

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS
LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO VEGETAL

**“Estudio de la función del transporte de auxinas y del módulo
MPK6-MKP1 en las respuestas de la raíz de *Arabidopsis thaliana* a
L-glutamato”**

TESIS

Que presenta

L.G.A. Gustavo Ravelo Ortega

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis

Doctor en Ciencias en Biotecnología de Plantas. José López

Bucio

Morelia, Michoacán, diciembre 2016

Este 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 dirección del D. C. José López Bucio.

Esta tesis la dedico a mis abuelos, Josefina y Jesús, a mi prima Sonia y a mi amigo Jesús, quienes durante mi estancia en la maestría me inspiraron a luchar sin desistir y que ahora están en una mejor vida.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia y por poner en mi camino a personas, de las cuales aprendí mucho.

A mis padres, Josefina y Daniel, por el apoyo incondicional que siempre me han dado para alcanzar mis metas y por todas sus buenas enseñanzas.

A mis hermanos, Daniel, Elizabeth y Liliana, por apoyarme aún y a distancia, y por la disponibilidad que tienen hacia mí cuando necesito de su ayuda.

A mis sobrinos, por convertir los malos momentos en horas de alegría.

A mi novia, Berenice, por ser mi motivación, por tu paciencia y por todos los ánimos que me das para poder seguir adelante sin importar el obstáculo al que me enfrente.

A mi familia en general, mis abuelos, primos y tíos, por el apoyo y ayuda que me han brindado durante todo este tiempo.

A mi asesor, el D.C. José, por darme la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo, por compartir su conocimiento y por tener el interés de ayudarme a mejorar como investigador.

A mis sinodales, D.C. Lourdes, D.C. Eduardo, D.C. Elda y D.C. Ernesto, por el tiempo que dedicaron a este trabajo para que pudiera completarse.

A mis compañeros del laboratorio, Javier, Ramón, Salvador, León, Edith, Amira, Alejandro, Marina, Viridiana, César, Guadalupe, Elizabeth, Sarahí, Juan y Pedro, por la ayuda que me brindaron durante este tiempo para que pudiera realizar este trabajo y por los buenos momentos que compartimos.

A mis amigos de la maestría, Marco, Cristian, Guadalupe, Laura y Elizabeth, por su apoyo, y por todos los momentos divertidos y agradables que compartimos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN.....	3
2 ANTECEDENTES.....	4
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
2.2 Sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
2.3 Mantenimiento del meristemo apical de la raíz	8
2.4 Reguladores de crecimiento.....	11
2.4.1 Auxinas	11
2.5 Función de las auxinas en el desarrollo radicular.....	17
2.6 Nuevos reguladores del crecimiento vegetal.....	18
2.7 Componentes de la vía de señalización en respuesta a L-glutamato	20
2.8 Vía de señalización de las MAPKs.....	22
2.9 Respuestas moduladas por MPK6-MKP1 en plantas.....	25
3 JUSTIFICACIÓN.....	26
4 HIPÓTESIS.....	26
5 OBJETIVOS.....	27
5.1 Objetivo general	27
5.2 Objetivos específicos	27
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
6.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento	27
6.2 Elaboración de cruzas.....	28
6.3 Ensayo de evaluación de la respuesta de la raíz a L-Glu	29

6.4	Análisis por microscopía.....	29
6.5	Variables analizadas	30
7	RESULTADOS	32
7.1	El L-Glu modifica la expresión de <i>DR5:GFP</i>	32
7.2	Las mutantes de la señalización de auxinas no son resistentes al efecto del L-Glu.....	33
7.3	El L-Glu disminuye drásticamente la expresión de <i>DR5:GFP</i> en <i>mkp1</i> pero no es afectada en <i>mpk6</i>	35
7.4	La síntesis de los transportadores de auxinas PIN es alterada diferencialmente por el L-Glu en Col-0, <i>mkp1</i> y <i>mpk6</i>	37
7.5	El L-Glu afecta la división celular en el meristemo apical de la raíz de Col-0 y <i>mkp1</i>	41
7.6	La expresión de los genes <i>PLT1/PLT2</i> disminuye a causa del L-Glu en la líneas Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	43
7.7	La expresión de <i>SHR</i> y <i>SCR</i> es modificada por el L-Glu diferencialmente en Col-0, <i>mkp1</i> y <i>mpk6</i>	45
7.8	El L-Glu disminuye la expresión de <i>WOX5</i> en Col-0 y <i>mkp1</i>	48
8	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	50
9	REFERENCIAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura celular de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i>	7
Figura 2. Factores de transcripción que participan en el mantenimiento del meristemo radicular	10
Figura 3. Procesos del ciclo biológico de <i>A. thaliana</i> controlados por auxinas.....	12
Figura 4. Rutas propuestas para la biosíntesis de AIA.....	13
Figura 5. Hipótesis quimiosmótica del transporte polar de auxinas.....	15
Figura 6. Actividad y dominios de expresión de los transportadores PIN.....	16
Figura 7. Modelo de la vía de la señalización de auxinas	17
Figura 8. Efecto del L-Glu sobre el sistema radicular de <i>A. thaliana</i>	20
Figura 9. Identificación de proteínas involucradas en la señalización dependiente de L-Glu	21
Figura 10. Respuesta de las mutantes <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i> de <i>A. thaliana</i> a L-Glu	22
Figura 11. Vías de señalización de MAPKs.....	25
Figura 12. Respuestas a factores bióticos y abióticos reguladas por MPK6-MKP1.	26
Figura 13. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>DR5:uidA</i> y <i>DR5:GFP</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
Figura 14. Efecto del L-Glu en las mutantes de la vía de señalización de auxinas.	34
Figura 15. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>DR5:GFP</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	36
Figura 16. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>PIN1::PIN1::GFP</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	38
Figura 17. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>PIN2::PIN2::GFP</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	39
Figura 18. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>PIN7::PIN7::GFP</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	40
Figura 19. Cinética del efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>CYCB1:uidA</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	42

Figura 20. Cinética del efecto del L-Glu sobre el tamaño de la zona meristemática y de la zona de elongación de Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	43
Figura 21. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>PLT1:CFP</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	44
Figura 22. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>PLT2:CFP</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	45
Figura 23. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>SHR:GFP</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	46
Figura 24. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>SCR::HB2::YFP</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	48
Figura 25. Efecto del L-Glu sobre la expresión de <i>WOX5:GFP</i> en los fondos genéticos Col-0, <i>mpk6</i> y <i>mkp1</i>	49
Figura 26. Modelo propuesto para la participación de MPK6-MKP1 en señalización del L-Glu y las posibles vías afectadas en este proceso que alteran el mantenimiento del meristemo radicular.....	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nivel de disminución de la expresión de los genes reporteros en respuesta a 400 μ M de L-Glu.....	55
--	----

ABREVIACIONES

ABC - ATP-BINDING CASSETTE

ARF - AUXIN RESPONSE FACTOR

AUX/IAA - AUXIN/INDOLE ACETIC ACID

BUD1 - BUSHY DWARF 1

CDF4 - CYCLING DOF FACTOR 4

CDKB1 – CYCD 6;1–CYCLIN DEPENDENT KINASE B1

CFP - CYAN FLUORESCENT PROTEIN

CI - CÉLULAS INICIALES

CIC - CÉLULAS INICIALES DE LA COLUMELA

CICE - CÉLULAS INICIALES DEL CÓRTEX Y ENDODERMIS

CQ - CENTRO QUIESCENTE

FT - FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

GFP - GREEN FLUORESCENT PROTEIN

GLR3.3 - GLUTAMATE LIKE GLUTAMATE 3.3 (GLR3.3)

GRB2 - GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2

HDA19 - HISTONE DEACETYLASE 19

JKD - JACKDAW

MAP65 - MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN 65

MAPK - MAP CINASA

MAPKK - MAP CINASA CINASA

MAPKKK - MAP CINASA CINASA CINASA

MAPKs - MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES

MGP - MAGPIE

MKP - MAP KINASE PHOSPHATASE

MR - MERISTEMO RADICULAR

NUT - NUTCRACKER

PHB - PHABULOSE

PIN - PIN-FORMED

PLT - PLETHORA

PMAP - PATRON MOLECULAR ASOCIADO A PATÓGENO

PRL - PRIMORDIO DE RAÍZ LATERAL

RAF - RAPIDLY ACCELERATED FIBROSARCOMA

RBR - RETINOBLASTOMA-RELATED

RL - RAÍZ LATERAL

SCF - SKP1-CUL1-F-BOX

SCR - SCARECROW

SHR - SHORT ROOT

SIEL - SHORT-ROOT INTERACTING EMBRYONIC LETHAL

SOS - SON OF SEVENLESS

TIR1/AFB - TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX
PROTEIN

TPL - TOPLESS

TPR - TOPLESS-RELATED

TWD1 - TWISTED DWARF1

WOX5 - WUSCHEL-RELATED HOMEBOX5

YDA - YODA

YFP - YELLOW FLUORESCENT PROTEIN

RESUMEN

Existen varios factores de origen biótico o abiótico que alteran el desarrollo radicular. Entre los bióticos se encuentran los microorganismos que pueden interactuar con la raíz mediante la secreción de distintas moléculas bioactivas como aminoácidos, péptidos y fitohormonas. Se ha reportado que el aminoácido L-glutamato (L-Glu) reprime el crecimiento de la raíz primaria y promueve el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*), similar al efecto causado por las auxinas. Estudios previos indican que la vía de señalización del L-Glu involucra la participación de la proteína MEKK1, la cual pertenece a las proteínas cinasas activadas por mitógeno, mejor conocidas por sus siglas en inglés como MAPKs. Adicionalmente, se ha propuesto que MPK6, una MAPK y su regulador negativo, la fosfatasa MKP1, actúan en la vía de señalización del L-Glu. En este trabajo, demostramos que la señalización del L-Glu modulada por MPK6-MKP1, converge con la vía de las auxinas para regular la actividad meristemática y programas del desarrollo de las raíces. También, observamos cambios producidos por el L-Glu en los niveles de proteínas transportadoras de auxinas y de los reguladores del nicho de células iniciales, sugiriendo un papel importante del L-Glu sobre la remodelación de la arquitectura radicular.

Palabras clave: L-Glutamato, auxinas, cinasas, raíz, actividad meristemática.

ABSTRACT

There are several biotic or abiotic factors that alter plant development. Among the biotic factors, microorganisms can interact with roots by secreting distinct several bioactive molecules such as amino acids, peptides and phytohormones. It has been reported that the amino acid L-glutamate (L-Glu) represses the primary root growth and promotes lateral roots development in *Arabidopsis thaliana*, effects similar to those caused by auxins. The components of L-Glu signaling pathway involve the participation of the MEKK1 protein, which belongs to the group of Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs). Previous studies from our group suggest the involvement of MPK6, a MAPK, and its negative regulator, the MKP1 phosphatase, to act on the signaling pathway of L-Glu. In this study, we demonstrate that L-Glu signaling targets the auxin pathway to modulate meristematic activity and root developmental programs. Besides, we observe changes produced by the L-Glu in the levels of auxin transport proteins and regulators of the root stem cell niche, which suggest an important role of L-Glu in root architecture remodeling.

Key words: L-Glutamate, auxins, kinases, root, meristematic activity.

1 INTRODUCCIÓN

El sistema radicular es el órgano de las plantas que hace frente a la interacción con los diversos microorganismos que se encuentran en el suelo. Los microorganismos pueden tener un efecto positivo o negativo sobre el desarrollo vegetal al regular la arquitectura de la raíz mediante la secreción de diferentes moléculas (Padje *et al.*, 2016). La raíz percibe las moléculas que se encuentran en el suelo mediante receptores que generalmente se localizan en la membrana de las células del ápice radicular (Filleur *et al.*, 2005). Cuando una molécula señal es percibida, se desencadena una cascada de señalización que involucra distintas proteínas y que finaliza con la regulación de la expresión de genes encargados de modificar los procesos del desarrollo o de controlar la producción de moléculas que median la interacción con el medio (Xu *et al.*, 2015).

Algunas de las vías de señalización son reguladas por el grupo de proteínas conocidas como MAPKs, que desencadenan una serie de fosforilaciones a diferentes substratos proteínicos. Los módulos de la vía MAPKs requieren al menos tres componentes: la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK), la MAP cinasa cinasa (MAPKK) y la MAP cinasa (MAPK). La MAPK que es la última en la cascada de señalización regula la actividad de una proteína blanco, que comúnmente es un factor de transcripción (Ichimura *et al.*, 2002). Actualmente se sabe que las vías de señalización de MAPKs modulan respuestas dependientes de factores bióticos o abióticos y algunas se relacionan con los procesos del desarrollo radicular (Tena *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2015).

En *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) el L-glutamato (L-Glu) que se suministra de manera exógena al medio, disminuye el crecimiento de la raíz primaria y promueve el desarrollo de las raíces laterales, posiblemente mediante su interacción con receptores ubicados en la cofia y que corriente abajo estimulan una MAPKKK denominada MEKK1 (Forde *et al.*, 2013; Walch-Liu *et al.*, 2006). Sin embargo, se desconoce cuáles son los mecanismos que regulan este efecto y que procesos celulares son controlados por la señalización del L-Glu y la posible participación de otras MAPKs en estos programas de morfogénesis.

2 ANTECEDENTES

2.1 *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia *Brassicaceae*, descubierta en el siglo XVI por Johannes Thal en Alemania; es endémica de Europa, Asia central y del noroeste de África. Desde la década de 1980, *A. thaliana* es el organismo que se utiliza más ampliamente en investigaciones sobre biología molecular y desarrollo en plantas (Toloti *et al.*, 2015).

Arabidopsis forma una pequeña roseta de aproximadamente 5 cm de diámetro en su etapa vegetativa, a partir de la cual crecen los tallos florales que miden en promedio 30 cm de altura y producen los frutos denominados silicuas que contienen alrededor de 50 semillas. El ciclo de vida de *A. thaliana* desde la germinación hasta la senescencia se completa en 8 semanas. Esta planta se distribuye en las regiones templadas de Europa, Asia, el Norte de África, Norte América y Australia y en su hábitat natural crece en suelos bien drenados y ricos en materia orgánica (Anderson y Wilson, 2000; Weigel y Glazebrook, 2002).

La primera referencia sobre *A. thaliana* en la literatura botánica es un artículo de Alexander Braun (1873), que describe una variante genética con flores aberrantes (probablemente alterada en el gen *AGAMOUS*) encontrada en un campo cerca de Berlín. Los trabajos pioneros de Friedrich Laibach demostraron la facilidad para realizar cruces y la posibilidad de mutagénesis y sobre esta base se propuso la adopción de *A. thaliana* como un organismo modelo en la investigación genética de plantas. Los resultados detallados de Laibach sobre mutagénesis utilizando rayos X condujeron a la primera colección de mutantes, que se publicaron en la tesis de doctorado de Erna Reinholz (Laibach, 1943; Reinholz, 1947). Laibach y sus estudiantes continuaron recopilando una amplia variedad de ecotipos, que posteriormente fueron organizados por Albert Kranz (Kranz y Kirchheim, 1987).

Existen diversos reportes sobre la identificación de mutantes en las décadas 1950-1970, que describen los métodos de mutagénesis, así como del uso de la planta para estudios experimentales y de genética cuantitativa. La adopción generalizada de *A. thaliana* como modelo en investigación ocurrió en las últimas dos décadas,

revolucionando con ello, la genética, fisiología, biología celular y el desarrollo de plantas. Lo que determinó el uso de *A. thaliana* sobre otras especies silvestres o cultivadas no es del todo claro, aunque se destacan las siguientes características: 1) facilidad para su cultivo en condiciones de laboratorio, 2) disponibilidad de protocolos de mutagénesis y métodos de selección de mutantes, 3) genoma pequeño, de 5 cromosomas entre los que se incluyen alrededor de 25, 000 genes, la mayoría de copia única, y 4) la posibilidad de transformar esta planta con DNA exógeno (Sussman *et al.*, 2000). Las características antes mencionadas permitieron el uso de *Arabidopsis* en laboratorios de Universidades y centros de investigación debido a que puede cultivarse fácilmente en cámaras de crecimiento.

En México diferentes grupos empezaron a utilizar *A. thaliana* en la década de 1990-2000, destacando el reporte de una de las primeras mutantes afectadas en la percepción del etileno, que condujeron a la posterior clonación de genes importantes en una de las rutas de transducción de señales canónicas y ubicuas en las plantas (Guzmán y Ecker, 1990). Actualmente y a partir de la secuenciación del genoma completo, se dispone de diversas colecciones de mutantes por inserciones dirigidas a genes específicos, lo que posibilita la aplicación de técnicas de “genética reversa” en la identificación de los genes y la caracterización de sus funciones (Lukowitz *et al.*, 2000).

La colección más grande del mundo de variantes genéticas de distintas procedencias se encuentra en el *Arabidopsis Biological Research Center* (ABRC), con sede en la Michigan State University (Ohio, Estados Unidos). La información sobre esta colección puede consultarse en la dirección de internet <http://arabidopsis.org>, la página inicial de *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR), donde se ingresa a todos los bancos de datos y pueden solicitarse mutantes afectadas en casi cualquier gen de interés (Koorneeff y Meinke, 2010). Otra colección importante de mutantes es la del *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASc), con sede en el Reino Unido (<http://nasc.nott.ac.uk>).

2.2 Sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*

La raíz es la parte de la planta que está anclada al suelo y tiene tres funciones principales: explorar el sustrato para crecer (ya sea en profundidad o distribuirse en las capas más superficiales del suelo) y extraer de ese sustrato los nutrientes y el agua que requiere la planta (Raya-González *et al.*, 2012; 2014). En *Arabidopsis*, a diferencia de lo que sucede con otros modelos vegetales, el desarrollo del sistema radicular es relativamente fácil de estudiar debido a que: 1) el meristemo apical de la raíz es accesible y no está encapsulado por órganos o primordios en su desarrollo, 2) la raíz no presenta pigmentos y por lo tanto es esencialmente transparente, 3) está formada por pocos tejidos diferenciados, 4) la morfogénesis de la raíz ocurre de manera continua y 5) las filas de células que la conforman son fáciles de observar en el microscopio.

La raíz primaria es la de mayor longitud y continúa creciendo durante todo el ciclo de vida, lo que se conoce como “crecimiento indeterminado”. La manera como el ambiente modula el programa genético y afecta las características morfológicas es importante en la configuración de la arquitectura de la raíz, e incluye aspectos de estructura, forma y función (Raya-González *et al.*, 2012; Pelagio-Flores *et al.*, 2013). Las raíces de *A. thaliana* presentan cuatro zonas distintas con actividades particulares de crecimiento (**Fig. 1A**). La zona meristemática (ZM) es la más cercana con el límite de las células de la columela, mide alrededor de 200 μm y se caracteriza por tener células con alta actividad mitótica, de esta manera ayuda a regenerar los distintos tipos de células que conforman a la raíz. Enseguida la zona de transición (ZT) abarca 320 μm , y ahí las células comienzan a crecer lentamente tanto en amplitud como en longitud para posteriormente alargarse de manera rápida en la zona de elongación (ZE), la cual mide unos 330 μm . Finalmente en la zona de diferenciación (ZD) de 650 μm de longitud y la más distal a la columela, las células dejan de crecer para alcanzar un estado maduro, y solo algunas células epidérmicas (tricoblastos) continúan su crecimiento para desarrollarse como pelos radiculares (Verbelen *et al.*, 2006).

La raíz primaria se desarrolla en el extremo basal del embrión durante la germinación, en tanto que las raíces laterales surgen de la capa interna de la raíz primaria denominada periciclo (Scheres *et al.*, 1996). Tanto la raíz primaria como las raíces laterales están conformadas por distintos tipos de capas celulares: la más externa es la epidermis, después el córtex y la endodermis (**Fig. 1A**). Estas tres capas conforman un arreglo de cilindros concéntricos que rodean el periciclo y los haces vasculares. Además, la cofia y la columela son capas celulares que rodean a la epidermis únicamente en la punta de la raíz para protegerla de la fricción durante su proceso exploratorio del suelo.

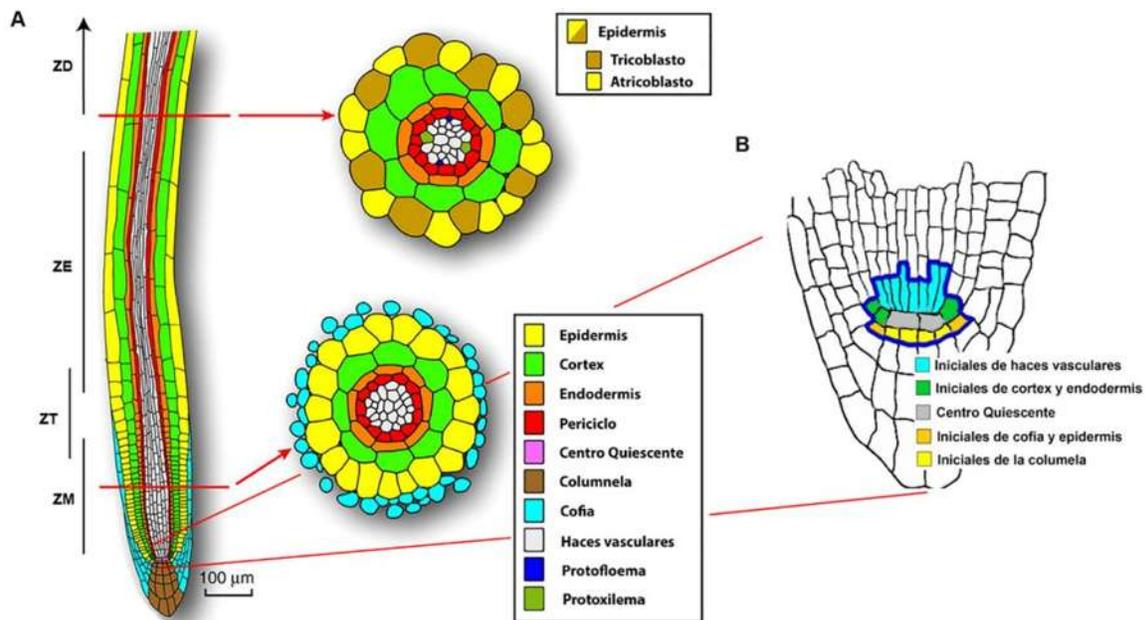


Figura 1. Esquema de la estructura celular de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. (A) Cortes longitudinales y transversales de la raíz que muestran las diferentes zonas y tejidos que la conforman. Zona Meristemática (ZM), la cual presenta una alta actividad mitótica. Zona de Transición (ZT), en donde las células comienzan a crecer lentamente tanto en longitud como en amplitud. Zona de Elongación (ZE), en la cual las células crecen rápidamente. Zona de diferenciación (ZD), en donde las células crecen lentamente y son diferenciadas en estructuras como los pelos radiculares. Los cortes transversales de la raíz en la ZE muestran su organización circunferencial y radial. La posición de las filas celulares de los tricoblastos y atricoblastos es indicada. (B) Nicho de células iniciales. Corte transversal de la parte apical de la raíz donde se puede observar la organización de las células iniciales a partir de las cuales se forman todos los tejidos de la raíz. Modificado de Overvoorde *et al.* (2010).

