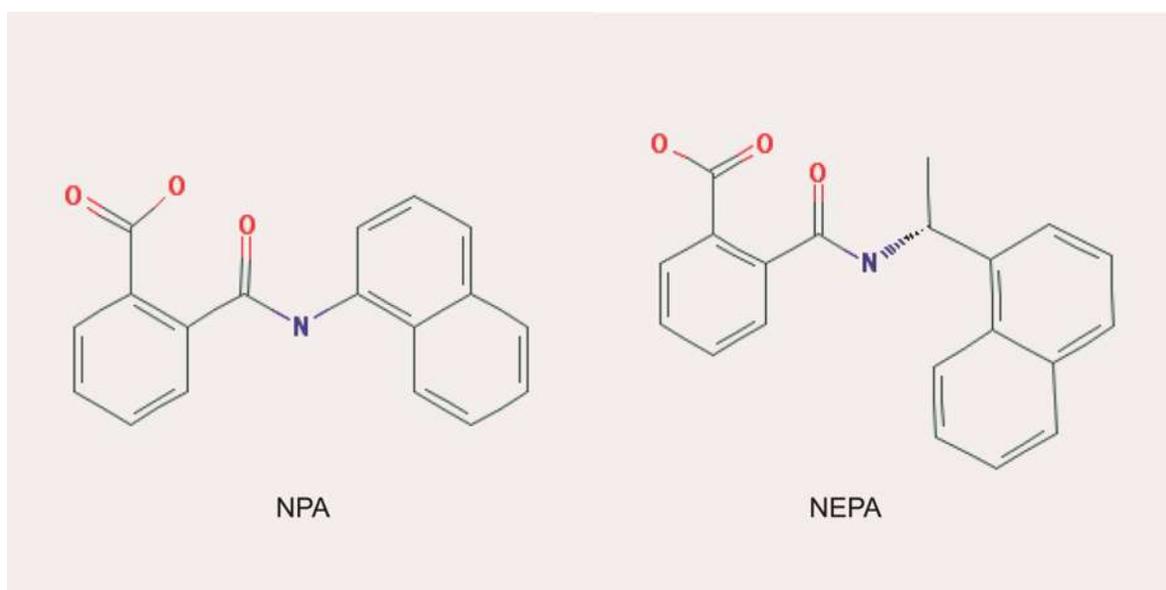
El conocimiento de los mecanismos del transporte polar de auxinas y su función sobre el desarrollo vegetal ha estado íntimamente ligado con el uso de pequeñas moléculas incluidos componentes auxínicos, antagonistas de acción auxínica e inhibidores del transporte de auxinas (ITAs) (Woodward y Bartel 2005, De Rybel *et al.*, 2009a).

Los ITAs bloquean el movimiento polar de auxinas entre las células. Al aplicar exógenamente ITAs, estos interfieren con la distribución de auxinas y perturban el desarrollo vegetal (Tanaka *et al.*, 2006). Algunos de los inhibidores más representativos son el ácido 2,3,5-triyodobenzoico (TIBA) y el ácido 1-pirenoilcenzóico (PBA), los cuales no sólo inhiben el eflujo de auxinas, sino interfieren con el tráfico subcelular de las proteínas PIN y AUX 1 (Kleine-Vehn *et al.*, 2006). PBA y TIBA interfieren con la motilidad de los organelos y el movimiento individual de vesículas, probablemente por inhibición del dinamismo de la actina del citoesqueleto (Dhonukshe *et al.*, 2007b). El ácido naftiltalámico (NPA) es el inhibidor de eflujo de auxinas mejor caracterizado, sus efectos inhibitorios en los sistemas de transporte de auxinas llevan a la supresión de elongación y

crecimiento diferencial de los hipocotilos en *Arabidopsis* (Ma y Robert, 2013). El NPA actúa como un inhibidor específico del eflujo del AIA teniendo como blanco principal los transportadores ABCB (Bailly *et al.*, 2008; Nagashima *et al.*, 2008) y representa una valiosa herramienta química en la investigación de la función del TPA y sus efectos sobre el desarrollo vegetal. Escrutinios genéticos de mutantes con respuestas alteradas al NPA permitieron la identificación de siete genes denominados *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE (TIR)*, *TIR 1-TIR 7* (Ruegger *et al.*, 1997). Posteriormente, se realizó la caracterización de algunos de estos genes: *TIR1*, es el receptor nuclear de las auxinas (Dharmasiri *et al.*, 2005); *TIR2* codifica para la proteína TAA una de las enzimas clave en ruta de biosíntesis de auxinas dependiente de IPA; *TIR3* codifica para un factor de respuesta a auxinas, el AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (ARF 7) y *TIR 5* para BIG, una proteína similar a calosina requerida en el TPA (Ma y Robert, 2013).

En años recientes, nuevos ITAs han sido identificados en algunos casos basándose en la similitud estructural de auxinas ya sea naturales o sintéticas, o de ITAs ya conocidos. Sin embargo, debido a los efectos pleiotrópicos que estos compuestos presentan sobre la arquitectura radicular, se ha dificultado la identificación de nuevos componentes involucrados en procesos específicos del desarrollo como en la formación de raíces laterales. Por lo tanto, encontrar moléculas sintéticas o naturales, que sean capaces de afectar la homeostasis de las auxinas en un tejido u órgano de manera específica, podría ayudar a entender los mecanismos moleculares de las auxinas u otras fitohormonas en la regulación de procesos específicos del desarrollo vegetal.

Katekar y Geissler (1980) fueron los primeros en caracterizar un grupo de ITAs denominado fitotropinas, en el cual fue incluido el NPA. Las fitotropinas son compuestos que inhiben las respuestas gravitrópicas y fototrópicas, así como el transporte de las auxinas. Su estructura incluye un ácido carboxílico unido a un anillo aromático ligado en posición orto a un segundo anillo aromático. En nuestro grupo de trabajo se han buscado moléculas con similitud estructural al principal inhibidor utilizado el NPA. La molécula seleccionada fue el ácido naftiletiftalámico (NEPA), que difiere del NPA por tener un carbono y grupo etilo adicional, además de contar con la estructura de una fitotropina (Fig. 8).



**FIGURA 8. Estructura comparativa de compuestos.** Estructura molecular del ácido naftilftalámico (NPA) y el ácido naftiletiftalámico (NEPA) (NCBI 2015).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El transporte de auxinas es fundamental para diversos procesos del crecimiento y desarrollo de las plantas. La caracterización de moléculas con similitud estructural a los inhibidores del transporte de auxinas, los cuáles manifiestan efectos deletéreos sobre el crecimiento al inhibir el crecimiento de la raíz primaria y causar agravitropismo, representa una alternativa para la identificación de compuestos con blancos más específicos, que puedan ser utilizados para el estudio de los procesos regulados por auxinas sin afectar de manera general el desarrollo.

#### 4. HIPÓTESIS

El NEPA, un compuesto que presenta similitud estructural con el inhibidor del transporte de auxinas NPA, afecta el desarrollo de la raíz en *Arabidopsis thaliana* modulado por las auxinas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo general.**

Caracterizar la actividad del ácido naftiletilftalámico (NEPA) sobre el transporte y respuesta a auxinas y la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*.

### **5.2. Objetivos específicos.**

1. Evaluar la actividad del NEPA sobre procesos del desarrollo de la raíz regulados por auxinas.
2. Analizar el efecto del NEPA sobre la expresión y localización de transportadores de auxinas.
3. Estudiar el efecto del NEPA sobre programas de morfogénesis en plantas silvestres y mutantes afectadas en la señalización por auxinas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material biológico

Para la realización de los diferentes experimentos, se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* del ecotipo silvestre Columbia 0 (Col-0), así como de las líneas transgénicas *CycB1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *DR5::uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997), *DR5::GFP* (Ottenschaläger *et al.*, 2003), *DR5::VENUS* (Heisler *et al.*, 2005), *EXP7::uidA* (Cho y Cosgrove, 2002), *PLT1::CFP* (Kormet y Scheres, 2009), *WOX5::GFP* (Blilou *et al.*, 2005), *PIN1::PIN1-GFP* (Benková *et al.*, 2003), *PIN2::PIN2-GFP*, *PIN3::PIN3-GFP* y *PIN7::PIN7-GFP* (Blilou *et al.*, 2005). También se utilizaron la mutante sencilla *tir1* (Ruegger *et al.*, 1997) y la triple mutante *tir1afb2afb3* (Parry *et al.*, 2009).

### 6.2. Compuestos químicos

El NEPA fue adquirido de SIGMA-ALDRICH (Número de catálogo 399728) y NPA de ChemService ALDRICH (Número de catálogo N-12507), ambos fueron disueltos en dimetil sulfóxido (DMSO). Plántulas crecidas en medio control se suplementaron con disolvente como tratamiento control.

### 6.3. Desinfección de las semillas

Las semillas se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml, se agregaron 500 µl de etanol al 96% v/v y se sometieron a agitación durante 5 minutos. Posteriormente, se retiró el etanol y adicionaron 700 µl de hipoclorito de sodio al 20% v/v, sometiéndose a una agitación vigorosa por 7 minutos. Finalmente, se retiró el hipoclorito y se lavaron con 1 ml de agua destilada estéril, cinco veces durante de 1 minuto en agitación. El proceso se llevó a cabo en una campana de flujo laminar,

en condiciones de esterilidad. Al finalizar la desinfección, los tubos se colocaron a 4 °C durante 48 h para promover y homogenizar la germinación.

#### **6.4. Preparación del medio de cultivo**

En un frasco con agua destilada se agregó 0.6 % de sacarosa, posteriormente 0.9 g por litro de sales de Murashige y Skoog (con los nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas) (Murashige y Skoog, 1962) que corresponden a una concentración de 0.2X. El medio MS está formado por los siguientes componentes:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  2.0 mM,  $\text{KNO}_3$  1.9 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3 mM,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.15 mM, KI 5  $\mu\text{M}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  25  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.1 mM,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 mM,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.1  $\mu\text{M}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.1 mM. Además se añadió inositol (10 mg/L) y glicina (0.2 mg/L). Una vez adicionados todos los componentes del medio, estos se disuelven por agitación, se ajustó el pH a 7, con KOH 0.1 N. Se agregó agar al 1 %, el medio se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 120 °C y 15 libras de presión. Una vez estéril el medio de cultivo, se adicionó NEPA y NPA disueltos en DMSO respectivamente para obtener las diversas concentraciones a evaluar. Posteriormente se vació en cajas de Petri estériles de 100 x 15 mm y se dejó solidificar.

#### **6.5. Siembra de las semillas**

Una vez solidificado el medio, se procedió a siembra de las semillas. Para los análisis en cajas de Petri se sembraron las semillas en la parte superior en fila para permitir a la raíz un crecimiento sobre el medio. Finalmente, las cajas se sellaron con plástico o cinta micropore, para evitar contaminación por microorganismos como bacterias y hongos.

## **6.6. Condiciones de crecimiento**

Después de la siembra, las semillas se incubaron en una cámara de crecimiento Percival AR95L con fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h de oscuridad, temperatura de 22 °C y humedad del 80 %. Las cajas se colocaron en posición vertical con un ángulo de 75° de inclinación, para permitir tanto el crecimiento del sistema radicular como del aéreo de la planta.

## **6.7. Análisis de las variables del crecimiento *in vitro***

Las variables que se analizaron en los diferentes bioensayos fueron: la longitud de la raíz primaria, el número de raíces laterales, la densidad de raíces laterales y densidad y longitud de pelos radiculares. La primera se midió con una regla, realizando mediciones de plantas provenientes de tres placas independientes. Las raíces laterales se cuantificaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico Leica MZ6/L2 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) en el objetivo 0.8X analizando todas las plantas por caja en las tres replicas para cada uno de los tratamientos. La densidad de las raíces laterales se determinó dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria y se expresó como el número de raíces laterales por centímetro. La densidad de los pelos radiculares se determinó midiendo en plántulas de 4 días la cantidad de pelos en una región de 500µm desde la punta de la raíz. La longitud de los pelos fue determinada midiendo 10 pelos por planta tomando como referencia la base del pelo radical se utilizó el programa del National Institutes of Health (2004) ImageJ, (image analysis software system), versión 1.46r. <http://imagej.nih.gov/ij/index.html>, las imágenes del sistema radicular de las plántulas fueron capturadas con una cámara digital SAMSUNG SCC 131-A adaptada a un microscopio estereoscópico Leica MZ6/L2 (Leica Microsystems, Wetzlar Germany) en el objetivo 1.25X.

## **6.8. Determinación de las etapas del desarrollo de los primordios de raíces laterales**

Los primordios de las raíces laterales fueron cuantificados y clasificados de acuerdo al protocolo propuesto por Malamy y Benfey (1997), en plantas de *A. thaliana* de 7 días en cada uno de los tratamientos. Las plantas fueron clarificadas para poder visualizar y cuantificar los primordios en las 8 etapas descritas (I-VII y RL emergidas) del desarrollo a lo largo de la raíz primaria.

## **6.9. Análisis de expresión del gen de la $\beta$ -glucuronidasa (GUS)**

Para la línea reportera *DR5::uidA* las plántulas de 7 ddg, se colocaron en cajas de microtítulo y se incubaron toda la noche, la línea *EXP7::uidA* se incubó por 20 min, ambas a 37 °C en el amortiguador de reacción de GUS (0.5 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-glucoronido en NaHPO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7.0;  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM; EDTA 10 mM; N-lauril-sarcosina 0.1%; Tritón X-100 0.1 %, y también contiene el catalizador de la oxidación ferri y ferrocianuro de potasio 5 mM (Jefferson *et al.*, 1987). Posteriormente las plantas fueron sometidas a clarificación de acuerdo a la metodología descrita a continuación y finalmente se realizaron montajes semipermanentes para su posterior análisis por microscopía.

## **6.10. Clarificación de tejidos vegetales**

La clarificación de las plántulas consistió de los siguientes pasos: se eliminó el buffer de tinción de GUS y se agregó un volumen de HCl 0.24 N en metanol al 20 %, se colocó la muestra a 57 °C durante 60 min. Transcurrido este tiempo se decantó la solución y agregó un volumen de NaOH al 7% en etanol al 60% durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó etanol al 40, 20 y 10% sucesivamente por 25 min c/u y en este último, se agregó un volumen de

glicerol al 50% para el almacenamiento del material previo a su análisis. Este procedimiento se realizó para cada experimento procesando al menos 10 plantas de cada tratamiento (Malamy y Benfey, 1997).

### **6.11. Preparaciones semipermanentes**

Las plantas ya clarificadas se montaron en portaobjetos, colocándolas dentro de un marco de cinta parafilm, el espacio vacío del marco se llenó con glicerol y se colocó un cubreobjetos. Finalmente, la preparación se selló por las orillas con esmalte.

### **6.12. Microscopía**

El sistema radicular de *Arabidopsis thaliana* se analizó con un microscopio estereoscópico (Leica MZ6) en un aumento de 0.8X. Los primordios de raíces laterales se analizaron en preparaciones semipermanentes utilizando microscopía de Nomarsky (Leica DM5000B) en los aumentos 10X y 40X. Los análisis de la proteína verde fluorescente (GFP) se realizaron en un microscopio confocal (Olympus FV1000).

### **6.13. Detección de la proteína verde fluorescente (GFP) y tinción con yoduro de propidio (IP)**

Para la tinción fluorescente con yoduro de propidio (IP), plántulas de las líneas transgénicas de *Arabidopsis DR5::GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003), *DR5::VENUS* (Heisler *et al.*, 2005), *EXP7::uidA* (Cho y Cosgrove, 2002), *PLT1::CFP* (Kormet y Scheres, 2009), *WOX5::GFP* (Blilou *et al.*, 2005), *PIN1::PIN1:GFP* (Benková *et al.*, 2003), *PIN2::PIN2:GFP*, *PIN3::PIN3:GFP* y *PIN7::PIN7:GFP* (Blilou *et al.*, 2005) fueron crecidas durante 7 días en los

diferentes tratamientos e incubadas en una solución de yoduro de propidio (10 mg ml<sup>-1</sup>) durante 3 minutos (Vieira *et al.*, 1975). Posteriormente, las muestras fueron analizadas de manera independiente en longitudes de onda específicas que permiten la fluorescencia del IP (568 nm de excitación y 585-610 nm de emisión) y de la GFP (488 nm de excitación y 500-523 nm de emisión) usando un microscopio confocal (Olympus FV1000). Cada una de las imágenes obtenidas del análisis se traslapó para obtener la imagen final.

#### **6.14. Análisis de datos**

Los datos fueron analizados por univarianza y sometidos a una prueba post hoc Tukey para determinar diferencias en las respuestas evaluadas en todos los tratamientos. En las gráficas las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). Para todos los experimentos los datos se analizaron estadísticamente con el programa StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

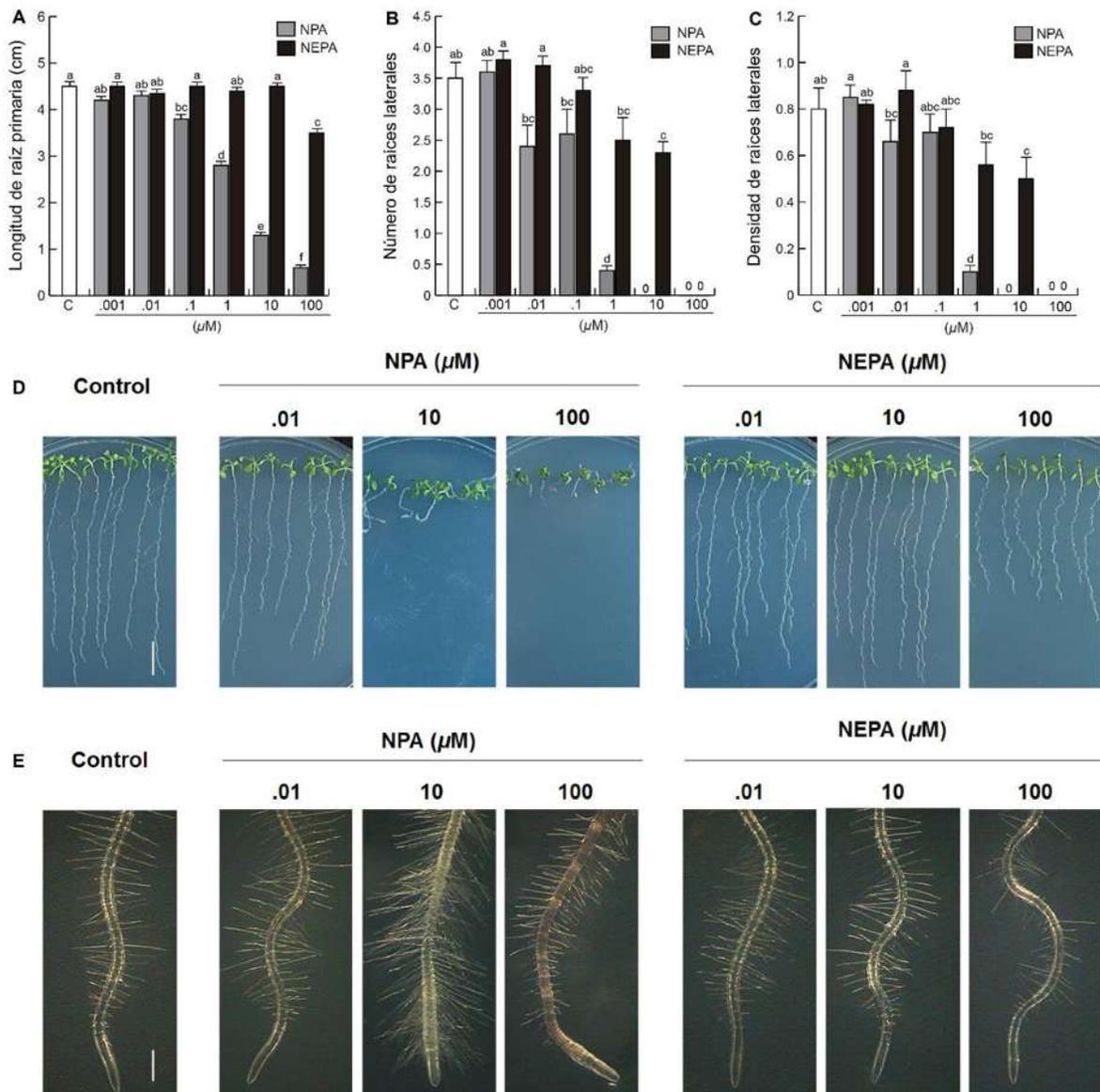
## 7. RESULTADOS

### 7.1. Curva de estandarización de concentraciones del NEPA y NPA

Para estandarizar la curva de concentraciones del NEPA a analizar, las semillas de *Arabidopsis* del ecotipo silvestre Col-0 fueron desinfectas y sembradas en cajas de Petri con medio MS 0.2X, con las concentraciones de NEPA y NPA de .001, .01, .1, 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  y su respectivo control adicionando DMSO. En la figura 9 se pueden observar fotografías representativas de plantas crecidas en los tratamientos.

En los experimentos mencionados se determinó la longitud de la raíz primaria, el número y densidad de raíces laterales. Después de 12 días en los tratamientos, se encontró que el NPA causa una inhibición del crecimiento de la raíz primaria, una disminución en la formación de raíces laterales y un crecimiento agravitrópico de la raíz primaria en concentraciones superiores a 0.1  $\mu\text{M}$ . En plantas tratadas con NEPA, se observa una inhibición de la formación de raíces laterales a partir de 10  $\mu\text{M}$  y del crecimiento de la raíz primaria en 100  $\mu\text{M}$  del 20% (Fig. 9 A-C).

