



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**“Participación de genes de la señalización del etileno en la regulación
del crecimiento de la raíz en *Arabidopsis thaliana*.”**

Tesis que presenta:

Maestro en Ciencias Alejandro Méndez Bravo

Como requisito para obtener el título de:

Doctor en Ciencias Biológicas

Directores de tesis:

Doctor en Ciencias José López Bucio

Doctor en Ciencias Miguel Martínez Trujillo

Morelia, Michoacán, diciembre de 2019

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas y en el Laboratorio de Genética y Microbiología de la Facultad de Biología; bajo la dirección del D.C. José López Bucio y del D.C. Miguel Martínez Trujillo. Durante su realización se contó con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de becario 286271.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1. Las plantas	2
2.2. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio	2
2.3. El sistema radicular de <i>A. thaliana</i>	3
2.4. El meristemo apical de la raíz primaria	5
2.5. Reguladores del crecimiento vegetal	6
2.6. Las auxinas	7
2.6.1. Biosíntesis y transporte.....	7
2.6.2. Mecanismo de percepción y señalización de auxinas.....	9
2.6.3. Papel de las auxinas en el desarrollo de la raíz primaria	11
2.6.4. Circuito regulatorio <i>SHORTROOT/SCARECROW</i>	13
2.7. El etileno.....	13
2.7.1. Biosíntesis	14
2.7.2. Señalización	14
2.7.3. Papel del etileno en el desarrollo de la raíz primaria.....	16
2.8. Interacción entre el etileno y las auxinas en el desarrollo de la raíz primaria	19
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS	21
5. OBJETIVOS.....	22
5.1. Objetivo general	22
5.2. Objetivos particulares.....	22
6. RESULTADOS	23
6.1. CAPÍTULO I	24
6.2. CAPÍTULO II	40
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	44
7.1 Resumen de resultados	50
7.2 Conclusiones Generales	50
8. REFERENCIAS	52
9. ADDENDA	61
9.1. ADDENDUM I.....	62
9.2. ADDENDUM II.....	87

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología y anatomía de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	4
Figura 2. El transporte polar del AIA y el máximo de auxinas.....	9
Figura 3. Vía de señalización del AIA en <i>A. thaliana</i>	10
Figura 4. Vía de señalización del etileno en <i>A. thaliana</i>	15
Figura 5. La triple respuesta y el efecto inhibitorio del etileno en la elongación de la raíz primaria de <i>A. thaliana</i>	17
Figura 6. Efecto de las mutaciones en las rutas de síntesis o señalización de etileno en la elongación de la raíz primaria. Morfología de la zona apical de la raíz.	18

RESUMEN

Debido a su condición sésil, las plantas están expuestas a una serie de condiciones ambientales altamente variables y frecuentemente adversas, y presentan un tipo de desarrollo llamado indeterminado, en el cual la organogénesis es la base de los cambios morfológicos que ocurren después de la germinación. El desarrollo indeterminado es posible gracias a la actividad de los meristemos, regiones celulares mitóticamente activas durante periodos prolongados, incluso durante todo el ciclo de vida. Esto les otorga a las plantas gran plasticidad fenotípica, así como la capacidad en algunas especies de modular su crecimiento cuando las condiciones no son idóneas. La regulación genética del desarrollo indeterminado es un tema novedoso para las áreas de la fisiología, la genética y la biología celular y su estudio es importante para generar un cabal entendimiento de la biología de las plantas.

La percepción de estímulos ocurre gracias a la síntesis de un conjunto de sustancias conocidas como reguladores del crecimiento vegetal que activan rutas de señalización y finalmente modulan la expresión genética. En el sistema radicular, cuyo desarrollo comienza con la formación de la raíz primaria, las auxinas y el etileno juegan un papel importante y se sabe que existen elementos comunes en las rutas de transducción de señales orquestadas por ambos compuestos. Sin embargo, gran parte del papel que juegan componentes de la señalización del etileno en el mantenimiento del meristemo y por lo tanto del desarrollo indeterminado de la raíz primaria (proceso tradicionalmente atribuido a las auxinas) aún se desconocen.