Todos los tejidos de la raíz surgen a partir de un conjunto de células que se encuentran en el ápice, denominadas Células Iniciales (CI) (**Fig. 1B**). Las CI se mantienen en un estado indiferenciado mediante eventos de señalización

provenientes de un grupo pequeño de células con poca actividad mitótica, a las cuales se les conoce como Centro Quiescente (CQ) (Cederholm *et al.*, 2012).

2.3 Mantenimiento del meristemo apical de la raíz

Existe un grupo de Factores de Transcripción (FT) que mantienen la identidad del Meristemo Radicular (MR). El gen *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5* (*WOX5*) se expresa en las células del CQ y codifica para un FT que conserva el estado indiferenciado de las CI que rodean al CQ. Se sabe que *WOX5* migra del CQ a las Células Iniciales de la Columela (CIC) para reclutar a los co-represores TOPLESS/TOPLESS-RELATED (TPL/TPR) y la HISTONE DEACETYLASE 19 (HDA19), y así evita la expresión del gen *CYCLING DOF FACTOR 4* (*CDF4*), un FT que permite la diferenciación de la columela al mantener un gradiente de expresión opuesto al CQ (**Fig. 2A**). También se ha reportado que *WOX5* reprime la expresión de *CYCD3*, evitando así la división celular para conservar la identidad del CQ (Drisch *et al.*, 2015; Petricka *et al.*, 2012; Pi *et al.*, 2015).

SHORT ROOT (SHR) es un FT que se expresa en las células de los haces vasculares y en éstas se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo. Se ha propuesto que vía plasmodesmos y con ayuda de SHORT-ROOT INTERACTING EMBRYONIC LETHAL (SIEL), SHR migra al núcleo de las células del CQ, de la endodermis y de las Células Iniciales del Córtex y Endodermis (CICE), donde se ha reportado que interacciona con el FT SCARECROW (SCR) (**Fig. 2B**) (Long *et al.*, 2015). Las mutantes *shr* y *scr* desarrollan una raíz pequeña, pierden drásticamente parte de los tejidos que envuelven a los haces vasculares y en el CQ ocurren divisiones ectópicas, lo que los convierte en reguladores importantes en el desarrollo del patrón radial de la raíz y del mantenimiento de la actividad meristemática. En el CQ el complejo SHR-SCR promueven la expresión de *WOX5* y en las CICE de *CYCD6*, el cual activa una serie de divisiones asimétricas que posteriormente darán lugar al córtex y a la endodermis (Petricka *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2007).

En la endodermis el complejo SHR-SCR activa la expresión de los *microRNA165/6*, los cuales regresarán a las células de los haces vasculares para

reprimir al FT PHABULOSE (PHB). PHB reprime a un regulador del movimiento de SHR, que es JACKDAW (JKD). JKD delimita a SHR en las zonas de interacción con SCR para que no regrese a las células vasculares. La expresión de *MAGPIE* (*MGP*) gen homólogo de *JKD*, está controlada por SHR-SCR y actualmente se estudia la posible participación de MGP sobre el control del movimiento de SHR, debido a que MGP contrarresta los efectos de JKD. Existe también una retroalimentación de la señal con SCR-SHR, *CYCD6* y la proteína RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR). Ésta última al unirse a SCR forma un complejo ternario inactivo: SHR-SCR-RBR. La expresión de *CYCD6;1* que es también inducida por SHR-SCR, permite la inactivación de RBR mediante la fosforilación realizada por el complejo *CYCD6;1*-CYCLIN DEPENDENT KINASE B1 (CDKB1), lo que permite que SHR-SCR quede libre y activo. La transcripción de otro FT denominado *NUTCRACKER* (*NUT*) también depende de SHR-SCR (Long *et al.*, 2015).

Se ha reportado una familia de FT denominados PLETHORA (*PLT*) que se expresan en el tejido vascular y con mayor nivel de expresión en el nicho de células iniciales del meristemo apical de la raíz. El gradiente de expresión de *PLT* se va perdiendo hacia la zona más diferenciada del ápice de la raíz. En la doble mutante *plt1plt2*, la expresión de *WOX5* se extiende fuera del CQ y el efecto opuesto ocurre en las mutantes *shr* y *scr*. Se ha reportado que en las líneas *plt1plt2* se presentan defectos en el patrón de división celular y en la proliferación celular, lo que sugiere que las proteínas *PLT* funcionan manteniendo la actividad mitótica del nicho de células iniciales y también están involucradas en un mecanismo paralelo al del complejo SHR-SCR que mantiene la identidad del CQ (Cederholm *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2007).

Weijers *et al.* (2006), reportaron que la expresión de genes *PLT* depende de la señalización de las auxinas, al observar que el dominio de expresión de la línea reportera de respuesta a auxinas *DR5:GFP*, es similar al dominio de los genes *PLT*, concentrando su máximo en el nicho de CI. Además, la localización de SHR y SCR se extiende por la misma zona en la que se encuentra la expresión de *PLT1/2* y *DR5:GFP* (**Fig. 2C**). Debido a este encuentro se ha sugerido que existe

una posible relación entre las auxinas y la vía de SHR-SCR (Cederholm *et al.*, 2012).

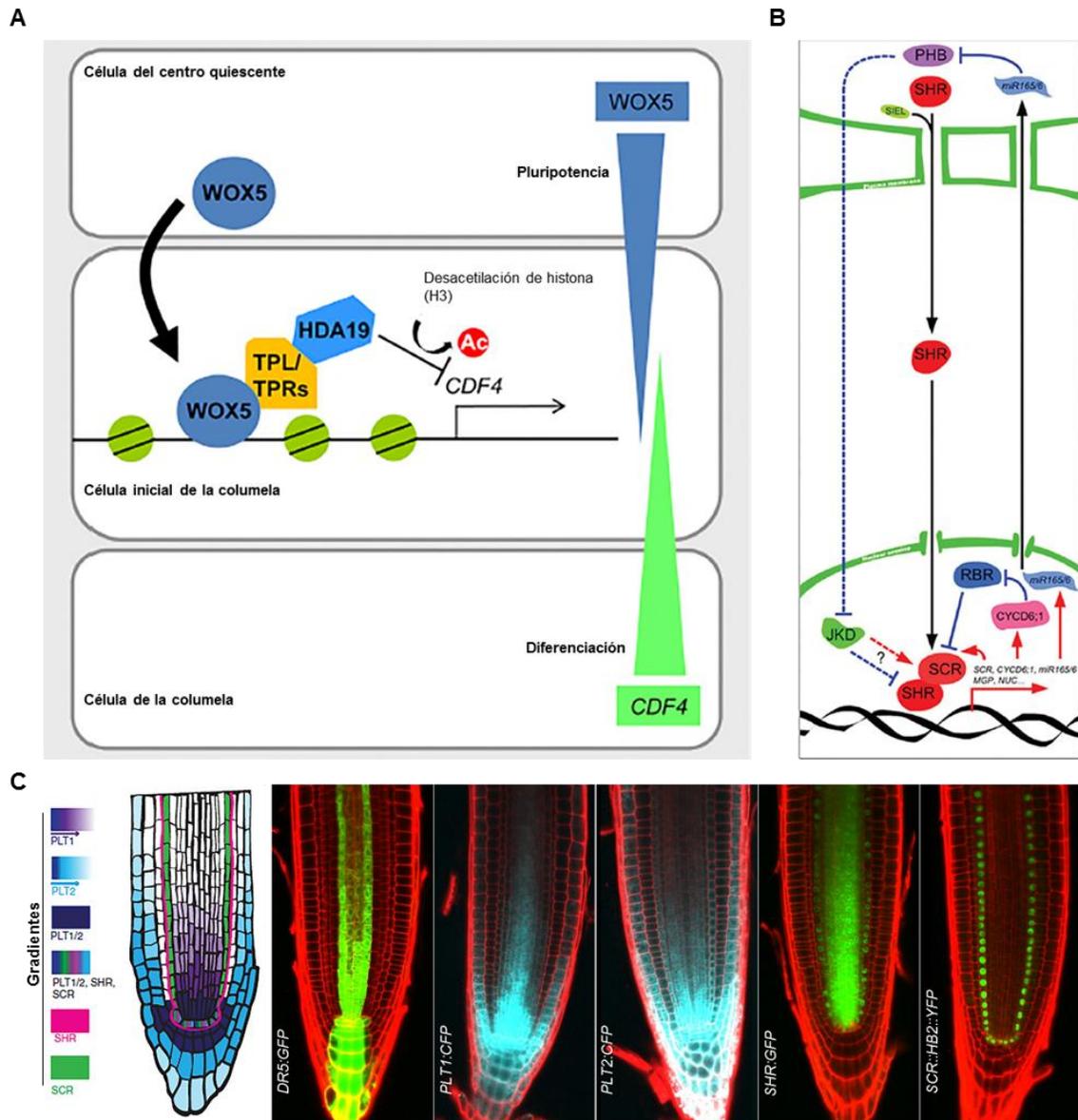


Figura 2. Factores de transcripción que participan en el mantenimiento del meristemo radicular. (A) Modelo de la represión transcripcional por WOX5 para mantener las células iniciales de la columela indiferenciadas. (B) Vía de señalización del complejo SHR-SCR que controla el desarrollo del cortex y endodermis. (C) Esquema de la colocalización de los gradientes de expresión de *PLT1/PLT2*, *SHR* y *SCR*. Se muestran fotos de las líneas reporteras de respuesta a auxinas, *DR5::GFP*, *PLT1::CFP*, *PLT2::CFP*, *SHR::GFP*, *SCR::HB2::GFP*, para señalar que comparten dominios de expresión similares que los relacionan funcionalmente. Modificado de Cederholm *et al.*, 2012; Long *et al.*, 2015; Pi *et al.*, 2015.

2.4 Reguladores de crecimiento

El crecimiento, desarrollo y defensa de las plantas son coordinados por un grupo de moléculas sintetizadas por la planta denominadas reguladores de crecimiento o fitohormonas. Los grupos de reguladores de crecimiento que se descubrieron primero y los más estudiados fueron las auxinas, citocininas, giberelinas, el etileno y ácido abscísico. Recientemente se han identificado más reguladores de crecimiento como los brasinosteroides, el ácido jasmónico, ácido salicílico, estrigolactonas, óxido nítrico y algunos péptidos (Shan *et al.*, 2012).

2.4.1 Auxinas

Las auxinas son un grupo de reguladores de crecimiento al que se le atribuye su participación en la mayoría de los procesos de desarrollo de la planta (**Fig. 3**). Estas moléculas intervienen en la reproducción, embriogénesis, elongación del hipocótilo, crecimiento de la raíz primaria, formación de raíces laterales y pelos radiculares, además de regular las respuestas a tropismos dependientes de la luz y la gravedad. Las auxinas son sintetizadas en las hojas jóvenes y en el meristemo apical de la raíz (Gray *et al.*, 1998; Vanneste *et al.*, 2009).

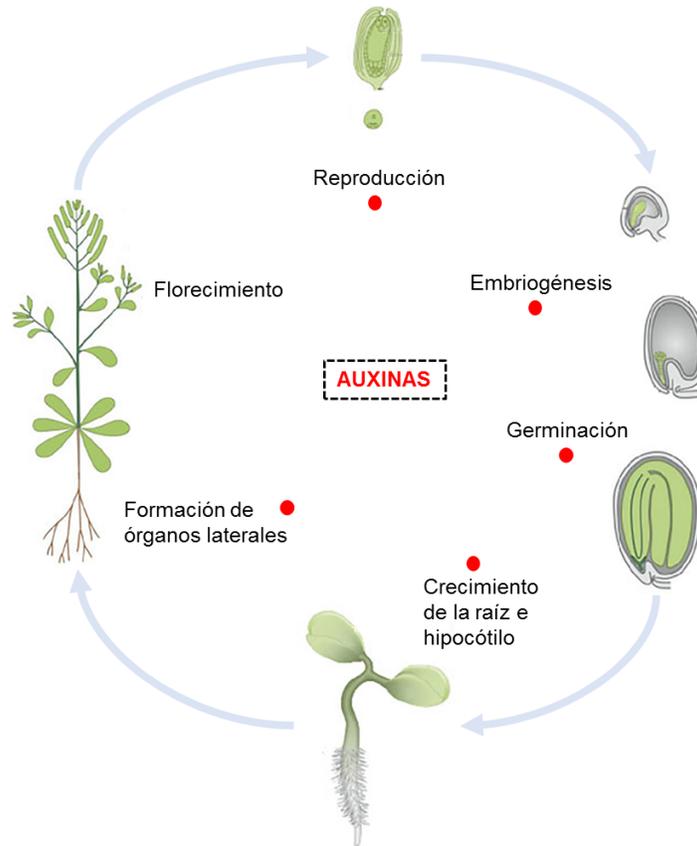


Figura 3. Procesos del ciclo biológico de *A. thaliana* controlados por auxinas. Con puntos rojos se señalan los procesos de desarrollo en donde participan las auxinas. Elaborado con información de Gray *et al.* (1998) y Vanneste *et al.* (2009).

La primera auxina descubierta fue el Ácido Indol Acético (AIA) y hasta al momento se han propuesto dos vías para su síntesis: la independiente y la dependiente del L-Triptófano (L-Trp) (**Fig. 4**). El L-Trp es derivado de la vía del corismato y ambos precursores de este aminoácido (el indol-3-glicerol fosfato y el indol) participan en la producción de AIA independiente del L-Trp, aunque se desconocen las enzimas involucradas en estas vías. Los precursores del AIA en la vía dependiente del Trp son el indol-3-acetaldoxima (IAOx), indol-3-acetamida (IAM), ácido indol-3-piruvico (IPA) y la triptamina (TAM). La ruta del AIA a partir de IAM, al parecer era específica de bacterias, debido a que no existían evidencias que lo relacionaran con plantas. Sin embargo, se ha logrado detectar IAM en varias especies vegetales, lo que plantea la controversia sobre la ubicuidad en plantas. Además, se ha descrito el gen *AMI1* de *A. thaliana* y *N. tabacum*, el cual codifica para una

hidrolasa que convierte el IAM a AIA. Se ha señalado que la vía de IAM parece ser la principalmente usada por fitopatógenos, mientras la vía de IPA ha sido encontrada en especies de rizobacterias promotoras del crecimiento. En bacterias el precursor IPA es convertido a indol-3-acetaldehído (IAD) por la indol-3-piruvato descarboxilasa y después mediante la indol-3-acetaldehido oxidasa convierte el IAD a AIA (Mano *et al.*, 2012).

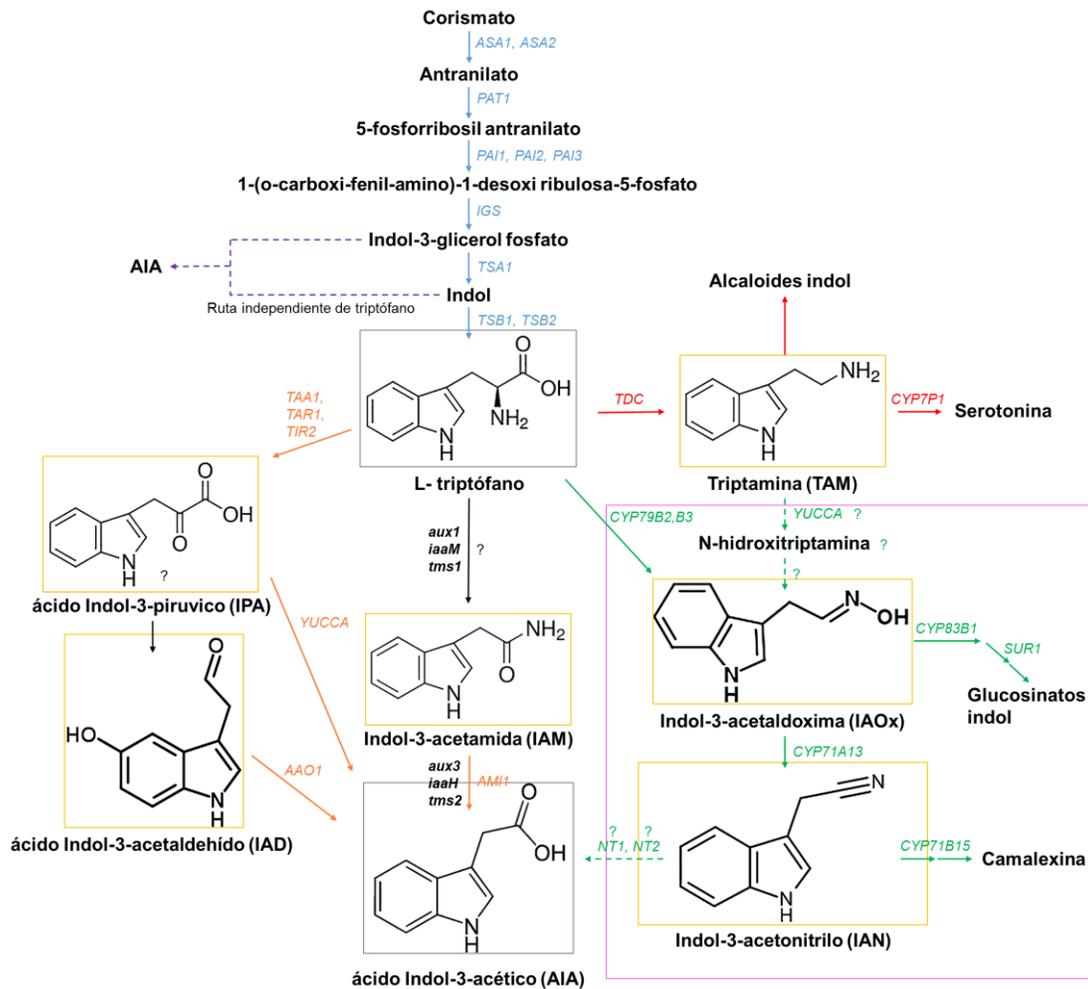


Figura 4. Rutas propuestas para la biosíntesis de AIA. En líneas azules se señala la síntesis del L-triptófano (L-Trp) en el cloroplasto. La línea morada interrumpida indica la vía independiente del L-Trp para la síntesis de AIA. Las líneas naranjas muestran los pasos donde se conocen los genes y la función enzimática para la síntesis de AIA dependiente del L-Trp. En líneas rojas se esquematiza la ruta biosintética de la serotonina y de los alcaloides indol a partir del L-Trp. Las líneas verdes indican la ruta biosintética del AIA utilizada específicamente en las especies de la familia *Brassicaceae*. Las líneas negras muestran los pasos donde aún se desconocen los genes y funciones enzimáticas que participan. Las líneas verdes interrumpidas señalan los pasos donde los genes y funciones enzimáticas son escasamente entendidas. Las letras minúsculas en cursiva son genes bacterianos. ASA1/2, antranilato sintasa. PAT1, antranilato fosforribosiltransferasa. PAI1/2/3, 5-fosforribosilantranilato isomerasa. IGS, indol-3-glicerol fosfato sintasa. TSA1/TSB1/2, triptófano sintasa. *aux1/iaaM/tms1*, triptófano-2-monooxigenasa. *aux3/iaaH/tms2/AM1*, indol-3-acetamida hidrolasa. TAA1/TAR1/TIR2, triptófano aminotransferasa. CYP79B2/3, triptófano N-hidroxilasa.

CYP71A13/CYP83B1/CYP71B15, monooxigenasa. *SUR*, liasa de alquiltiohidroxamato. *YUCCA*, flavina monooxigenasa. *AAO1*, aldehído oxidasa. *TDC*, triptófano descarboxilasa. *NT1/2*, nitrilasa. Modificado de Mano *et al.* (2012).

En plantas se desconoce si el IPA es convertido a IAD, o la identidad de las proteínas involucradas en esa conversión. Hasta la fecha solo se ha encontrado IPA en *A. thaliana* y en *Pisum sativum*. Otros compuestos son generados de precursores de AIA, como es el caso de la TAM que es intermediario en la producción de alcaloides indol y de serotonina. Por otra parte, a partir del IAOx se generan glucosinolatos indol. Ambos precursores, IAOx y TAM, son utilizados por las plantas que pertenecen a la familia Brassicaceae para la producción de AIA (Mano *et al.*, 2012). Los niveles de AIA pueden disminuir mediante la degradación de AIA a 2-oxoindol-3-acético y también el AIA puede conjugarse con aminoácidos y azúcares para permanecer inactivo (Schaller *et al.*, 2015).

Las auxinas son distribuidas a las distintas partes de la planta por dos tipos de transporte: uno rápido y no direccional, donde el floema se utiliza como conducto para movilizar a las auxinas hacia los tejidos demandantes. El otro tipo de transporte es direccional, efectuándose polarmente de célula a célula con la ayuda de proteínas transportadoras de eflujo o influjo. El Transporte Polar de Auxinas (TPA) está basado en la teoría quimiosmótica del AIA, la cual propone que el AIA es un ácido débil con un pKa de 4.75, lo que le permite adquirir dos formas químicas dependiendo del pH del ambiente: una protonada (AIAH) a pH ácido y otra aniónica (AIA⁻) a pH neutro (**Fig. 5**). El pH en la pared celular es de 5.5, por tal razón aproximadamente el 15% del AIA está en forma protonada y puede difundirse 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, así que su transporte requiere de proteínas transportadoras para el influjo y eflujo de auxinas (Vanneste *et al.*, 2009).