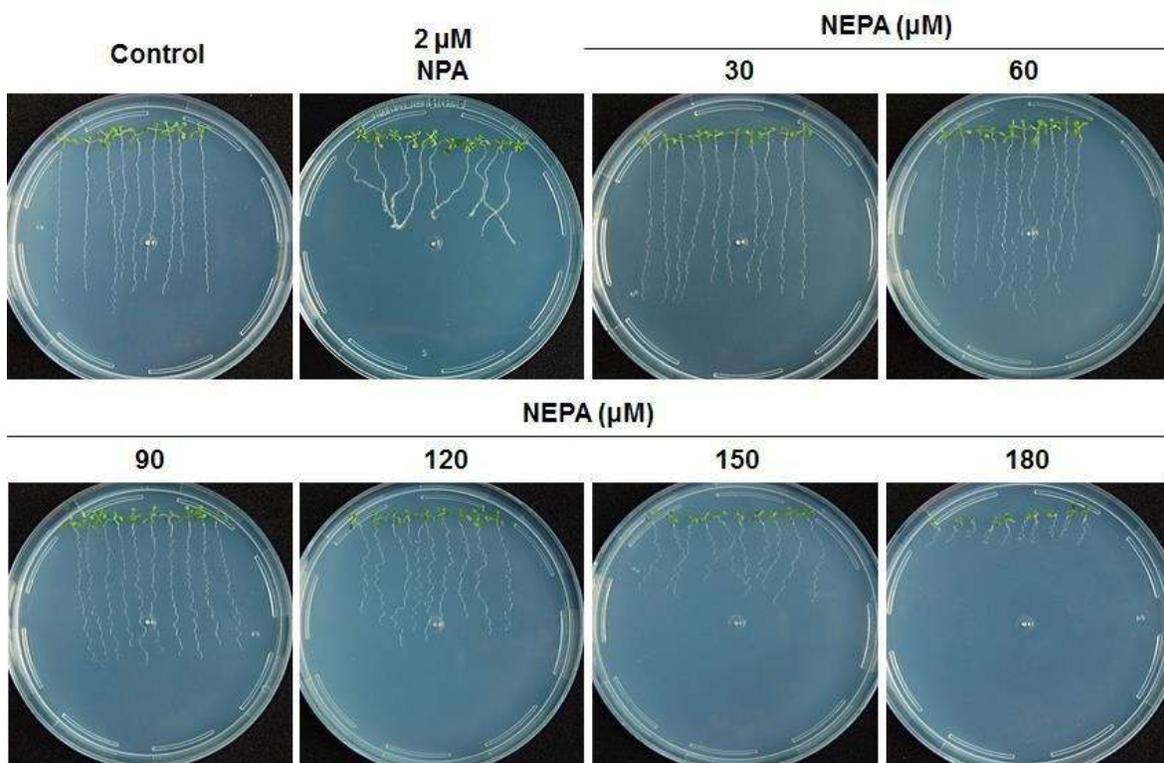
Debido a que en el medio suplementado con 1  $\mu\text{M}$  de NPA aún hay formación de raíces laterales, se decidió utilizar 2  $\mu\text{M}$  como control ya que es una concentración altamente reportada y se sabe que a esta ya no hay formación de raíces laterales y el crecimiento de la raíz primaria se inhibe en un 50%. En los tratamientos con NEPA observamos que a partir de 10  $\mu\text{M}$  comienza a disminuir la formación de raíces laterales, sin embargo, el crecimiento de la raíz primaria no se ve afectado sino hasta 100  $\mu\text{M}$  y solo en un 20 % mientras que la formación de raíces laterales queda abatida en esta concentración, es por eso que decidimos analizar una curva de concentraciones de NEPA con intervalo desde 30 hasta 180  $\mu\text{M}$ .



**FIGURA 9. Crecimiento de plantas silvestres de *Arabidopsis* en medio suplementado con NEPA y NPA.** Semillas del ecotipo silvestre Col-0 fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X adicionado con NEPA y NPA por 12 días. **(A)** Longitud de raíz primaria. **(B)** Número de raíces laterales. **(C)** Densidad de raíces laterales. **(D y E)** Fotografías representativas de plantas crecidas con los tratamientos. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar ( $n=30$ ). Las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). La barra de escala equivale a 1 cm y 100  $\mu\text{m}$  respectivamente. El experimento fue realizado por triplicado con resultados similares.

## 7.2. Efecto del NEPA sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana*

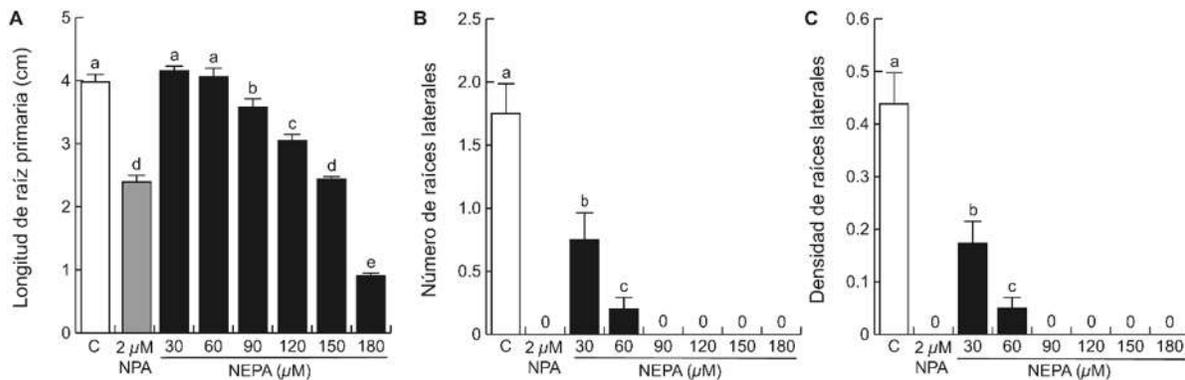
Para analizar los efectos del NEPA sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana*, semillas del ecotipo silvestre Col-0 fueron desinfectadas y sembradas en cajas de Petri con medio MS 0.2X, con las concentraciones de NEPA de 30, 60, 90, 120, 150 y 180  $\mu\text{M}$ , comparando sus efectos con el inhibidor del transporte de auxinas NPA, en concentración de 2  $\mu\text{M}$ , y su respectivo control adicionando DMSO. En la figura 10 se pueden observar fotografías representativas de plantas crecidas en los tratamientos.



**FIGURA 10. Crecimiento de plantas silvestres de *Arabidopsis* en medio suplementado con NEPA y NPA.** Semillas del ecotipo silvestre Col-0 fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X adicionado con NEPA y NPA por 8 días. El experimento se realizó por triplicado obteniendo resultados similares.

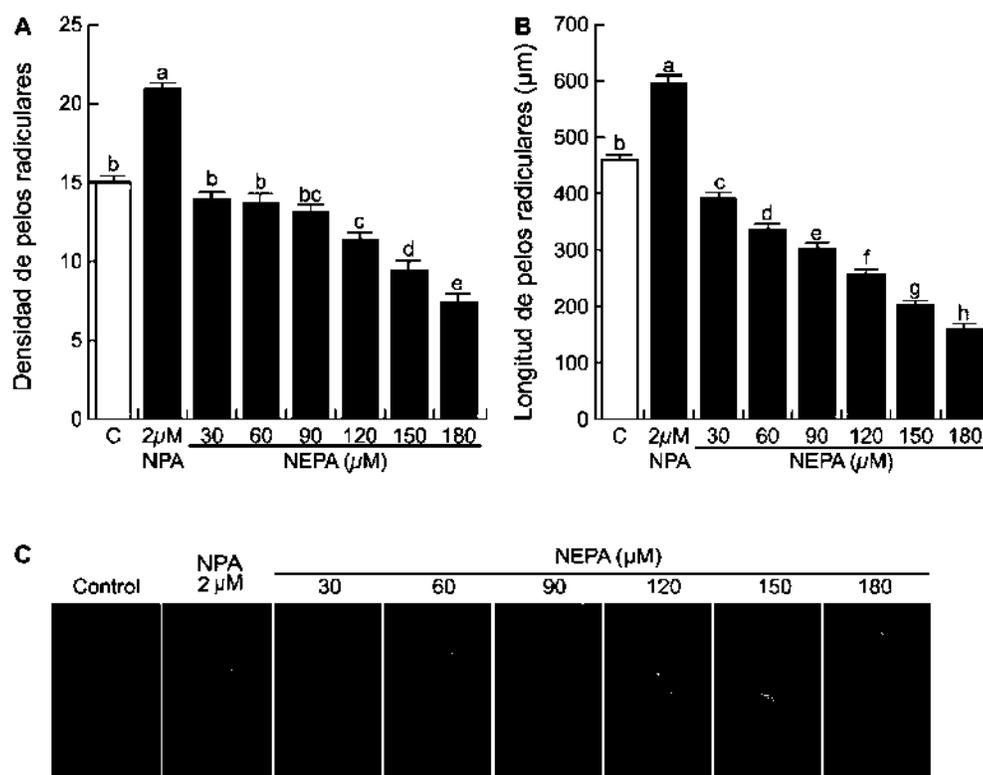
Después de 8 días en los tratamientos, se encontró que el NPA causa una inhibición del crecimiento de la raíz primaria, una disminución en la formación de raíces laterales y un crecimiento agravitrópico de la raíz primaria. En las plantas tratadas con NEPA, la inhibición de la raíz primaria puede ser detectada en concentraciones superiores a 90  $\mu\text{M}$ , con una longitud 11% menor a la registrada en el control, en tanto que en la mayor concentración evaluada de NEPA (180  $\mu\text{M}$ ) se registró un 77% de inhibición del crecimiento (Fig 11 A). En contraste con el NPA, que afecta la respuesta gravitrópica, el NEPA parece incrementar dicha respuesta evidenciado porque la raíz primaria incrementa el número de giros al crecer sobre el medio (Fig.12 C).

Las plantas tratadas con NPA muestran inhibición completa de formación de raíces laterales (Fig. 11 B y C), en tanto que el número de raíces laterales decrecen con el incremento en la concentración de NEPA, comenzando a disminuir en un 72% en 30  $\mu\text{M}$ , 87.5% en 60  $\mu\text{M}$  y 100% en 90  $\mu\text{M}$ , comparadas con las plantas control (Fig. 11 B y C). Interesantemente, la formación de raíces laterales fue afectada antes de que el crecimiento de la raíz primaria fuera inhibido de una forma importante.



**FIGURA 11. Efecto del NEPA en la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*. (A)** Longitud de raíz primaria. **(B)** Número de raíces laterales. **(C)** Densidad de raíces laterales. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (n=30). Las letras indican las medias que difieren significativamente (P <0.05). El experimento fue realizado por triplicado con resultados similares.

Los pelos radiculares son células epidérmicas que participan en la captación de agua y nutrientes. Para determinar si el NEPA podría alterar el desarrollo de pelos radiculares, se desarrollaron experimentos en los cuales plántulas de *Arabidopsis* (Col-0) fueron germinadas y crecidas en medios conteniendo diferentes concentraciones de NEPA y NPA. Los parámetros de los pelos radiculares fueron analizados a los 5 días después de germinar en una región de 500  $\mu\text{m}$  en la zona de diferenciación de raíces primarias de las plantas control y las tratadas con los compuestos. La figura 12 C muestra fotografías representativas de los pelos radiculares formados. Las plántulas control muestran la organización celular típica de la punta de la raíz primaria, mientras que el tratamiento con NPA incrementa substancialmente la densidad de pelos radiculares (Fig. 12 A) y la longitud de los pelos radiculares (Fig. 12 B), posiblemente debido a la acumulación de auxinas en la punta de la raíz. Por lo contrario, en las plantas tratadas con NEPA se observa una disminución tanto en la densidad (Fig. 12 A) como en la longitud de los pelos radiculares (Fig. 12 B) de una manera dosis dependiente. Estos resultados indican que el NPA y el NEPA afectan de manera diferente y contrastante el desarrollo de los pelos radiculares.

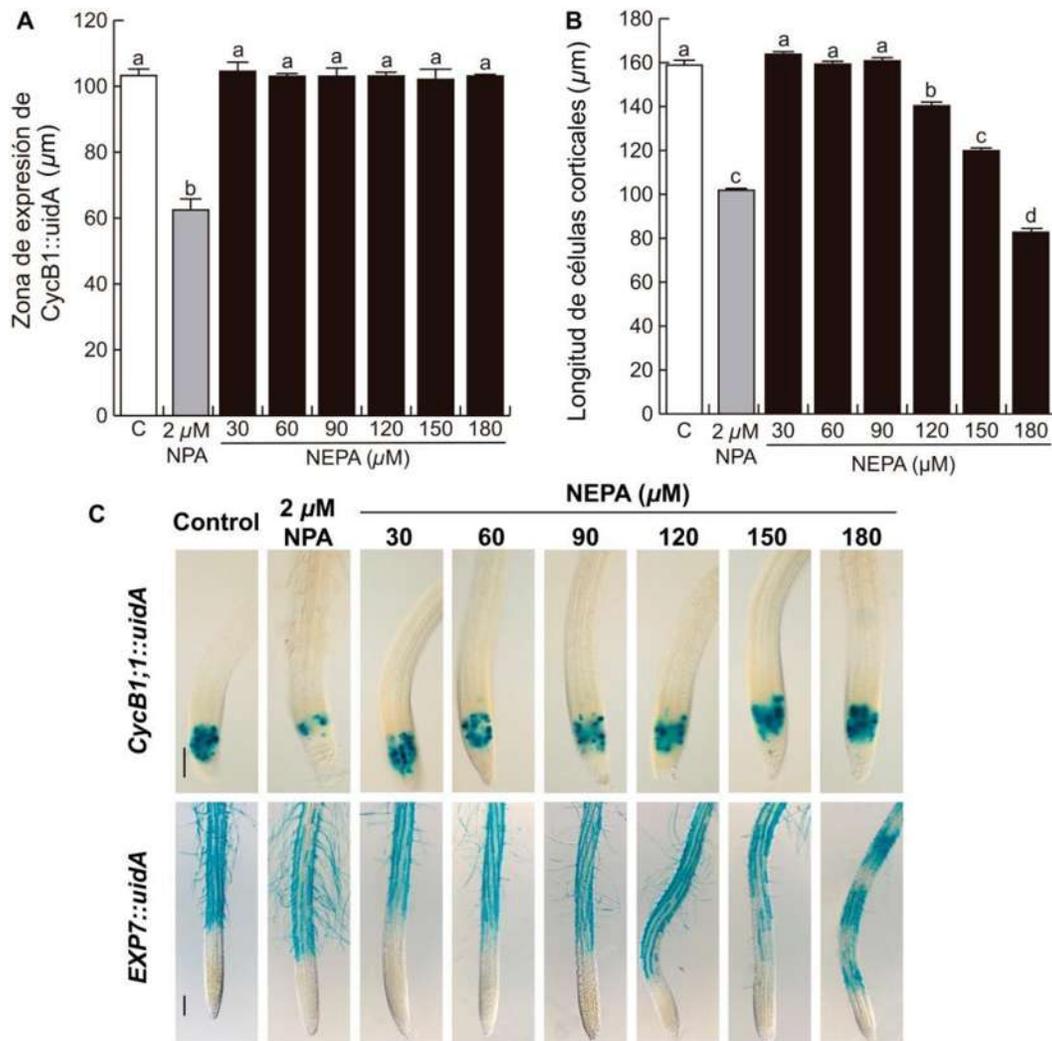


**FIGURA 12. Efecto del NEPA en la formación de pelos radiculares. (A)** Densidad de pelos radiculares, **(B)** Longitud de pelos radiculares. **(C)** Imágenes representativas de pelos radiculares formados en presencia de NEPA y NPA. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* fueron crecidas por 7 días en medio MS 0.2X suplementado con las concentraciones indicadas de NEPA y NPA. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (n=20), las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). Este experimento fue realizado por triplicado con resultados similares.

### 7.3. Efectos del NEPA en la división y elongación celular

Para esclarecer si los tratamientos con NEPA podrían modificar el desarrollo de la raíz por alteraciones en división y/o elongación celular, analizamos la expresión del marcador de ciclo celular *CycB1::uidA* que se expresa sólo en células en la fase G2/M del ciclo celular y es un marcador de la actividad mitótica (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Además, para evaluar los efectos del NEPA en la

diferenciación celular, se analizó la expresión de *pAtEXP7::uidA* la cual se expresa en los tricoblastos y se correlaciona con procesos de elongación y diferenciación celular (Cho y Cosgrove 2002). En los tratamientos con NPA la expresión de *CycB1::uidA* fue claramente reducida (Fig. 13 A, C). La localización e intensidad de la expresión de *CycB1::uidA* en tratamientos con NEPA fue similar a la observada en las plántulas sin el compuesto, mostrando una típica expresión puntuada en el meristemo (Fig. 13 C), correspondiendo cada punto a una célula proliferativa. Al medir la longitud de la zona de expresión de *CycB1::uidA* se observó que en las plantas control, la zona de expresión comprende alrededor de 102  $\mu\text{m}$  (Fig. 13 A) en tanto el tratamiento con NPA mostró una inhibición del 38% en la zona de expresión (Fig. 13 A) y en las plantas tratadas con NEPA la zona de expresión fue similar a la que se puede observar en las plantas control (Fig. 13 A, C). También analizamos las alteraciones en la elongación celular midiendo el tamaño de las células en la región de maduración de la raíz primaria en plantas silvestres (Col-0). Estos análisis mostraron que el tamaño de las células epidérmicas en las plantas tratadas decrece de manera dependiente de la concentración de NEPA 12% a 120  $\mu\text{M}$ , 25% a 150  $\mu\text{M}$  y 48% a 180  $\mu\text{M}$  cuando fueron comparadas con las plantas control (Fig. 13 B), mientras que el tamaño de las células epidérmicas en las plantas tratadas con NPA decrecen 36% (Fig. 13 B). La expresión de *pAtEXP7::uidA* en las plantas tratadas con NPA fue similar a la observada en las plantas control (Fig. 13 C). La inhibición del crecimiento de la raíz primaria a 120  $\mu\text{M}$  o concentraciones mayores de NEPA correlacionó con la disminución de la expresión de GUS en la raíz de *pAtEXP7::uidA*. Estos resultados indican que el efecto inhibitorio del NEPA sobre la raíz primaria está causado por una inhibición de la elongación celular pero no por una reducción en la actividad proliferativa de células del meristemo.



**FIGURA 13. Efecto del NEPA en la división y elongación celular. (A)** Zona de expresión de *CycB1::uidA*. **(B)** Longitud de células corticales. **(C)** Expresión de *CycB1::uidA* y *EXP7::uidA*. Las semillas de ambas líneas transgénicas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X suplementado con NPA y NEPA en las concentraciones indicadas. Las plantas se procesaron para determinar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa y se clarificaron para mostrar la expresión del gen marcador GUS. Las fotografías son representativas de 15 plantas. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (A n=20; B n=60), las letras indican las medias que difieren significativamente ( $P < 0.05$ ). La barra de escala equivale a 100  $\mu$ m. Este experimento fue realizado por triplicado con resultados similares.

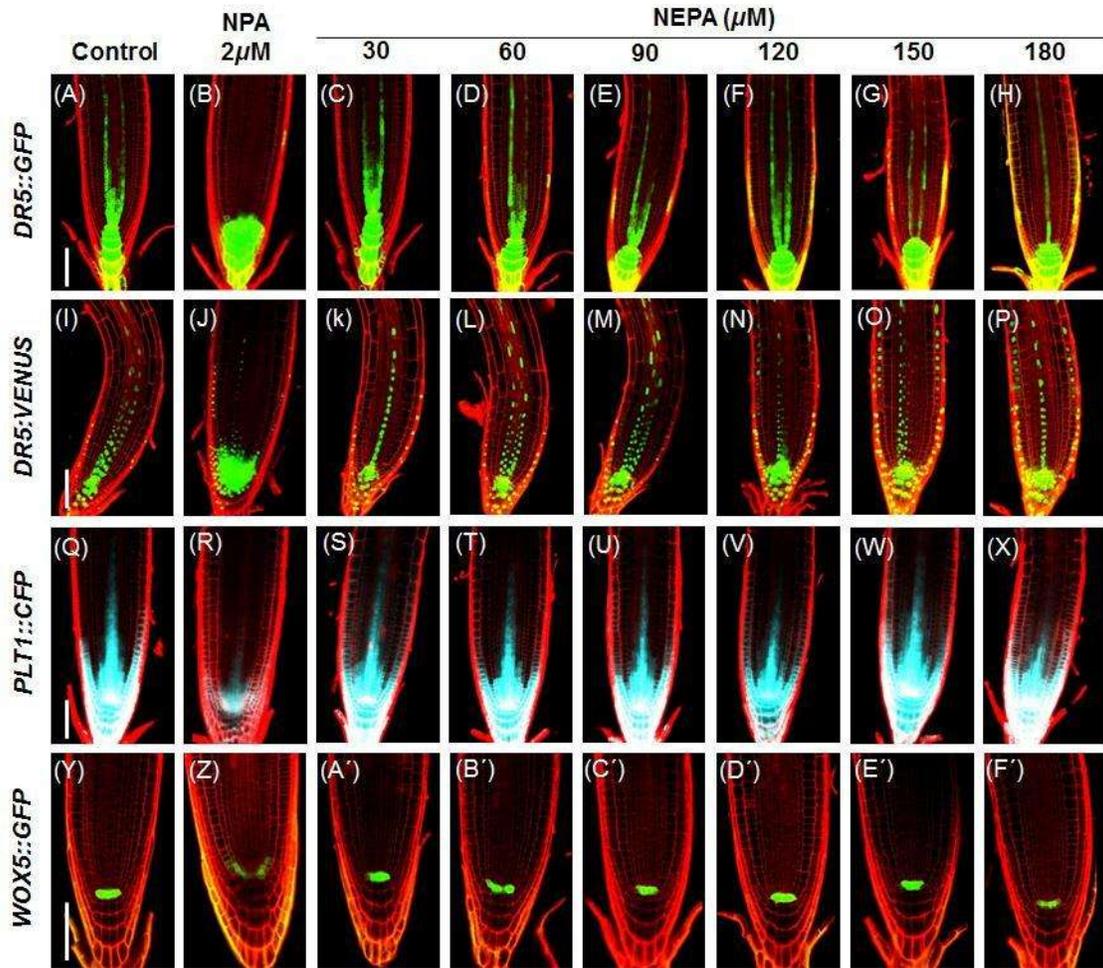
#### 7.4. El NEPA no afecta la señalización de auxinas ni el nivel de proteínas asociadas al mantenimiento del nicho celular

Las auxinas han sido implicadas en la regulación de una gran cantidad de procesos del desarrollo de las plantas (Depuydt y Hardtke, 2011). Una de las ventajas de *Arabidopsis thaliana*, es que existen líneas transgénicas con construcciones de genes reporteros de respuesta a varias rutas de señalización, entre ellas de auxinas. Especialmente las líneas que tienen la construcción con la proteína GFP resultan importantes para el estudio de procesos fisiológicos, ya que permiten monitorear la actividad de la proteína y por consecuencia, la respuesta específica *in vivo* (Ottenschläger *et al.*, 2003). Además, el tipo de microscopía para observar la expresión de esta proteína es sitio específico.