En este trabajo fue posible comprobar que la cinasa CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1), regulador negativo de la señalización del etileno, juega un papel fundamental en el mantenimiento del meristemo de la raíz primaria. Esto ocurre en parte mediante una inducción de la síntesis del ácido indol-3-acético (AIA) y la expresión subsecuente de genes dependientes de auxinas. De una manera interesante, se pudo demostrar un efecto independiente al AIA sobre la expresión de un conjunto de factores de transcripción que incluye a PLETHORA1 y 2 (PLT1 y 2), SHORT ROOT (SHR) y SCARECROW (SCR). Además, encontramos que el efecto negativo del etileno y en particular de CTR1 sobre la actividad del meristemo, se integra con el transporte polar de auxinas *in vivo* mediante la actividad del transportador de AIA, PIN FORMED2 (PIN2). Este estudio propone que la interacción auxinas-etileno es crítica para el desarrollo indeterminado de la raíz.

Palabras Clave: regulación genética, fisiología vegetal, fitohormonas, raíz primaria, meristemo.

ABSTRACT

Plants exhibit a sesile condition and thus are exposed throughout their life span to constantly changing conditions in their environment, which are frequently challenging for them. To cope with these adverse situations, they display an indeterminate developmental program, characterized by organogenesis as the basis for post-embryonic growth. This is opposed to the determinate development of animals, whose architecture is completed during the embryonic phase.

Indeterminate development is sustained by meristems, regions with mitotically active cells that remain undifferentiated for extensive periods, and even the whole life cycle. This developmental strategy renders plants highly plastic such that most species are able to modulate their growth when conditions are not favorable. Understanding the mechanisms and genetic factors underlying indeterminate growth represents a major goal for plant physiologists and molecular biologists.

Environmental sensing occurs through the synthesis of a wide and diverse group of chemical compounds denominated growth regulators or phytohormones that activate signalling cascades and ultimately modify gene expression. Root system development begins with the embryonic formation of a primary root and the regulators auxin and ethylene play an important role in this process. Several signaling elements are known to be shared by both compounds, yet, major issues about the involvement of ethylene signalling pathway components in the maintenance and activity of the primary root meristem remain elusive, since its regulation has been traditionally attributed to auxins.

The present research assessed the role of the kinase protein CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1), a negative regulator of ethylene response, and demonstrates its function for root meristem maintenance. Interestingly, it was found an IAA independent control over the expression of a group of transcription factors that include *PLETHORA1* and *2* (*PLT1* and *2*), *SHORT ROOT* (*SHR*) and *SCARECROW* (*SCR*), whose protein products control meristem function. Moreover, we found that ethylene, and more specifically CTR1, is integrated *in vivo* by the IAA transporter protein PIN FORMED2 (*PIN2*). Our study shows that auxin-ethylene crosstalk is responsible of root indeterminacy.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas están expuestas a una serie de factores ambientales altamente variables. Para adaptarse a dichas condiciones, producen diversos compuestos biológicamente activos que regulan cascadas de señalización y que modifican en última instancia la expresión genética. Estas son conocidas en conjunto como fitoreguladores (Santner *et al.*, 2004).

El sistema radicular es importante para las plantas pues les brinda anclaje al suelo y participa en la adquisición de agua y nutrientes. De sus componentes, la raíz primaria es la primera estructura formada después de la germinación y debido a la actividad mitótica en una región en su ápice llamada meristemo, representa la fuente celular que abastece su crecimiento y la posterior formación del resto de órganos, a cuyo conjunto y forma conocemos como arquitectura de la raíz (Smith y De Smet, 2012).