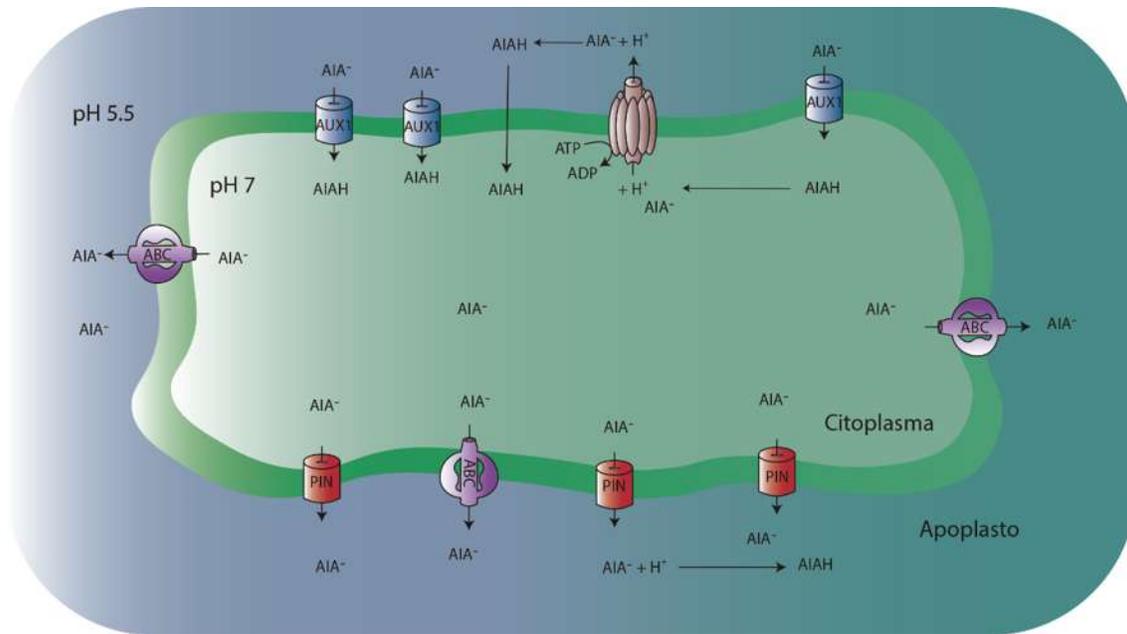


Figura 5. Hipótesis quimiosmótica del transporte polar de auxinas. Mediante ATPasas de H⁺ localizadas en la membrana plasmática se mantiene un pH bajo en el apoplasto, el cual favorece a que el AIA⁻ sea protonado (AIAH) para difundir libremente por la membrana hacia el interior de la célula. Además de la difusión pasiva, la auxina es también transportada hacia el citoplasma por las proteínas de influjo AUX1. En el citoplasma el pH neutro disocia al AIAH a AIA⁻ e impide su salida, y para ser expulsado al apoplasto requiere de los transportadores de eflujo PIN y ABC. Elaborado con información de Vanneste *et al.* (2009).

La función de las proteínas AUX1 se descubrió mediante el análisis molecular de la mutante *aux1*, la cual presentó resistencia a la movilización de auxinas hacia el interior de la célula. Estos resultados sugirieron que AUX1 participa en el influjo de auxinas. Por otra parte, para mediar el eflujo de auxinas se han reportado dos grupos de transportadores: las proteínas ATP-Binding Cassette (ABC) y el grupo de los PIN-FORMED (PIN). Los transportadores ABC fueron descubiertos al ser desactivados funcionalmente por el ácido naftilftalámico (NPA) y los flavonoides, los cuales la interacción entre las proteínas ABC y la proteína FKBP42 TWISTED DWARF1 (TWD1). En *A. thaliana* se han identificado ocho secuencias *PIN*, y fenotipos de mutantes en los primeros dos genes *PIN* analizados, indicaron su función de transportadores polares de auxinas en la regulación de los procesos del desarrollo de la raíz y en respuestas al gravitropismo (**Fig. 6**) (Adamowski y Friml, 2015; Vanneste *et al.*, 2009).

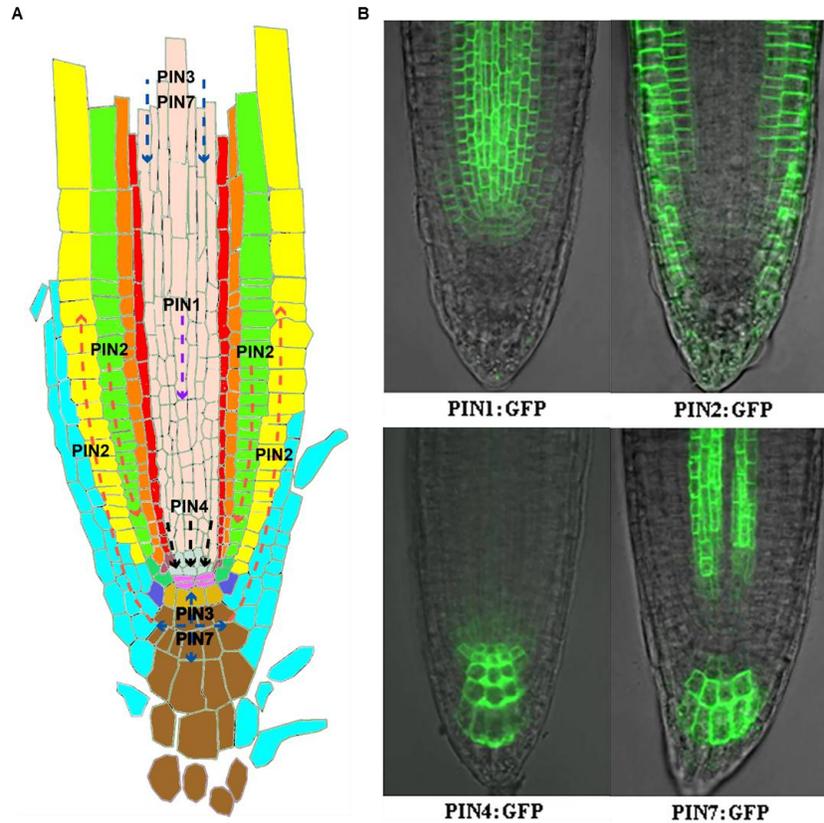


Figura 6. Actividad y dominios de expresión de los transportadores PIN. (A) Flujo de auxinas mediado por transportadores PIN en el meristemo apical de la raíz. Las líneas azules indican el dominio de expresión de PIN3 y PIN7 (haces vasculares y columela). La línea morada muestra los dominios de expresión de PIN1 (haces vasculares). Las líneas negras muestran los dominios de expresión de PIN4 (centro quiescente y columela). Las líneas naranjas indican los dominios de expresión de PIN2 (córtez y endodermis). (B) Expresión basal de las líneas reporteras PIN1, PIN2, PIN4 y PIN7 fusionadas a GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP). Modificado de Jaillais y Chory (2010).

Cuatro transportadores PIN son expresados durante el estado embrionario (PIN1, PIN3, PIN4 y PIN7). Posteriormente, durante la etapa de plántula PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 y PIN7 se expresan en tejidos diferentes del ápice de la raíz (cortex, endodermis, haces vasculares, columela y CQ) para mantener la actividad meristemática, promover programas de organogénesis y controlar respuestas de gravitropismo mediante la regulación de un reflujo constante de auxinas (Adamowski y Friml, 2015; Vanneste *et al.*, 2009).

La vía de señalización de las auxinas y sus respuestas fisiológicas se describen a continuación: Cuando existe una concentración baja de auxinas dentro de la célula, los represores de la familia AUXIN/INDOLE ACETIC ACID (AUX/IAA) se

encuentran unidos a los factores de transcripción AUXIN RESPONSE FACTORS (ARFs), bloqueando la transcripción de genes de respuesta a auxinas (**Fig. 7**). Durante este proceso los represores AUX/IAA reclutan a los co-represores TOPLESS (TPL) y TOPLESS RELATED (TPR), los cuales impiden la actividad transcripcional mediante el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDACs). Al elevarse la cantidad de auxinas, estas moléculas son reconocidas por las proteínas de la familia TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEINS (TIR1/AFBs), promoviendo su unión con el represor AUX/IAA. Posteriormente, TIR1 recluta a SKP1–Cul1–F-box (SCF), una ligasa tipo E3, formándose el complejo SCF^{TIR1/AFB} que desencadenará la ubiquitinación del represor AUX/IAA para que pueda ser degradado mediante el proteosoma 26S (**Fig. 7**). Una vez que la proteína AUX/IAA es degradada, los ARFs son liberados para promover la transcripción de los genes de respuesta a auxinas (Schaller *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014).

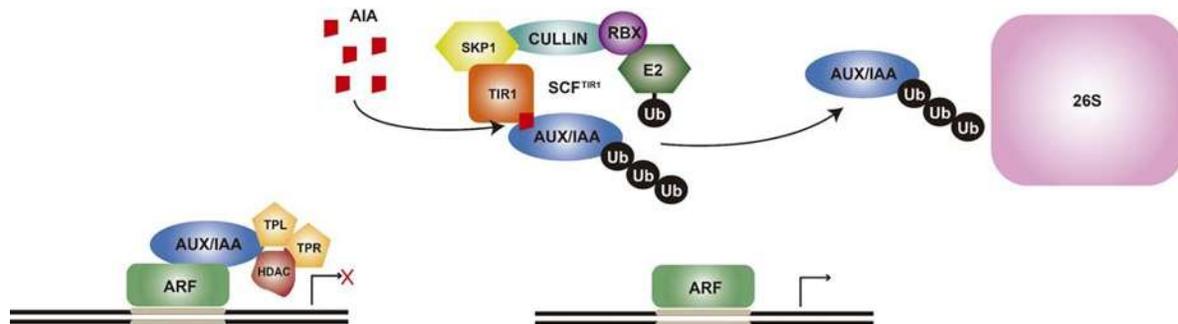


Figura 7. Modelo de la vía de la señalización de auxinas. Cuando el nivel de auxinas es bajo, la proteína AUX/IAA con la ayuda de TPL, TPR y HDAC mantiene reprimida la función de los ARF para evitar la transcripción de los genes de respuesta a auxinas. Al aumentar el nivel de auxinas se favorece la formación del complejo SCF^{TIR1}, el cual realizará la ubiquitinación del represor AUX/IAA para que sea degradado vía el proteosoma 26S. Elaborado con información de Schaller *et al.* (2015) y Wang *et al.* (2014).

2.5 Función de las auxinas en el desarrollo radicular

Las auxinas controlan varios procesos de desarrollo por su distribución diferencial entre las células de un tejido. Cuando las auxinas se acumulan en una sola célula o en un grupo pequeño de células, esto se denomina máximo de auxinas, pero si la zona donde se acumulan las auxinas es más grande y forma una concentración gradual, se denomina gradiente de auxinas. Sin embargo, estos tipos de

acumulaciones de auxinas pueden darse a partir de la síntesis de auxinas en tejidos específicos o mediante su redireccionamiento por las proteínas transportadoras (Vanneste *et al.*, 2009).

Las auxinas son necesarias desde la etapa temprana de la embriogénesis para definir el cuerpo apical y basal de la planta. Posteriormente, la parte basal del embrión se dividirá para formar las células de la hipófisis y del suspensor. La célula de la hipófisis dará lugar al CQ y al meristemo apical de la raíz. Durante todos estos procesos de división y diferenciación celular se produce un proceso de máximos de auxinas regulados por los transportadores PIN (Cederholm *et al.*, 2012).

La acumulación de auxinas en células del periciclo promueve divisiones asimétricas para iniciar el desarrollo del Primordio de Raíz Lateral (PRL). Una vez formado el PRL las auxinas son transportadas por PIN3 a la punta, generando división y el crecimiento celular. De esta manera el PRL atravesará la endodermis, córtex y epidermis para emerger como una Raíz Lateral (RL) madura. Una vez que el meristemo de la raíz primaria o laterales es funcional, se forma un gradiente de auxinas con una concentración máxima en el CQ que mantiene la actividad del nicho de células iniciales (Tian *et al.*, 2014; Vilches-Barro *et al.*, 2015).

2.6 Nuevos reguladores del crecimiento vegetal

Además de los reguladores de crecimiento que son sintetizados por las plantas, existen otras moléculas que se encuentran conservadas entre organismos de los diferentes reinos y que tienen un efecto sobre la arquitectura del sistema radicular. La serotonina, que en mamíferos funciona como neurotransmisor, fue aplicada en dosis bajas (10-160 μM) de manera exógena a la raíz de *A. thaliana*, provocando un aumento en el número de raíces laterales sin modificar el crecimiento de raíz primaria. Mientras que a concentraciones más altas (300-600 μM) se reprimió el desarrollo de la raíz primaria, raíces laterales y pelos radiculares y se promovió el desarrollo de raíces adventicias. A concentraciones altas de serotonina, se evaluaron las líneas transgénicas de respuesta a auxinas *DR5:uidA* y *BA3:uidA*, y en ambas líneas fue reprimida la expresión del gene reportero. Estos datos

sugieren que la serotonina funciona como un represor natural de la señalización de auxinas, alterando negativamente programas del desarrollo radicular (Pelagio-Flores *et al.*, 2011). Pelagio-Flores *et al.* (2012), también evaluaron la respuesta de *A. thaliana* a la melatonina, una hormona de animales que regula el sueño, estado anímico, fisiología de la reproducción, ritmos circadianos y funciona como antioxidante. Los autores observaron que la melatonina modula la arquitectura del sistema radicular de *A. thaliana*, promoviendo el desarrollo de raíces laterales y manteniendo el crecimiento normal de la raíz primaria. Al analizar el efecto de la melatonina sobre las líneas *DR5:uidA* y *BA3:uidA* se observó que la expresión de los genes reporteros, lo que sugiere que el efecto regulatorio de la melatonina sobre la arquitectura de la raíz es independiente a la señalización de auxinas.

El aminoácido L-glutamato al igual que la serotonina, funciona como neurotransmisor en mamíferos, y al ser aplicado de manera exógena a *A. thaliana* se observó que se comporta como una molécula señal que modifica la arquitectura de la raíz. Walch-Liu *et al.*, (2006) analizaron los cambios que provoca el L-Glu sobre la arquitectura radicular de *A. thaliana*, observando que este aminoácido inhibe el crecimiento de la raíz primaria y promueve el desarrollo de raíces laterales (**Fig. 8A-E**). Para evaluar si el L-Glu pudiera ser tomado por la planta como una fuente de nitrógeno se comparó su efecto con su isómero el D-Glu, el cual no tuvo efecto sobre la raíz (**Fig. 8B**). Para estos experimentos fue utilizado el ecotipo C24 de *A. thaliana*, que fue más sensible al L-Glu, registrando una respuesta máxima a la concentración de 100 μ M de L-Glu (**Fig. 8C**). Además, mediante la aplicación localizada de L-Glu en distintas zonas de la raíz, pudieron discernir que el L-Glu era percibido por la punta de la raíz primaria (**Fig. 8D-E**). También evaluaron la actividad meristemática de la raíz ante el efecto del L-Glu y concluyeron que las células del meristemo dejan de dividirse, implicando a dicho aminoácido en una acción directa sobre la mitosis.

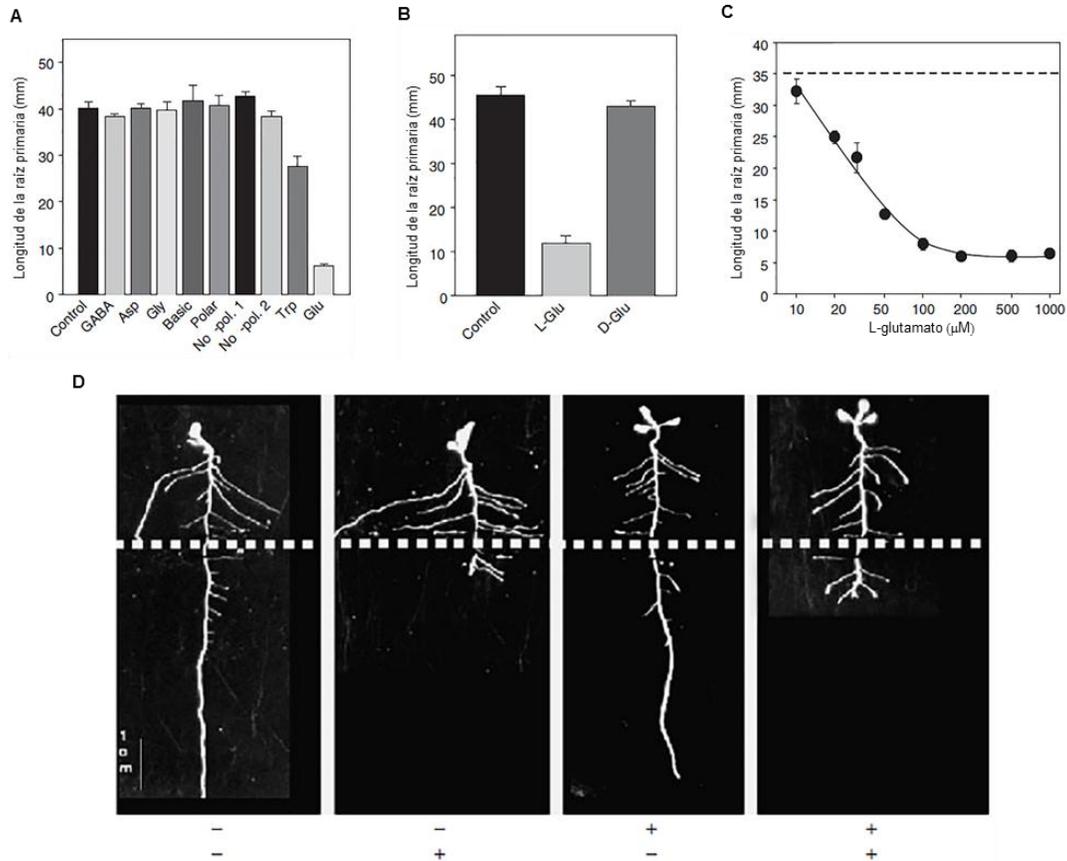


Figura 8. Efecto del L-glutamato sobre el sistema radicular de *A. thaliana*. (A) Efecto de diferentes aminoácidos sobre el crecimiento de la raíz primaria. (B) Efecto del L-glutamato y D-glutamato. (C) Efecto de varias concentraciones de L-glutamato sobre el crecimiento de la raíz primaria de *A. thaliana*. (D) Fotos representativas con la aplicación (+) o ausencia (-) del L-glutamato en el segmento superior o inferior de la raíz indicado por la línea punteada. Tomado de Walch-Liu *et al.* (2006).

2.7 Componentes de la vía de señalización en respuesta a L-glutamato

Existe poca información de los componentes involucrados en la señalización del L-Glu al ser percibido por la raíz. Se han identificado en *A. thaliana* 20 genes que codifican para receptores ionotrópicos (permiten el paso de iones) de L-Glu, homólogos a los reportados en mamíferos, en algunos de ellos se analizó el efecto del L-Glu y su relación sobre la actividad del calcio en las células. Hasta el momento, se ha demostrado que el L-Glu causa un incremento en el calcio citosólico y una despolarización de la membrana. También en una línea mutante del gen *GLUTAMATE LIKE GLUTAMATE 3.3 (GLR3.3)*, el cual codifica para uno de los 20 receptores de L-Glu en *A. thaliana*, se observó un decremento significativo en la despolarización de la membrana y un bloqueo del incremento del

calcio citosólico causada por el L-Glu, lo que sugirió la participación de GLR3.3 como receptor del L-Glu (Lam *et al.*, 1998; Qi *et al.*, 2006).

A partir de un escrutinio de 1500 moléculas bioactivas en *Saccharomyces cerevisiae* se identificaron dos compuestos, el 2-(4-cloro-3-metilfenil)-2-oxoetil tiocianato (CMOT) y 1-(2,6 dimetilfenil)-2,5-dihidro-1H-pirrol-5, diona (DDPD), que inhibieron la respuesta del L-Glu sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana* (**Fig. 9A**). Además se observó que CMOT actúa sobre STE11, una proteína MAPKKK. Posteriormente, se realizaron mutaciones sobre los alelos de *MEKK*, que codifica en plantas para la cinasa homóloga de STE11, y pudieron observar que la mutación confería resistencia al efecto del L-Glu, mientras que la complementación de la mutante con *MEKK1* restauraba el fenotipo silvestre ante el efecto del L-Glu (**Fig. 9B**). Los experimentos antes mencionados demostraron que *MEKK1* participa en la vía de señalización dependiente del L-Glu (Forde *et al.*, 2013).

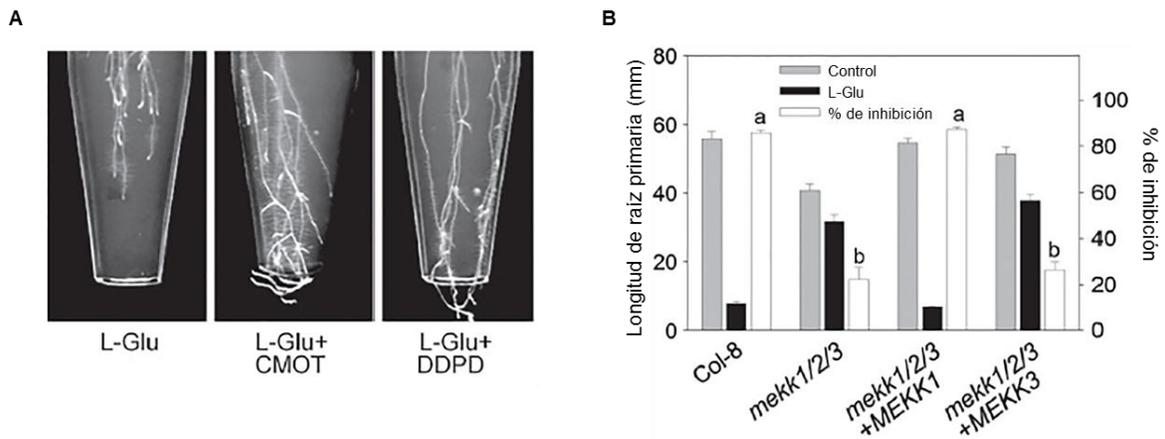


Figura 9. Identificación de proteínas involucradas en la señalización dependiente de L-Glu. (A) Efecto de las moléculas inhibitoras de la respuesta del L-Glu sobre la arquitectura de la raíz. (B) Longitud de la raíz primaria de mutantes de *A. thaliana* en alelos de *MEKK1*. Tomado de Forde *et al.* (2013).

En estudios previos de nuestro grupo, se evaluó a la MAPK, MPK6, y a la fosfatasa MKP1 (regulador negativo de MPK6), ante el efecto del L-Glu utilizando las líneas mutantes *mpk6* y *mcp1*. Se observó que la mutante *mpk6* mostró resistencia al efecto del L-Glu, manteniendo un crecimiento normal en la raíz primaria. Por otro lado, la mutante *mcp1* fue hipersensible, y presentó una mayor

inhibición en el crecimiento de la raíz primaria (**Fig. 10**). Estos datos sugieren que el módulo MPK6-MKP1 controla la señalización dependiente del L-Glu en *A. thaliana* (López-Bucio, J.S. Com. Per., 2016).

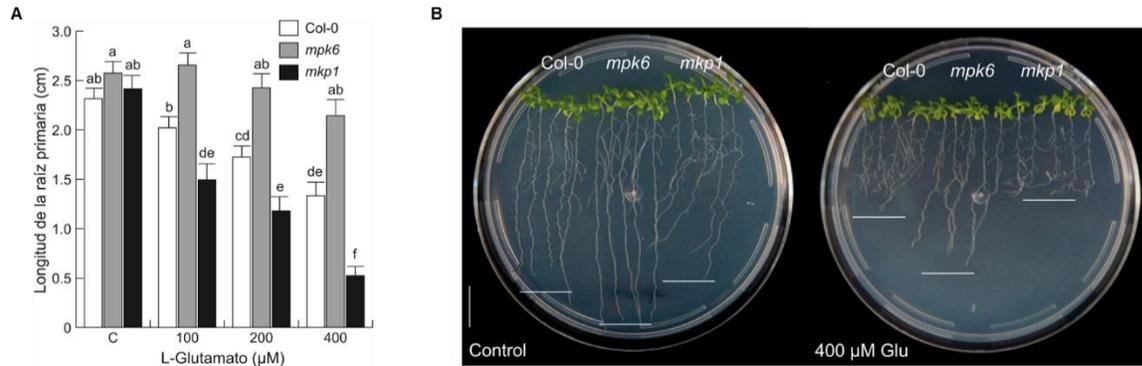


Figura 10. Respuesta de las mutantes *mpk6* y *mpk1* de *A. thaliana* a L-Glu. Semillas Col-0, *mpk6* y *mpk1* fueron sembradas en medio MS con diferentes concentraciones de L-Glu. (A) Longitud de la raíz primaria. (B) Fotos representativas de la respuesta de Col-0, *mpk6* y *mpk1* en medio de cultivo control y con L-Glu (400 μM). Tomado de López-Bucio, J.S. Com. Per., 2016.