Debido a que NEPA es estructuralmente similar al inhibidor NPA, nos preguntamos si los efectos observados en la raíz son causados por una acumulación de auxinas en la punta de la raíz, como sucede con el NPA. Se decidió utilizar la línea *DR5::GFP*, que indica la acumulación de IAA en los tejidos. Se observó la expresión de la proteína GFP evidenciada por la fluorescencia tanto en las células de la cofia, como en el meristemo y el sistema vascular. En el tratamiento con NPA existe una acumulación de la expresión de GFP en la zona meristemática (Fig.14 B). En los tratamientos con NEPA la expresión de GFP fue similar a la de las plantas control, en las concentraciones de 150 y 180  $\mu\text{M}$  se ve una ligera disminución (Fig. 14 A, C-H).

Las plantas *DR5::VENUS* expresan una construcción formada por el promotor sintético de respuesta a auxinas *DR5* unido a tres copias en tándem de *VENUS*, una variante de *YFP* de plegamiento rápido, fusionado a una secuencia de localización nuclear llamada N-7, dicha línea reportera se expresa en el núcleo en presencia de auxinas. Se observó la expresión de la proteína *VENUS* en los núcleos de las células de la cofia, meristemo y sistema vascular. La expresión observada tanto en las plantas tratadas con NPA como con NEPA concuerdan con la obtenida con la línea reportera *DR5::GFP* (Fig. 14 I-P).

Las auxinas regulan el mantenimiento del centro quiescente (QC) y la actividad del meristemo a través de factores transcripcionales como *PLT 1* y *WOX 5*. Ya que los experimentos anteriores sugerían que la división celular y la cantidad de auxinas del meristemo en los tratamientos con NEPA no está alterada, decidimos analizar la expresión de *PLT 1* y *WOX 5* germinando semillas de las líneas reporteras *PLT1::CFP* y *WOX5::GFP* en medio MS 0.2X suplementado con NEPA y NPA en las concentraciones antes referidas. Las plántulas tratadas con NEPA muestran una expresión de *PLT1* similar a la de las plantas control, mientras que en plántulas tratadas con NPA se observa una disminución de la expresión (Fig. 14 Q-X). La expresión de *WOX 5* en el tratamiento con NPA muestra una disminución y expresión ectópica. En los tratamientos con NEPA, la expresión fue similar a la de las plantas control (Fig. 14 Y-F´). Estos resultados sugieren que NEPA a diferencia del NPA no afecta el meristemo ni el mantenimiento del QC, ya que la disminución de la longitud de la raíz primaria en concentraciones mayores no es a causa de la inhibición de la expresión de dichos genes.



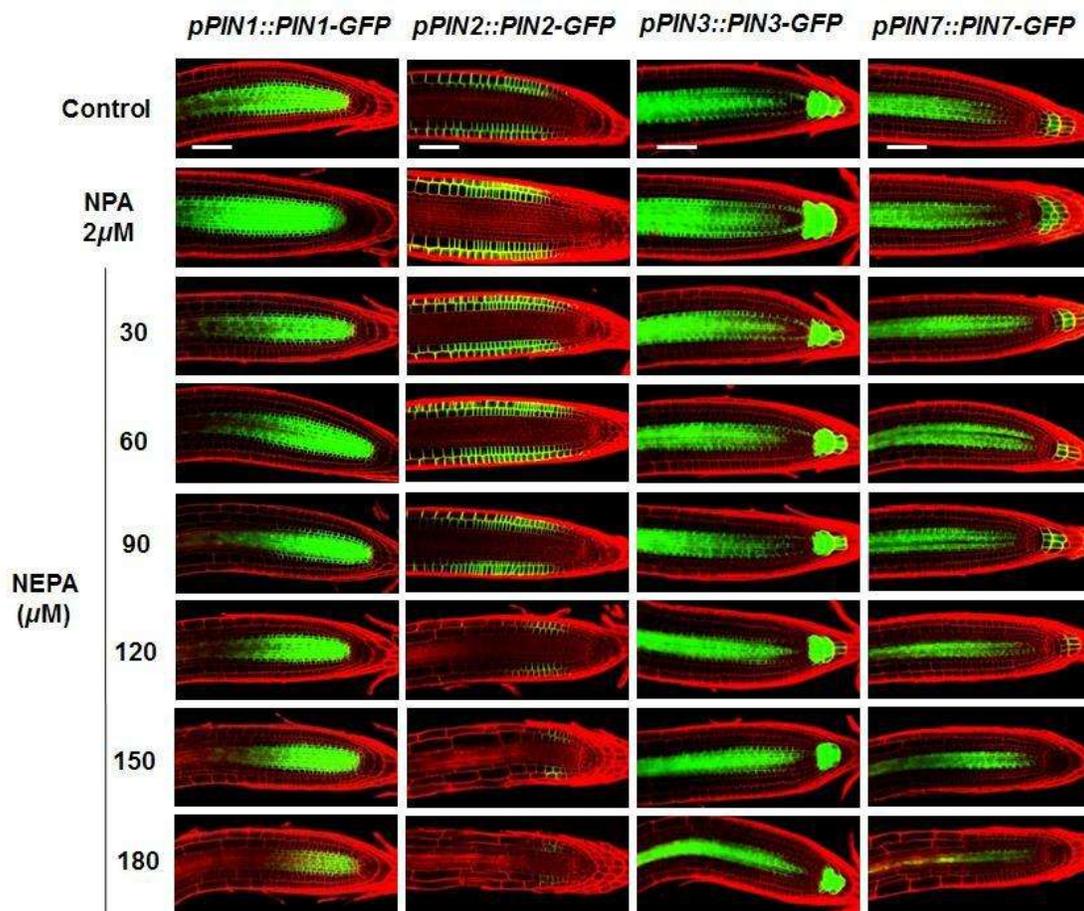
**FIGURA 14.** El NEPA no afecta la señalización de auxinas ni genes involucrados en el mantenimiento del nicho celular. **(A-H)** Expresión de *DR5::GFP*. **(I-P)** Expresión de *DR5::VENUS*. **(Q-X)** *PLT1::CFP*. **(Y-F')** *WOX5::GFP*. Las semillas de las cuatro líneas transgénicas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X por 7 días. Las plantas fueron analizadas mediante microscopía confocal para observar la expresión del gen. La barra de escala equivale a 100  $\mu$ m. Las fotografías son representativas de al menos 10 plantas.

## 7.5. El NEPA no afecta la expresión de transportadores de auxinas en el meristemo

Los resultados anteriores sugieren que el efecto primordial del NEPA sería inhibir la elongación celular, proceso potencialmente regulado por auxinas. A continuación se analizó la expresión de los transportadores de eflujo de auxinas, para lo cual utilizamos las líneas reporteras *pPIN1::PIN1-GFP* (Benková *et al.*, 2003), *pPIN2::PIN2-GFP*, *pPIN3::PIN3-GFP* y *pPIN7::PIN7-GFP* (Blilou *et al.*, 2005) tratadas con NEPA y NPA, y a los 5 ddg se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron por microscopía confocal.

Uno de los participantes importantes en el transporte polar es PIN 1, el cual se expresa principalmente en células del estele y de la endodermis (Friml *et al.* 2002a) (Fig. 15). Utilizando la línea reportera *pPIN1::PIN1-GFP* se encontró que en plántulas tratadas con NEPA existe una disminución en la expresión de GFP de manera dependiente de la concentración, mientras que las plantas tratadas con NPA mostraron un incremento de la expresión de la proteína, además de una localización ectópica en el córtex (Fig. 15). PIN2 media el crecimiento gravitrópico de la raíz, se expresa principalmente en la capa lateral de la columela y en la epidermis (Friml, 2003) (Fig. 15). En plántulas tratadas con NPA de la línea *pPIN2::PIN2-GFP* se observó un incremento en la expresión de la proteína GFP, contrariamente en los tratamientos con NEPA, que presentó una disminución de la expresión de manera dependiente de la concentración (Fig. 15). PIN3 está involucrado en la respuesta gravitrópica, se expresa principalmente en la columela y en la estela (Friml *et al.*, 2002b). En plántulas tratadas con NPA observamos un incremento en la expresión de *pPIN3::PIN3-GFP*, en tanto que en plántulas tratadas con NEPA se observó una ligera disminución de la expresión de manera dependiente de la concentración (Fig. 15), aunque no tan drástica como la observada con los otros transportadores. PIN 7 está involucrado en la especificación del patrón durante la formación de raíces laterales. En la raíz primaria se expresa en células del meristemo y zona de elongación, mientras que en las células de la columela coincide con PIN 3. Se utilizó la línea reportera

*pPIN7::PIN7-GFP*, en plántulas tratadas con NEPA se observó una inhibición de la expresión dependiente de la concentración. Plántulas tratadas con NPA muestran una expresión incrementada sobre todo en las células de la columela (Fig. 15). La disminución de los transportadores en las plántulas tratadas con NEPA correlaciona con la inhibición del crecimiento de la raíz primaria en concentraciones superiores a 90  $\mu\text{M}$  y con la disminución de la expresión de *EXP7::uidA* (Fig. 13), lo cual indica que no hay suficientes auxinas para que las células procedan el programa de elongación celular.



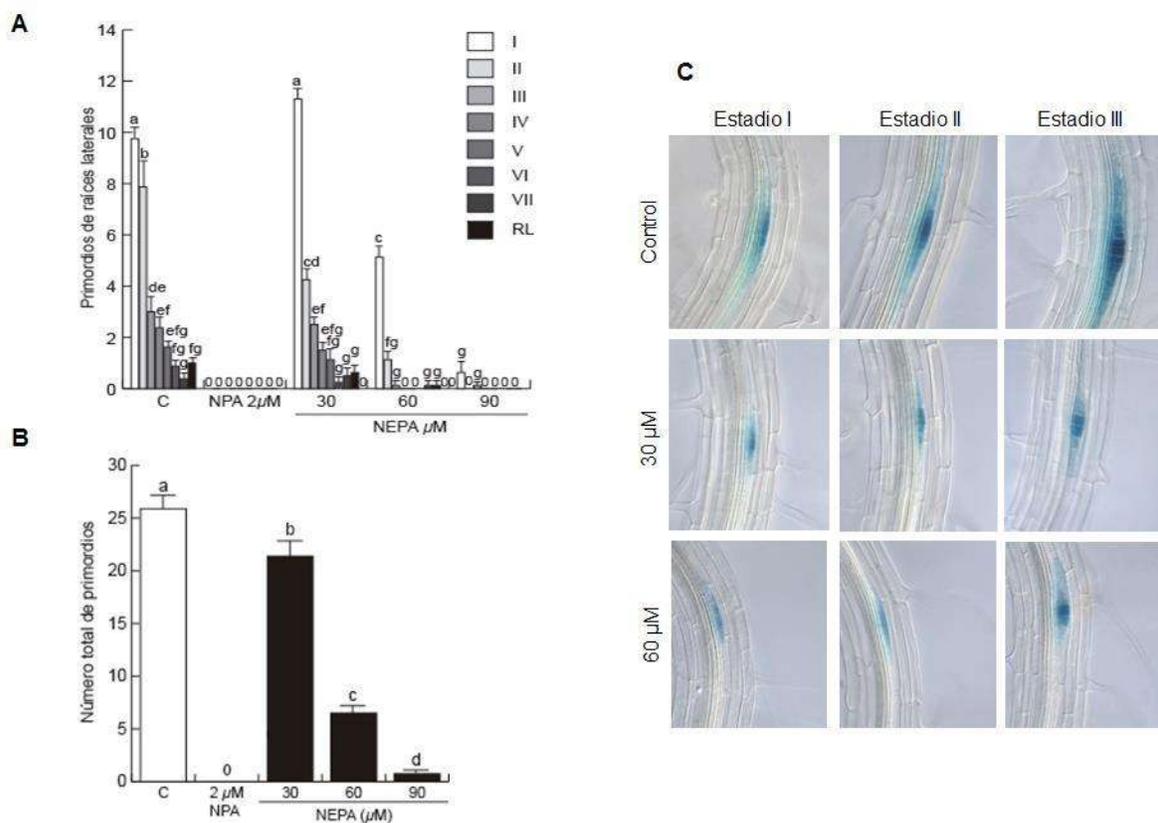
**FIGURA 15. El NEPA regula la expresión de transportadores de auxinas en el meristemo.** Expresión de *pPIN1::PIN1-GFP*, *pPIN2::PIN2-GFP*, *pPIN3::PIN3-GFP* y *pPIN7::PIN7-GFP*. Las semillas de las cuatro líneas transgénicas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X por 7 días. Las plantas fueron analizadas por microscopia confocal para observar la expresión del transgen. La barra de escala equivale a 100  $\mu\text{m}$ . Las fotografías son representativas de al menos 10 plantas.

## 7.6. El NEPA inhibe la formación de raíces laterales

Uno de los efectos observados en desarrollo de la raíz al en presencia de diferentes concentraciones de NEPA fue la disminución de formación de raíces laterales, lo cual podría ser debido a la inhibición de la emergencia de primordios de raíces laterales (PRL) pre-existentes o de la formación de *novo* de primordios. Para establecer las bases del desarrollo en la formación de raíces laterales por el efecto del NEPA, los PRL formados en la raíz primaria de *Arabidopsis* fueron cuantificados a los 7 días usando plántulas *DR5::uidA*. Las plántulas *DR5::uidA* fueron teñidas para evidenciar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y clareadas para permitir que los PRL en estadios tempranos fuesen visualizados y contados. Cada PRL fue clasificado acorde a su estado de desarrollo de acuerdo Malamy y Benfey 1997, quienes consideraron los siguientes estadios: I: primeras divisiones anticlinales; II: una división periclinal divide el PRL en dos capas; III: la capa exterior se divide periclinalmente, generando un primordio de tres capas; IV: la capa interna se divide periclinalmente, creando un total de cuatro capas de células; V: una célula central en las capas exteriores se divide anticlinalmente para formar cuatro pequeñas células cúbicas patrón del córtex; VI: células de la capa exterior que bajo una división periclinal, crean una nueva capa interna; VII el PRL parece emerger a partir de la raíz principal.

Plantas tratadas con NEPA manifiestan un número disminuido de PRL en todos los estadios (Fig. 16 A), mientras que en las plantas tratadas con NPA existe ausencia total de PRL. El número total de primordios revela que las plantas tratadas con 30  $\mu$ M, 60  $\mu$ M y 90  $\mu$ M de NEPA, respectivamente, forman 32%, 73% y 96.9% menos PRL que el control (Fig. 16 B). Las observaciones de que tratamientos con NEPA inhiben el número de PRL y estadios de primordios sugieren que NEPA puede inhibir la ramificación de la raíz por represión de la iniciación de raíces laterales. El efecto de NEPA en la disminución de formación de *novo* de PRL, podría ser debido a un mecanismo auxínico ya que se necesita de una alta concentración de auxinas para la iniciación de PRL, para evaluar esta posibilidad se analizó la expresión de la línea reportera *DR5::uidA* en los

primordios de las raíces laterales. Las plantas fueron germinadas y crecidas durante 9 días en medios suplementados con NEPA y posteriormente fueron procesadas para el análisis de la expresión de GUS. En la figura 16 C podemos observar las imágenes representativas de diferentes estadios de PRL con distintas concentraciones de NEPA la expresión del marcador (coloración azul). Conforme aumenta la concentración del NEPA la expresión del marcador disminuye, este resultado indica que NEPA podría estar modulando la arquitectura radicular a través de un mecanismo auxínico.



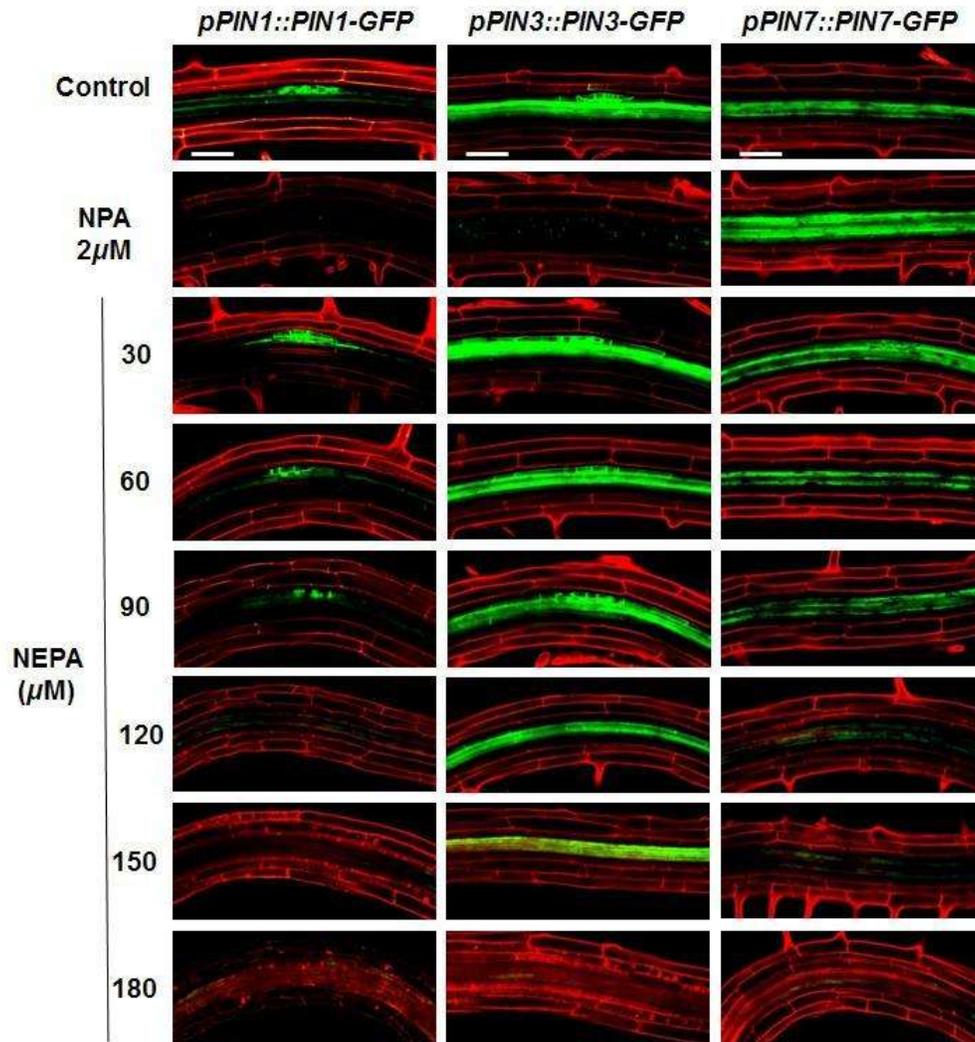
**FIGURA 16. Efecto del NEPA en la expresión de *DR5::uidA* y en primordios de raíces laterales. (A) Primordios de raíces laterales. (B) Número de primordios. (C) Expresión de *DR5::uidA*.** Plántulas de *Arabidopsis thaliana* fueron germinadas y crecidas por 9 días en medio MS 0.2X suplementado con las concentraciones indicadas de NEPA. Las plantas de la línea fueron teñidas para evidenciar la actividad de la β-glucuronidasa y clareadas para mostrar la expresión del gen.

## 7.7. El NEPA inhibe la expresión de transportadores de auxinas en la vasculatura

En la raíz, las auxinas sintetizadas en el follaje son transportadas a través de las células de la vasculatura hacia la punta de la raíz por la acción combinada de los transportadores de auxinas PIN 1, PIN 3 y PIN 7, los cuales mantienen el gradiente de auxinas y la redistribución lateral (Blilou *et al.*, 2006). El transportador de auxinas PIN 1 ha sido relacionado con el establecimiento del gradiente de auxinas que controla el desarrollo de las raíces laterales (Benková *et al.*, 2003), es por eso que decidimos analizar el nivel de dicho transportador, para lo cual se utilizó la línea reportera *pPIN1:PIN1-GFP*. Las plantas expresando este marcador fueron germinadas y crecidas durante 7 días en medio MS 0.2X suplementado con NEPA y NPA, y posteriormente fueron sometidas a un análisis con microscopia confocal para observar la expresión referida. Se observó que la expresión del marcador con ambos compuestos disminuyó, en el caso de NEPA de una forma dependiente de la concentración (Fig. 17).