El etileno y las auxinas desempeñan un papel importante en la formación de la raíz primaria. Tanto los componentes genéticos de las rutas de síntesis y señalización para los dos compuestos, así como algunos de los aspectos del desarrollo que controlan, han sido ampliamente estudiados en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Resulta evidente la existencia de elementos convergentes en diferentes aspectos, incluyendo la biosíntesis, el transporte y la percepción del etileno y las auxinas. A la fecha, dichos mecanismos permanecen bajo investigación. Uno de estos elementos es la proteína CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1), cuya expresión regula de manera negativa la señalización del etileno y ha sido implicada en el control del programa de elongación celular, promoviendo la síntesis de ácido indol-3-acético (AIA) (Woodward y Bartel, 2005; Blillou *et al.*, 2005; Strader *et al.*, 2009; Le *et al.*, 2001).

La caracterización fenotípica de la raíz primaria en *ctr1* y otras mutantes de *A. thaliana* afectadas en las rutas de síntesis y señalización de etileno, indica un papel importante e independiente al del AIA en el mantenimiento de la actividad del meristemo de la raíz primaria y el desarrollo indeterminado. Así, mediante un enfoque genético y fisiológico, este trabajo pretende generar información que esclarezca dicha posibilidad, así como de los componentes y los mecanismos que puedan estar implicados.

2. ANTECEDENTES

2.1. Las plantas

A pesar de las muy diversas adaptaciones existentes en los diferentes subórdenes que integran al reino vegetal (*Plantae*) y de la gran cantidad de especies descritas, que a la fecha ascienden a alrededor de 374,000; poseen todas características fundamentales unificadoras. Entre estas podemos destacar que son organismos multicelulares compuestos por células eucariontes recubiertas por una pared celular compuesta principalmente por celulosa, que son organismos autótrofos que sintetizan carbohidratos mediante la fotosíntesis, y que aunque no pueden desplazarse, pueden orientar su crecimiento hacia fuentes esenciales de recursos como la luz, el agua y los nutrientes minerales (Christenhusz y Byng, 2016; Taiz y Zeiger, 2002).

Las plantas vasculares desarrollaron un plano corporal que consta de dos partes fundamentales, el sistema aéreo y el sistema radicular. La porción aérea está compuesta por los tallos y hojas que representan el sitio donde se lleva cabo la fotosíntesis, y portan las estructuras reproductivas. El sistema radicular se compone de una raíz primaria y raíces laterales de diferentes órdenes que les permiten el anclaje al suelo y además llevan a cabo la captación de agua y de nutrientes. Ambos sistemas están interconectados por tejidos conductores que transportan agua y nutrientes desde las raíces a la parte aérea y los productos fotosintéticos en el sentido inverso (Smith y De Smet, 2012; Himanen *et al.*, 2002).

Debido a que son los productores primarios de la mayoría de los ecosistemas y la fuente principal del oxígeno atmosférico que permite el sustento de gran parte de los organismos vivos, las plantas son especímenes valiosos e interesantes para el estudio de procesos genéticos, celulares, fisiológicos, morfogenéticos y adaptativos.

2.2. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

A partir de una serie de trabajos clásicos que datan de las décadas de 1960 y 70, *A. thaliana* se ha convertido en la especie predilecta para el estudio de la genética y el desarrollo de los vegetales. Se trata de una angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia Brassicaceae, originaria de regiones templadas de Eurasia y África. En la naturaleza se comporta como una herbácea anual cuya reproducción se basa principalmente en la autopolinización. Debido a estas condiciones, posee un ciclo de vida bastante corto, una talla manipulable para su crecimiento *in vitro* y una prolífica producción de semillas (Pigliucci, 2002; Malamy, 2005).

La gran cantidad de trabajos realizados con ella han permitido que actualmente se encuentren secuenciados al menos 119 de las 125 Mb que componen su genoma, organizado en aproximadamente 26,000 genes y 5 cromosomas bien caracterizados. Esto ha permitido determinar la función de numerosos genes mediante la generación de una extensa colección de líneas mutantes, que aunada a la alta eficiencia que presenta para diversas técnicas de transformación genética, la convierten en un excelente modelo biológico (Bevan y Walsh, 2005; The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

2.3. El sistema radicular de *A. thaliana*

El desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis* inicia en la etapa embrionaria con la formación de la raíz primaria, la cual funciona como órgano pivotante del que se originan raíces laterales que pueden ramificar en diversos órdenes para aumentar la capacidad exploratoria y así optimizar la obtención de agua y nutrientes. Existe además otro tipo de órganos conocidos como raíces adventicias, que tienen funciones similares en el soporte, exploración y captación de recursos pero tienen un origen independiente a la raíz primaria (Smith y De Smet, 2012).