2.8 Vía de señalización de las MAPKs

La vía de las MAPKs se basa en una serie de fosforilaciones en las que participan diferentes proteína cinasas conservadas entre eucariontes. Esta cascada de señalización inicia cuando un receptor membranal es estimulado y activa directa o indirectamente por fosforilación a la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK), la cual corriente abajo fosforila a la MAP cinasa cinasa (MAPKK) y ésta finalmente activa fosforilando a la MAP cinasa (MAPK) (**Fig. 11A**). La MAPK puede fosforilar a varias proteínas blanco: cinasas, enzimas o factores de transcripción. La activación de la MAPK puede ser regulada negativamente mediante fosfatasa, denominadas en inglés como MAP Kinase Phosphatases (MPKs) (Xu *et al.*, 2015). El término de MAPKs por primera vez fue utilizado para describir a una proteína cinasa identificada en mamíferos, llamada ERK o pp44, la cual es estimulada por varios mitógenos: el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, forbol-12-miristato-13-acetato, la trombina y la insulina (Rossomando *et al.*, 1989). La vía de señalización estimulada por mitógenos ya se encuentra elucidada (**Fig. 11B**). Esta vía inicia con la unión del mitógeno al receptor cinasa que se autofosforila para reclutar el complejo proteínico

compuesto por GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2 (GRB2) y SON OF SEVENLESS (SOS). GRB2-SOS intercambian el guanosín difosfato (GDP) que se encuentra unido a la guanosina trifosfatasa (RAS), por un guanosín trifosfato (GTP). El complejo RAS-GTP activa a la MAPKKK, RAPIDLY ACCELERATED FIBROSARCOMA (RAF), que conducirá a los eventos de fosforilaciones secuenciales de MEK (MAPKK) y ERK (MAPK). Finalmente, ERK fosforila a factores de transcripción que permiten la expresión de varios genes como los *MYC*. El gen *MYC1* codifica para una proteína que aumenta la actividad de las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), lo que promueve la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S. También la respuesta génica a estos mitógenos regula negativamente a ERK por la síntesis de la fosfatasa MPK (Long *et al.*, 2015; Pearson *et al.*, 2001).

En la actualidad numerosas investigaciones han demostrado el papel esencial de las MAPKs en respuesta a diversos estímulos ambientales en levaduras, mamíferos y plantas. Las primeras investigaciones de MAPKs en plantas se relacionaron con respuestas a inductores provenientes de bacterias y hongos, y también a algunos factores ambientales como la temperatura, humedad, salinidad y estrés oxidativo (Tena *et al.*, 2001). Además, se conoce que la vía de las MAPKs regula procesos del desarrollo embrionario, radicular, foliar y floral (Xu *et al.*, 2015). Se ha descrito la participación de YODA (YDA), una MAPKKK, actuando corriente arriba de MPK6 para controlar los planos de división celular en la raíz mediante la regulación de MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN 65 (MAP65) (**Fig. 11C**), la cual ayuda a estabilizar a los microtúbulos antiparalelos del huso mitótico central durante el paso de anafase a telofase. Tanto las mutantes *yda* y *mpk6* presentaron patrones alterados de división en la epidermis, tejidos internos y en el nicho de células iniciales de la raíz (Müller J. *et al.*, 2009; Smékalová *et al.*, 2014). A partir de ensayos de fosforilación se determinó que MPK6 es capaz de fosforilar a MAP65. Además, en *yda* y en la sobreexpresante $\Delta Nyda1$ se realizaron ensayos de inmunodetección por fosfoetiquetado, utilizando extractos de la raíz para identificar a MAP65 en su forma fosforilada. Los niveles que se encontraron en *yda* y en la planta silvestre fueron moderados, pero en la mutante $\Delta Nyda1$

fueron significativamente altos (Smékalová *et al.*, 2014). Estos últimos experimentos evidenciaron a MAP65 corriente abajo del módulo YDA-MPK6 en la regulación de la división celular en la raíz.

MAP3Kε1 y *MAP3Kε2* son genes que codifican para dos MAPKKK, sus transcritos fueron localizados en la raíz y la función de ambas proteínas se ha relacionado con el crecimiento radicular (**Fig. 11C**), debido a que en la doble mutante se redujo la expansión celular y presentó un fenotipo con una raíz mucho más corta que la planta silvestre (Chaiwongsar *et al.*, 2012).

Por otra parte en *A. thaliana* se aisló la mutante *bushy dwarf 1 (bud1)*, que fue identificada como una MAPKK. La expresión disminuida de *BUD1* en *A. thaliana*, aumentó el transporte de auxinas y el número de raíces laterales. Un resultado contrario se observó en la sobreexpresión de *BUD1*, sugiriendo que esta cinasa es un regulador negativo de transportadores de auxinas que causa la represión del desarrollo de raíces laterales (**Fig. 11C**) (Dai *et al.*, 2006).

Hasta el momento, solo algunas MAPKs han sido involucradas en la modulación de los procesos celulares que determinan el desarrollo radicular, sin embargo, se sigue investigando la posible participación de otros componentes de la vía MAPKs que pudieran complementar a estas vías de señalización (Xu *et al.*, 2015).

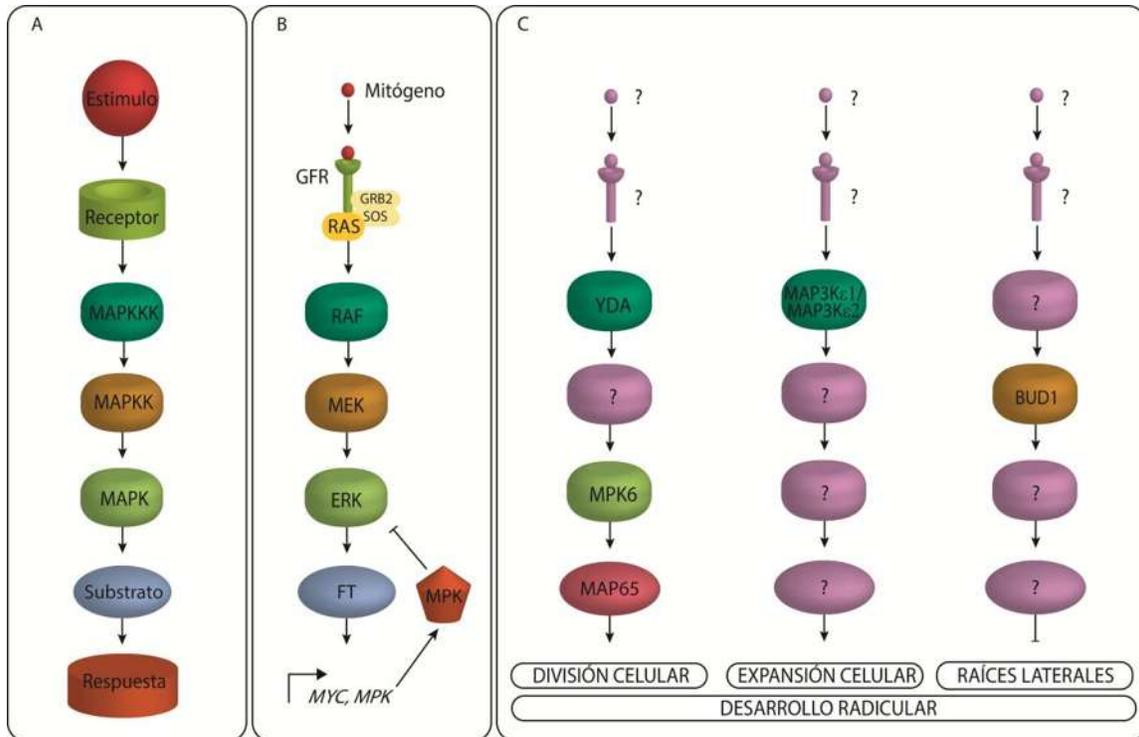


Figura 11. Vías de señalización de MAPKs. (A) Esquema general de las vías de señalización MAPKs. (B) Vía de señalización de MAPKs estimulada por mitógenos en mamíferos. (C) Vía de señalización de MAPKs implicadas en el desarrollo radicular. Elaborado con información de Chaiwongsar *et al.*, 2012; Dai *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2015; Müller J. *et al.*, 2009; Pearson *et al.*, 2001; Smékalová *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015.

2.9 Respuestas moduladas por MPK6-MKP1 en plantas

Se ha documentado que la MAPK, MPK6, es activada por estrés genotóxico como la exposición a la luz ultravioleta de onda corta (UV-C). Además se ha demostrado que la actividad de MPK6 ante este tipo de estrés está regulada por la fosfatasa MKP1 (**Fig. 12A**) (Ulm *et al.*, 2002).

El módulo MPK6-MKP1 también participa en las respuestas desencadenadas por moléculas denominadas Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PMAPs), reconocidas por receptores membranales que activan sistemas de defensa. Se eligió al PMAP, elf22, un péptido conservado del factor de elongación bacteriano (EF-Tu), para observar su efecto en plantas *mkp1* y tipo silvestre. Posteriormente, se realizó la inmunodetección con anti-fosfo ERK ½ (anti-pT-E-pY) de algunas MAPK activadas a partir de los extractos obtenidos de las plantas *mkp1* y silvestres, las cuales previamente fueron tratadas y no tratadas con elf22. En los

resultados de este experimento se observó que en plantas tratadas con elf22 se incrementó rápidamente la activación de MPK6 y MPK3 (**Fig. 12B**). Lo que sugiere la participación de MKP1 en la regulación negativa de MPK6 y MPK3 durante las respuestas a PMAPs (Anderson *et al.*, 2011).

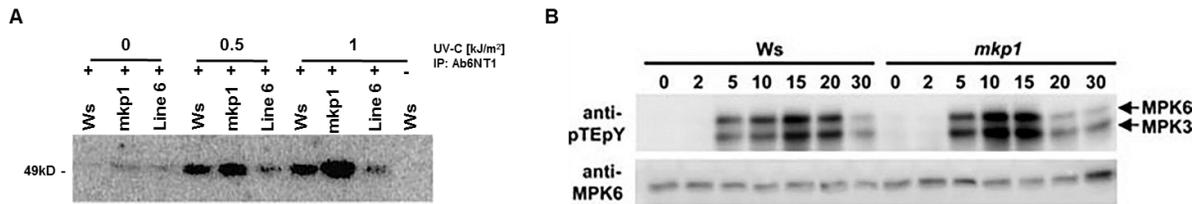


Figura 12. Respuestas a factores bióticos y abióticos reguladas por MPK6-MKP1. (A) La actividad cinasa de MPK6 en respuesta a la luz ultra violeta de onda corta (UV-C) está determinada por MKP1. Inmunoprecipitado de MPK6 por Ab6NT1 después de la irradiación con luz UV-C en plantas silvestre, la mutante *mkp1* y la sobreexpresante de MKP1, line 6. (B) La activación de MAPK estimulada por el PMAP fls22 es potenciada en plantas *mkp1*. Las plantas fueron tratadas con y sin 1 μ M de elf26 durante los tiempos indicados en la parte superior. Las proteínas extraídas de hojas tratadas, fueron separadas por SDS-PAGE y la inmunodetección fue realizada usando el anticuerpo α -pTEpY o el α -MPK6. Tomado de Anderson *et al.* (2011).

3 JUSTIFICACIÓN

El L-glutamato induce cambios en el sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*, modulando el crecimiento de la raíz primaria y promoviendo la formación de raíces laterales. Estos cambios son similares a los provocados por las auxinas. Recientemente, se mostró que MEKK1, una MAPKKK, está involucrada en la respuesta a L-glutamato. Sin embargo, se desconoce la mayor parte de los componentes asociados a la respuesta del L-glutamato y su interacción con las diferentes vías hormonales para modular dichos procesos. Por lo tanto, es importante determinar si el módulo MPK6-MKP1 y la señalización de las auxinas participan en regular los diferentes procesos del desarrollo mediados por L-glutamato en *Arabidopsis thaliana*.

4 HIPÓTESIS

El L-glutamato regula el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*, a través del módulo MPK6-MKP1 y de la señalización de auxinas.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Determinar la participación del módulo MPK6-MKP1 y de la señalización de las auxinas en la regulación del desarrollo de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* en respuesta a L-glutamato.

5.2 Objetivos específicos

- Estudiar la participación de la señalización de auxinas en la respuesta a L-glutamato.
- Evaluar la participación del módulo MPK6-MKP1 sobre la expresión de los transportadores de auxinas en respuesta a L-glutamato.
- Determinar la participación del módulo MPK6-MKP1 en la actividad mitótica del meristemo de la raíz primaria afectada por el L-glutamato en *Arabidopsis thaliana*.
- Analizar la expresión de genes asociados a la identidad celular meristemática en respuesta a L-glutamato.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

En este trabajo se utilizaron semillas silvestres de *A. thaliana* (ecotipo Col-0), de las mutantes *mpk6-2* (Liu *et al.*, 2004), *mkp1* (Ulm *et al.*, 2002), *tir1afb2afb3* (Parry *et al.*, 2009) *axr1-3* (Lincoln *et al.*, 1990), *arf7-1/arf19-1* (Wilmoth *et al.*, 2005), *axr2-1* (Timpote *et al.*, 1994), *slr1* (Fukaki *et al.*, 2002), *aux1-7* (Pickett *et al.*, 1990), *eir1-1* (Roman *et al.*, 1995), y de las líneas transgénicas *DR5:GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003), *DR5:uidA* (Ulmasov *et al.*, 1997), *PIN1::PIN1::GFP* (Benková *et al.*, 2003), *PIN2::PIN2::GFP* (Xu *et al.*, 2005), *PIN7::PIN7::GFP*, *CycB1:uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *WOX5:GFP* (Ding *et al.*, 2010), *SCR::H2B::YFP* (Reyes-Hernández *et al.*, 2013), *SHR:GFP* (Helariuta *et al.*, 2000), *PLT1:CFP* (Galinha *et al.*, 2007) y *PLT2:CFP* (Galinha *et al.*, 2007). Además se movilizaron mediante

cruzas todos los genes reporteros antes mencionados a las mutantes *mpk6-2* (Liu *et al.*, 2004) y *mkp1* (Ulm *et al.*, 2002).

Para mantener condiciones asépticas, las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) durante 5 minutos y cloro al 20% (v/v) por 5 minutos. Posteriormente, se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril y se incubaron por 48 horas a 5°C. Las semillas fueron germinadas y crecidas en cajas de Petri que contenían medio de cultivo MS 0.2X (Murashige y Skoog, 1962). El medio de cultivo es preparado con sales MS (0.9 g/L) de Sigma, y con sacarosa (6 g/L). Después de ajustar el pH a 7 se agregó fitagar (10 g/L) de Phytotechnology. Finalmente se agregó L-Glu de Sigma para algunos de los tratamientos. Se esterilizaron los medios de cultivo durante 20 minutos bajo 15 psi. Las condiciones de crecimiento para las plantas fueron de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, una intensidad de luz de 100 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ y una temperatura de 22°C (condiciones mantenidas por una cámara de crecimiento Percival Scientific AR-95L).

6.2 Elaboración de cruzas

Entre las líneas transgénicas que fueron utilizadas en este trabajo, algunas expresan el gen que codifica para GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP), YELLOW FLUORESCENT PROTEIN (YFP), CYAN FLUORESCENT PROTEIN (CFP) o la proteína β -glucuronidasa (*uidA*). Para la obtención de dichas líneas transgénicas se generaron plásmidos que contenían el gen reportero bajo el promotor del gen a estudiar en la planta. Estos plásmidos fueron introducidos a *Agrobacterium tumefaciens* para después introducirlos al genoma de la planta.

Para este estudio fue necesario transferir los genes reporteros de las líneas transgénicas a las plantas mutantes mediante cruzas. Las cruzas se realizaron polinizando las plantas mutantes con polen de las plantas transgénicas. Se seleccionaron flores de las plantas mutantes y con ayuda de pinzas se expusieron sus estigmas y se polinizaron estableciendo un contacto con las anteras de flores de las plantas transgénicas. La silicua (fruto) desarrollada a partir del proceso de polinización fue denominada generación Filial 1 (F1). Las semillas F1 fueron sembradas y analizadas para seleccionar plantas con fenotipo silvestre; las

semillas generadas por autopolinización de la planta mutante fueron desechadas. Las plántulas seleccionadas de la F1 fueron crecidas hasta producir semillas, las cuales se denominaron generación F2. Las semillas F2 fueron sembradas y analizadas para seleccionar plántulas con fenotipo mutante, las cuales fueron crecidas hasta obtener semillas F3, donde el 100% de la semilla producen plántulas con fenotipo mutante. Se revisaron los distintos lotes cosechados de las semillas F3 para comprobar la expresión las proteínas reporteras y así seleccionar líneas homocigotas que después fueron utilizadas en los diferentes experimentos.

6.3 Ensayo de evaluación de la respuesta de la raíz a L-Glu

Las plantas obtenidas de las cruza antes mencionadas fueron expuestas a concentraciones crecientes de L-Glu y analizar la respuesta de los genes de interés. Primeramente, se siembran las semillas y crecen en cajas Petri con medio MS 0.2X. A los 4 días después de la germinación las plántulas fueron transferidas a cajas Petri que contenían solo medio MS 0.2X como tratamiento control y otras cajas con medio MS 0.2X y concentraciones de L-Glu (100 μ M, 200 μ M y 400 μ M). Cinco días después de haber realizado las transferencias, las plantas fueron analizadas por microscopía confocal o de contraste (Nomarsky) para determinar la expresión de los genes reporteros.

6.4 Análisis por microscopía

Las plantas transgénicas *CycB1:uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *mpk6XpCycB1:uidA* y *mkp1XpCycB1:uidA*, después de cuatro días después de haber germinado se transfirieron a cajas con medio MS 0.2X y MS 0.2X con L-Glu, y se determinó el crecimiento a los días 1, 3 y 5 posterior a la transferencia. Previo al análisis las plantas, se transfirieron a cajas de microtítulo con X-Gluc al 0.1% (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronido) en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH 7) con $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (2 mM), y se incubaron por 6 horas a 37 °C. Posteriormente, se retiró la solución X-Gluc y las plantas fueron clarificadas con una solución de HCL 0.24 N en metanol al 20% (v/v) durante 60 minutos a 62 °C, después la solución se removió y se agregó NaOH al 7% (v/v) en etanol al 60% (v/v) por 25 minutos a temperatura ambiente. La solución fue

retirada y el tejido se hidrató con tratamientos de etanol al 40, 20 y 10% (v/v) por 20 minutos cada uno. Una vez retirado el etanol al 10%, se adicionó glicerol al 50% (v/v) y se colocaron en portaobjetos para su análisis en un microscopio de contraste Leica DM 5500 B.

Para el análisis con los tratamientos de medio MS 0.2X y MS 0.2X con L-Glu en las líneas transgénicas *DR5::GFP* (Ottensschläger *et al.*, 2003), *PIN1::PIN1::GFP* (Benková *et al.*, 2003), *PIN2::PIN2::GFP* (Xu *et al.*, 2005), *PIN7::PIN7::GFP*, *WOX5::GFP* (Ding *et al.*, 2010), *SCR::HB2::YFP* (Reyes-Hernández *et al.*, 2013), *SHR::GFP* (Helariuta *et al.*, 2000), *PLT1::CFP* (Galinha *et al.*, 2007), *PLT2::CFP* (Galinha *et al.*, 2007) y las cruzas obtenidas con *mpk6-2* (Liu *et al.*, 2004) y *mkp1* (Ulm *et al.*, 2002), las raíces fueron suspendidas en Yoduro de Propidio (YP) al 0.1% (v/v) sobre un portaobjetos y finalmente se analizaron en un microscopio confocal *Olympus Fluo-View FV1000-PME*.

La detección de GFP, YFP, CFP e YP se realizó en aumentos de 400X o 600X. Para la GFP se utilizó una longitud de onda de excitación de 488 nm y el registro de un haz de 509 nm. Para la YFP se utilizó un haz con longitud de onda de 510 nm y el registro de 527 nm. El haz de la longitud de onda para la proteína CFP fue de 433 nm y el registro de 475 nm. Finalmente, para el YP se incidió un haz de 493 nm y se registró a 535 nm.

6.5 Variables analizadas

Los análisis fueron hechos 5 días después de haber transferido las plantas a los tratamientos con L-Glu; a excepción de las cinéticas, donde se analizaron los días 1, 3 y 5 posterior a la transferencia. La medición y el conteo de raíces se graficaron en barras representando los promedios y el error estándar como líneas truncadas.

Las longitudes de la zona meristemática y la zona de elongación se registraron con el software *Image J* (Wayne Rasband; National Institute of Health, USA).

Los patrones de expresión de los genes reporteros y las cuantificaciones de fluorescencia de *GFP*, *YFP* y *CFP* está representada como unidades arbitrarias (U.A. = escala de grises de pixeles/ μm^2), que representan el número de pixeles del

color fluorescente analizado en el área comprendida entre el centro quiescente y la célula cortical número 20 de la raíz. Dicha área se eligió porque la mayor expresión de los transgenes se encuentra dentro del meristemo. El procesamiento de las imágenes se realizó con el software *Image J*. Para las figuras se eligió una fotografía representativa de cada condición experimental.

Todos los datos obtenidos de los experimentos fueron analizados estadísticamente con el software STATISTICA 10 (Statsoft, 2010), aplicándoles análisis de varianza, ANOVA de una vía y pruebas de significancia de Tukey con una $P < 0.05$. Los grupos estadísticamente diferentes se representan con letras en la parte superior de las barras y del error estándar en las gráficas.