El transportador de auxinas PIN 3 es expresado en un pequeño grupo de células endodérmicas adyacentes al PRL. En estas células, PIN 3 es localizado en los revestimientos de la membrana de los primordios. El reflujó de auxinas de la endodermis a los primordios dirigido por PIN 3 participa en la inducción de auxinas, necesaria para la apropiada división de los PRL (Marhavý *et al.*, 2013). Por esta razón decidimos analizar la expresión del transportador, para lo cual se utilizó la línea reportera *pPIN3:PIN3-GFP*. Las plantas fueron germinadas y crecidas durante 7 días en medio MS 0.2X suplementado con NEPA y NPA, sometidas a un análisis con microscopia confocal. Los niveles de PIN 3 de las plántulas tratadas con NEPA se inhibieron de una forma dependiente de la concentración (Fig. 17). Lo mismo fue observado con el tratamiento con NPA (Fig. 17). PIN 7 no se expresa en PRL sólo en raíces laterales emergidas ya que regula el patrón de formación de las mismas, también se expresan en las vasculatura, ya que redistribuye las auxinas. El estudio de la línea reportera *pPIN7:PIN7-GFP* mostró que la expresión disminuye de manera dependiente de la concentración.

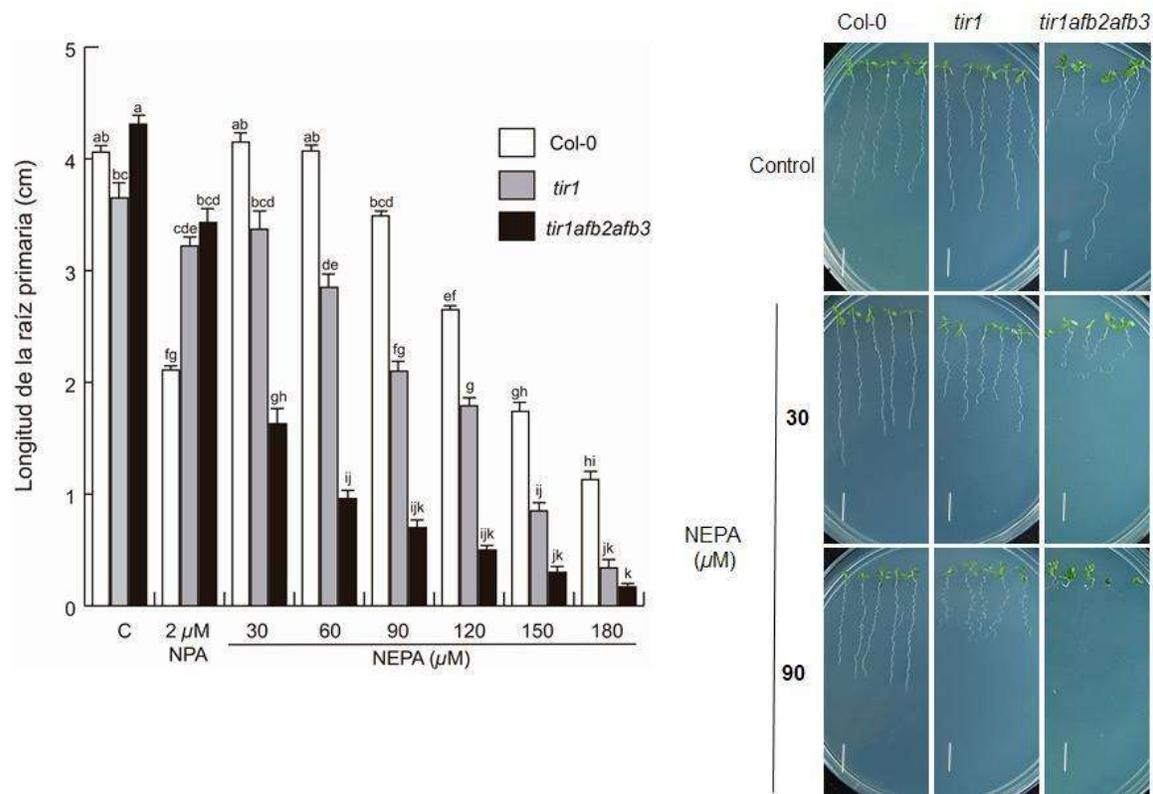
En el tratamiento con NPA se observó una expresión más alta a la del control (Fig. 17). Estos resultados indican que en los tratamientos con NEPA y NPA no se están transportando suficientes auxinas al periciclo para la formación de PRL.



**FIGURA 17. El NEPA disminuye la expresión de transportadores de auxinas en la vasculatura.** Expresión de *pPIN1::PIN1-GFP*, *pPIN3::PIN3-GFP* y *pPIN7::PIN7-GFP*. Semillas de las tres líneas transgénicas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X por 7 días. Las plantas fueron analizadas por microscopia confocal para observar la expresión del gen. La barra de escala equivale a 100 μm. Las fotografías son representativas de al menos 10 plantas.

## 7.8 Los receptores *TIR1*, *AFB2* y *AFB3* regulan negativamente el efecto del NEPA sobre la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*

Los resultados anteriores sugieren que el NEPA actúa a través de un mecanismo auxínico, es por eso que decidimos evaluar la respuesta de mutantes afectadas en los receptores de auxinas. Para tal fin utilizamos las mutantes *tir1* (Ruegger *et al.*, 1997) la cual fue aislada por ser resistente a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria causada por el NPA y *tir1afb2afb3* (Parry *et al.*, 2009), que está afectada en tres de los receptores de auxinas. Ambas líneas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X suplementado con NEPA y NPA. Posteriormente, se analizó la longitud de la raíz primaria ya que las mutantes carecen de raíces laterales. En la figura 18 podemos observar imágenes representativas en las cuales claramente se ve una hipersensibilidad a la inhibición del crecimiento en plantas tratadas con NEPA en ambas mutantes, siendo más drástica en la triple mutante *tir1afb2afb3*. En la línea mutante *tir1*, el tratamiento con NPA causó una inhibición del 12 % de la longitud de la raíz primaria. En plantas tratadas con NEPA la inhibición de la raíz primaria fue de 8% a 30  $\mu$ M, 22 % a 60  $\mu$ M, 42 % a 90  $\mu$ M, 51 % a 120  $\mu$ M, 77 % a 150 y 90 % a 180  $\mu$ M de NEPA (Fig. 17). Posteriormente, se analizó la longitud de la raíz primaria de la triple mutante *tir1afb2afb3*. El NPA causa una inhibición del 20 % de la longitud de la raíz primaria. En plantas tratadas con NEPA la inhibición del crecimiento de la raíz primaria es de 62 % a 30  $\mu$ M, 77 % a 60  $\mu$ M, 84 % a 90  $\mu$ M, 88 % a 120  $\mu$ M, 92 % a 150 y 96 % a 180  $\mu$ M de NEPA (Fig. 18).

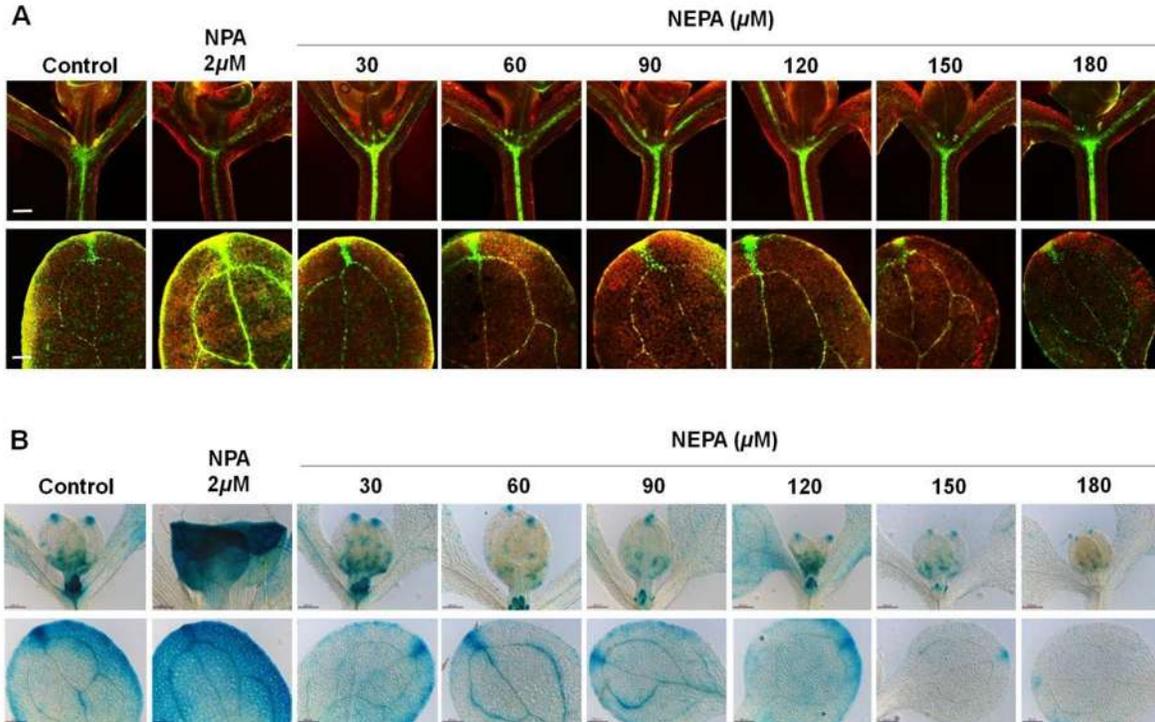


**FIGURA 18. TIR1, AFB2 y AFB3 regulan negativamente el efecto del NEPA sobre la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*.** Semillas del ecotipo silvestre Col-0, *tir1* (Ruegger *et al.*, 1997) y *tir1afb2afb3* (Parry *et al.*, 2009) fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X adicionado con NEPA y NPA por 8 días. Los valores representan la media  $\pm$  error estándar (n=20), las letras indican las medias que difieren significativamente (P < 0.05). La barra de escala equivale a 1 cm. El experimento fue realizado por triplicado con resultados similares.

### 7.9. El NEPA inhibe la expresión de *DR5* en el follaje de manera dependiente de la concentración

Las hojas jóvenes son uno de los principales sitios en los cuales se lleva a cabo la biosíntesis de auxinas. Para conocer si los efectos del NEPA implicaban una sobreacumulación de auxinas en el follaje, utilizamos la línea reportera *DR5::GFP*. Las plantas fueron germinadas y crecidas durante 7 días en medio MS 0.2X suplementado con NEPA y NPA, y posteriormente fueron sometidas a un

análisis con microscopia confocal. En las plántulas control se observa expresión del marcador en las puntas y vasculatura de las hojas, vasculatura del hipocotilo y primordios de hojas. En los tratamientos con NPA se observa una disminución de la expresión en los primordios de hojas y vasculatura del hipocotilo y un incremento en las puntas y vasculatura de las hojas. Contrariamente las plantas tratadas con NEPA mostraron inhibición de la expresión en la vasculatura de las hojas de manera dependiente de la concentración, mientras que en la vasculatura del hipocotilo se expresó de manera similar a la del control (Fig. 19 A). Los pigmentos presentes en las plantas utilizadas en la microscopia confocal, como la clorofila, podrían interferir con los resultados obtenidos debido a la autofluorescencia (Roshchina V.V. 2012), es por eso que usamos la línea reportera *DR5::uidA*, ya que con el clareo se elimina la clorofila y con ello se permite la visualización de la expresión del marcador por la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS). En las plántulas control se observa expresión del marcador en las puntas de las hojas, vasculatura y primordios de hojas. El tratamiento con NPA resulta en un incremento de la actividad de GUS en los márgenes de las hojas pero menos en la vasculatura (Fig. 19 B). En plantas tratadas con NEPA se observa una disminución de la expresión de manera dependiente de la concentración, tanto en puntas de las hojas como en vasculatura y primordios de hojas (Fig. 19 B). Sin embargo en la vasculatura de los hipocotilos la expresión no es tan perceptible como con la línea *DR5::GFP*.



**FIGURA 19. El NEPA inhibe la expresión de *DR5* en el follaje de manera dependiente de la concentración. (A) Expresión de *DR5::uidA*. (B) *DR5::GFP*.** Las semillas de la línea *DR5::GFP* fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X por 7 días. Las plantas fueron analizadas mediante microscopia confocal para observar la expresión del gen. Plántulas de *Arabidopsis thaliana* de la línea *DR5::uidA* fueron germinadas y crecidas por 9 días en medio MS 0.2X suplementado con las concentraciones indicadas de NEPA y NPA. Las plantas de la línea fueron teñidas para evidenciar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa y clareadas para mostrar la expresión del gen. Las fotografías son representativas de al menos 10 plantas La barra de escala equivale a 200  $\mu$ m.

## 8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las auxinas regulan la división y elongación celular y activan eventos específicos de diferenciación durante el desarrollo embrionario y post-embrionario (Hayashi, 2012), para lo cual requieren un mecanismo de transporte sofisticado, conocido como transporte polar de auxinas (Michniewicz *et al.*, 2007). Los ITA han sido utilizados como herramientas farmacológicas en la investigación de la acción del TPA y sus efectos en el desarrollo vegetal (Ma y Robert, 2013). Sin embargo, debido a los efectos pleiotrópicos de los ITA en el sistema radicular, resulta difícil la identificación de componentes específicos implicados en la organogénesis *de novo*, es por ello que encontrar moléculas sintéticas o de origen natural capaces de afectar la homeostasis de auxinas en un tejido u órgano de manera específica, proporcionaría una herramienta para entender mejor los mecanismos moleculares de la acción de las auxinas en la regulación del desarrollo vegetal.

En este trabajo se mostró que el NEPA, un compuesto con una estructura química similar a la del inhibidor de auxinas NPA (Fig. 8), modifica el desarrollo post embrionario de la raíz de *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo independiente al del NPA. Inicialmente se decidió analizar la morfología de la raíz de *A. thaliana*, para determinar si el NEPA tendría algún efecto sobre el desarrollo de la misma, como se ha descrito para el inhibidor del transporte de auxinas NPA (Thomson *et al.*, 1973). Los efectos inhibitorios del NPA en los sistemas de transporte de auxinas afectan la formación de raíces laterales, así como del crecimiento de la raíz primaria, respuesta a la gravedad y la supresión en la elongación y crecimiento diferencial de los hipocotilos (Ma y Robert, 2013). Para lo anterior se analizaron plántulas de *Arabidopsis thaliana* germinadas y crecidas en medio MS 0.2X suplementado con concentraciones crecientes de NEPA y una concentración de NPA que inhibe el 50 % del crecimiento de la raíz.

Los resultados mostraron que de manera dependiente de la concentración, el NEPA disminuye la longitud de la raíz primaria y la formación de las raíces laterales. Interesantemente, se afectó el programa de desarrollo de RL antes que

el del crecimiento de la raíz primaria, ya que en 90  $\mu\text{M}$  de NEPA hay ausencia total de RL y un ligero decremento en la longitud de la raíz primaria. Además, no se observó agravitropismo en las raíces como en el NPA aún en las concentraciones más elevadas de NEPA, contrario a ello se observó un incremento en los giros de la raíz sobre el medio. Para alcanzar un efecto inhibitorio del crecimiento de la raíz primaria igual al causado con 2  $\mu\text{M}$  NPA se requirió de 150  $\mu\text{M}$  de NEPA, lo cual indica que el NEPA es hasta 75 veces menos activo que el NPA en cuanto a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria (Fig. 11). Otro de los parámetros evaluados fue el desarrollo de pelos radiculares, se ha reportado que NPA incrementa el número y longitud de pelos radiculares, esto se debe a que los PINs, regulan el crecimiento de los pelos radiculares transportando IAA hasta los tricoblastos y al adicionar NPA, que es un inhibidor del eflujo de auxinas, los PINs no expulsan a las auxinas de las células (Ganguly *et al.*, 2010). Contrario a lo reportado para NPA, observamos en los tratamientos con NEPA un decremento en la densidad y elongación de pelos radiculares (Fig. 12), lo cual sugiere que el NEPA no causa acumulación de auxinas en los tricoblastos y que puede estar disminuyendo la diferenciación celular.

La proliferación celular está relacionada directamente con la actividad de la división de las células del meristemo, las cuales posteriormente se diferencian. Para evaluar si los tratamientos con NEPA podrían modificar el desarrollo de la raíz por alteraciones en división y/o elongación celular, analizamos la expresión del marcador de ciclo celular *CycB1::uidA* la cual es expresada sólo en células en la fase G2/M del ciclo celular y es un marcador de la actividad mitótica (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Además, para evaluar los efectos del NEPA en la diferenciación celular, analizamos la expresión de *pAtEXP7::uidA* la cual se correlaciona con procesos de elongación y diferenciación celular (Cho y Cosgrove 2002). Ambas líneas presentan una construcción de su respectivo promotor con el gen reportero de la  $\beta$ -glucuronidasa. Este último permite observar las células gracias a una coloración azul al poner las plantas en contacto con el sustrato específico de la enzima. En los tratamientos con NPA la expresión de *CycB1::uidA* fue claramente reducida (Fig. 13A, C). La localización e intensidad de la expresión

de *CycB1::uidA* en tratamientos con NEPA fue similar a la observada en las plántulas sin tratar, mostrando una típica expresión irregular en el meristemo (Fig. 13 C). Medimos la longitud de la zona de expresión de *CycB1::uidA* encontrando que el NPA inhibe la expresión en el meristemo (Fig. 13 A). En plántulas tratadas con NEPA la zona de expresión es similar a la que se puede observar en las plantas control (Fig. 13 A, C). También analizamos si la elongación celular fue alterada por el NEPA, para ello medimos el tamaño de las células en la región de maduración de la raíz primaria en plantas silvestres (Col-0). Estos análisis mostraron que el tamaño de las células corticales en las plantas tratadas decrece de manera dependiente de la concentración de NEPA (Fig. 13 B) de igual forma, el tamaño de las células corticales en las plantas tratadas con NPA disminuye (Fig. 13 B). Este es el único aspecto en que la actividad de ambos compuestos coincide. La expresión de *pAtEXP7::uidA* en las plantas tratadas con NPA fue similar a la observada en las plantas control (Fig. 13 C). La inhibición del crecimiento de la raíz primaria a 120  $\mu\text{M}$  o concentraciones mayores de NEPA correlaciona con la pérdida de expresión de GUS en la raíz de *pAtEXP7::uidA*. Por lo tanto, el efecto inhibitorio en el crecimiento de la raíz primaria observado con los tratamientos de NEPA se podría explicar por una disminución de la elongación celular, pero no por una reducción en la actividad proliferativa del meristemo. Los análisis anteriores sugieren que los procesos de diferenciación se ven alterados por el NEPA y debido a que estos son regulados por las auxinas, se decidió analizar el efecto del NEPA sobre la expresión de los marcadores de respuesta a auxinas *DR5::GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003) y *DR5::VENUS* (Heisler *et al.*, 2005). Como resultado de este análisis encontramos que en el tratamiento con NPA existe acumulación de la expresión de GFP y VENUS en la punta de la raíz (Fig.14 B), pero en los tratamientos con NEPA la expresión de GFP y VENUS fue similar a la de las plantas control, y sólo en las concentraciones más altas se ve una ligera disminución de la expresión (Fig. 14 A, C-H). Sin embargo, nunca hay acumulación de auxinas en la punta de la raíz como ocurre con NPA aún en la concentración más alta evaluada. Este resultado indica el que NEPA no bloquea el transporte de auxinas ni la síntesis de las mismas en el meristemo de la raíz, a

diferencia de lo que ocurre en el follaje. En concordancia con lo anterior, las plántulas tratadas con NEPA muestran una expresión de los genes maestros *PLT 1* y *WOX 5*, los cuales son esenciales para el mantenimiento del RAM y el desarrollo de la raíz primaria, similar a la de las plantas control, mientras que en plántulas tratadas con NPA, se observa una importante disminución de la expresión de las proteínas (Fig. 14 Q-F'). Estos resultados sugieren que el NEPA no afecta de manera substancial la actividad mitótica ni el mantenimiento del centro quiescente, y permiten sugerir que la disminución de la longitud de la raíz primaria en concentraciones mayores no es a causa de la inhibición de la expresión de dichos genes, ya que la actividad meristemática está presente. Evidentemente, el blanco del NEPA parece ser el proceso de elongación celular de la raíz.