La raíz primaria consta de tres zonas diferentes, según el tipo y la actividad de las células que las componen. La primera de ellas llamada zona meristemática, se localiza en el ápice y está constituida por un grupo central de células conocido como nicho de células iniciales, que como se analizará con mayor detalle en el subtema siguiente, mantienen características embrionarias y se dividen mitóticamente, auto-renovándose en cada ciclo de división. Las células hijas de las iniciales se dividen en rondas posteriores, por lo que son desplazadas cada vez más lejos del nicho. A medida que esto sucede, su capacidad mitótica disminuye y comienzan a aumentar lentamente de tamaño en sus tres dimensiones (Ivanov y Dubrovsky, 2013). Mientras la actividad del meristemo se mantenga intacta, las células producidas alcanzan la zona de elongación, donde el crecimiento de las células ocurre preferentemente en su eje apical-basal hasta alcanzar una longitud de entre 10 y 20 veces mayor que aquellas del meristemo. Este aumento de tamaño correlaciona con la formación de una vacuola central y un aumento en la actividad metabólica. Una vez alcanzado su tamaño final, entran en la zona de diferenciación, donde adquieren las funciones específicas del tejido al que corresponden (Scheres *et al.*, 2002). En la Figura 1 se muestran dos acercamientos de la región apical de la raíz primaria en cortes longitudinales que evidencian estas zonas (A), y su disposición tisular (B).