7 RESULTADOS

7.1 El L-Glu modifica la expresión de *DR5:GFP*

El efecto del L-Glu en la raíz de *A. thaliana* es similar al de las auxinas, acorta la raíz primaria, promueve el desarrollo de raíces laterales y aumenta el número y el crecimiento de los pelos radiculares (Woodward y Bartel, 2005). Para investigar si en el meristemo apical de la raíz existe un cambio en los niveles de auxinas en respuesta al L-Glu, realizamos experimentos con la línea reportera *DR5:uidA*. Esta línea transgénica contiene varias secuencias promotoras fusionadas a la secuencia que codifica para la proteína β -glucoronidasa y que es activada en presencia de auxinas. La β -glucoronidasa en presencia del sustrato (X-Gluc) produce una tinción color azul. Para estos experimentos las semillas de *DR5:uidA* fueron sembradas en medio MS 0.2X, sin y suplementado con 200 μ M de L-Glu. Como control positivo se incluyó el tratamiento con 200 μ M de L-Trp, el cual es precursor de la síntesis de auxinas y por lo tanto incrementa los niveles de auxinas. Al analizar las plantas tratadas con los aminoácidos, se observó que a diferencia de las plantas control, aumentó el número y crecimiento de pelos radiculares, además de una inhibición del crecimiento de la raíz primaria (**Fig. 13A-B**). Sin embargo, como era de esperarse los efectos observados fueron más drásticos en presencia del L-Trp, ya que las plantas mostraron un incremento exacerbado en la expresión del gen reportero en el meristemo radicular. Mientras que en el tratamiento con 200 μ M de L-Glu los niveles de auxinas fueron similares al control (**Fig. 13A**). Después, analizamos el efecto de 100, 200 y 400 μ M de L-Glu en la línea *DR5:GFP*, donde observamos que en 400 μ M hubo una ligera disminución de la expresión en los haces vasculares, mientras que el patrón de la distribución de auxinas cambió en la zona del CQ y de la columela, observándose una zona más compacta y una deslocalización hacia el córtex (**Fig. 13C**).

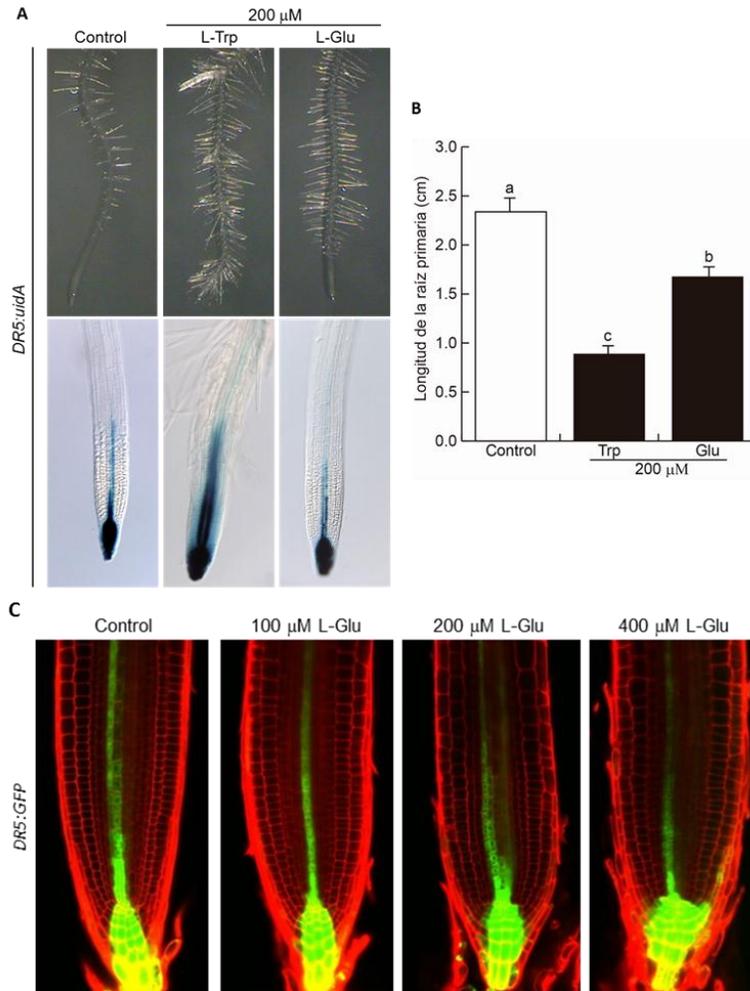


Figura 13. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *DR5:uidA* y *DR5:GFP* en *Arabidopsis thaliana*. (A) Fotografías representativas del efecto de L-Glu y del precursor de auxinas L-Trp (200 μ M) sobre la expresión de *DR5:uidA* en el meristemo radicular de la raíz primaria. (B) Crecimiento de la raíz primaria en tratamientos con 200 μ M de L-Glu y L-Trp. Las barras truncadas representan el error estándar de una n=20 plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$. (C) Fotografías representativas del efecto del L-Glu (100, 200 y 400 μ M) sobre la expresión de *DR5:GFP* en el meristemo radicular de la raíz primaria. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X, sin y suplementado con 200 μ M de L-Trp o con 100, 200 y 400 μ M de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al cuarto día después de la germinación (n=10).

7.2 Las mutantes de la señalización de auxinas no son resistentes al efecto del L-Glu

Debido a que el efecto que tiene el L-Glu sobre la raíz de *A. thaliana* fue similar al provocado por las auxinas, se decidió averiguar si estos cambios en la raíz que provoca el L-Glu eran regulados por la vía de señalización de las auxinas. Para esto, evaluamos el efecto del L-Glu en mutantes de *A. thaliana* en genes involucrados en la señalización de auxinas para determinar si eran resistentes o

sensibles. Primero, las plantas fueron germinadas y crecidas en medios MS 0.2X sin y suplementado con 400 μM de L-Glu. Cuatro días después de la germinación analizamos el crecimiento de la raíz primaria y encontramos que de manera general todas las mutantes fueron sensibles a la respuesta del L-Glu (**Fig. 14 A-C**). La triple mutante en los receptores de auxinas (*tir1afb2afb3*), la doble de los factores de transcripción de respuesta a auxinas (*arf7arf19*), la mutante en el transportador de influjo (*aux1-7*) y en el transportador de eflujo PIN2 (*eir1*), fueron igualmente sensibles al L-Glu que las plantas silvestres (Col-0). Por otra parte, las mutantes que mantienen activos a represores de la familia AUX/IAA (*axr1-3*, *axr2-1* y *slr1*) mostraron mayor sensibilidad al L-Glu.

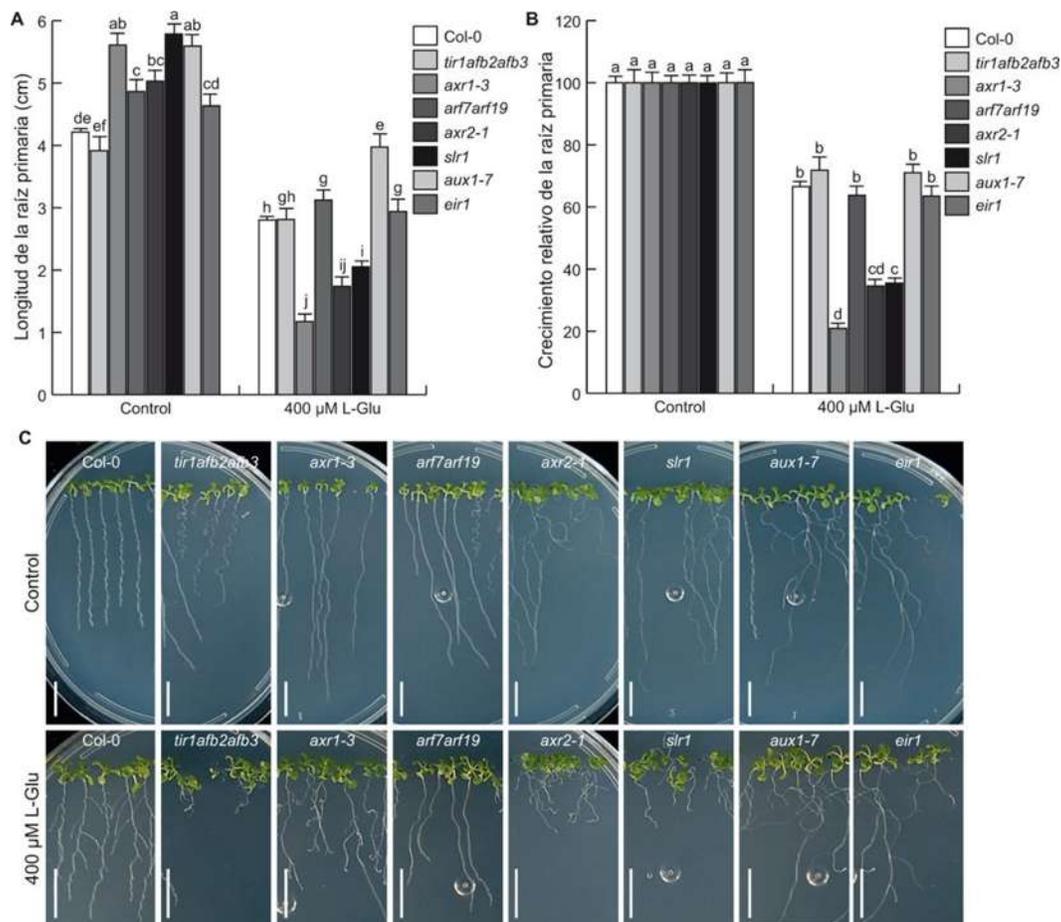


Figura 14. Efecto del L-Glu en las mutantes de la vía de señalización de auxinas. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X sin y suplementado con 400 μM de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al cuarto día después de la germinación. (A) Crecimiento de la raíz primaria en diferentes mutantes de la vía de señalización de auxinas tratadas con L-Glu. (B) Crecimiento de la raíz primaria con base a los valores del tratamiento control relativos a 100. Las barras truncadas representan el error estandar de una $n=20$ plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$. (C) Fotografías representativas del efecto del L-Glu sobre el crecimiento de la raíz primaria en las diferentes mutantes utilizadas.

7.3 El L-Glu disminuye drásticamente la expresión de *DR5:GFP* en *mkp1* pero no es afectada en *mpk6*

Hasta el momento, conocíamos que el L-Glu modificaba la expresión de *DR5:GFP* y que la señalización de este aminoácido no dependía de los componentes de la vía de las auxinas. Sin embargo, tomando en cuenta el antecedente de que la mutante *mkp1* fue hipersensible y *mpk6* resistente al efecto del L-Glu, decidimos utilizar las cruza *mkp1 X DR5:GFP* y *mpk6 X DR5:GFP* para obtener mayor información sobre los cambios de la respuesta a auxinas por efecto del L-Glu y la posible participación de MPK6-MKP1 sobre esta señalización. Interesantemente, observamos que en *mkp1 X DR5:GFP* la intensidad de la fluorescencia emitida por la proteína reportera y el tamaño del dominio de expresión que rodea al CQ fueron menores respecto a la planta silvestre, perdiéndose por completo en la columela y CIC en el tratamiento con 400 μ M de L-Glu (**Fig. 15**). La crusa *mpk6 X DR5:GFP* mostró resultados opuestos a *mkp1 X DR5:GFP* en los tratamientos con L-Glu, es decir, mantiene una intensidad de fluorescencia similar al tratamiento control, además de un dominio de expresión intacto en la zona que rodea al CQ (**Fig. 15**).

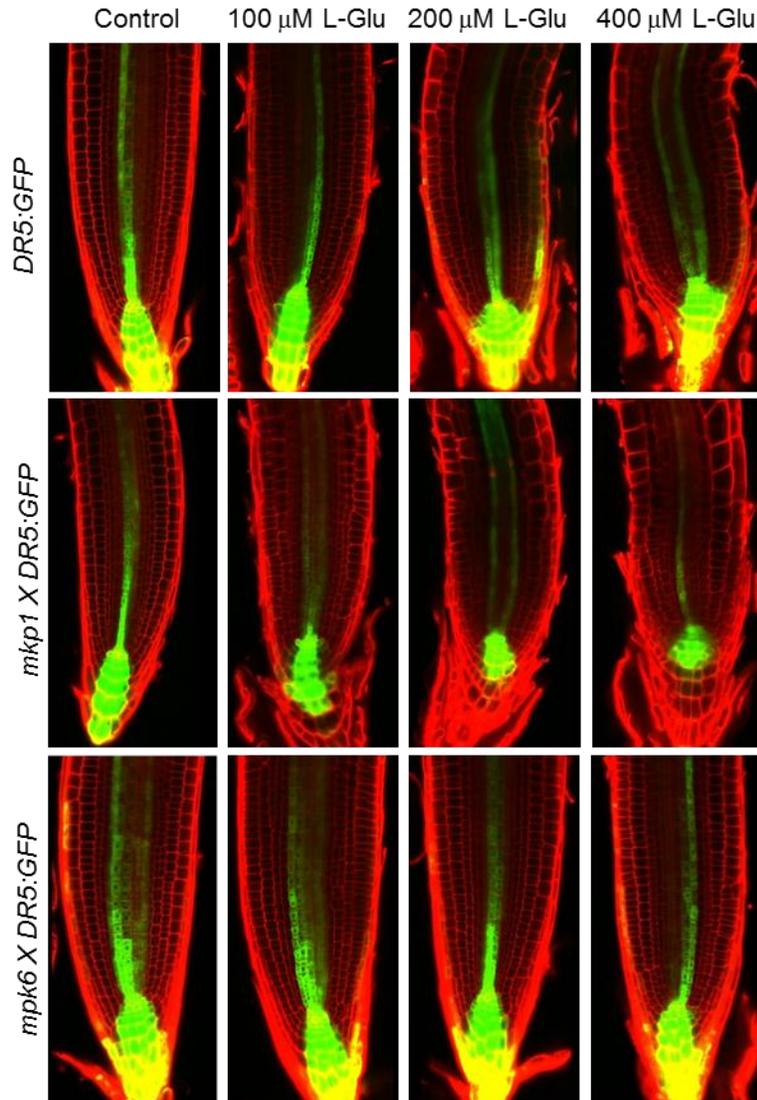


Figura 15. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *DR5:GFP* en los fondos genéticos *Col-0*, *mpk6* y *mkp1*. Se muestran fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *DR5:GFP* en los diferentes fondos genéticos. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y al cuarto día después de la germinación las plantas se transfirieron al medio MS 0.2X sin y suplementado con 100, 200 y 400 μ M de L-Glu para su análisis posterior (n=10).

información sobre los cambios de la respuesta a auxinas por efecto del L-Glu y la posible participación de MPK6-MKP1 sobre esta señalización. Interesantemente, observamos que en *mkp1 X DR5:GFP* la intensidad de la fluorescencia emitida por la proteína reportera y el tamaño del dominio de expresión que rodea al CQ fueron menores respecto a la planta silvestre, perdiéndose por completo en la columela y CIC en el tratamiento con 400 μ M de L-Glu (**Fig. 15**). La cruz *mpk6 X DR5:GFP*

mostró resultados opuestos a *mkp1 X DR5:GFP* en los tratamientos con L-Glu, es decir, mantiene una intensidad de fluorescencia similar al tratamiento control, además de un dominio de expresión intacto en la zona que rodea al CQ (**Fig. 15**).

7.4 La síntesis de los transportadores de auxinas PIN es alterada diferencialmente por el L-Glu en Col-0, *mkp1* y *mpk6*

Se ha reportado que el transporte polar de auxinas es un mecanismo importante para mantener de manera normal el gradiente de auxinas en el meristemo apical de la raíz y que los transportadores PIN juegan un papel importante en estos procesos (Adamowski *et al.*, 2015; Vanneste *et al.*, 2009). Al observar en el experimento anterior los cambios de expresión de *DR5:GFP* producidos por L-Glu, no descartamos la posibilidad de que los transportadores PIN estuvieran siendo regulados por MPK6-MKP1 en respuesta al L-Glu para controlar la distribución de auxinas. Por lo tanto, evaluamos el efecto del L-Glu sobre algunas líneas reporteras de transportadores PIN fusionados a GFP.

Debido a que la expresión de *DR5:GFP* en la planta silvestre y en la mutante *mkp1* disminuyó de manera dependiente de la concentración de L-Glu en la zona de los haces vasculares, decidimos evaluar bajo los mismos tratamientos de L-Glu a las líneas reporteras *PIN1::PIN1::GFP*, *mkp1 X PIN1::PIN1::GFP* y *mpk6 X PIN1::PIN1::GFP*, ya que una de las zonas de actividad de PIN1 son los tejidos de los haces vasculares. En el fondo genético silvestre, la producción de *PIN1::GFP* decayó de manera dependiente a la concentración del L-Glu, alcanzando una represión de casi un 50% en el tratamiento con 400 μ M de L-Glu (**Fig. 16A-B**). Al comparar con la línea silvestre, la síntesis de *PIN1::GFP* en *mkp1* disminuyó desde el tratamiento control, sin embargo, fue dicho decremento más drástico en los tratamientos con L-Glu, bajando hasta un 80% en 400 μ M de L-Glu. De igual manera que en *mkp1 X PIN1::PIN1::GFP*, *mpk6 X PIN1::PIN1::GFP* desde el tratamiento control mostró un decremento en la intensidad de la fluorescencia de aproximadamente un 40%, pero de manera interesante, bajo las diferentes concentraciones de L-Glu no se alteró significativamente la intensidad de la fluorescencia (**Fig. 16A-B**).

Cuando se evaluó en la planta silvestre y en *mpk6* la expresión de *DR5::GFP* en los tratamientos de L-Glu, se observó una expresión del marcador que se deslocalizaba hacia el córtex y la endodermis, tejidos donde PIN2 se encarga de distribuir a las auxinas (**Fig. 17A**). Consecuentemente, analizamos el efecto del L-Glu sobre la síntesis de *PIN2::GFP* en los fondos Col-0, *mpk1* y *mpk6* (**Fig. 17A**). Se encontró en la planta silvestre que la producción de *PIN2::GFP* bajó hasta un 40% y en *mpk1* la caída fue más drástica de hasta un 80% en el tratamiento de 400 μ M de L-Glu (**Fig. 17B**). De manera sorprendente, en el fondo *mpk6* la síntesis de *PIN2::GFP* no se alteró con los tratamientos de L-Glu.

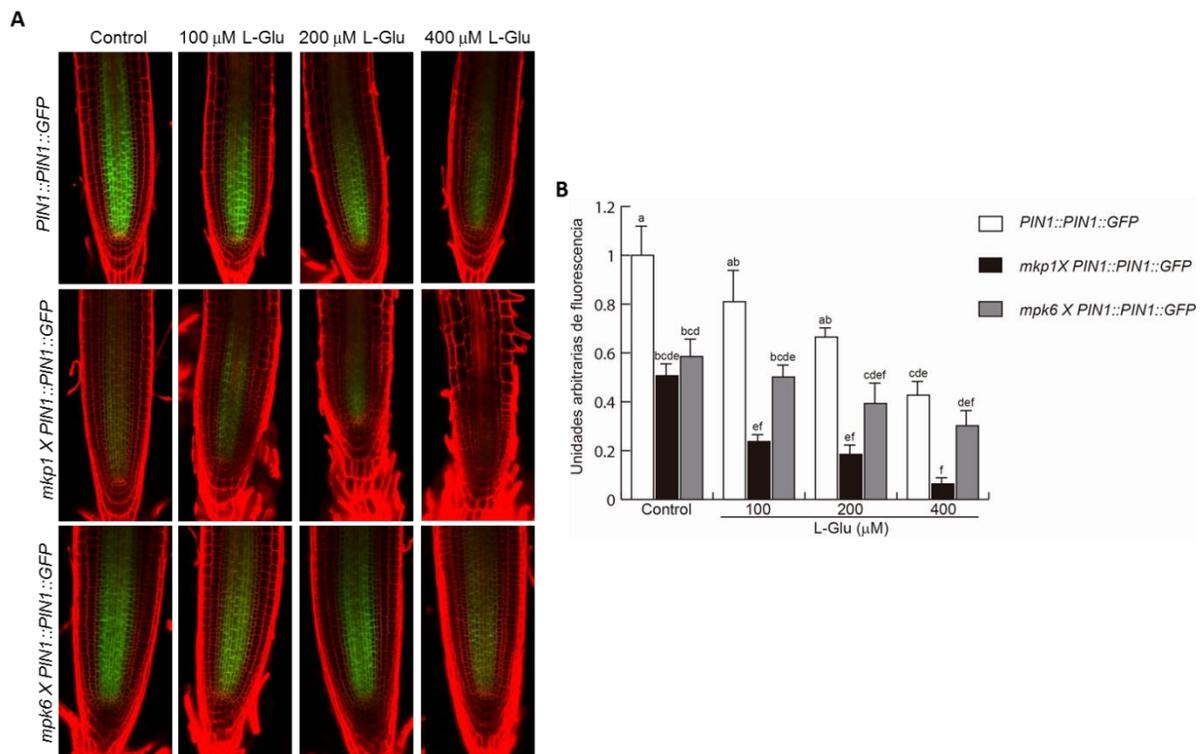


Figura 16. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *PIN1::PIN1::GFP* en los fondos genéticos Col-0, *mpk6* y *mpk1*. (A) Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *PIN1::PIN1::GFP* en los diferentes fondos genéticos. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y al cuarto día después de la germinación las plantas se transfirieron a medio MS 0.2X sin y suplementado con 100, 200 y 400 μ M de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al quinto día después de la transferencia. (B) Medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se representa como unidades arbitrarias que equivale a número de pixeles/ μ m². Las barras truncadas representan el error estándar de una n=10 plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey p< 0.05.

Previamente habíamos observado que en las líneas transgénicas *DR5::GFP* y *mkp1 X DR5::GFP*, el dominio de expresión que rodea al CQ y el de la columela fueron afectados por el L-Glu, desapareciendo por completo la expresión en la columela y en las CIC de las plantas *mkp1 X DR5::GFP* (Fig. 16). Se ha reportado que la proteína PIN7 además de localizarse en los tejidos de los haces vasculares también se localiza en la columela, se pensó que la participación de este transportador pudiera relacionarse con la pérdida de la distribución de auxinas en la columela, por lo que se decidió analizar el comportamiento de la producción de *PIN2::GFP* en respuesta al L-Glu, tanto en la planta silvestre como en los fondos *mkp1* y *mpk6* (Fig. 18A).