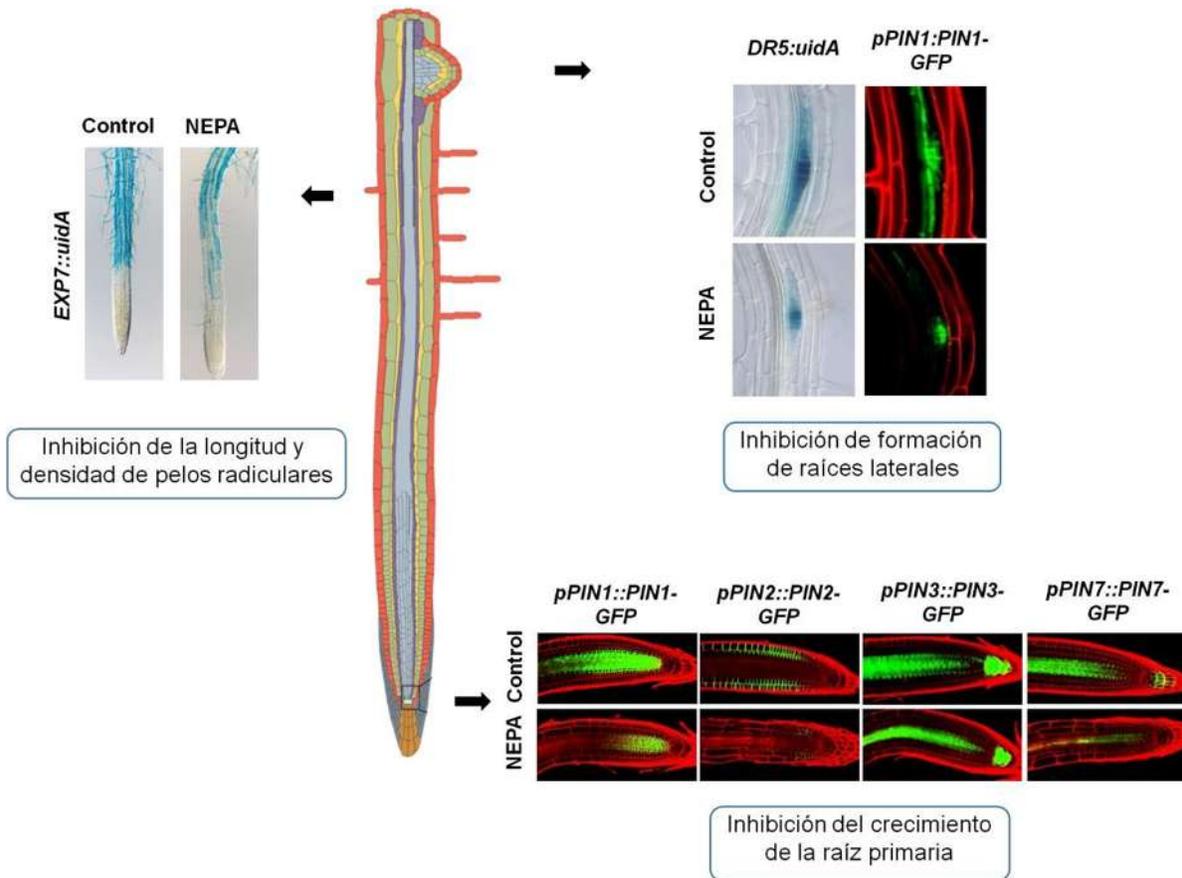
Los estudios realizados con los transportadores de auxinas *pPIN1::PIN1-GFP*, *pPIN2::PIN2-GFP*, *pPIN3::PIN3-GFP* y *pPIN7::PIN7-GFP* ponen de manifiesto una correlación entre la localización de los transportadores en las plántulas tratadas con NEPA con la inhibición del crecimiento de la raíz primaria. Dicha inhibición ocurre en concentraciones superiores a 90  $\mu\text{M}$  y correlaciona con la disminución de la expresión de *EXP7::uidA*, lo cual sugiere que no hay suficientes auxinas para que las células se elonguen. Esta inhibición de la elongación celular podría ser causada por un retraso en el desarrollo general de la planta, o por una inhibición en la síntesis de auxinas en el follaje, desde donde se transporta la mayor cantidad de auxinas para dirigir los programas de organogénesis en la raíz. Ambas propuestas explicarían la disminución en el número de raíces laterales dependiente de la concentración de NEPA.

En la raíz, las auxinas sintetizadas en el follaje son transportadas a través de las células de la vasculatura hacia la punta de la raíz por la acción combinada de los transportadores de auxinas PIN 1, PIN 3 y PIN 7, los cuales mantienen la posición del máximo de auxinas y la redistribuyen lateralmente (Blilou *et al.*, 2006). En los tratamientos con NPA se observó una disminución de los niveles de PIN 1 y PIN 3, interesantemente PIN 7 se localiza de manera similar al control, esto indica

que el NPA no afecta de igual forma los niveles de los diferentes transportadores PIN consistentemente con observaciones previas (Ganguly *et al.*, 2010; Titapiwatanakun *et al.*, 2009), mientras que en las plántulas tratadas con NEPA se observó una disminución. Para dilucidar un posible blanco de señalización del NEPA a nivel de los receptores de auxinas, se comparó el crecimiento de la raíz primaria de plantas silvestres (Col-0) y las mutantes *tir1* la cual fue identificada por ser resistente a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria causada por NPA (Ruegger *et al.* 1997) y la triple mutante *tir1afb2afb3* (Parry *et al.*, 2009) ambas líneas están afectadas en los receptores nucleares de auxinas. La mutante sencilla *tir1*, mostró resistencia a la inhibición de la longitud de la raíz primaria en el tratamiento con NPA como lo reportado por Ruegger *et al.*, (1998), por el contrario con NEPA mostró hipersensibilidad a la inhibición de crecimiento de la raíz. Como se mencionó antes la triple mutante *tir1afb2afb3* mostró una ligera resistencia al tratamiento con NPA. Contrario a los tratamientos con NPA la mutante mostró hipersensibilidad con NEPA, ya que la longitud de la raíz primaria se inhibió de manera importante desde la primera concentración analizada comparado con lo observado en las plantas silvestres (Fig. 18). Lo anterior indica que el NEPA no actúa a través de señalización de auxinas a nivel de los receptores, ya que la hipersensibilidad que muestran las líneas mutantes, sugiere un mecanismo independiente que al combinarse con un defecto en vías de señalización produce un efecto sinérgico. De acuerdo a los resultados anteriores el NEPA no afecta la biosíntesis en el meristemo de la raíz. Es por ello que nos preguntamos cómo se encontraría la expresión de auxinas en el follaje, ya que las hojas jóvenes son uno de los principales sitios en los cuales se lleva a cabo la biosíntesis de auxinas (Ljung *et al.*, 2001, 2005). Para tal fin utilizamos la línea reportera de respuesta a auxinas *DR5::GFP*. En las plántulas control se observa expresión del marcador en las puntas y vasculatura de las hojas, vasculatura del hipocotilo y primordios de hojas. En los tratamientos con NPA se observa una disminución de la expresión en los primordios de hojas y vasculatura del hipocotilo y un incremento en las puntas y vasculatura de las hojas. Contrariamente las plantas tratadas con NEPA mostraron inhibición de la expresión en la vasculatura

de las hojas de manera dependiente de la concentración, mientras que en la vasculatura del hipocotilo se expresó de manera similar a la del control (Fig. 19 A). Los pigmentos presentes en las plantas utilizadas en la microscopia confocal, como la clorofila, podrían interferir con los resultados obtenidos debido a la autofluorescencia (Roshchina V.V. 2012), es por eso que usamos la línea reportera *DR5::uidA*, fueron procesadas para la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) y clareadas para permitir la visualización de la expresión del marcador. El tratamiento con NPA resultó en un incremento de la actividad de GUS en los márgenes de las hojas. En plantas tratadas con NEPA se observa una disminución de la expresión de manera dependiente de la concentración, tanto en puntas y vasculatura de las hojas como primordios de hojas (Fig. 19 B).

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, planteamos que el NEPA tiene un mecanismo de acción independiente al del NPA, que actúa como un inhibidor específico del eflujo del AIA teniendo como blanco principal los transportadores ABCB (Bailly *et al.*, 2008; Nagashima *et al.*, 2008). Pudimos observar que conforme aumenta la concentración de NEPA, se presenta una inhibición del desarrollo del sistema radicular a causa de afectaciones en procesos de elongación celular, los cuales están regulados por auxinas a través de la participación de los transportadores de eflujo PIN, los cuales son regulados por la cantidad de auxinas presentes en la planta (Fig. 20)



**FIGURA 20. Resumen de los efectos del NEPA sobre la regulación del desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.** NEPA modifica la arquitectura radicular a través de afectaciones en procesos de elongación celular, los cuales están regulados por auxinas a través de la participación de los transportadores de eflujo PIN, los cuales son regulados por la cantidad de auxinas presentes en la planta.

## 9. REFERENCIAS

- Bailly A., Sovero V., Vincenzetti V., Santelia D., Bartnik D., Koenig B.W., Mancuso S., Martinoia E., Geisler M. 2008. Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *J. Biol. Chem.* 283:21817-21826.
- Bainbridge K., Guyomarc'h S., Bayer E., Swarup R., Bennet M., Mandel T., Kuhlemeier C. 2008. Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev.* 22:810-823.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G. y Friml J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:561-602.
- Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Lee O.R., Mravec J., Titapiwatanakun B., Sauer M., Makam S.N., Cheng Y., Bouchard R., Adamec J., Geisler M., Nagashima A., Sakai T., Martinoia E., Friml J., Peer W.A., Murphy A.S. 2007. Interactions among PIN-FORMED and P-Glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:131-147.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433:39-44.
- Bohn-Courseau I. 2010. Auxin: A major regulator of organogenesis. *C. R. Biol.* 333: 290-296.
- Cazzonelli C.I., Vanstraelen M., Simon S., Yin K., Carron-Arthur A., Nisar N., Tarle G., Cuttriss A.J., Searle I.R., Benkova E., Mathesius U., Masle J., Friml J., Pogson B.J. 2013. Role of the *Arabidopsis* PIN6 auxin transporter in auxin homeostasis and auxin-mediated development. *PLOS ONE*. 8:e70069.
- Covanová M., Sauer M., Rychtár J., Friml J., Petrásek J., Zazimalová E. 2013. Overexpression of the Auxin Binding PROTEIN1 modulates PIN-dependent auxin transport in tobacco cells. *PLOS ONE*. 8:e70050.
- Cho H-T Cosgrove D.J. 2002. Regulation of hair initiation and expansin gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 14:3237-3253.
- Cho M., Lee S.H., Cho H.-T. 2007. P-glycoprotein-like genes of *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* 19:3930-3943.
- Cho M., Cho H.-T. 2012. The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal Behav.* 8(2):e22990.

- Dal Bosco C, Dovzhenko A, Liu X, Woerner N., Rensch T, Eismann M, Eimer S., Hegermann J., Paponov I. A., Ruperti B., Heberle-Bors E., Touraev A., Cohen J.D., Palme K. 2012a. The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis. *Plant J.* 71:860-870.
- Dal Bosco C., Dovzhenko A., Palme K. 2012b. Intracellular auxin transport in pollen. *Plant Signal Behav.* 7:1-2.
- Delrot S., Lauvergeat V. 2011. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* 62:2465-2483.
- De Smet I., Tetsumura T., De Rybel B., dit Frey N.F., Laplace L., Casimiro I., Swarup R., Naudts M, Vanneste S., Audenaert D., Inzé D., Bennett M.J., Beeckman T. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134:681-690.
- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435:441-445.
- Dhonukshe P., Anieto F., Hwang I., Robinson D.G., Mravec J., Stierhof Y.D., Friml J. 2007a. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 17:520-527.
- Dhonukshe P., Grigoriev I., Fisher R., Tominaga M., Robinson D., Hasek J., Paciorek T., Gadella T.W.J., Stierhof Y., Ueda T., Oiwa K., Akhmanova A., Brock R., Spang A., Friml J. 2007b. Auxin transport inhibitors block vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:4489-4494.
- Dhonukshe P., Tanaka H., Goh T., Ebine K., Mahonen A.P., Prasad K., Blilou I., Geldner N., Xu J., Uemura T., Chory J., Ueda T., Nakano A., Scheres B., Friml J. 2008. Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 456:962-966.
- Ding Z, Wang B, Moreno I, Dupláková N, Simon S, Carraro N, Reemmer J., Pěňčík A., Chen X., Tejos R., Skupa P., Pollmann S., Mravec J., Petrášek J., Zažímalová E., Honys D., Rolčík J., Murphy A., Orellana A., Geisler M., Friml J. 2012. ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 3:1-9.
- Dolan L., K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poethig, K. Roberts, B. Scheres. 1993. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.

- Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil S., Ivancheko M.G., Friml J., Shishkova S., Celenza J., Benková E. 2007. Auxin acts as a local morphogenetic to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:8790-8794.
- Epstein E., Cohen J. y Slovin J. 2002. The biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid changes during tomato fruit development. *Plant Growth Regul.* 38:15-20.
- Finet C., Jaillas Y. 2012. Auxology: When auxin meets plant evo-devo. *Dev. Biol.* 369:19:31.
- Fonseca S., Rosado A., Vaughan-Hirsch J., Bishopp A., Chini A. 2014. Molecular locks and keys the role of small molecules in phytohormone research. *Front Plant Sci* 5:1-16.
- Fortin M.C., Pierce, F.J., Poff, K.L. 1989. The pattern of secondary root formation in curving roots of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Cell Environ.*12:337-339.
- Forzani C., Aichinger E., Sornay E., Willemsen V., Laux T., Dewitte W. Murray J. A.H. 2014. WOX5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr. Biol.* 24:1939–1944.
- Franklin K.A., Preaekelt U., Stoddart W.M, Billingham O.E., Halliday K.J., Whitelam G.C. 2003. Phytochromes B, D and E act redundantly to control multiple physiological responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131:1340-1346.
- Friml J., Benková E., Blilou I., Wisniewska J., Hamann T., Ljung K., Woody S., Sandberg G., Scheres B., Jürgens G., Palme K. 2002a. AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108:661-673.
- Friml, J., Wisniewska, J., Benková, E., Mendgen, K. and Palme, K. 2002b. Lateral relocation of auxin efflux regulator AtPIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415:806-809.
- Friml J. 2003. Auxin transport – shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6:7-12.
- Friml J. 2010. Subcellular trafficking of PIN auxin efflux in auxin transport. *Eur. J. Cell Biol.* 89:231-235.
- Ganguly A., Lee S.H., Cho M., Lee O.R., Yoo H., Cho H. Differential Auxin-Transporting Activities of PIN-FORMED Proteins in Arabidopsis Root Hair Cells. 2010. *Plant Physiology.* 153:1046-1061

- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., Sheres B. 2007. PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449:1053–1057.
- Geisler, M., Blakeslee J.J., Bouchard R., Lee E.R., Vincenzetti V., Bandyopadhyay A., Titapiwatanaun B., Peer W. A., Bailly A., Richards E.L., Ejendal K. F. K., Smith A.P., Baroux C., Grossniklaus U., Müller A., Hrycyna C. A., Dudler R., Murphy A. S., Martinoia E. 2005. Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* 44:179-194.
- Geldner N., Frilm J., Stierhof Y.D., Jürgens G., Palme K. 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413:425-428.
- Grebe M., Friml J., Swarup R., Ljung K., Sandberg G., Terlou M., Palme K., Bennett M.J., Scheres B. 2002. Cell polarity signaling in Arabidopsis involves a BFA-sensitive auxin influx pathway. *Curr. Biol.* 12:329-334.
- Guo J., Wei J., Xu J., Sun M-X. 2014. Inducible knock-down of GNOM during root formation reveals tissue-specific response to auxin transport and modulation of local auxin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 65:1165-1179.
- Habets M.E.J., Offringa R. 2014. PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals. *New Phytologist* 203:362-377.
- Hayashi K. 2012. The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol.* 53:965-975.s.
- Harrison B. R., Masson P.H. 2008. ARL2, ARG1 y PIN3 defines a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Planta* 53:380-392.
- Heisler M. G., Ohno C., Das P., Sieber P., Reddy G. V., Long J. A., Meyerowitz E. M. 2005. Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology* 15:1899-1911.
- Hernández-Mata G., Mellado-Rojas M.E., Richards-Lewis A., López-Bucio J., Beltrán-Peña E., Soriano-Bello E.L. 2010. Plant immunity induced by oligogalacturonides alters root growth in a process involving flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.* 29:441-454.
- Hichri I., Barrieu F., Bogs A., Kappel C., Lauvergeat V. 2011. Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* 1:1-19.
- Imhoff V., Muller P., Guern J., Delbarre A. 2000. Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 105:580–588.

- Ishikawa H., Evans M.L. 1990. Gravity-induced changes in intracellular potentials in elongating cortical cells of mung bean roots. *Plant Cell Physiology* 31:457-462.
- Jones A.R., Kramer E.M., Knox K., Swarup R., Bennett M.J., Lazarus C.M., Grierson C.S. 2009. Auxin transport through non hair cells sustains root hair development. *Nat. Cell Biol.* 11:78-84.
- Kaneda M., Schuetz M., Lin B.S.P., Chanis C., Hamberger B., Western T.L., Ehltng J., Samuels A.L. 2011. ABC transporters coordinately expressed during lignifications of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J. Exp. Bot.* 62:2063-2077.
- Kang B.G., Ye X., Osburn L.D, Stewrt C.N. Jr., Cheng Z.M. 2010. Transgenic hybrid aspen overexpressing the *Atwbc19* gene encoding an ATP- binding cassette transporter confers resistance to four aminoglycoside antibiotics. *Plant Cell Rep.* 29:643-650.
- Kang J., Park H., Burla B., Kretzschmar T., Lee Y.,Martinoia E.2011. Plant ABC transporters. *The Arabidopsis Book*.9: e0153
- Katekar G. F, Geissler E. 1980. Auxin transport inhibitors. *Plant Physiol.* 66:1190-1195.
- Kleine-Vehn J., Huang F., Zhang J., Michniewicz M., Offringa R., Friml J. 2009. PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-independent trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:3839-3849.
- Kleine-Vehn J., Dhonukshe P., Swarup R., Bennett M., Friml J. 2006. A novel pathway for subcelular trafficking of AUX1 auxin influx carrier. *Plant Cell* 18:3171-3181.
- Kornet N., Scheres B. 2009. Members of the GCN5 histone acetyltransferase complex regulate PLETHORA-mediated root stem cell niche maintenance and transit amplifying cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:1070–1079.
- Lewis D.R., Miller N.D., Splitt B.L., Wu G., Spalding E. P. 2007. Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporter genes. *Plant Cell* 19:1838-1850.
- Lewis D.R., Negi S., Sukumar P., Muday G.K. 2011. Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carries. *Development* 138:3485-3495.

- Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28:465-474.
- Ljung, K., Celenza A.K, Yamada J., Estelle M., Normanly J., Sandberg G. 2005. Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17:1090-1104.
- López-Bucio J., Cruz-Ramírez A., L. Herrera-Estrella. 2003. The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6:280-287.
- Ludwig-Muller J. 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* 62:1757-1773.
- Ma Q. y Robert S. 2013. Auxin biology revealed by small molecules. *Physiol. Plant.* 151:25-42.
- Malamy J. E., P. N. Benfey. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.
- Marrhavý P., Bielach A., Abas L., Abuzeineh A., Duclercq J., Tanaka H., Parezová M., Friml J., Kleine-Vehn J., Benkova E. 2011. Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev. Cell* 21:796-804.
- Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K., Amrhein N. 1993. ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364:247-249.
- Michniewicz M., Brewer P.B., Friml J. 2007. Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book* 5:1-29.
- Mravec J., Kubes M., Bielach A., Gaykova V., Petrásek J., Skupa P., Chand S., Benková E., Zazimalová E., Friml J. 2008. Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 135:3345-3354.
- Mravec J., Shúpa P., Baily A., Hoyerová K., Krecek P., Bielach A., Petrásek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y-D., Dobrev P.I., 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.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15:473–497.

- Nagashima A., Uehara Y. Sakai T. 2008. The ABC subfamily B auxin transporter AtABCB19 involved in the inhibitory effects of N-Naphthylphthalamic acid in the phototropic and gravitropic responses of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 49:1250-1255.
- Noh B, Murphy A.S., Spalding E.P. 2001. Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin mediated development. *Plant Cell* 135:2441-2454.
- Oliva, M. and Dunand, C. 2007. Waving and skewing: how gravity and the surface of growth media affect root development in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 176:37-43.
- Okada K., Shimura Y. 1990. Reversible root tip rotation in *Arabidopsis* seedlings induced by obstacle-touching stimulus. *Science* 250:274-276.
- Ouyang J., Shao X., Li J. 2000. Indole-3-glycerol phosphate, a branch point of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 24:327–334.
- Parry G., Calderon-Villalobos L. I., Prigge M., Dharmasiri S., Itoh H., Lechner E., Gray W. M., Bennet M., Estelle M. Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106:22540-22545.
- Peer W.A., Murphy A.S. 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci.* 12:556-563.
- Péret B., De Rybel B., Casimiro I., Benková E., Swarup R., Laplace L., Beeckman T., Bennett M. J.. 2009. *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* 14: 399-408.
- Péret, B., Swarup K., Ferguson A., Seth M., Yang Y., Dhondt S., James N., Casimiro I., Perry P., Syed A., Yang H., Reemmer J., Venison E., Howells C., Perez-Amador M. A., Yun J., Alonso J., Beemster G. T., Laplace L., Murphy A., Bennett M. J., Nielsen E., Swarup R. 2012. AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 24:1-12.
- Petrásek J., Mravec J., Bouchard R., Blajeslee J.J., Abas M., Seifertová D., Wisniewska J., Tadele Z., Kubes M., Covanová M., Dhonukshe P., Skupa P., Benková E., Perry L., Krecek P., Lee O.R., Fink G.R., Geisler M., Murphy A.S., Luschning C., Zazimalová E., Friml J. 2006. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312:914-918.
- Petrásek J., Friml J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development* 106:2675-2688.

- Rapparini F., Tam Y., Cohen J., Slovin J. 2002. Indole-3-acetic acid metabolism in *Lemna gibba* undergoes dynamic changes in response to growth temperature. *Plant Physiol.*128:1410-1416.
- Rashotte A.M., Brady S.R., Reed R.C., Ante S.J., Muday G. K. 2000. Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*123:481-491.
- Robert H. S., Friml J. 2009. Auxin and other signals on the move in plants. *Nat. Chem. Biol.* 5:325-332.
- Robert S., Kleine-Vehn J., Barbez E., Sauer M., Paciorek T., Baster P., Vanneste S, Zhang J, Simon S, Covanova M, Hayashi H, Dhonukshe P, Yang Z, Bednarek S, Jones A, Luschnig C, Aniento F, Zazimalova E., Friml J. 2010. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 143:111-121.
- Roshchina V.V. 2012. Vital autofluorescence application to the study of plant living cells. *Int. J. Spectrosc.* 2012:1-14.
- Rubery P., Shelldrake A. 1974. Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 88:101-121.
- Rubery P.H. 1990. Phytotropins: receptors and endogenous ligands. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 44:119-46.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Brown D., Bernasconi P., Turner J., Muday G., Estelle M. 1997. Reduced naphthylphthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* 9:745-757.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W.G., Hobbie L., Turner J., Estelle M. 1998. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* 12:198-207.
- Sairanen I., Novák O., Pencík 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.
- Santelia D., Vincenzetti V., Azzarello E., Bovet L., Fukao Y., Düchtig P., Mancuso S., Martinoia E., Geisler M. 2005. MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett.* 579:5399-5406.
- Santner A., Calderon-Villalobos L.I.A., M. Estelle. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nat. Chem. Biol.* 5:301-307.

- Sauner M., Robert S., and Kleine-Vehn J. 2013. Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* 64:2565-2577.
- Scheres B., Benfey P., Dolan L. 2002. Root development. *The Arabidopsis Book* 1: e0101.
- Swarup R., Friml J., Marchat A., Ljung K., Sandberg G., Palme K., Bennett M. 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggest two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* 15:2648-2653.
- Swarup R., Kargul J., Marchat A., Zadik D., Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L., Millner P., Tsurumi S., Moore I., Napier R., Kerr I.D., Bennett M.J. 2004. Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *Plant Cell* 16:3069-3083.
- Swarup K., Benkova E., Swarup R., Casimiro I., Peret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M. P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J.D., Taylor C.G., Schachtman D.P., May S., Sandberg G., Benfey P., Friml J., Kerr I., Beeckman T., Laplaze L., Bennett M.J. 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* 10:946-954.
- Swarup R., Péret B., 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers an overview. *Front. Plant Sci.* 3:1-11.
- Sztein A., Cohen J., Cooke T. 2002. Indole-3-acetic acid biosynthesis in isolated axes from germinating bean seeds: The effect of wounding on the biosynthetic pathway. *Plant Growth Regul.* 36:201-207.
- Taiz L., E. Zeiger. 2002. *Plant Physiology*. 3rd Ed. Sinauer Associates Inc. 690 pp.
- Takahashi H. 2013. Auxin biology in roots. *Plant Root* 7:49-64.
- Tanaka H Dhonukshe P., Brewer F., Friml J. 2006. Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol. Life Sci.* 63:2738-2754.
- Tanaka H., Kitakura S., Rakusová H., Uemura T., Feraru M.I., Rycke R.D., Robert S., Kakimoto T., Friml J. 2013. Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 9:1-9.
- Terasaka K., Blakeslee J.J., Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bandyopadhyay A., Makam S.N., Lee O.R., Richards E.L., Murphy A.S., Sato F., Yazaki K. 2005.

PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* 17:2922-2939.

- Thompson E.P., Wilkins C., Demidchik V., Davies J.M., Glover B.J. 2010. An *Arabidopsis* flavonoid transporter is required for anther dehiscence and pollen development. *J. Exp. Bot.* 61:439-451.
- Thomson R. S., Hertel R., Müller S., Tavares J. 1973. 1-N-naphthylphthalamic acid and 2, 3, 5- triiodobenzoic acid-*in-vitro* binding to particulate cell fractions and action on auxin transport in corn coleoptiles. *Planta* 109:337-352.
- Tian H., De Smet I., Ding Z. 2014. Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Cell* 19:426-431.
- Titapiwatanakun B., Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Yang H., Mravec J., Sauer M., Cheng Y., Adamec J., Nagashima A., Geisler M., Sakai T., Friml J., Peer W.A., Murphy A.S. 2009. ABCB19/PGP19 stabilizes PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant J.* 57:27-44.
- Titapiwatanakun B., Murphy A.S. 2009. Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J. Exp. Bot.* 60:1093-1107.
- Valladares F., Gianoli E., Gómez J.M. 2007. Ecological limits to plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* 176:749-763.
- Vandenbussche F., Petrášek J., Zádňíková P, Hoyerová K., Pesek B., Raz V., Swarup R., Bennett M., Zazimalová, Benková E., Van Der Straeten D. 2010. The auxin influx carriers AUX1 y LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development* 137:597-606.
- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benková E., Benjamins R., Beeckman T., Luschning C., Friml J. 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132:4521-4531.
- Vilches-Barro, Maizel A. 2015. Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 23:31-38
- Wisniewska J., Xu J., Seifertová D., Brewer P.B., Ruzicka K., Blilou I., Rouquié D., Benková E., Sheres B., Friml J. 2006. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 312:883.

- Wu G., Lewis D.R., Spalding E.P. 2007. Mutations in Arabidopsis multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* 19:1826-1837.
- Yang H., Murphy A.S. 2009. Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant J.* 59:179-191.
- Yang Y., Hammes U.Z., Taylor C.G., Schachtman D.P., Nielsen E. 2006. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr. Biol.* 16:1123-1127.
- Zazimalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K., Hose P. 2010. Auxin transporters why so many? *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2:a001552.
- Zhao Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 275:3137-3143.

## FUENTES DE INTERNET

The National Science Foundation (NSF). 2002. *Arabidopsis*: The model plant. <http://www.nsf.gov/pubs/2002/bio0202/model.htm>

Consultado: 07 de Abril de 2015

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=853685, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/853685>

Consultado: 09 de Abril de 2015)

National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=8594, <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8594>

Consultado: 09 de Abril de 2015)

## 10. APÉNDICE

**Relación de publicaciones generadas durante la realización del presente trabajo:**

1. Magaña-Dueñas V., López- Bucio J. y Beltrán-Peña E. 2015. El transporte de auxinas y su impacto sobre el desarrollo vegetal. Ciencia Nicolaita 64:22-41.



# **E**l transporte de auxinas y su impacto sobre el desarrollo vegetal

*Viridiana Magaña Dueñas, José López Bucio, Elda Beltrán Peña*

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH (eldabelt@umich.mx)

## **Resumen**

Las auxinas constituyen un grupo amplio de reguladores del crecimiento vegetal que incluyen al ácido indol-3-acético y el ácido indol-3-butírico, así como diversos compuestos precursores y conjugados. Dichas sustancias se producen de manera natural en las plantas, aunque es común encontrarlas en bacterias y hongos. El transporte y la direccionalidad que determinan los gradientes de concentración de auxinas en los tejidos vegetales son fundamentales para el desarrollo de las plantas. La distribución tisular de estos fitorreguladores ocurre como resultado de la biosíntesis, el metabolismo y predominantemente del transporte célula a célula. Este último proceso regula el desarrollo embrionario, el mantenimiento de los meristemos, la arquitectura radicular y del follaje, así como las respuestas a estímulos ambientales como el fotoperiodo y la gravedad. En esta revisión se analizan los progresos recientes en las investigaciones sobre el transporte de auxinas y su participación en los diversos procesos del desarrollo vegetal.

## **Abstract**

Auxins constitute a wide group of plant regulators that include indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid, as well as diverse precursor and conjugate compounds. Such substances are principally produced in plants, although they can be produced by bacteria and fungi. The transport and directionality that determine auxin gradients in plant tissues are fundamental for plant development. The tissue distribution of these plant regulators occurs as a result of biosynthesis, metabolism and predominantly, due to

cell-to-cell movement. This later process regulates embryo development, meristem maintenance, root and shoot architecture, and responses to environmental factors such as photoperiod and gravity. In this review, we analyze recent progress in the research about auxin transport, and its participation in the diverse processes of plant development.

**Palabras clave:** auxinas, transporte, desarrollo vegetal, tropismos.

**Keywords:** auxin, transport, plant development, tropisms.

## Introducción

Las auxinas son un grupo importante de fitoreguladores que regulan la división y elongación celular y activan eventos específicos de diferenciación incluyendo la formación del tejido vascular, dominancia apical, respuesta a la luz y gravedad (Hayashi, 2012). Las auxinas son moléculas pequeñas con capacidad para estimular el crecimiento de las plantas. Las principales auxinas producidas de forma natural son el ácido indol-3-acético (AIA) y el ácido indol-3-butírico (AIB). La actividad de las auxinas está regulada principalmente a tres niveles: biosíntesis, transporte y señalización (Zhao, 2010; Ludwig-Muller, 2011; Sauer et al., 2013). Las auxinas se sintetizan en el ápice del follaje, hojas jóvenes y meristemo de la raíz (Ljung et al., 2001, 2005). Desde los sitios de síntesis, las auxinas se redistribuyen a otros tejidos donde afectan una gran variedad de procesos del desarrollo vegetal como la formación de raíces laterales, la dominancia apical, el desarrollo de hojas y flores y respuestas a estímulos ambientales (Ljung et al., 2005). En este artículo revisaremos los recientes progresos sobre el conocimiento del transporte de auxinas, durante diversos eventos del desarrollo vegetal como son: la embriogénesis, la organogénesis y los tropismos.

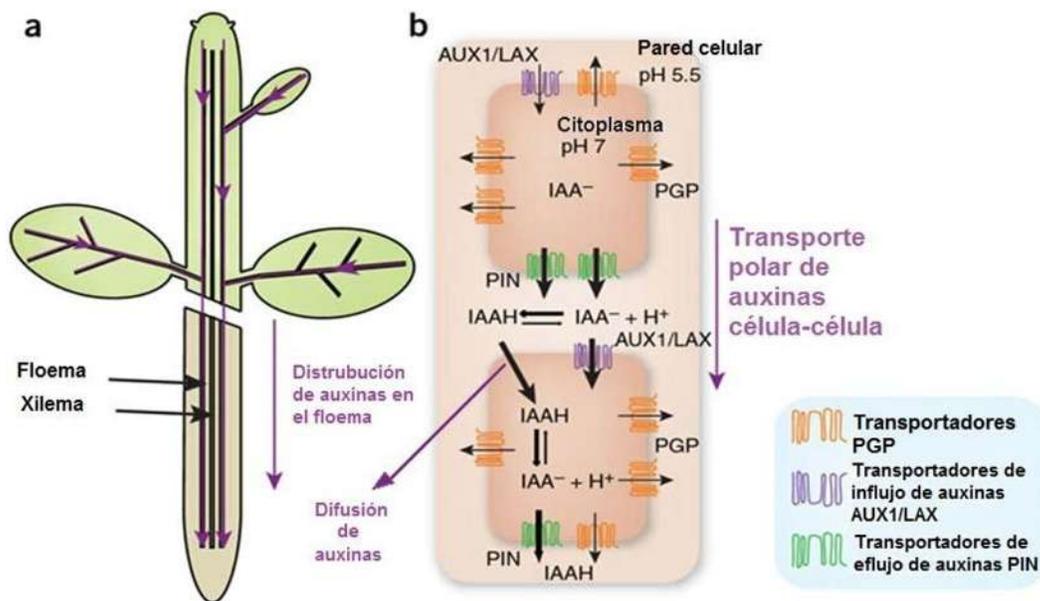
## Transporte de auxinas

El transporte y distribución permite establecer un gradiente de auxinas en las plantas mediante la ubicación específica de transportadores de entrada (influjo) y salida (eflujo) en las membranas celulares (Petrásek et al., 2006). Para transportar a las auxinas recién sintetizadas a los diferentes órganos, las plantas han desarrollado dos tipos de sistemas de transporte: i) a través del floema, denominado transporte no polar o pasivo y ii) célula a célula, conocido como transporte polar de auxinas (TPA) o transporte activo (Michniewicz et al., 2007). A continuación se describe como se lleva a cabo cada uno de ellos:

### a) Transporte no polar de auxinas o pasivo

Las auxinas y otros compuestos indólicos se mueven a larga distancia a través del floema junto con los fotosintatos a diversos tejidos blanco (Michniewicz et al., 2007) (Fig. 1a). La conexión entre el transporte a través del floema y el transporte polar que ocurre célula

la a célula se ha establecido mediante experimentos con plantas de chícharo, en donde se encontró que las auxinas que se marcan radiativamente y suministran a las hojas fueron transportadas a través del floema hasta llegar a partes distales de la plantas, incluyendo las raíces laterales y las puntas de la raíz primaria (Cambridge y Morris, 1996).



**Figura 1. Transporte de auxinas.** a) Distribución de auxinas a través del floema desde los tejidos fuente – hojas jóvenes y brotes florales – hacia el ápice radicular. b) Transporte polar de auxinas. La auxina protonada -ácido indol-3-acético sin disociar (IAAH)– puede difundir a través de la membrana plasmática, mientras que la forma aniónica es transportada dentro de la célula por transportadores de influjo AUX1/LAX. En el citosol, el AIAH es disociado en su forma aniónica (AIA) y por lo tanto atrapado dentro de la célula. El AIA solamente puede salir de la célula a través de los transportadores de eflujo PGP, PIN y PIL. La localización de los transportadores determina la direccionalidad del flujo intracelular de auxinas (Robert y Friml, 2009).

### b) Transporte polar de auxinas o activo (TPA)

El TPA es fundamental para la distribución de las auxinas a través de distancias cortas y ocurre célula a célula a través de diversas familias de transportadores. La familia AUXIN RESISTANT 1/LIKE-AUX1 (AUX1/LAX) incluye transportadores de influjo y los transportadores de eflujo están agrupados en la familia PIN-FORMED (PIN) y la subfamilia ATP-binding cassette B/resistente a multidroga/P-glicoproteínas (ABCB/MDR/PGP) (Petrásek y Friml, 2009). Ambos tipos de transportadores establecen el gradiente de auxinas, el cual es regulado por la expresión y localización subcelular de las proteínas transportadoras en respuesta a señales ambientales y durante el desarrollo (Friml, 2010). El TPA puede ser

regulado a tres niveles: i) por la abundancia de transportadores (mediadas a nivel de transcripción, traducción y degradación); ii) por el tráfico subcelular y posicionamiento de los transportadores en sitios específicos de la membrana plasmática; y iii) por la actividad del transporte que puede variar por modificaciones postraduccionales, inhibidores endógenos, regulación del pH e interacciones entre los transportadores (Petrásek y Friml, 2009). Debido a que el AIA es un ácido débil con un pKa de 4.75, puede adquirir dos formas químicas dependiendo del pH del ambiente: una protonada (AIAH) a pH ácido y otra aniónica (AIA<sup>-</sup>) a pH neutro. El pH en la pared celular es de 5.5, por tal razón aproximadamente el 15% del AIA está en forma protonada y se puede difundir a través de la membrana, mientras que en el citosol, cuyo pH es aproximadamente de 7, se favorece la estructura del AIA en forma aniónica. Debido a que esta última está cargada eléctricamente, no puede ser transportada a través de la membrana hacia las células vecinas (Rubery y Sheldrake, 1974). Por lo tanto, la membrana plasmática presenta proteínas transportadoras requeridas para el influjo y eflujo de auxinas (Bohn-Courseau, 2010) (Fig. 1b).

## Transportadores de influjo de auxinas

Aunque las auxinas en un determinado porcentaje pueden entrar libremente a la célula por difusión a través de la membrana plasmática (Tanaka et al., 2006) (Fig. 1b), se ha demostrado mediante inhibidores específicos de influjo como son: el ácido 1-naftoxicético (1-NOA) y el ácido 3-cloro-4-hidroxifenilacético (CHPAA), que las proteínas transportadoras de influjo son requeridas para la distribución de auxinas durante los tropismos y la organogénesis (Imhoff et al., 2000). El primer transportador de influjo identificado fue AUX1. En *Arabidopsis*, *AUX1* pertenece a una pequeña familia de genes, que comprende cuatro genes altamente conservados, *AUX1* y parecidos a los *AUX1* (*LAX*), *LAX1*, *LAX2* y *LAX3* que forman una subfamilia específica de transportadores en plantas (Péret et al., 2012; Swarup y Péret, 2012). Las proteínas AUX1/LAX actúan como simportadores, que permiten la entrada de la forma aniónica del AIA con ayuda de un gradiente de protones (Yang et al., 2006). Aunque los miembros de la familia AUX/LAX tienen similitudes, cada uno regula un proceso del desarrollo dependiente de auxinas. Por ejemplo, diversos estudios apoyan la idea de que AUX1 funciona en programas de desarrollo mediados por auxinas como el gravitropismo (Swarup et al., 2001, 2004), el crecimiento de los pelos radiculares (Grebe et al., 2002; Jones et al., 2009) y la distribución de las hojas en el tallo (Reinhard et al., 2003; Bainbridge et al., 2008), mientras que AUX1 y LAX3 son requeridos para el desarrollo de raíces laterales (De Smet et al., 2007; Swarup et al., 2008) y la formación del gancho apical (Vandenbussche et al., 2010). LAX2 regula el desarrollo vascular, en tanto que LAX1 y LAX2 están involucrados en el patrón de distribución de las hojas en el tallo (Bainbridge et al., 2008).

## Transportadores de eflujo

Debido a que en el citosol se favorece la forma aniónica de las auxinas, las proteínas transportadoras de eflujo son esenciales para que las auxinas se movilicen a través de la membrana celular. Dos tipos de transportadores de eflujo han sido identificados, la familia de los transportadores PIN-FORMED (PIN) y la subfamilia ATP-binding cassette B/resistente a multidrogas/P-glicoproteínas (ABCB/MDR/PGP).

### a) Transportadores ABCB

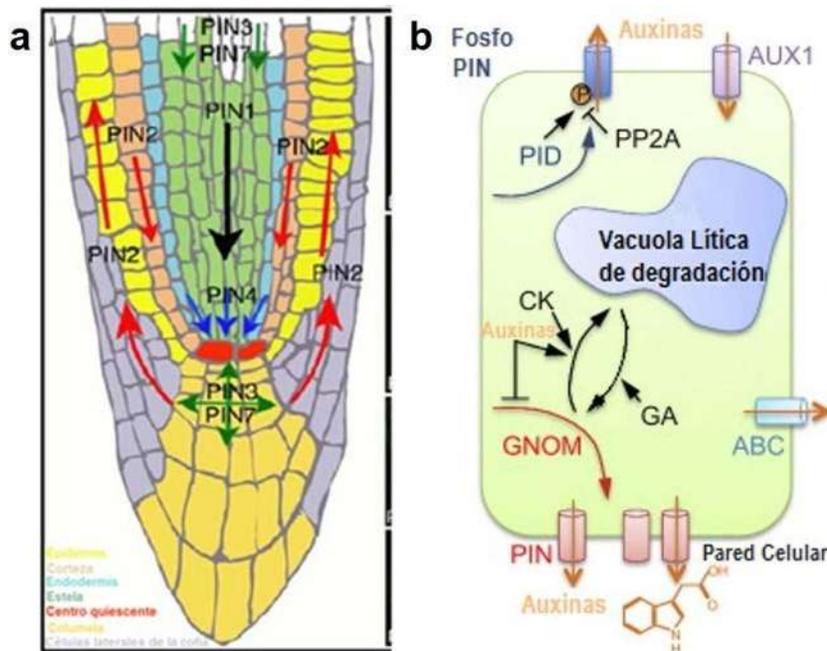
La familia de los transportadores que presenta el motivo de unión a ATP (*ATP-binding cassette*; ABC/MDR/PGP) (Fig. 1b), originalmente fue identificada por los transportadores que participan en procesos de detoxificación (Martinoia et al., 1993). Desde su descubrimiento, se ha demostrado que dichas proteínas están involucradas en las respuestas a patógenos, acumulación de fitato en las semillas e interacciones con el ácido abscísico. Adicionalmente, los transportadores ABC/MDR/PGP juegan una función importante en el crecimiento de órganos, la nutrición de las plantas, el desarrollo vegetal, la respuesta a estrés abiótico y la interacción de las plantas con su ambiente (Kang et al., 2011). La subfamilia (ABCB/MDR/PGP), incluye 21 miembros divididos en tres grupos (Cho y Cho, 2013). Entre la subfamilia ABCB, los miembros ABCB1, ABCB4 y ABCB19 han sido bien caracterizados como transportadores de auxinas (Titapiwatanakun y Murphy, 2009), teniendo como característica particular que se encuentran ubicados de manera constitutiva. MDR1 también conocido como PGP19 o ABCB19, se identificó a partir de un escrutinio de plantas de *Arabidopsis* para aislar genes con funciones relacionados a canales de aniones. Sin embargo, el análisis de las mutantes individuales *pgp1* y *pgp19* mostraron curvatura anómala de los cotiledones y de las hojas, así como ondulaciones en los hipocotilos y raíces, por lo cual, dichas proteínas se asociaron con el transporte de auxinas (Noh et al., 2001). Defectos en el transportador *ABCB4* presentaron un fenotipo de plántulas con pelos radiculares más grandes (Cho et al., 2007), por lo que se sugirió que esta proteína participa en el transporte de auxinas en la raíz. Además, *ABCB4* también se relacionó con la importación de auxinas producidas por los microorganismos del suelo, esto último aunado a su localización en células epidérmicas (Santelia et al., 2005; Terasaka et al., 2005; Lewis et al., 2007; Wu et al., 2007; Yang y Murphy, 2009). Se ha observado que *AtABCB19* confiere resistencia al antibiótico kanamicina cuando dicha proteína es sobre-expresada en plantas, lo que indica que dicha proteína puede transportar diversos metabolitos (Kang et al., 2010). Estudios recientes han demostrado que ABCB14 y ABCB15 están asociadas con el transporte polar de auxinas (Kaneda, 2011), ya que se localizan principalmente en el tejido vascular de la inflorescencia del tallo, afectando el transporte en estos tejidos. ABCB19 se localiza en las partes apicales de la planta sugiriendo una función en el transporte de auxinas a las puntas de la raíz y del follaje (Zazimalova et al., 2010). ABCB1 se expresa en la cofia y el meristemo apical de la raíz y en las células corticales y epidérmicas en donde se relaciona con el transporte de auxinas hacia el follaje desde el ápice de la raíz (Geisler et al, 2005). Por otra parte, ABCB4 se expre-

sa en la epidermis de la raíz y también media el transporte de auxinas hacia el follaje (Lewis et al., 2007). Reportes recientes sugieren que ABCB19 afecta el transporte de auxinas a través de las proteínas PIN. ABCB19 se localiza en la membrana plasmática y estabiliza a PIN1, de esta manera afecta el tráfico y la función de PIN. La desestabilización de PIN1 por la pérdida de ABCB19 ocasionó una total inactivación del transporte polar de auxinas, mayor aún que la mostrada por la mutante *pin1* (Titapiwatanakun et al., 2009). En algunos tipos de tejidos, los transportadores ABCB19 y PIN1 pueden interactuar, cuando se encuentran formando un complejo muestran un efecto sinérgico y las proteínas son más sensibles a los inhibidores del transporte de auxinas (Blakeslee et al., 2007).