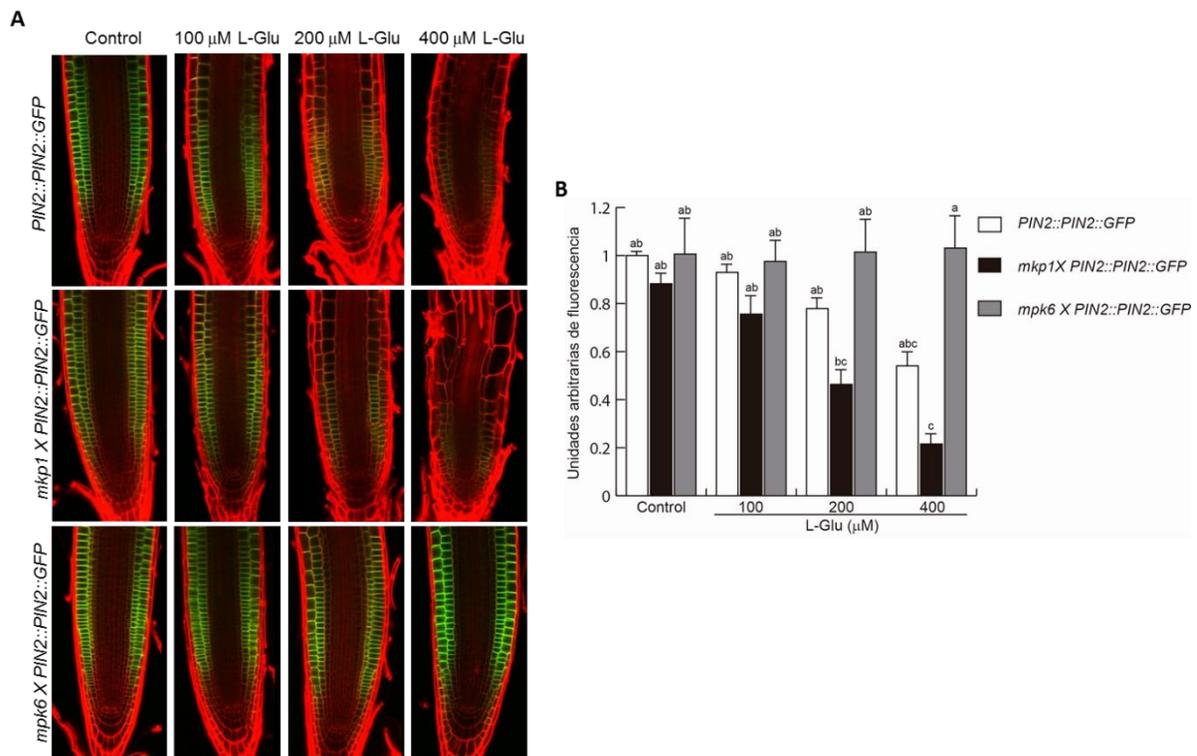


Figura 17. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *PIN2::PIN2::GFP* en los fondos genéticos Col-0, *mpk6* y *mkp1*. (A) Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *PIN2::PIN2::GFP* en los diferentes fondos genéticos. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y al cuarto día después de la germinación las plantas se transfirieron a medio MS 0.2X sin y suplementado con 100, 200 y 400 μM de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al quinto día después de la transferencia. (B) Medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se representa como unidades arbitrarias que equivale a número de pixeles/μm². Las barras truncadas representan el error estándar de una n=10 plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey p< 0.05.

Al determinar la fluorescencia de la proteína reportera en el fondo silvestre se observó una disminución de forma dependiente de la concentración de L-Glu en los haces vasculares y en la columela. En *mkp1 X PIN7::PIN7::GFP* se detectó una caída de la fluorescencia desde el tratamiento control, pero disminuyó en un 50% a 200 μ M de L-Glu (**Fig. 18B**). Además, en la zona de la columela de *mkp1 X PIN7::PIN7::GFP* desapareció la fluorescencia en el tratamiento de 400 μ M de L-Glu. Finalmente en *mpk6* la producción de la proteína PIN7 estaba disminuida un 40% en el tratamiento control, pero así se conservó aún con los tratamientos de L-Glu.

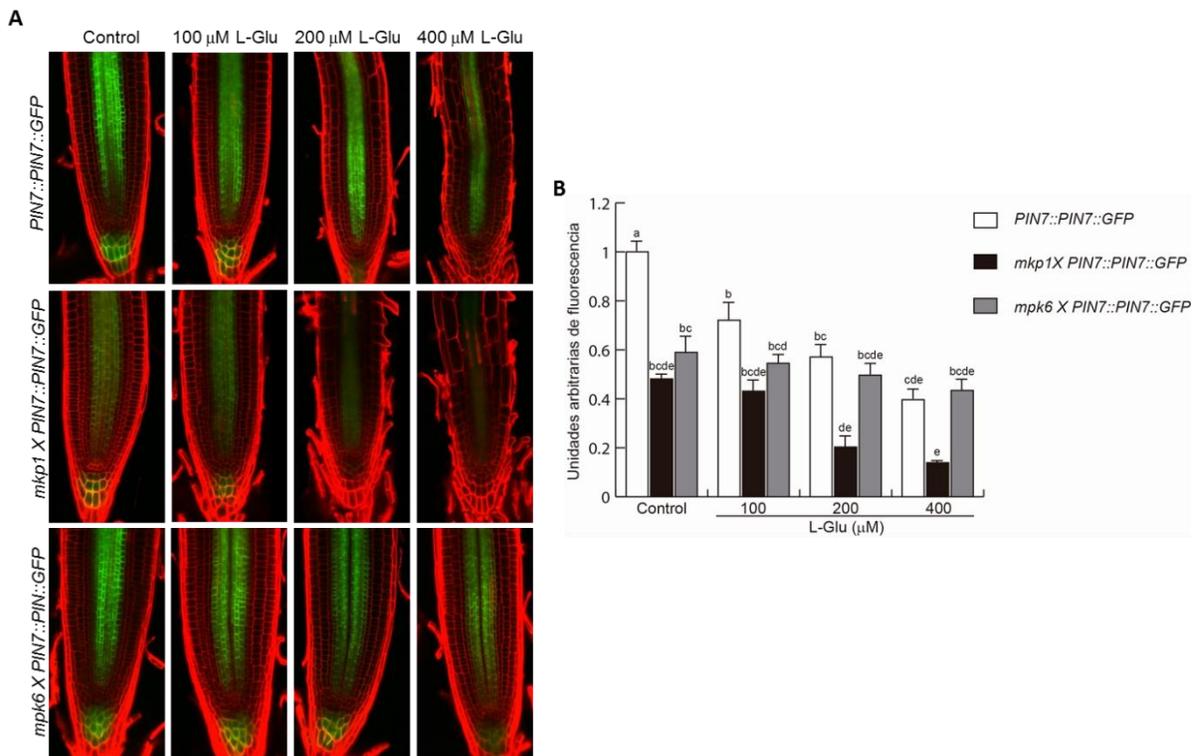


Figura 18. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *PIN7::PIN7::GFP* en los fondos genéticos Col-0, *mpk6* y *mkp1*. (A) Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *PIN7::PIN7::GFP* en los diferentes fondos genéticos. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y al cuarto día después de la germinación las plantas se transfirieron a medio MS 0.2X y MS 0.2X suplementado con 100, 200 y 400 μ M de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al quinto día después de la transferencia. (B) Medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se representa como unidades arbitrarias que equivale a número de pixeles/ μ m². Las barras truncadas representan el error estándar de una n=10 plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$.

7.5 El L-Glu afecta la división celular en el meristemo apical de la raíz de Col-0 y *mkp1*

Las auxinas mantienen una actividad mitótica estable en la zona meristemática de la raíz. Un cambio en el gradiente normal de auxinas puede reflejarse en el aumento o disminución de la división celular. Cuando las auxinas disminuyen en el meristemo apical de la raíz se agota la división celular e incrementa la diferenciación, dando lugar a una disminución del tamaño de la zona meristemática y de elongación, y a un aumento de raíces laterales y pelos radiculares. Walch-Liu *et al.* (2006), reportaron que el L-Glu afecta la expresión de *CYCB1:uidA* y disminuye en un 60% el tamaño de la zona mitóticamente activa. Para investigar si el L-Glu alteraba la división celular a través de MPK6-MKP1, en este trabajo evaluamos la expresión de *CYCB1:uidA* en los fondos genéticos de Col-0, *mkp1* y *mpk6*. El experimento consistió en germinar las semillas de las tres líneas mencionadas en medio MS 0.2X, 4 días después de la germinación las plántulas fueron transferidas a un tratamiento control (MS 0.2X) y con L-Glu (400 μ M), las evaluaciones del número de células en división se realizaron los días 1, 3 y 5 (**Fig. 19A-B**). La línea silvestre Col-0 y las dos mutantes bajo condiciones del tratamiento control y durante los diferentes días analizados presentaron en su MR un rango de entre 20 a 25 células que expresaban el gen reportero *CYCB1:uidA*. En el tratamiento con L-Glu la expresión de *CYCB1:uidA* en Col-0 cayó un poco a partir del tercer día, observándose un promedio de 18 células. Para el quinto día la cantidad de células en Col-0 que expresaban *CYCB1:uidA* bajo a 14. Al tercer día el L-Glu causó un efecto drástico en la expresión de *CYCB1:uidA* bajo el fondo mutante *mkp1*, debido a que solo un promedio de 11 células del MR expresaron el gen reportero, pero en el quinto día la expresión se perdió casi por completo al registrar únicamente el promedio de 2 células que expresaron el gen reportero. Finalmente, la mutante *mpk6* mostró una resistencia al efecto que causa L-Glu sobre la expresión de *CYCB1:uidA*, manteniendo entre los días analizados un rango de 20 a 25 células que expresaban el gen reportero, datos iguales a los registrados en el tratamiento control.

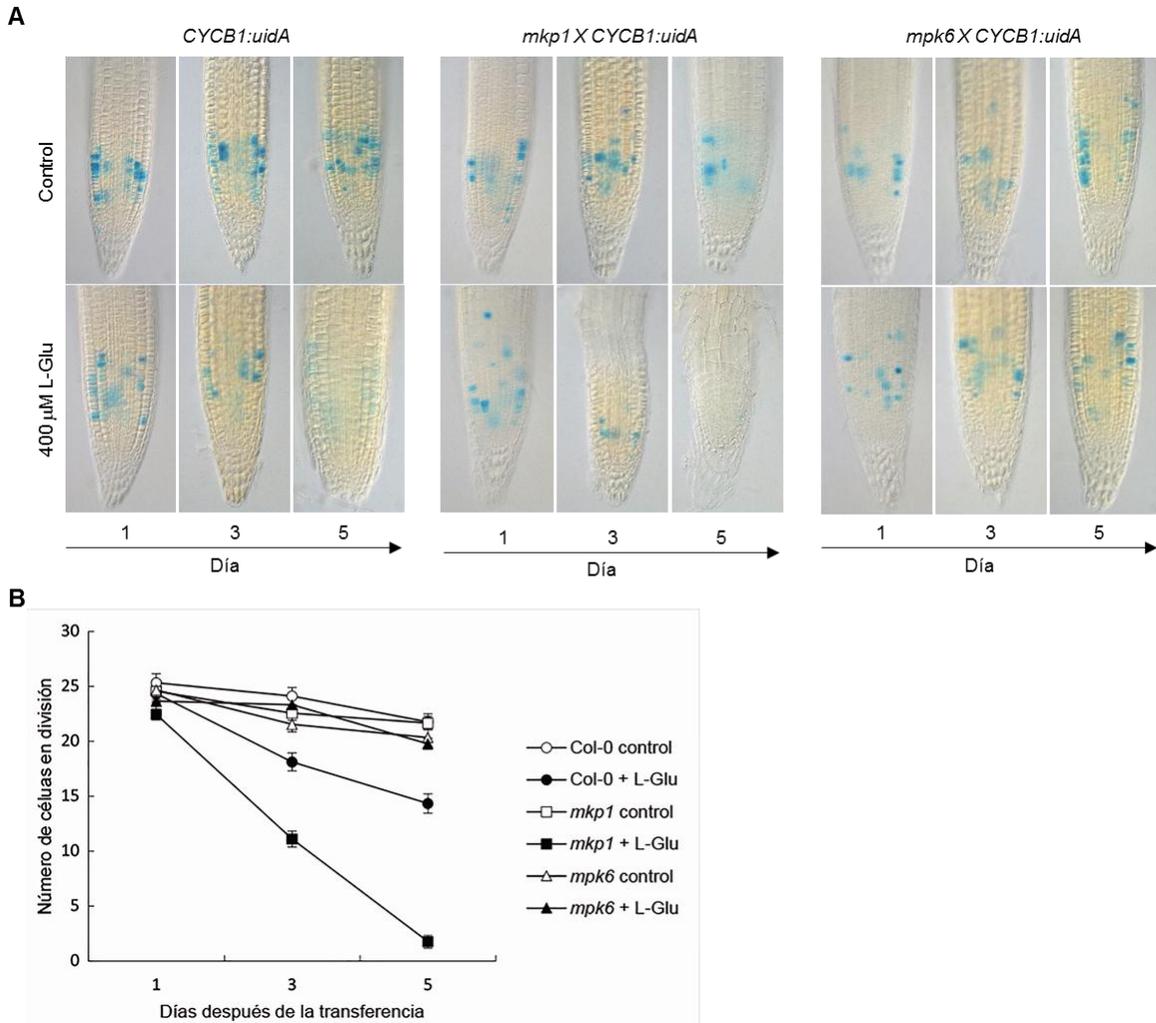


Figura 19. Cinética del efecto del L-Glu sobre la expresión de *CYCB1:uidA* en los fondos genéticos Col-0, *mpk6* y *mpk1*. (A) Fotografías representativas de la expresión de *CYCB1:uidA* en el meristemo radicular de Col-0, *mpk1* y *mpk6*. (B) Evaluación del número de células que expresan *CYCB1:uidA* en los diferentes fondos genéticos. En este experimento las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y 4 días después de la germinación se transfirieron al medio MS 0.2X sin y suplementado con 400 μ M de L-Glu. Las plantas fueron analizadas los días 1,3 y 5 posteriores a la transferencia. Las barras truncadas representan el error estándar de una n=10 y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$.

Además, se registraron las longitudes de la zona meristemática y de elongación (**Fig. 20A-B**). La zona meristemática de Col-0, *mpk1* y *mpk6* conservaron un tamaño promedio de 240 μ m en el tratamiento control. Por otro lado, el L-Glu alteró el tamaño de la zona meristemática de Col-0 desde el tercer día, reduciéndolo a 210 μ m y manteniendo ese tamaño hasta el quinto día. En *mpk1* el tamaño de la zona meristemática se acortó mucho más que en Col-0, registrando

un promedio de 85 μm en el tercero y quinto día. Interesantemente, el L-Glu no cambió el tamaño de la zona meristemática en *mpk6* (**Fig. 20A**). Respecto al efecto del L-Glu sobre el tamaño de la zona de elongación, se observó que en los tres días analizados, las diferentes líneas conservaron el mismo tamaño en el control con un promedio de 360 μm . Sin embargo, en presencia del L-Glu en el tercer día se observó acortamiento de la zona de elongación en Col-0 (179 μm) y *mpk1* (145 μm). Al quinto día en el tratamiento con L-Glu, Col-0 presentó un tamaño promedio de 149 μm en la zona de elongación y en *mpk1* se registró un promedio de 78 μm . De manera sorprendente, el L-Glu no impactó el tamaño de la zona de elongación en las plántulas *mpk6*.

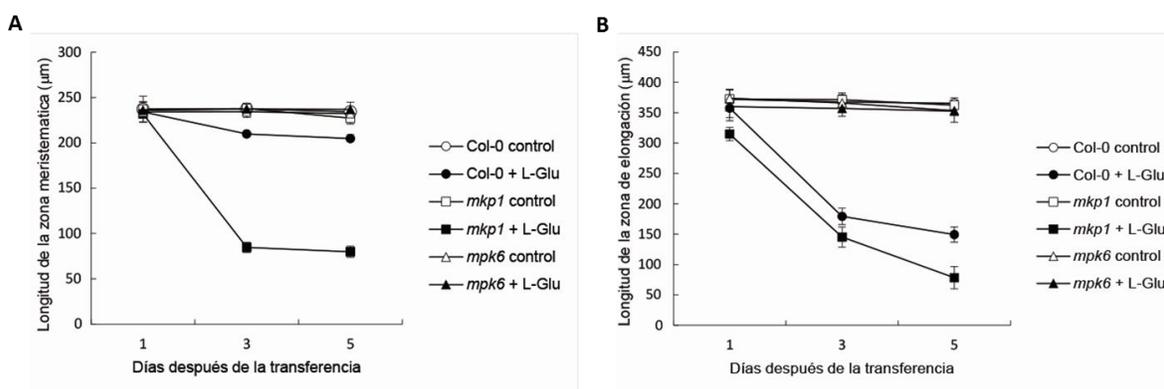


Figura 20. Cinética del efecto del L-Glu sobre el tamaño de la zona meristemática y de la zona de elongación de Col-0, *mpk6* y *mpk1*. (A) Longitud de la zona meristemática en tratamientos con y sin L-Glu. (B) Longitud de la zona de elongación en tratamientos con y sin L-Glu. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X para después de 4 días a partir de la germinación, transferirlas a medio MS 0.2X (símbolos blancos) sin y suplementado con 400 μM de L-Glu (símbolos negros). Las plantas fueron analizadas a partir de la transferencia en los días 1,3 y 5, indicado en el eje X. Los datos fueron obtenidos en μm como se señala en el eje Y. Las barras truncadas representan el error estándar de una $n=10$ y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$.

7.6 La expresión de los genes *PLT1/PLT2* disminuye a causa del L-Glu en la líneas Col-0, *mpk6* y *mpk1*

Se ha propuesto que las auxinas mantienen la actividad meristemática en la raíz actuando a través de la síntesis de los factores de transcripción PLT, los cuales se han relacionado con la identidad del CQ (Cederholm *et al.*, 2012; Petricka *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2007). Para investigar si el agotamiento del meristemo causado por el L-Glu estaba siendo modulado por MPK6-MKP1 a través de la

regulación de la vía PLT, evaluamos la actividad promotora de *PLT1/2* en tratamientos con L-Glu, utilizando las líneas transgénicas *PLT1:CFP*, *PLT2:CFP* y las mismas construcciones en los fondos mutantes *mkp1* y *mpk6*. Bajo los tratamientos con L-Glu, encontramos que la expresión de *PLT1:CFP* en el fondo genético silvestre disminuyó a partir del tratamiento de 200 μM de L-Glu (**Fig. 21A-B**). Mientras que en 400 μM de L-Glu se observó una disminución de la expresión

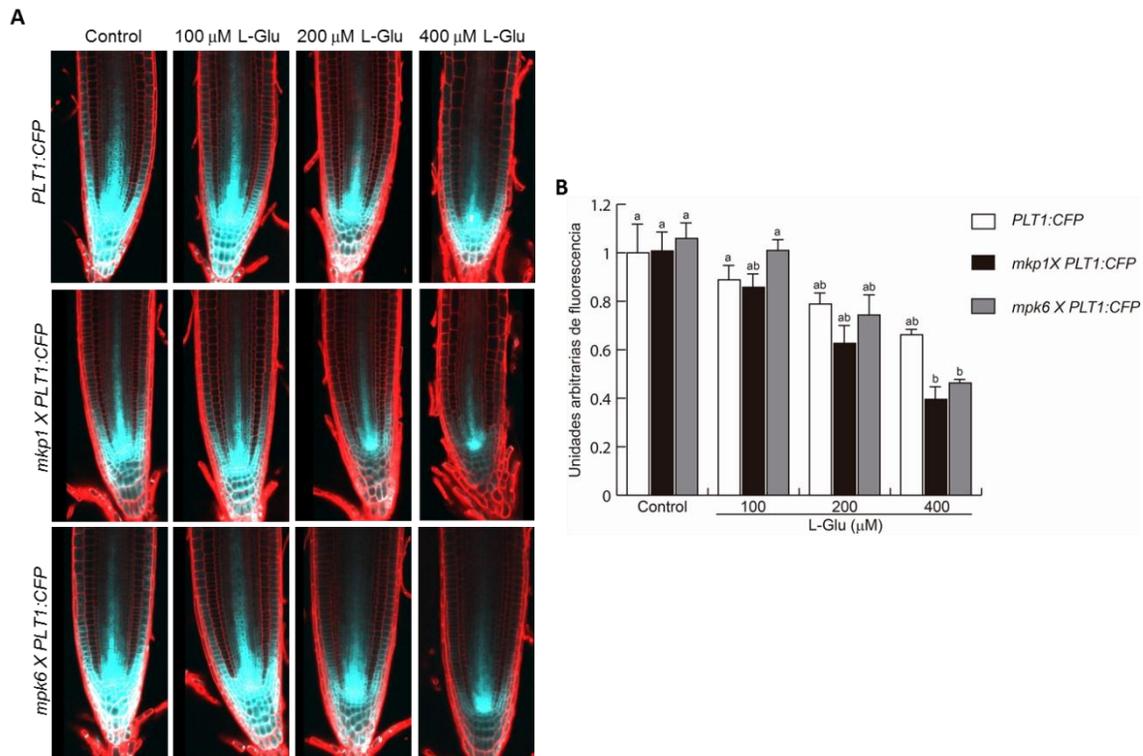


Figura 21. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *PLT1:CFP* en los fondos genéticos Col-0, *mpk6* y *mkp1*. (A) Se muestran fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *PLT1:CFP* en los diferentes fondos genéticos. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y al cuarto día después de la germinación las plantas se transfirieron a medio MS 0.2X suplementado con 100, 200 y 400 μM de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al quinto día después de la transferencia. (B) Medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se representa como unidades arbitrarias que equivale a número de píxeles/ μm^2 . Las barras truncadas representan el error estándar de una $n=10$ plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$.

marcada en las mutantes *mkp1* y *mpk6*. La expresión de *PLT2:CFP* también se vio disminuida por el L-Glu en los tres fondos genéticos analizados, pero más drásticamente en *mkp1* (**Fig. 22A-B**). Los datos anteriores muestran que la respuesta del L-Glu afecta la expresión de *PLT1/PLT2*.

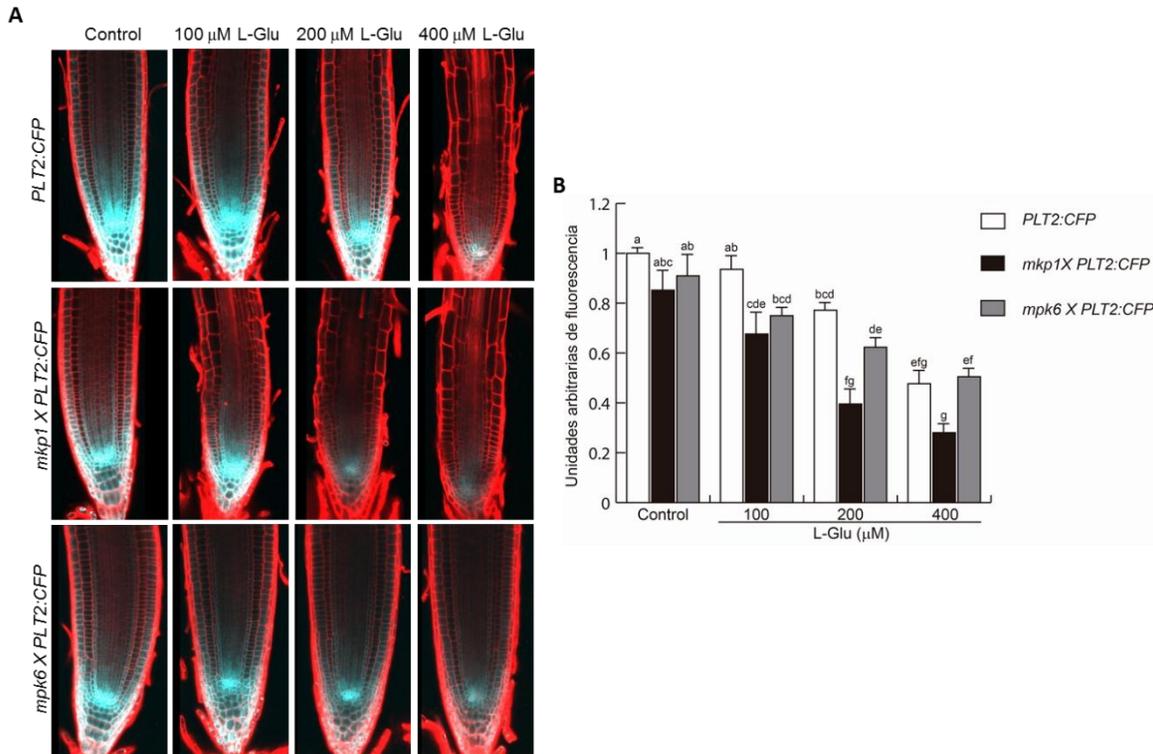


Figura 22. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *PLT2::CFP* en los fondos genéticos *Col-0*, *mpk6* y *mpk1*. (A) Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *PLT2::CFP* en los diferentes fondos genéticos. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y al cuarto día después de la germinación las plantas se transfirieron a medio MS 0.2X sin y suplementado con 100, 200 y 400 μ M de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al quinto día después de la transferencia. (B) Medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se representa como unidades arbitrarias que equivale a número de pixeles/ μ m². Las barras truncadas representan el error estándar de una n=10 plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$.