### b) Transportadores de eflujo PIN

Las proteínas PIN-FORMED (PIN) son una familia de proteínas transmembranales específicas de plantas, que transportan auxinas y están constituidas por ocho miembros (Krecek, 2009; Friml, 2010), los cuales son divididos en dos subfamilias con base en la presencia o ausencia de un hueco hidrofílico central: i) La subfamilia de PIN grandes incluye todos los miembros definidos como transportadores de eflujo de auxinas localizados en la membrana plasmática: PIN1-PIN4 y PIN7. PIN6 también forma parte de este grupo, con base en su secuencia altamente similar en las regiones transmembranales y la reducción parcial en el hueco hidrofílico (Petrásek et al., 2006; Wisniewska et al., 2006). ii) La subfamilia de PIN cortos, codifican proteínas con el hueco hidrofílico central ausente y comprende a las proteínas PIN5 y PIN8, que parecen estar localizadas en el retículo endoplásmico, y por lo tanto no están directamente involucradas en el transporte de auxinas entre células, pero si median la homeostasis intracelular de las auxinas (Mravec et al., 2009). La proteína PIN8, se expresa específicamente en el gametofito masculino (Dal Bosco et al., 2012a; Ding et al., 2012) y junto con PIN5 median el transporte intracelular de auxinas en el polen (Dal Bosco et al., 2012b). En *Arabidopsis*, PIN1 media la organogénesis y diferenciación del tejido vascular, PIN2 el crecimiento gravitrópico de la raíz, PIN3 el crecimiento diferencial del follaje, PIN4 la actividad del meristemo de la raíz y PIN6 modifica el transporte de auxinas en procesos dependientes de alteración de auxinas, especialmente aquellos requeridos para el crecimiento de la raíz y desarrollo reproductivo (Cazzonelli et al., 2013). PIN7 está involucrada en el desarrollo temprano del embrión (Vieten et al., 2005). En la figura 2a se muestra la ubicación de las proteínas PIN en la punta de la raíz de *Arabidopsis*. La localización de las proteínas PIN en la membrana plasmática regula la dirección del movimiento de auxinas y consecuentemente determina la distribución local de auxinas. La localización celular de las proteínas PIN está regulada por fitoreguladores y señales ambientales y del desarrollo (Hayashi, 2012). Un factor determinante en la polaridad de PIN es su tráfico endocítico, las proteínas PIN son secretadas de una manera no polar y su subsecuente endocitosis y reciclamiento establece su localización polar en la parte basal de la célula (Dhonukshe et al., 2008) (Fig. 2b). Este reciclamiento es dependiente de la proteína endosomal GNOM (GN). La fosforilación de PIN por diversas cinasas como PINOID (PID), lleva a estos transportadores de auxinas a una vía de reciclamiento dirigiéndola al polo apical de la célula (Kleine-Vehn et al., 2009). Esta activi-

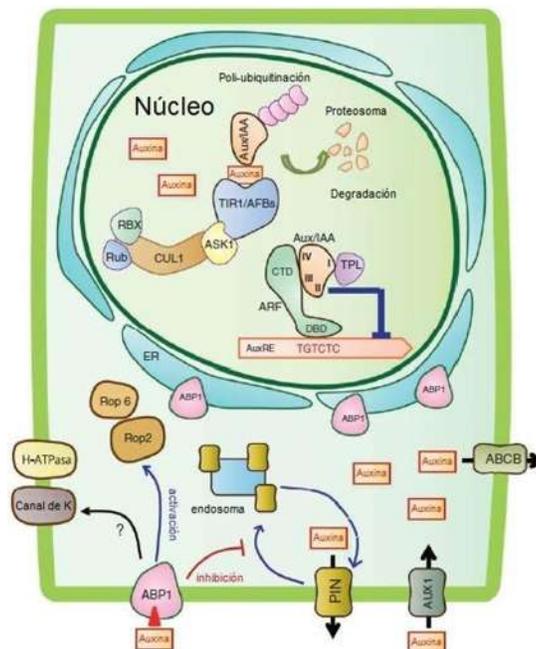
dad es antagonizada por la proteína fosfatasa 2A (PP2A). La endocitosis y el reciclamiento también controlan la cantidad de proteínas PIN en la membrana plasmática por regulación del balance de la proteína que es reciclada de vuelta a la membrana plasmática o dirigida a la vacuola lítica para su degradación (Fig. 2b) (Finet y Jaillais, 2012). Se ha observado que la biosíntesis local de auxinas puede contribuir al establecimiento de los gradientes de auxinas en tejidos específicos (Guo et al., 2014). Por otra parte, el receptor de auxinas, la proteína *Auxin Binding Protein 1* (ABP1) está involucrada en la modulación del reciclamiento intracelular de las proteínas, controlando la tasa de transporte de las auxinas a través de la membrana plasmática y el reciclamiento de transportadores PIN (Covanová et al., 2013). La señalización de auxinas a través de ABP1 inhibe la internalización de las proteínas PIN mediada por clatrina (Fig. 3) (Dhonuksheet et al., 2007a; Robert et al., 2010; Tanaka et al., 2013). El tráfico de proteínas PIN también puede ser regulado por fitoreguladores, las auxinas por sí mismas, inhiben la internalización de las proteínas PIN desde la membrana plasmática, controlando de esta manera la retroalimentación en respuesta a niveles de auxinas (Fig. 3) (Geldner et al., 2001). Por otra parte, las citocininas también controlan la endocitosis de las proteínas PIN induciendo su degradación (Fig. 2b) (Marhavy et al., 2011). Altas concentra-



**Figura 2. Posicionamiento, tráfico y reciclaje de las proteínas PIN.** a) La localización polar de las proteínas PIN es la clave para el flujo de auxinas y el establecimiento local de concentraciones de auxinas en la punta de la raíz. b) Un factor determinante para la polaridad de las proteínas PIN es el tráfico endocítico, el modelo propone que las proteínas PIN son secretadas en una manera no polar y que su subsecuente endocitosis y reciclamiento establece su localización polar en el polo basal de la célula (Michniewicz et al., 2007; Finet y Jaillais, 2012).

**El transporte de auxinas y su impacto...**

ciones de jasmonato también inducen la degradación y endocitosis de PIN2 (Sun et al., 2011). Las giberelinas limitan el tráfico de PIN a la vacuola lítica al igual que los péptidos de la familia GOLVEN (Willige et al., 2012; Whitford et al., 2012) (Fig. 2b), mientras que el etileno incrementa la expresión de *PIN3* y *PIN7* (Lewis et al., 2011). En un escrutinio *in silico*, para aislar proteínas con homología y topología similar a los miembros de la familia PIN en *Arabidopsis* se encontraron siete proteínas parecidas a las PIN (PILS) con actividad transportadora de auxinas, que se localizaron en el retículo endoplásmico (Habets y Offringa, 2014).



**Figura 3. Modelo para la señalización de auxinas en la célula.** El receptor de auxinas TIR1/AFB es una proteína F-box que forma un complejo con ASK (ASK1) y culina (CUL1). SCF<sup>TIR1/AFB</sup> cataliza la ubiquitinación de las proteínas represoras Aux/IAA en presencia de auxinas. La actividad de los factores de transcripción de respuesta a auxinas (ARF) está bloqueada por Aux/IAA unida a TOPLESS (TPL). Las auxinas se unen en una pequeña cavidad entre TIR1 y Aux/IAA. La degradación de Aux/IAA inducida por auxinas libera a los ARF y activa la transcripción de genes de respuesta a auxinas. *Auxin binding protein 1* (ABP1) es una proteína localizada en el retículo endoplásmico que también actúa como un receptor de auxinas. Las auxinas bloquean la endocitosis de PIN mediada por clatrina desde la membrana plasmática a través de la señalización de ABP1. La señal de ABP1 activa canales de K<sup>+</sup> y H-ATPasas para inducir la respuesta rápida de las auxinas como el crecimiento inducido por la turgencia. La señal de ABP1 también activa a las Rho GTPasas (RP2 y ROP6), las cuales median procesos que controlan el crecimiento de las células de la epidermis de las hojas (Hayashi, 2012).

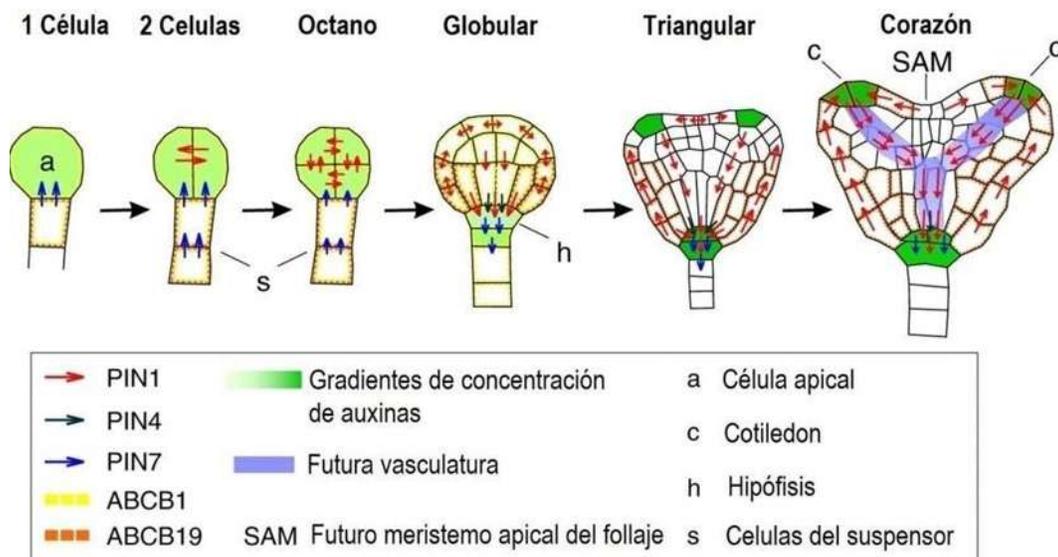
## Inhibidores del transporte de auxinas

El conocimiento acerca de los mecanismos del transporte polar de auxinas y su función sobre el desarrollo vegetal se ha basado ampliamente en herramientas farmacológicas, como los inhibidores del transporte de auxinas (ITAs), los cuales bloquean el movimiento polar de auxinas entre las células. Al aplicar los ITAs, estos interfieren con la distribución de auxinas y afectan el desarrollo vegetal (Tanaka et al., 2006). Algunos de los inhibidores más representativos son el ácido 2,3,5-triyodobenzoico (TIBA) y el ácido 1-pirenoilcenzóico (PBA), los cuales no sólo inhiben el eflujo de auxinas sino también interfieren con el tráfico subcelular de las proteínas PIN y AUX1 (Kleine-Vehn et al., 2006). PBA y TIBA interfieren con la motilidad de los organelos y el movimiento individual de vesículas, probablemente por inhibición del dinamismo de la actina del citoesqueleto (Dhonukshe et al., 2007b). El ácido N-1-naftiltalámico (NPA) es el inhibidor de eflujo de auxinas mejor caracterizado, sus efectos inhibitorios en los sistemas de transporte de auxinas llevan a la supresión de elongación y crecimiento diferencial de los hipocotilos en *Arabidopsis* (Ma y Robert, 2013). El NPA actúa como un inhibidor específico del AIA teniendo como blanco principal a los transportadores ABCB (Bailly et al., 2008; Nagashima et al., 2008) y ha sido ampliamente utilizado como una valiosa herramienta química en la investigación de la función del TPA y sus efectos sobre el desarrollo vegetal. Escrutinios genéticos de mutantes con respuestas alteradas al NPA permitieron la identificación de siete genes *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE (TIR)*, *TIR1-TIR7* (Ruegger et al., 1997). Posteriormente, se realizó la caracterización de algunos de estos genes: *TIR1*, es el receptor nuclear de las auxinas (Dharmasiri et al., 2005); *TIR2* codifica para la proteína TAA una de las enzimas clave en ruta de biosíntesis de auxinas IPA; *TIR3* codifica para la proteína AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (ARF7) y *TIR5* para BIG, una proteína similar a calosina requerida en el TPA (Ma y Robert, 2013). Un grupo de sustancias producidas naturalmente que actúan como los inhibidores del transporte de auxinas, son los flavonoides, los cuales, son metabolitos secundarios poli-fenólicos de las plantas cuya síntesis es tejido específica, regulada por el desarrollo y depende de las condiciones ambientales como luz y temperatura. Además, los flavonoides controlan la fertilidad del polen y llevan a cabo funciones para proteger a las plantas contra estrés biótico y abiótico (Thompson et al., 2010; Hichri et al., 2011). Algunos flavonoides como la quercetina y el kempferol han mostrado una inhibición del TPA y por consiguiente disminuyen la acumulación de auxinas en las plantas. Las mutantes de *Arabidopsis*, *TRANSPARENT TESTA 3, 4 y 7 (TT3, TT4 y TT7)*, que carecen de enzimas de la ruta biosintética de flavonoides, han sido usadas para elucidar la función de los flavonoides endógenos en el transporte de auxinas. Al agregar flavonoides, a las mutantes y a las plantas normales se observó que los flavonoides afectan el transporte polar de auxinas (Peer y Murphy, 2007). Algunos sitios de acción de los flavonoides han sido identificados como proteínas membranales de unión al NPA, como la subunidad regulatoria NBP (*NPA-binding protein*) (Hernández-Mata et al., 2010).

## Procesos del desarrollo vegetal modulados por las auxinas

### a) Embriogénesis

Las auxinas modulan los estadios tempranos del desarrollo vegetal. Análisis de mutantes de *Arabidopsis* han demostrado que la distribución diferencial de auxinas media eventos importantes durante la embriogénesis, como el establecimiento del eje axial-basal y la formación de las hojas. Después de la primera división anticlinal del cigoto fertilizado, se incrementa la concentración de auxinas en la célula apical. Esta distribución diferencial resulta de la actividad de PIN7 localizada apicalmente en las células adyacentes al suspensor. En este estadio, PIN1 media la distribución uniforme de auxinas entre las células que forman el pre-embrión. Los transportadores ABCB1 y ABCB19 también contribuyen al transporte de auxinas durante la etapa temprana de la formación del pre-embrión (Mravec et al. 2008). ABCB1 está localizada en todas las células del suspensor y células pre-embriónicas, mien-

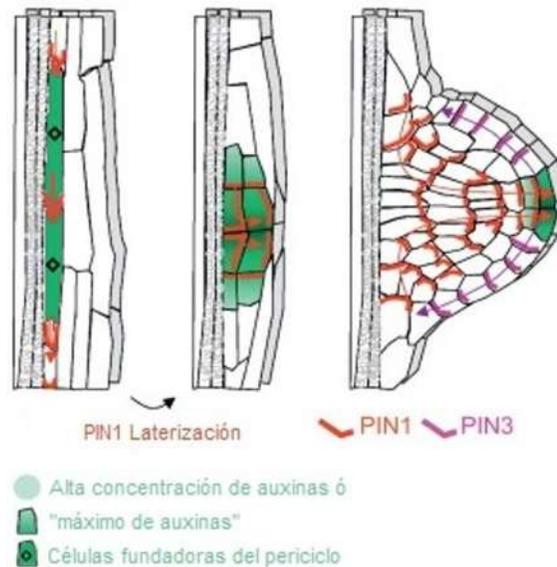


**Figura 4. Gradientes y transportadores de auxinas durante la embriogénesis.** La formación del eje axial-basal está correlacionada con el flujo y concentración de auxinas. Primero, una distribución asimétrica de PIN7 media el flujo de auxinas en la célula apical en la primera división del cigoto. Después, la auxina es drenada del embrión debido a la distribución asimétrica de PIN1 durante la fase globular. Posteriormente, el flujo de auxinas es direccionado hacia la parte superior del embrión. Por último, la polaridad reversa de PIN1 en el ápice del embrión globular define una zona carente de auxinas: el futuro meristemo apical del follaje (Petrásek y Friml, 2009).

tras que la localización de ABCB19 está restringida a las células que forman el suspensor. En el estadio globular temprano, PIN1 se relocaliza en la membrana plasmática de las células del embrión, específicamente en la hipófisis (Kleine-Vehn et al., 2008). Simultáneamente, la polaridad de PIN7 cambia de apical a basal en las células. La proteína PIN4 es expresada en la célula de la hipófisis. En este estado, la distribución y respuesta de auxinas es crucial para la especificación de la hipófisis como el precursor del meristemo de la raíz. La expresión de PIN3 comienza relativamente tarde en el estado de corazón en las células precursoras de la cofia (Möller y Weijers, 2009). En los embriones en estado triangular y de corazón, la simetría bilateral del máximo de auxinas es establecida a través de los primordios de los cotiledones, este máximo es generado por la actividad de PIN1 en la epidermis (Fig. 4) (Petrásek y Friml, 2009).

### b) Organogénesis

El desarrollo embrionario resulta del establecimiento de un plan básico corporal para el desarrollo de la plántula, pero en la planta adulta en gran medida la organogénesis post-embriónica, como la formación de hojas y flores son procesos que dependen de las auxinas. Plantas tratadas con inhibidores del transporte de auxinas o mutantes defectuosas en el transporte de auxinas como *pin1*, presentan deformidades en las inflorescencias y arquitectura floral. El transporte de auxinas dependiente de PIN juega una función importante en

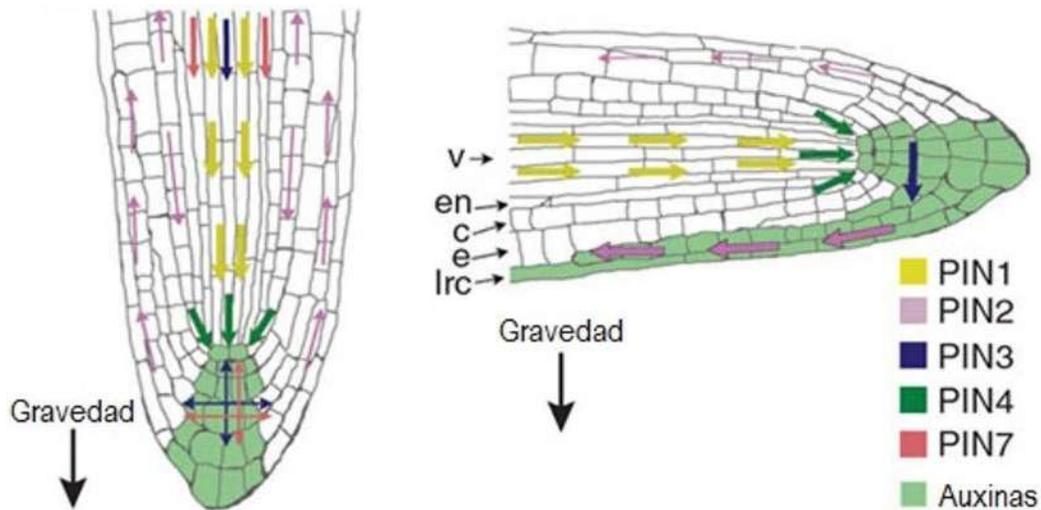


**Figura 5. Formación de raíces laterales** Las raíces laterales se originan exclusivamente en las células fundadoras del periciclo, proceso que es dependiente de la concentración y transporte de auxinas. Los transportadores que principalmente participan en la formación de raíces laterales son PIN1 y PIN3 (Finet y Jaillais 2012).

estos eventos post-embrionarios, ya que este fitoregulador es necesario para un desarrollo adecuado de las flores (Pfluger y Zambryski, 2004). Por otra parte, la acumulación local de las auxinas determina los sitios de iniciación de primordios del follaje y de la raíz (Benková et al., 2003) y la aplicación exógena de auxinas activa la formación de hojas o flores (Dubrovsky et al., 2008). PIN1 transporta más auxinas formando un máximo de auxinas temporal, que consecuentemente activará la formación de órganos, también causa una disminución temporal de auxinas alrededor de cada primordio emergente, inhibiendo la iniciación de nuevos primordios en la vecindad del primordio (Michniewicz et al., 2007). La raíz primaria usualmente se ramifica para formar raíces laterales, las cuales facilitan el anclaje y la absorción de nutrientes de la planta. Las raíces laterales se originan exclusivamente a partir de las células fundadoras del periciclo; todas las células del periciclo tienen la capacidad de dividirse en respuesta a elevados niveles de auxinas, sin embargo, solo algunas células pueden convertirse en células fundadoras (Finet y Jaillais, 2012; Takahashi, 2013) (Fig. 5). La creación y mantenimiento de un máximo de auxinas en la punta del nuevo órgano es crucial para la formación de los primordios de las raíces laterales. En los órganos aéreos, las auxinas son transportadas a través de las capas internas hacia la punta del primordio en desarrollo y en la parte interior del órgano (Michniewicz et al., 2007).