7.7 La expresión de *SHR* y *SCR* es modificada por el L-Glu diferencialmente en *Col-0*, *mpk1* y *mpk6*

Los factores de transcripción *SHR* y *SCR* funcionan de forma paralela a la vía *PLT* para mantener la identidad del meristemo. El complejo *SHR-SCR* en el CQ promueve la transcripción de *WOX5*, el cual, codifica para un FT que se encarga de conservar el estado indiferenciado de las células iniciales. Para investigar si el efecto del L-Glu sobre el meristemo dependía de la cinasa *MPK6* y su regulador negativo *MKP1*, e involucrando la vía de *SHR-SCR*, evaluamos la actividad de las secuencias promotoras de *SHR* y *SCR* en *Col-0*, *mpk1* y *mpk6* mediante el uso de líneas transgénicas (*SHR::GFP* y *SCR::HB2::GFP*) (Fig. 23A-B). Al analizar la expresión de *SHR::GFP* en *Col-0* se observó que el L-Glu disminuyó su expresión

hasta un 60% en el tratamiento de 400 μ M. En *mkp1* el impacto en el nivel de expresión de *SHR:GFP* por L-Glu fue más marcado, registrando un caída del 90%. Sin embargo, *mpk6 X SHR:GFP* desde el tratamiento control mostraba una intensidad de fluorescencia 25% menor que la registrada para Col-0 y *mkp1*, pero el efecto del L-Glu tan solo disminuyó ligeramente el nivel de expresión de *SHR:GFP* (Fig. 23B).

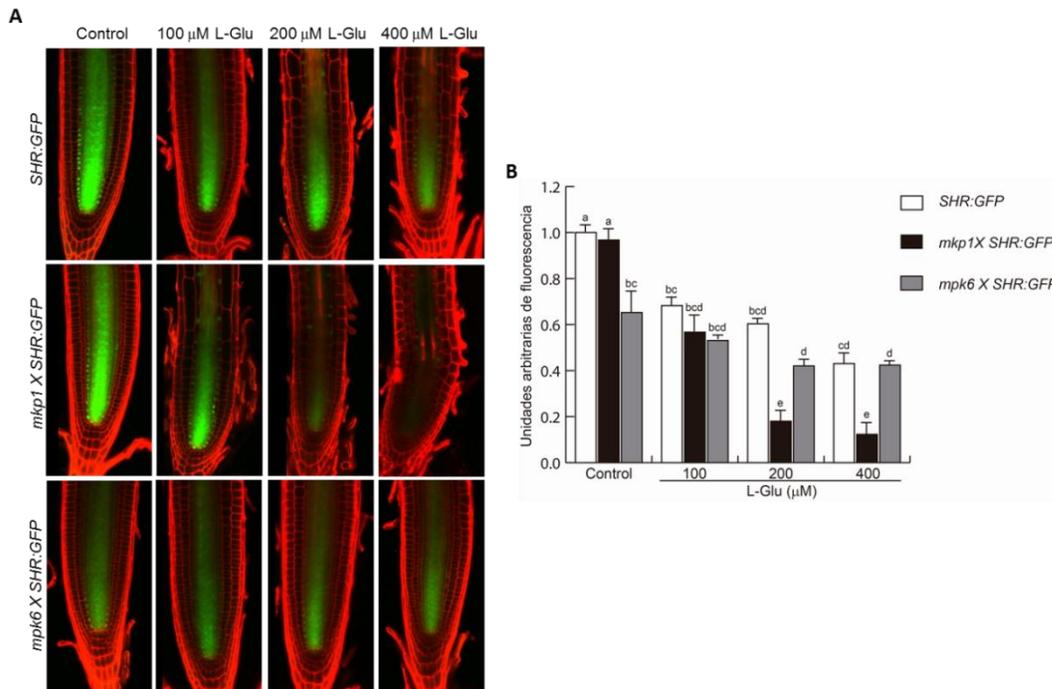


Figura 23. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *SHR:GFP* en los fondos genéticos Col-0, *mpk6* y *mkp1*. (A) Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *SHR:GFP* en los diferentes fondos genéticos. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y al cuarto día después de la germinación las plantas se transfirieron al medio MS 0.2X sin y suplementado con 100, 200 y 400 μ M de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al quinto día después de la transferencia. (B) Medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se representa como unidades arbitrarias que equivale a número de pixeles/ μ m². Las barras truncadas representan el error estándar de una n=10 plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$.

Cuando analizamos la expresión de *SCR::HB2::GFP* pudimos observar que en el fondo genético de Col-0 la intensidad de fluorescencia fue bajando de manera dependiente a la concentración del L-Glu, hasta alcanzar un 45% de disminución en el tratamiento de 400 μ M de L-Glu. Las mutantes *mpk6* y *mkp1* mostraron una disminución similar a Col-0 (Fig. 24A-B). Por lo tanto, los resultados de la

intensidad de la fluorescencia del gen reportero indican que la expresión de *SCR* se ve disminuida por el L-Glu y es independiente de la participación de MPK6-MKP1. Además de los cambios que observamos en la intensidad de la fluorescencia resultante del nivel de proteína YFP producida, detectamos alteraciones marcadas en el dominio de expresión de *SCR::HB2::GFP* generadas por el L-Glu, por lo que examinamos el número de células que expresaban el gen reportero. Un promedio de 70 células fluorescentes se encontró en el tratamiento control para las tres líneas analizadas de *A. thaliana* (**Fig. 24C**). En Col-0 y en *mkp1*, el L-Glu de manera dependiente de la concentración causó una disminución de la cantidad de células que expresaban el gen reportero. En la concentración de 400 μ M de L-Glu, Col-0 presentó un promedio de 34 células fluorescentes, en *mkp1* bajó a 24 células, sin embargo, *mpk6* mantuvo la resistencia al efecto del L-Glu, ya que conservó un promedio de 72 células fluorescentes. Estos datos indican que de manera correlacionada, tanto el nivel como el dominio de expresión del gen reportero están afectados por el L-Glu en Col-0 y *mkp1*. Por otra parte, en *mpk6* se ve disminuido el nivel de expresión del gen reportero por el L-Glu, pero su dominio de expresión no se altera.

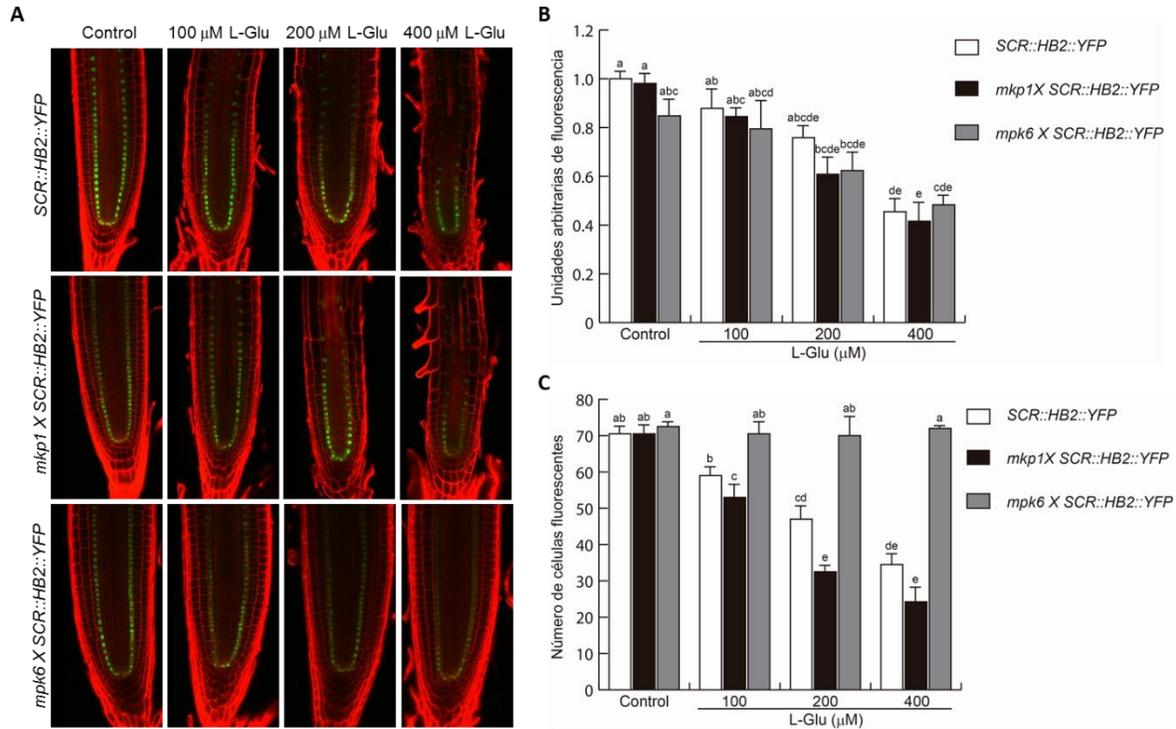


Figura 24. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *SCR::HB2::YFP* en los fondos genéticos *Col-0*, *mpk6* y *mpk1*. (A) Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *SCR::HB2::YFP* en los diferentes fondos genéticos. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y al cuarto día después de la germinación las plantas se transfirieron a medio MS 0.2X sin y suplementado con 100, 200 y 400 μ M de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al quinto día después de la transferencia. (B) Medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se representa como unidades arbitrarias que equivale a número de píxeles/ μ m². Las barras truncadas representan el error estándar de una n=10 y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$. (C) A partir del mismo experimento se contabilizó el número de células que expresaban el gen reportero. El conteo se realizó sobre la zona que abarcaba 250 μ m de longitud iniciando en el CQ y continuando hacia la parte superior. Las barras truncadas representan el error estándar de una n=10 plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey $p < 0.05$.

7.8 El L-Glu disminuye la expresión de *WOX5* en *Col-0* y *mpk1*

Se ha reportado que los factores de transcripción PLT y el complejo SHR-SCR se relacionan con la expresión de *WOX5* de manera opuesta. La doble mutante *plt1plt2* presenta un dominio de expresión de *WOX5* ectópico que se extiende a las células que rodean al CQ pero en *shr* y *scr* la expresión de *WOX5* se pierde (Aida *et al.*, 2004). Anteriormente se observó que el L-Glu disminuía diferencialmente las expresiones de *PLT1/2*, *SHR* y *SCR* en los tres fondos genéticos analizados, pero no sabíamos de qué forma se comportaría la expresión de *WOX5* bajo las mismas condiciones. Evaluamos la expresión de *WOX5:GFP*

en Col-0 y también el gen reportero se movilizó a *mkp1* y a *mpk6* mediante cruza para determinar su participación sobre la regulación de la transcripción de *WOX5* en respuesta al L-Glu. Se detectó que la expresión de *WOX5:GFP* en Col-0 disminuyó gradualmente al ir incrementando la concentración de L-Glu, llegando a reducirse hasta un 50% en 400 μ M de L-Glu (**Fig. 25A-B**). Tanto en *mkp1* como en *mpk6*, la expresión de *WOX5:GFP* fue un 40% más baja que Col-0 en el tratamiento control. Sin embargo, la expresión de *WOX5:GFP* en el fondo *mkp1* cayó un 65% al aplicar 400 μ M de L-Glu, pero en *mpk6* observamos que el L-Glu no modificó su expresión (**Fig. 25B**).

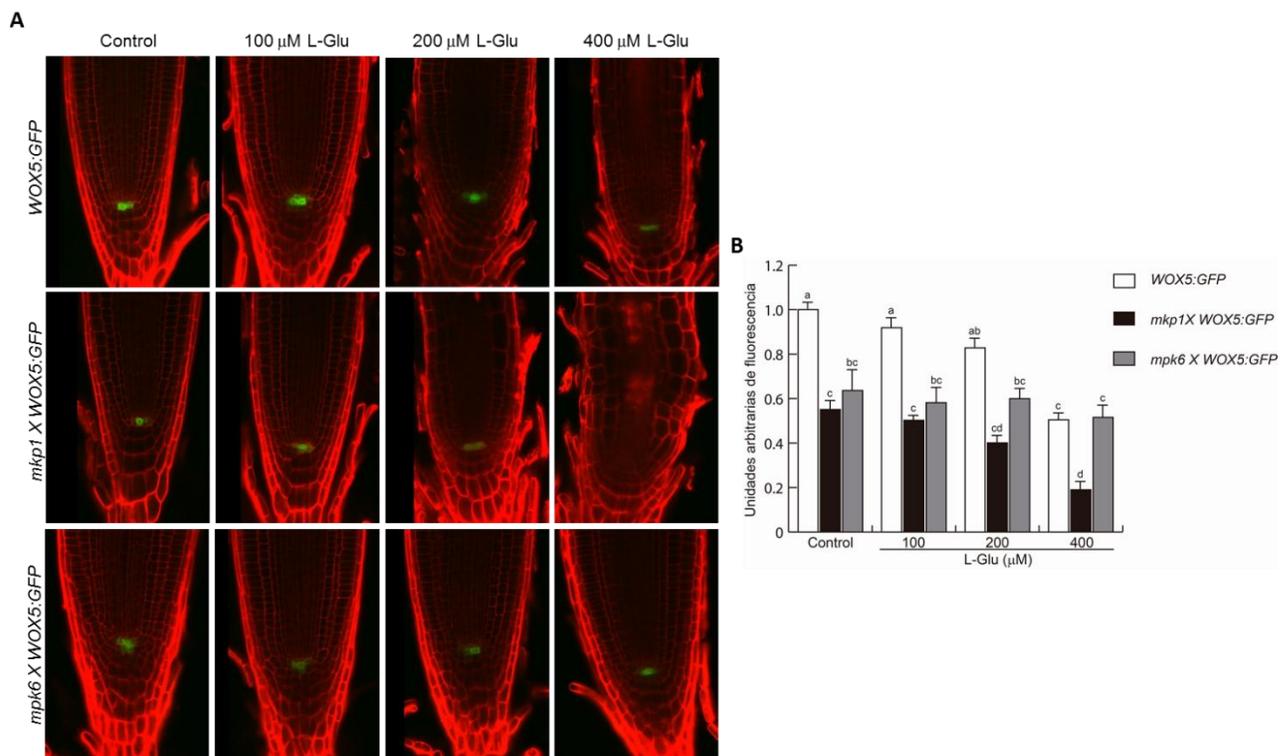


Figura 25. Efecto del L-Glu sobre la expresión de *WOX5:GFP* en los fondos genéticos Col-0, *mpk6* y *mkp1*. (A) Fotografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *WOX5:GFP*. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0.2X y al cuarto día después de la germinación las plantas se transfirieron al medio MS 0.2X sin y suplementado con 100, 200 y 400 μ M de L-Glu. El análisis de las plantas se realizó al quinto día después de la transferencia. (B) Medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a dichos tratamientos. La fluorescencia se representa como unidades arbitrarias que equivale a número de píxeles/ μ m². Las barras truncadas representan el error estándar de una n=10 plantas y las letras muestran los grupos estadísticos obtenidos con una prueba de Tukey p< 0.05.

8 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las auxinas juegan un papel importante en procesos del desarrollo de la raíz de las plantas. Se ha evaluado la acción de varias auxinas sobre la arquitectura de *A. thaliana* y se encontró que la mayoría de estas moléculas inhiben el crecimiento de la raíz primaria y promueven el desarrollo de raíces laterales (Woodward y Bartel, 2005). Otros compuestos de naturaleza química distinta a la de las auxinas tienen efectos parecidos en la raíz de *A. thaliana*, como es el caso del L-Glu. Este aminoácido disminuye el crecimiento de la raíz primaria y aumenta el desarrollo de raíces laterales (Walch-Liu *et al.*, 2006). Para investigar si la señalización del L-Glu es modulada por la vía de las auxinas, analizamos el efecto del L-Glu sobre el crecimiento de la raíz primaria de plantas mutantes afectadas en genes que participan en la señalización de auxinas. En general, todas las mutantes utilizadas fueron sensibles al L-Glu, y solo tres fueron hipersensibles (**Fig. 14**). Existen componentes de la vía de señalización de auxinas que son codificados por una familia numerosa de genes. Por ejemplo, en el genoma de *A. thaliana* se encuentran 6 genes que codifican para receptores de auxinas (*TIR1/AFB1-5*) y 29 genes que codifican para factores de transcripción de respuesta a auxinas. Al realizar mutaciones sencillas en alguno de estos genes la insensibilidad a la respuesta de la señalización de auxinas no es tan marcada, posiblemente porque la función de ese gen puede ser suplida por los demás genes homólogos. Pero cuando se combina la mutación de varios genes aumenta la insensibilidad a la respuesta de auxinas (Mockaitis y Estelle, 2008). Esto puede explicar porque algunas de las mutantes en la señalización de auxinas fueron más sensibles que otras al efecto del L-Glu. Cuando un gen que participa en la señalización de auxinas no está siendo codificado o no es funcional, y sin embargo la respuesta del L-Glu se lleva a cabo, entonces, esto sugiere que dicho gen no participa en la señalización del L-Glu. Si observamos que el efecto del L-Glu es más drástico cuando un gen está afectado, esto nos dice que ese gen cuando es funcional puede estar contrarrestando la respuesta del L-Glu. De manera opuesta, cuando vemos que la línea mutante afectada en el gen de la vía de las auxinas es resistente al efecto del L-Glu, quiere decir que este gen es necesario para modular

positivamente la vía del L-Glu. Por lo tanto, al observar en los resultados que las mutantes de la vía de las auxinas son sensibles al efecto del L-Glu nos permite concluir que la señalización del L-Glu no está modulada positivamente por la vía de las auxinas y que al encontrar hipersensibilidad en algunas de estas mutantes sugiere que la vía de las auxinas puede estar regulando negativamente la respuesta del L-Glu. La mutante *axr1-3* fue la más hipersensible al L-Glu. El gen *AXR1* codifica para una enzima que promueve la unión de RUB1 con la proteína CULLIN para que quede activo el complejo SCF (Paciorek y Friml, 2006). El complejo SCF también participa en las vías de señalización del ácido jasmónico y de las giberelinas, por lo que existe la posibilidad de que alguna de estas fitohormonas también estuvieran regulando negativamente la respuesta del L-Glu (Shan *et al.*, 2012).

La participación en el control de un proceso del desarrollo no solo recae en un grupo de fitohormonas, debido a que una alteración en la respuesta de un fitoregulador, desencadena un ajuste sobre la respuesta de otras fitohormonas lo que permite completar el programa de desarrollo inducido. Es decir, un regulador del crecimiento puede actuar sobre la actividad de otro a nivel de síntesis, transporte o señalización (Pacifci *et al.*, 2015). Hemos visto que el efecto del L-Glu no depende de la señalización de las auxinas, pero observamos que este aminoácido altera la estructura de la raíz de *A. thaliana*, disminuye la expresión de *DR5:GFP* en los haces vasculares y el dominio de expresión de este marcador en el CQ se compacta (**Fig. 13C**). A causa del L-Glu en *mkp1* la expresión de *DR5:GFP* disminuyó más que Col-0 en los haces vasculares y se perdió en la columela (**Fig. 15**). Contrariamente, la expresión de *DR5:GFP* se mantuvo estable en el fondo mutante *mpk6* en presencia de L-Glu (**Fig. 15**). Diversas proteínas transportadoras de auxinas son las encargadas de mantener una concentración local de estas moléculas en el meristemo apical de la raíz, lo que permite que las células iniciales que rodean al CQ se conserven indiferenciadas. Las proteínas PIN pertenecen a una familia de transportadores de eflujo de auxinas y se ha reportado que al menos cinco miembros de esta familia participan en la distribución de auxinas en el meristemo apical de la raíz (Adamowski y Friml,

2015). Actualmente se sabe que algunas fitohormonas u otras moléculas pueden regular positiva o negativamente la producción y la localización de los transportadores PIN, lo que resulta en una modificación del patrón de distribución y los niveles de auxinas en el meristemo (Blilou *et al.*, 2005; Pacifici *et al.*, 2015). Como se observó que la distribución de auxinas se alteró por el L-Glu, analizamos los niveles de los transportadores PIN1, PIN2 y PIN7 en los fondos genéticos Col-0, *mkp1* y *mpk6* para determinar si la vía MPK6-MKP1 regula la producción o localización de estos transportadores de manera dependiente al L-Glu. Encontramos que la producción de los tres transportadores PIN analizados fue reducida en presencia del L-Glu en Col-0 y de manera más severa en la mutante *mkp1* (**Fig. 16, 17 y 18**). Por otra parte, en *mpk6* la producción de los PIN analizados no se vio comprometida a causa del L-Glu. Estos datos apoyan la participación de MPK6 en modular la señalización del L-Glu para disminuir la síntesis de los transportadores PIN1, PIN2 y PIN7, lo que provocaría que se afecte la distribución y el nivel de auxinas en tejidos específicos de la raíz. Además, el efecto tan drástico del L-Glu sobre la disminución de los transportadores PIN en el fondo *mkp1*, sugiere que la fosfatasa MKP1 está regulando negativamente la señalización del L-Glu y posiblemente lo hace desactivando a MPK6, debido a que en las investigaciones de Ulm *et al.* (2002) y Anderson *et al.* (2011) se reportó a MKP1 para regular negativamente a MPK6 en respuesta a luz UV-C y al PMAP fls22.

El tamaño y el mantenimiento del meristemo radicular dependen de un gradiente de auxinas específico que regula la división celular a través del incremento en la expresión de genes que codifican para ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas, que participan en la regulación del ciclo celular (Bursens *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 1994; Hemerly *et al.*, 1993). Se ha reportado que algunas moléculas como las citocininas, pueden afectar la división celular al disminuir la acumulación de auxinas mediante la represión de los transportadores PIN (Ruzicka *et al.*, 2009). Walch-Liu *et al.* (2006), reportaron que el L-Glu afecta el tamaño del meristemo de la raíz en *A. thaliana* al disminuir la división celular. En este trabajo pudimos determinar que el L-Glu en *mkp1* provoca una disminución de la división celular

más drástica que la registrada en Col-0, pero en *mpk6* no cambia (**Fig. 19A-B**). Además, en Col-0 el tamaño de las zonas meristemática y de elongación se acorta por el efecto del L-Glu y de manera más marcada en *mkp1*, pero no en *mpk6* (**Fig. 20A-B**). Estos datos sustentan la propuesta que MPK6 modula la señalización del L-Glu para disminuir la actividad mitótica del meristemo y promover la diferenciación celular, y que MKP1 regula negativamente este efecto.

Blilou *et al.* (2005), evidenciaron que las proteínas PIN promueven la transcripción de los genes *PLT* a través de los máximos de auxinas, pero también que existe una retroalimentación, debido a que los factores de transcripción PLT inducen la expresión de los genes *PIN*. Aida *et al.* (2004), reportaron que *PLT1* y *PLT2* son genes redundantes y necesarios para el mantenimiento del meristemo de la raíz, ya que la doble mutante *plt1plt2* muestra un acortamiento del meristemo por la falta de división celular y las células del CQ no logran establecer una identidad correcta. Como podemos observar la alteración en el mantenimiento de la actividad mitótica de la zona meristemática de la raíz que presenta *plt1plt2*, es un efecto similar al que provoca el L-Glu. Por lo tanto, en el presente estudio evaluamos la expresión de *PLT1:CFP* y *PLT2:CFP* ante el efecto del L-Glu para investigar si existe una correlación con el decremento de la división celular. Observamos que en el fondo genético silvestre y en *mpk6* disminuyó ligeramente la expresión de *PLT1:CFP*, mientras que en la mutante *mkp1* la disminución fue más marcada (**Fig. 21A-B**). Al analizar los niveles de expresión de *PLT2:CFP* bajo los tratamientos del L-Glu detectamos una disminución en los tres fondos genéticos analizados, pero más drásticamente en *mkp1* (**Fig. 22A-B**). Los datos anteriores muestran que la respuesta del L-Glu afecta la expresión de *PLT1/PLT2:CFP*, sin embargo, esto no sugiere la participación de MPK6-MKP1 debido a que en las dos mutantes (*mkp1* y *mpk6*) se redujo de manera similar la expresión de los genes reporteros.

Otro factor, además de la vía de los PLT, que mantiene la identidad del MR es el complejo SHR-SCR, el cual promueve la transcripción de *WOX5* en el CQ y controla el patrón de división celular en las CICE que permite el desarrollo del córtex y la endodermis (Cederholm *et al.*, 2012). Como en las mutantes de *shr* y

scr se observa que disminuye el tamaño del MR y el crecimiento de la raíz primaria, decidimos evaluar el efecto del L-Glu en la actividad de los promotores de *SHR* y *SCR* (Petricka *et al.*, 2012). Se observó que el L-Glu disminuyó la expresión de *SHR:GFP* en Col-0 y más drásticamente en *mkp1*, a diferencia de *mpk6*, la cual mostró mayor resistencia (**Fig. 23A-B**). Los resultados indican que la señalización del L-Glu es modulada por MPK6 para disminuir la expresión de *SHR*, y que MKP1 está actuando como regulador negativo de esta respuesta.

Encontramos que el L-Glu disminuye un 50% el nivel de expresión de *SCR::HB2::YFP* en Col-0, *mkp1* y *mpk6* (**Fig. 24A-B**). Estos datos ponen en duda la participación de MPK6 y MKP1 en modular la vía del L-Glu para alterar la expresión de *SCR*, debido a que la actividad del promotor de *SCR* en las mutantes *mpk6* y *mkp1* respondió de manera similar que en Col-0. Sin embargo, también observamos que el dominio de expresión de *SCR::HB2::YFP* en Col-0 fue afectado y de manera más drástica en *mkp1*, pero en *mpk6* se mantuvo intacto (**Fig. 24C**). Los resultados del análisis sobre el dominio de expresión de *SCR::HB2::YFP*, muestran que la MAPK, MPK6, modula la señalización del L-Glu para alterar el dominio de expresión de *SCR::HB2::YFP* y que MKP1 regula negativamente este efecto.

WOX5 es un factor de transcripción que se encarga de mantener indiferenciadas el nicho de CI del meristemo y se ha propuesto que las auxinas actúan corriente arriba de WOX5. Evaluamos la actividad del promotor de *WOX5* en Col-0 y en las mutantes *mkp1* y *mpk6* para determinar su participación de las proteínas MKP1 y MPK6 en la regulación de la transcripción de *WOX5* en respuesta al L-Glu. El L-Glu disminuyó la expresión de *WOX5:GFP* en *mkp1*, en mayor proporción que en Col-0 (**Fig. 25A-B**). Por otra parte, en *mpk6* el L-Glu no modificó la expresión de *WOX5:GFP*. Los resultados sugieren que MPK6 regula la señalización del L-Glu para alterar la expresión de *WOX5*, y que MKP1 regula negativamente esta respuesta.

Finalmente, proponemos un modelo en el que se integra la información relacionada con la señalización del L-Glu que existe actualmente en la literatura, y

lo complementamos con los datos obtenidos de esta investigación (**Fig. 26**). En el trabajo de Qi *et al.* (2006), se señaló a GLR3.3 como receptor del L-Glu. Forde *et al.* (2013), demostró que la MAPKKK, MEKK1, está involucrada en modular cascada abajo la señal del L-Glu. La vía de las MAPKs comúnmente está compuesta por tres componentes (MAPKKK-MAPKK-MAPK) y se ha reportado que pueden ser regulada negativamente por fosfatasa, la cual desfosforila a la MAPK para desactivarla. Nuestros resultados sugieren que la MAPK, MPK6, participa en modular la señalización del L-Glu. Sin embargo, se desconoce a la MAPKK que este activando a MPK6 en presencia del L-Glu. Además, proponemos que la fosfatasa MKP1 pudiera estar regulando negativamente a MPK6 para que se inhiba la señalización del L-Glu. Por otra parte, MPK6 en respuesta al L-Glu, pudiera regular la actividad de algún sustrato, el cual actúa negativamente sobre la síntesis de los transportadores PIN y en la expresión de *SHR* y *SCR*. Si los transportadores PIN disminuyen, se desregula el transporte de auxinas, lo que puede afectar el máximo de auxinas del MR. Cuando el nivel de auxinas baja en el MR, se afecta la expresión de los genes *PLT* y de *WOX5*, por lo tanto, se compromete la identidad del MR. La expresión de *WOX5* también se perjudica debido a que disminuye el nivel de *SHR* y *SCR* (**Fig. 26**).

Tabla 1. Nivel de disminución de la expresión de los genes reporteros en respuesta a 400 μ M de L-Glu.

Fondos	Col-0	<i>mkp1</i>	<i>mpk6</i>
Marcadores			
<i>DR5::GFP</i>	**	***	*
<i>PIN1::PIN1::GFP</i>	**	***	*
<i>PIN2::PIN2::GFP</i>	**	***	*
<i>PIN7::PIN7::GFP</i>	**	***	*
<i>CYCB1::uidA</i>	**	***	*
<i>PLT1::CFP</i>	**	**	**
<i>PLT2::CFP</i>	**	**	**
<i>SHR::GFP</i>	**	***	*
<i>SCR::HB2::YFP</i>	**	**	**
<i>WOX5::GFP</i>	**	***	*

No disminuye la expresión (*), si disminuye (**), y disminuye drásticamente (***).

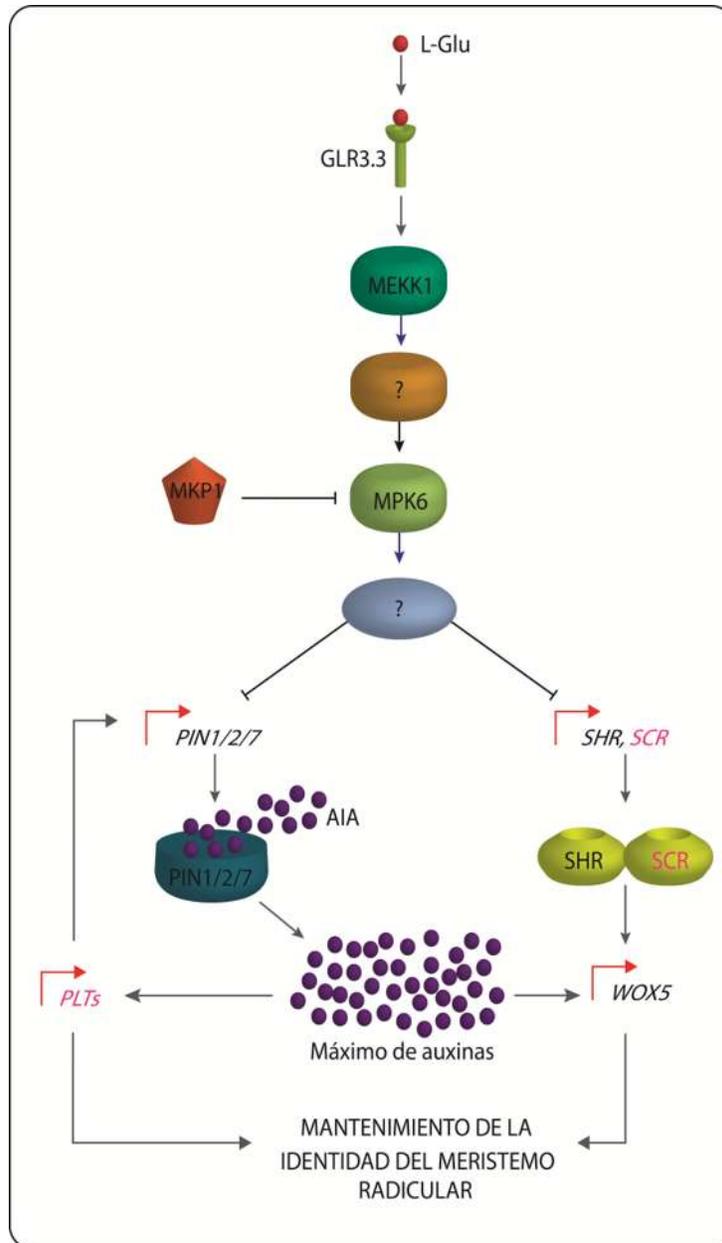


Figura 26. Modelo propuesto para la participación de MPK6-MKP1 en señalización del L-Glu y las posibles vías afectadas en este proceso que alteran el mantenimiento del meristemo radicular. MPK6 modula la señal del L-Glu para reprimir la expresión de los transportadores *PIN* y la de los factores de transcripción *SHR-SCR*. Cuando baja la producción de los transportadores *PIN* se afecta la distribución de auxinas y por lo tanto no existe un máximo de auxinas que permita promover la expresión de los genes encargados del mantenimiento de la identidad del meristemo radicular (*PLT* y *WOX5*). Además, la expresión de *WOX5* también está afectada en ausencia de *SHR* o *SCR*. Finalmente, la fosfatasa *MKP1* regula negativamente a *MPK6* para que no medie la señalización que desencadena el L-Glu. Las líneas rematadas en flecha muestran una regulación positiva y las truncadas una regulación negativa. Las grises muestran los datos reportados en la literatura. En color azul se representan los eventos que aún se desconocen. En líneas negras se señalan los procesos propuestos en nuestra discusión y conclusiones. Las flechas de color rojo representan la transcripción de genes. Las letras rosas indican genes afectados por el L-Glu pero sin ser clara la participación de *MPK6-MKP1*.

9 REFERENCIAS

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

Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y. S., Amasino R. Scheres B. (2004). The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119 (1): 109-120.

Anderson M., Wilson F. (2000). Growth, maintenance, and use of *Arabidopsis* genetic resource. En Wilson (ed.) *Arabidopsis a practical approach*. En: The practical approach series, no. 223 (ed. Hames, B. D.) Oxford University Press, USA, 275: 1-28.

Anderson J. C., Bartels S., Gonzalez Besteiro M. A., Shahollari B., Ulm R. Peck S. C. (2011). *Arabidopsis* MAP Kinase Phosphatase 1 (AtMKP1) negatively regulates MPK6-mediated PAMP responses and resistance against bacteria. *Plant Journal* 67 (2): 258-268.

Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertova D., Jurgens G. Friml J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115 (5): 591-602.

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 (7021): 39-44.

Burssens S., de Almeida Engler J., Beeckman T., Richard C., Shaul O., Ferreira P., Van Montagu M. Inze D. (2000). Developmental expression of the *Arabidopsis thaliana CycA2;1* gene. *Planta* 211 (5): 623-631.

Cederholm H. M., Iyer-Pascuzzi A. S. Benfey P. N. (2012). Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *WIREs Development Biology* 1 (5): 675-691.

Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T. Doerner P. (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* 20 (4): 503-508.

Chaiwongsar S., Strohm A. K., Su S. H. Krysan P. J. (2012). Genetic analysis of the *Arabidopsis* protein kinases MAP3Kepsilon1 and MAP3Kepsilon2 indicates roles in cell expansion and embryo development. *Frontiers in Plant Science* 3: 228.

Dai Y., Wang H., Li B., Huang J., Liu X., Zhou Y., Mou Z. Li J. (2006). Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18 (2): 308-320.

Ding Z. Friml J. (2010). Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (26): 12046-12051.

Drisch R. C. Stahl Y. (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Frontiers in Plant Science* 6: 505.

Ferreira P., Hemerly A., de Almeida Engler J., Bergounioux C., Burssens S., Van Montagu M., Engler G. Inze D. (1994). Three discrete classes of *Arabidopsis* cyclins are expressed during different intervals of the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (24): 11313-11317.

Filleur S., Walch-Liu P., Gan Y. Forde B. G. (2005). Nitrate and glutamate sensing by plant roots. *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 1): 283-286.

Forde B. G., Cutler S. R., Zaman N. Krysan P. J. (2013). Glutamate signaling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces changes in *Arabidopsis* root architecture. *Plant Journal* 75 (1): 1-10.

Fukaki H., Tameda S., Masuda H. Tasaka M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA14* gene of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 29 (2): 153-168.

Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., Willemsen V., Blilou I., Heidstra R. Scheres B. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449 (7165): 1053-1057.

- Gray W. M., Ostin A., Sandberg G., Romano C. P., Estelle M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (12): 7197-7202.
- Guzmán P., Ecker J. R. (1999). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *The Plant Cell* 2: 513-523.
- Hemerly A. S., Ferreira P., de Almeida Engler J., Van Montagu M., Engler G., Inze D. (1993). *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* 5 (12): 1711-1723.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B. E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J. C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7 (7): 301-308.
- Jaillais Y., Chory J. (2010). Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nature Structural & Molecular Biology* 17 (6): 642-645.
- Toloti J. M., Chacón-Madrid K., Miranda B. C., Zezzi M. A. (2015). *Arabidopsis thaliana* and omics approaches: a review. *Journal of Integrated Omics* 5 (1): 1-16.
- Koorneef M., Meinke D. (2010). The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal* 61: 909-921.
- Kranz A. R., Kirchheim B. (1987). Genetic resources in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Service* 24: 1-167.
- Laibach F. (1943). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetisch und entwicklungsphysiologisch Untersuchungen. *Botanica Acta* 44: 493-455.
- Lam H. M., Chiu J., Hsieh M. H., Meisel L., Oliveira I. C., Shin M., Coruzzi G. (1998). Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396 (6707): 125-126.
- Lincoln C., Britton J. H., Estelle M. (1990). Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2 (11): 1071-1080.

Liu Y. Zhang S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16 (12): 3386-3399.

Long Y., Scheres B. Blilou I. (2015). The logic of communication: roles for mobile transcription factors in plants. *Journal of Experimental Botany* 66 (4): 1133-1144.

López-Bucio, J.S. (2016). Mitogen activated protein kinase 6 and phosphatase 1 mediate root responses to glutamate in *Arabidopsis*. Manuscript in preparation.

Lukowitz W., Stewart Gillmor C., Scheible R. W. (2000). Positional cloning in *Arabidopsis*. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiology* 123: 795-805.

Mano Y. Nemoto K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* 63 (8): 2853-2872.

Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D. Koornneef M. (1998). *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. *Science* 282 (5389): 662, 679-682.

Mockaitis K. Estelle M. (2008). Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24: 55-80.

Müller J., Beck M., Mettbach B., Komis G., Hause G., Menzel D. y Samaj J. (2009). *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* 1-15.

Ottenschläger I., Wolff P., Wolverton C., Bhalerao R. P., Sandberg G., Ishikawa H., Evans M. Palme K. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (5): 2987-2991.

Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6: a001537.

Pacifici E., Polverari L. Sabatini S. (2015). Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. *Journal of Experimental Botany* 66 (4): 1113-1121.

Paciorek T., Friml J. (2006). Auxin signaling. *Journal of Cell Science* 119: 1199-1202.

Padje A. V., Whiteside M. D. Kiers E. T. (2016). Signals and cues in the evolution of plant-microbe communication. *Current Opinion in Plant Biology* 32: 47-52.

Parry G., Calderon-Villalobos L. I., Prigge M., Peret B., Dharmasiri S., Itoh H., Lechner E., Gray W. M., Bennett M. Estelle M. (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (52): 22540-22545.

Pearson G., Robinson F., Gibson T. B., Xu B.-E., Karandikar M., Berman K. y Cobb M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 30: 153-183.

Pelagio-Flores R., Ortíz-Castro R., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L., López-Bucio J. (2011). Serotonin, a tryptophan-derived signal conserved in plants and animals, regulates root system architecture probably acting as a natural auxin inhibitor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 52: 490-508.

Pelagio-Flores R., Munoz-Parra E., Ortiz-Castro R. Lopez-Bucio J. (2012). Melatonin regulates *Arabidopsis* root system architecture likely acting independently of auxin signaling. *Journal Pineal Research* 53 (3): 279-288.

Petricka J. J., Winter C. M. Benfey P. N. (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annual Review of Plant Biology* 63: 563-590.

Pi L., Aichinger E., van der Graaff E., Llavata-Peris C. I., Weijers D., Hennig L., Groot E. Laux T. (2015). Organizer-Derived WOX5 Signal Maintains Root Columella Stem Cells through Chromatin-Mediated Repression of CDF4 Expression. *Development Cell* 33 (5): 576-588.

Pickett F. B., Wilson A. K. Estelle M. (1990). The aux1 mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* 94 (3): 1462-1466.

Qi Z., Stephens N. R. Spalding E. P. (2006). Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiology* 142 (3): 963-971.

Raya-González J., Ortiz-Castro R., Ruíz-Herrera L. F., Kazan K., López-Bucio J. (2014). PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME1/MEDIATOR25 regulates lateral root formation via auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 165: 880-894.

Raya-González J., Pelagio-Flores R., López-Bucio J. (2012). The jasmonate receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and lateral root positioning in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 169: 1348-1358.

Reinholz E. (1947). Auslösung von Röntgen-Mutationen bei *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. und ihre Bedeutung für die Pflanzenzucht und Evolutions theorie. Field Information Agency Technical Reports No. 1006: 1-70.

Reyes-Hernández B. J., Srivastava A. C., Ugartechea-Chirino Y., Shishkova S., Ramos-Parra P. A., Lira-Ruan V., Diaz de la Garza R. I., Dong G., Moon J. C., Blancaflor E. B. Dubrovsky J. G. (2014). The root indeterminacy-to-determinacy developmental switch is operated through a folate-dependent pathway in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 202 (4): 1223-1236.

Roman G., Lubarsky B., Kieber J. J., Rothenberg M. Ecker J. R. (1995). Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* 139 (3): 1393-1409.

Rossomando A. J., Payne D. M., Weber M. J. Sturgill T. W. (1989). Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86 (18): 6940-6943.

Ruzicka K., Simaskova M., Duclercq J., Petrasek J., Zazimalova E., Simon S., Friml J., Van Montagu M. C. Benkova E. (2009). Cytokinin regulates root meristem

activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (11): 4284-4289.

Sarkar A. K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R. Laux T. (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446 (7137): 811-814.

Schaller G. E., Bishopp A. Kieber J. J. (2015). The yin-yang of hormones: cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell* 27 (1): 44-63.

Scheres B., McKhann H. I. Van Den Berg C. (1996). Roots redefined: anatomical and genetic analysis of root development. *Plant Physiology* 111 (4): 959-964.

Shan X., Yan J. Xie D. (2012). Comparison of phytohormone signaling mechanisms. *Current Opinion of Plant Biology* 15 (1): 84-91.

Smékalová V., Luptovciak I., Komis G., Samajova O., Ovecka M., Dosekčilová A., Takac T., Vadovic P., Novak O., Pechan T., Ziemann A., Kosutova P. Samaj J. (2014). Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytologist* 203 (4): 1175-1193.

Sussman M. R., Amasino R. M., Young J. C., Krysan P. J., Austin-Phillips S. (2000). The *Arabidopsis* knockout facility at the University of Wisconsin-Madison. *Plant Physiology* 124: 1465-1467.

Tena G., Asai T., Chiu W. L. Sheen J. (2001). Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion of Plant Biology* 4 (5): 392-400.

Tian H., De Smet I. Ding Z. (2014). Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Trends in Plant Science* 19 (7): 426-431.

Timpte C., Wilson A. K. Estelle M. (1994). The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response. *Genetics* 138 (4): 1239-1249.

Ulm R., Ichimura K., Mizoguchi T., Peck S. C., Zhu T., Wang X., Shinozaki K. Paszkowski J. (2002). Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO Journal* 21 (23): 6483-6493.

Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. Guilfoyle T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9 (11): 1963-1971.

Vanneste S. Friml J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136 (6): 1005-1016.

Verbelen J. P., De Cnodder T., Le J., Vissenberg K. Baluska F. (2006). The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signal & Behavior* 1 (6): 296-304.

Vilches-Barro A. Maizel A. (2015). Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 23: 31-38.

Walch-Liu P., Liu L. H., Remans T., Tester M. Forde B. G. (2006). Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 47 (8): 1045-1057.

Wang R., Estelle M. (2014). Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion of Plant Biology* 21: 51-58.

Weigel D., Glazebrook J. (2002). *Arabidopsis* a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 353.

Weijers D., Schlereth A., Ehrismann J. S., Schwank G., Kientz M. Jurgens G. (2006). Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Development Cell* 10 (2): 265-270.

Wilmoth J. C., Wang S., Tiwari S. B., Joshi A. D., Hagen G., Guilfoyle T. J., Alonso J. M., Ecker J. R. Reed J. W. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant Journal* 43 (1): 118-130.

Woodward A.W., Bartel B. (2005) Auxin: Regulation, action and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.

Xu J. Scheres B. (2005). Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity. *Plant Cell* 17 (2): 525-536.

Xu J. Zhang S. (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* 20 (1): 56-64.