### c) Tropismos

Los tropismos son respuestas continuas del crecimiento a estímulos ambientales como la luz (fototropismo) y la gravedad (gravitropismo) que generan tasas de elongación diferencial en los órganos de la planta. La acumulación de auxinas en un lado de un órgano promueve (en follaje) o inhibe (en raíz) el crecimiento o elongación. La gravedad estimula a las raíces, mientras que la luz y la gravedad estimulan a los hipocotilos. La interrupción genética o farmacológica del transporte de auxinas inhibe la distribución asimétrica de auxinas y las respuestas trópicas de las plantas, lo que demuestra que el TPA media la distribución asimétrica de las auxinas (Esmon et al., 2006). Cuando se permite el desarrollo y crecimiento de forma vertical de la raíz, la respuesta a auxinas se incrementa en el cilindro central y en el ápice de la raíz, incluyendo la cofia. El transporte polar hacia la punta y la síntesis local de auxinas es lo que permite el establecimiento de los máximos de auxinas (Fig. 2) (Spalding, 2013). En *Arabidopsis*, PIN3 es requerido para respuestas trópicas, la mutante *pin3* es parcialmente defectuosa en el gravitropismo y fototropismo. PIN3 está localizada predominantemente en los lados laterales interiores de células endodermales del follaje, donde media la distribución lateral de las auxinas (Harrison y Masson, 2008). PIN3 parece también estar vinculada con la percepción de la gravedad. En raíces que crecen hacia abajo, la proteína PIN3 se encuentra localizada en las células de la cofia, las cuales contienen estatolitos que censan la gravedad. Durante la graviestimulación, PIN3 sigue la sedimentación de los estatolitos y rápidamente se relocaliza en la nueva parte inferior de las células de la columela (Fig. 6) (Michniewicz et al., 2007). Otros transportadores como PGP4 y PGP19, también han sido involucrados en las respuestas gravitrópicas, las mutantes *pgp19* muestran hipocotilos hi-



**Figura 6. Gravitropismo de la raíz.** La gravedad produce la relocalización de las proteínas PIN3 en la parte inferior de las células de la coifa que perciben la gravedad. El flujo de auxinas es re-direccionado a la parte inferior de la raíz donde las auxinas inhiben la elongación y causan la curvatura de la raíz (Robert y Friml, 2009).

pergravitrópicos y las mutantes *pgp4* exhiben gravitropismo reducido en la raíz (Noh et al., 2003).

## Conclusiones

El transporte polar de auxinas es crucial para el desarrollo vegetal. Además de la difusión pasiva a través del floema, existe un transporte célula a célula que requiere de proteínas transportadoras. Mientras que los transportadores PIN determinan principalmente la direccionalidad, las proteínas AUX1/LAX y ABCB controlan los niveles de auxinas. Una gran atención se ha puesto en la investigación del desarrollo de las raíces laterales y su importancia en el desarrollo vegetal, convirtiendo a las auxinas en las hormonas maestras involucradas en cada aspecto de este proceso. El uso de moléculas sintéticas, como los inhibidores del transporte de auxinas se ha convertido en una herramienta importante para elucidar estos mecanismos. Sin embargo, debido a los efectos pleiotrópicos en el sistema radicular se ha dificultado la identificación de nuevos componentes específicos en la formación de raíces laterales. Encontrar moléculas capaces de afectar la homeóstasis de auxinas en un tejido u órgano de manera específica, proporcionarían una herramienta para entender los mecanismos moleculares de la acción de las auxinas en la regulación de procesos específicos del desarrollo vegetal.

## Referencias

- Bailly A., Sovero V., Vincenzetti V., Santelia D., Bartnik D., Koenig B.W., Mancuso S., Martinoia E., Geisler M. 2008. Modulation of P-glycoproteins by auxin transport inhibitors is mediated by interaction with immunophilins. *J. Biol. Chem.* 283: 21817-21826.
- Bainbridge K., Guyomarc'h S., Bayer E., Swarup R., Bennet M., Mandel T., Kuhlemeier C. 2008. Auxin influx carriers stabilize phyllotactic patterning. *Genes Dev.* 22: 810-823.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. 2003. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 561-602.
- Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Lee O.R., Mravec J., Titapiwatanakun B., Sauer M., Makam S.N., Cheng Y., Bouchard R., Adamec J., Geisler M., Nagashima A., Sakai T., Martinoia E., Friml J., Peer W.A., Murphy A.S. 2007. Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 131-147.
- Bohn-Courseau I. 2010. Auxin: A major regulator of organogenesis. *C. R. Biol.* 333: 290-296.
- Cambridge A.P., Morris D.A. 1996. Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum*). *Planta* 99: 583-588.
- Cazonelli C.I., Vanstraelen M., Simon S., Yin K., Carron-Arthur A., Nisar N., Tarle G., Cuttriss A.J., Searle I.R., Benkova E., Mathesius U., Masle J., Friml J., Pogson B.J. 2013. Role of the *Arabidopsis* PIN6 auxin transporter in auxin homeostasis and auxin-mediated development. *PLoS One.* 8: e70069.
- Covanová M., Sauer M., Rychtár J., Friml J., Petrášek J., Zazimalová E. 2013. Overexpression of the Auxin Binding PROTEIN1 modulates PIN-dependent auxin transport in tobacco cells. *PLoS One.* 8: e70050.
- Cho M., Lee S.H., Cho H.-T. 2007. P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporter-like genes of *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *Plant Cell* 19: 3930-3943.
- Cho M., Cho H.-T. 2013. The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal. Behav.* 8: e22990.
- Dal Bosco C., Dovzhenko A., Liu X., Woerner N., Rensch T., Eismann M., Eimer S., Hegermann J., Paponov I.A., Ruperti B., Heberle-Bors E., Touraev A., Cohen J.D., Palme K. 2012a. The endoplasmic reticulum localized PIN8 is a pollen specific auxin carrier involved in intracellular auxin homeostasis. *Plant J.* 71: 860-870.
- Dal Bosco C., Dovzhenko A., Palme K. 2012b. Intracellular auxin transport in pollen: PIN8, PIN5 and PILS5. *Plant Signal. Behav.* 7: 1504-1505.
- De Smet I., Tetsumura T., De Rybel B., Frey N.F., Laplaze L., Casimiro I., Swarup R., Naudts M., Vanneste S., Audenaert D., Inzé D., Bennett M.J., Beeckman T. 2007. Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134: 681-690.

- Dharmasiri N., Dharmasiri S., Estelle M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445.
- Dhonukshe P., Anieto F., Hwang I., Robinson D.G., Mravec J., Stierhof Y.D., Friml J. 2007a. Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 17: 520-527.
- Dhonukshe P., Grigoriev I., Fisher R., Tominaga M., Robinson D., Hasek J., Paciorek T., Gaddella T.W.J., Stierhof Y., Ueda T., Oiwa K., Akhmanova A., Brock R., Spang A., Friml J. 2007b. Auxin transport inhibitors block vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 4489-4494.
- Dhonukshe P., Tanaka H., Goh T., Ebine K., Mahonen A.P., Prasad K., Blilou I., Geldner N., Xu J., Uemura T., Chory J., Ueda T., Nakano A., Scheres B., Friml J. 2008. Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 456: 962-966.
- Ding Z., Wang B., Moreno I., Dupláková N., Simon S, Carraro N., Reemmer J., Pinčík A., Chen X., Tejos R., Skůpa P., Pollmann S., Mravec J., Petrášek J., Zažímalová E., Honys D., Rolčík J., Murphy A., Orellana A., Geisler M., Friml J. 2012. ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 3: 1-9.
- Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil S., Ivancheko M.G., Friml J., Shishkova S., Celenza J., Benková E. 2008. Auxin acts as a local morphogenetic to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 8790-8794.
- Esmon C.A., Tinsley A.G., Ljung K., Sandberg G., Hearne L.B., Liscum E. 2006. A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 236-241.
- Finet C., Jaillais Y. 2012. Auxology: when auxin meets plant evo-devo. *Dev. Biol.* 369: 19-31.
- Friml J. 2010. Subcellular trafficking of PIN auxin efflux in auxin transport. *Eur. J. Cell Biol.* 89: 231-235.
- Geisler, M., Blakeslee J.J., Bouchard R., Lee E.R., Vincenzetti V., Bandyopadhyay A., Tita-piwatanakun B., Peer W. A., Bailly A., Richards E.L., Ejendal K.F.K., Smith A.P., Baroux C., Grossniklaus U., Müller A., Hrycyna C.A., Dudler R., Murphy A.S., Martinoia E. 2005. Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *Plant J.* 44: 179-194.
- Geldner N., Friml J., Stierhof Y.D., Jürgens G., Palme K. 2001. Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413: 425-428.
- Grebe M., Friml J., Swarup R., Ljung K., Sandberg G., Terlou M., Palme K., Bennett M.J., Scheres B. 2002. Cell polarity signaling in *Arabidopsis* involves a BFA-sensitive auxin influx pathway. *Curr. Biol.* 12: 329-334.

- Guo J., Wei J., Xu J., Sun M.-X. 2014. Inducible knock-down of GNOM during root formation reveals tissue-specific response to auxin transport and modulation of local auxin biosynthesis. *J. Exp. Bot.* 65: 1165-1179.
- Habets M.E.J., Offringa R. 2014. PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals. *New Phytol.* 203: 362-377.
- Hayashi K. 2012. The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant Cell Physiol.* 53: 965-975.
- Harrison B.R., Masson P.H. 2008. ARL2, ARG1 y PIN3 defines a gravity signal transduction pathway in root statocytes. *Planta* 53: 380-392.
- Hernández-Mata G., Mellado-Rojas M.E., Richards-Lewis A., López-Bucio J., Beltrán-Peña E., Soriano-Bello E.L. 2010. Plant immunity induced by oligogalacturonides alters root growth in a process involving flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Growth Regul.* 29: 441-454.
- Hichri I., Barrieu F., Bogs J., Kappel C., Delrot S., Lauvergeat V. 2011 Recent advances in the transcriptional regulation of the flavonoid biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* 62: 2465–2483.
- Imhoff V., Muller P., Guern J., Delbarre A. 2000. Inhibitors of the carrier-mediated influx of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 2105: 580–588.
- Jones A.R., Kramer E.M., Knox K., Swarup R., Bennett M.J., Lazarus C.M., Grierson C.S. 2009. Auxin transport through non - hair cells sustains root – hair development. *Nat. Cell Biol.* 11: 78-84.
- Kaneda M., Schuetz M., Lin B.S.P., Chanis C., Hamberger B., Western T.L., Ehltling J., Samuels A.L. 2011. ABC transporters coordinately expressed during lignifications of *Arabidopsis* stems include a set of ABCBs associated with auxin transport. *J. Exp. Bot.* 62: 2063-2077.
- Kang B.G., Ye X., Osburn L.D, Stewart C.N. Jr., Cheng Z.M. 2010. Transgenic hybrid aspen overexpressing the *Atwbc19* gene encoding an ATP- binding cassette transporter confers resistance to four aminoglycoside antibiotics. *Plant Cell Rep.* 29: 643-650.
- Kang J., Park H., Burla B., Kretschmar T., Lee Y., Martinoia E. 2011. Plant ABC transporters. *The Arabidopsis Book*.9: e0153.
- Kleine-Vehn J., Dhonukshe P., Sauer M., Brewer P.B., Wisniewska J., Paciorek T., Benkova E., Friml J. 2008. ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 18: 526–531.
- Kleine-Vehn J., Dhonukshe P., Swarup R., Bennett M., Friml J. 2006. A novel pathway for subcellular trafficking of AUX1 auxin influx carrier. *Plant Cell* 18: 3171-3181.
- Kleine-Vehn J., Huang F., Zhang J., Michniewicz M., Offringa R., Friml J. 2009. PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-independent trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21: 3839-3849.

- Krecek P., Skupa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J., Zazimalová E. 2009. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol.* 10: 249.
- Lewis D.R., Miller N.D., Splitt B.L., Wu G., Spalding E.P. 2007. Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporter genes. *Plant Cell* 19: 1838-1850.
- Lewis D.R., Negi S., Sukumar P., Muday G.K. 2011. Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development* 138: 3485-3495.
- Ljung K., Bhalerao R.P., Sandberg G. 2001. Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28: 465-474.
- Ljung, K., 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: 1757-1773.
- Ma Q., Robert S. 2013. Auxin biology revealed by small molecules. *Physiol. Plant.* 151: 25-42.
- Marrhavý P., Bielach A., Abas L., Abuzeineh A., Duclercq J., Tanaka H., Parezová M., Friml J., Kleine-Vehn J., Benkova E. 2011. Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev. Cell* 21: 796-804.
- Martinoia E., Grill E., Tommasini R., Kreuz K., Amrhein N. 1993. ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature* 364: 247-249.
- Michniewicz M., Brewer P.B., Friml J. 2007. Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book.* 5: 1-29.
- Möller B., Weijers D. 2009. Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* A1: a001545.
- Mravec J., Kubes M., Bielach A., Gaykova V., Petrásek J., Skupa P., Chand S., Benková E., Zazimalová E., Friml J. 2008. Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* 135: 3345-3354.
- Mravec J., Shúpa P., Baily A., Hoyerová K., Krecek P., Bielach A., Petrásek J., Zhang J., Gaykova V., Stierhof Y.-D., Dobrev P.I., 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.
- Nagashima A., Uehara Y., Sakai T. 2008. The ABC subfamily B auxin transporter AtABCB19 is involved in the inhibitory effects of N-Naphthylphthalamic acid in the phototropic and gravitropic responses of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* 49: 1250-1255.

- Noh B., Murphy A.S., Spalding E.P. 2001. Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin mediated development. *Plant Cell* 135: 2441-2454.
- Noh B., Bandyopadhyay W.A., Peer E.P., Spalding E.P., Murphy A.S. 2003. Enhanced gravi- and phototropism in plant *mdr* mutants mislocalizing the auxin efflux protein PIN1. *Nature* 423: 999-1002.
- Peer W.A., Murphy A.S. 2007. Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci.* 12: 556-563.
- Péret B., Swarup K., Ferguson A., Seth M., Yang Y., Dhondt S., James N., Casimiro I., Perry P., Syed A., Yang H., Reemmer J., Venison E., Howells C., Perez-Amador M.A., Yun J., Alonso J., Beemster G.T., Laplace L., Murphy A., Bennett M.J., Nielsen E., Swarup R. 2012. AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 24: 1-12.
- Petrásek J., Mravec J., Bouchard R., Blakeslee J.J., Abas M., Seifertová D., Wisniewska J., Tadele Z., Kubes M., Covanová M., Dhonukshe P., Skupa P., Benková E., Perry L., Krecek P., Lee O.R., Fink G.R., Geisler M., Murphy A.S., Luschning C., Zazimalová E., Friml J. 2006. PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312: 914-918.
- Petrásek J., Friml J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675-2688.
- Pfluger J., Zambryski P. 2004. The role of SEUSS in auxin response and floral organ patterning. *Development* 131: 4697-4707.
- Reinhardt D., Pesce E.-R., Stieger P., Mandel T., Baltensperger K., Bennet M., Traas J., Friml J., Kuhlemeier C. 2003. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature* 426: 255-260.
- Robert H.S., Friml J. 2009. Auxin and other signals on the move in plants. *Nat. Chem. Biol.* 5: 325-332.
- Robert S., Kleine-Vehn J., Barbez E., Sauer M., Paciorek T., Baster P., Vanneste S., Zhang J., Simon S., Covanová M., Hayashi H., Dhonukshe P., Yang Z., Bednarek S. Y., Jones A.M., Luschning C., Aniento F., Zazymalova E., Friml J. 2010. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 143: 111-121.
- Rubery P., Sheldrake A. 1974. Carrier-mediated auxin transport. *Planta* 88: 101-121.
- Ruegger M., Dewey E., Gray W.M., Hobbie L., Brown D., Bernasconi P., Turner J., Muday G., Estelle M. 1997. Reduced naphthyl phthalamic acid binding in the *tir3* mutant of *Arabidopsis* is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. *Plant Cell* 9: 745-757.
- Santelia D., Vincenzetti V., Azzarello E., Bovet L., Fukao Y., Düchtig P., Mancuso S., Martinoia E., Geisler M. 2005. MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Lett.* 579: 5399-5406.

- Sauer M., Robert S., Kleine-Vehn J. 2013. Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* 64: 2565-2577.
- Spalding E.P. 2013. Diverting the downhill flow of auxin to steer growth during tropisms. *Am. J. Bot.* 100: 203-214.
- Sun J., Chen Q., Qi L., Jiang H., Li S., Xu Y., Liu F., Zhou W., Pan J., Li X., Palme K., Li K. 2011. Jasmonate modulates endocytosis and plasma membrane accumulation of the *Arabidopsis* PIN2 protein. *New Phytol.* 191:360-375.
- Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K., Bennett M.J. 2001. Localization of the auxin permease AUX1 suggest two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* 15: 2648-2653.
- Swarup R., Kargul J., Marchant A., Zadik D., Rahman A., Mills R., Yemm A., May S., Williams L., Millner P., Tsurumi S., Moore I., Napier R., Kerr I.D., Bennett M.J. 2004. Structure-function analysis of the presumptive *Arabidopsis* auxin permease AUX1. *Plant Cell* 16: 3069-3083.
- Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Péret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M. P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J.D., Taylor C.G., Schachtman D.P., May S., Sandberg G., Benfey P., Friml J., Kerr I., Beeckman T., Laplace L., Bennett M.J. 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* 10: 946-954.
- Swarup R., Péret B. 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers- an overview. *Front. Plant Sci.* 3: 1-11.
- Takahashi H. 2013. Auxin biology in roots. *Plant Root.* 7: 49-64.
- Tanaka H., Dhonukshe P., Brewer F., Friml J. 2006. Spatio temporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 2738-2754.
- Tanaka H., Kitakura S., Rakusová H., Uemura T., Feraru M.I., Rycke R.D., Robert S., Kikimoto T., Friml J. 2013. Cell polarity and patterning by PIN trafficking through early endosomal compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 9: 1-9.
- Terasaka K., Blakeslee J.J., Titapiwatanakun B., Peer W.A., Bandyopadhyay A., Makam S.N., Lee O.R., Richards E.L., Murphy A.S., Sato F., Yazaki K. 2005. PGP4, an ATP binding cassette P-glycoprotein, catalyzes auxin transport in *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant Cell* 17: 2922-2939.
- Thompson E.P., Wilkins C., Demidchik V., Davies J.M., Glover B.J. 2010. An *Arabidopsis* flavonoid transporter is required for anther dehiscence and pollen development. *J. Exp. Bot.* 61: 439-451.
- Titapiwatanakun B., Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Yang H., Mravec J., Sauer M., Cheng Y., Adamec J., Nagashima A., Geisler M., Sakai T., Friml J., Peer W.A., Murphy A.S. 2009. ABCB19/PGP19 stabilizes PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant J.* 57: 27-44.

- Titapiwatanakun B., Murphy A.S. 2009. Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *J. Exp. Bot.* 60: 1093-1107.
- Vandenbussche F., Petrásek J., Zádňíková P., Hoyerová K., Pesek B., Raz V., Swarup R., Bennett M., Zazímalová E., Benková E., Van Der Straeten D. 2010. The auxin influx carriers AUX1 y LAX3 are involved in auxin-ethylene interactions during apical hook development in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Development* 137: 597-606.
- Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., Benková E., Benjamins R., Beeckman T., Luschnig C., Friml J. 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132: 4521-4531.
- Whitford R., Fernández A., Tejos R., Pérez A.C., Kleine-Vehn J., Vanneste S., Drozdzecki A., Leitner J., Abas L., Aerts M., Hoogewijs K., Baster P., De Groot R., Lin Y.C., Storme V, Van de Peer Y, Beeckman T, Madder A, Devreese B, Luschnig C, Friml J., Hilson P. 2012. GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Dev. Cell* 22: 678–685.
- Willige B.C., Ogiso-Tanaka E., Zourelidou M., Schwechhimer C. 2012. WAG2 represses apical hook opening downstream from gibberellin and PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 5. *Development* 139: 4020-4028.
- Wisniewska J., Xu J., Seifertová D., Brewer P.B., Ruzicka K., Blilou I., Rouquié D., Benková E., Scheres B., Friml J. 2006. Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 312: 883.
- Wu G., Lewis D.R., Spalding E.P. 2007. Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* 19: 1826-1837.
- Yang H., Murphy A.S. 2009. Functional expression and characterization of *Arabidopsis* ABCB, AUX1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant J.* 59:179-191.
- Yang Y., Hammes U.Z., Taylor C.G., Schachtman D.P., Nielsen E. 2006. High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Curr. Biol.* 16:1123-1127.
- Zazímalová E., Murphy A.S., Yang H., Hoyerová K., Hose P. 2010. Auxin transporters why so many? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2: a001552.
- Zhao Y. 2010. Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 275: 3137-3143.