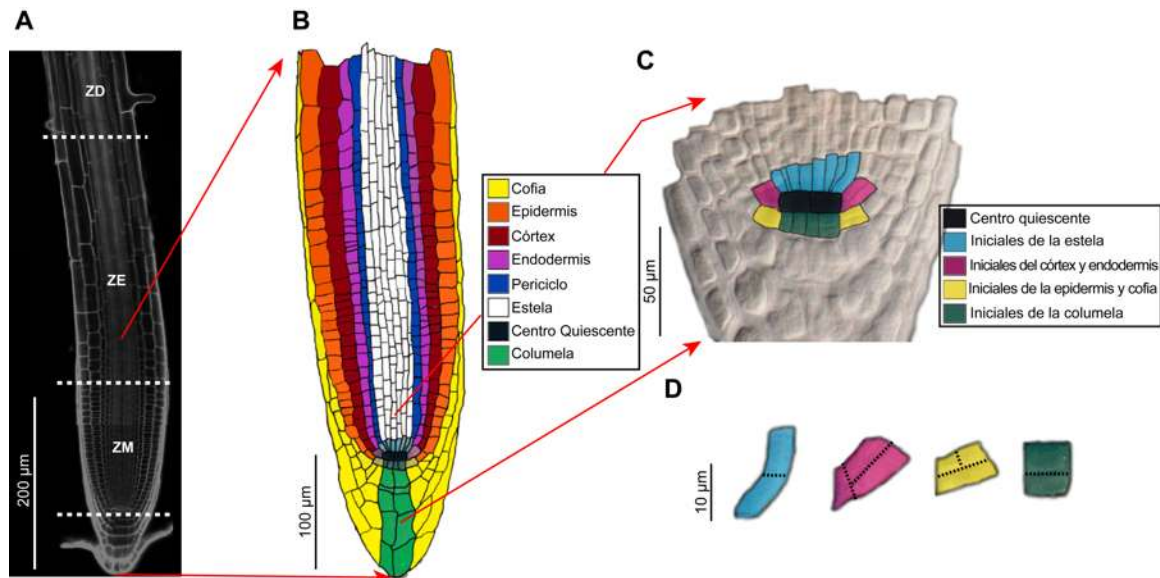


Figura 1. Morfología y anatomía de la raíz primaria de *A. thaliana*. (A) Corte longitudinal de la raíz primaria mostrando las diferentes zonas de la raíz: ZM zona meristemática, ZE zona de elongación y ZD zona de diferenciación. Nótese la diferencia en la longitud celular entre ZM y ZE y la presencia de pelos radiculares en ZD. (B) Corte longitudinal y acercamiento mostrando la disposición tisular de la raíz primaria. (C) Acercamiento del nicho de células iniciales del meristemo de la raíz primaria mostrando las células que lo componen. (D) Células iniciales con los patrones de división característicos para cada una, mostrados en líneas negras. Barra de escala para (A)=200 µm, (B)= 100 µm, (C)=50 µm.

Las raíces laterales se originan a partir de un tejido llamado periciclo localizado internamente en la raíz primaria. De manera general la formación de estas estructuras se puede dividir en cuatro etapas principales: 1) la estimulación y des-diferenciación de células del periciclo, 2) divisiones celulares periclinales (paralelas respecto al plano de crecimiento del periciclo) y anticlinales (perpendiculares respecto al periciclo) que forman un primordio, 3) emergencia del primordio y 4) activación de un meristemo de la raíz lateral que permite continuar su crecimiento y desarrollo (Malamy y Benfey, 1997; Casimiro *et al.*, 2001). Finalmente, las raíces adventicias se originan en la parte aérea de la planta, en el hipocotilo o tallo, como respuesta a condiciones de estrés y ante variaciones en las concentraciones de auxinas y otros fitoreguladores (Falasca y Altamura, 2003).

Las zonas meristemática, de elongación y de diferenciación están presentes tanto en las raíces laterales como en las adventicias. Las zonas de diferenciación pueden ubicarse por la presencia de pelos radiculares, los cuales se originan en células de la epidermis conocidas como tricoblastos. Su función es la de ampliar la superficie de contacto de las raíces con el suelo, optimizando la captación de agua y nutrientes. El mecanismo que especifica la identidad de los tricoblastos está determinado por la posición de las células epidérmicas con respecto a las células corticales; aquellas en contacto con 2 células corticales forman pelos radiculares

mientras que las adyacentes a una sola célula cortical no lo harán. La formación del pelo radicular requiere la expansión de la pared celular del tricoblasto mediante enzimas celulasas y expansinas, así como un reacomodo del citoesqueleto (Dolan *et al.*, 1994; Foreman y Dolan, 2001; Lee y Schiefelbein, 2002).

2.4. El meristemo apical de la raíz primaria

Las plantas presentan un desarrollo conocido como indeterminado, en el que la organogénesis es la base de los cambios morfológicos post-embrionarios y ocurre en los sistemas aéreo y radicular (Nawy *et al.*, 2005). El desarrollo indeterminado es posible gracias a la actividad mitótica en los meristemos, que da origen a las células que sustentan el crecimiento de los diferentes tejidos y órganos. Los meristemos se mantienen mediante una población celular conocida como nicho de células iniciales, que comparten con las células madres de los animales la capacidad de auto renovación y la ausencia de diferenciación celular (Aichinger *et al.*, 2012; Scheres, 2007).

En el meristemo apical de la raíz primaria de *A. thaliana*, el nicho de células iniciales está compuesto por un grupo de 4 a 8 células centrales llamado centro quiescente, rodeado de 4 tipos diferentes de células troncales multifuncionales, o iniciales (Scheres *et al.*, 2002). El centro quiescente posee un índice mitótico bajo y mediante experimentos en los que se elimina, ya sea por daño mecánico o mediante un láser, ha quedado claro que se originan en él señales que reprimen la diferenciación celular del resto del nicho y que funcionan como un reservorio que permite regenerar a las células iniciales que pudiesen sufrir daños durante el crecimiento. Su baja tasa proliferativa puede explicarse como un mecanismo preventivo de errores en la replicación del genoma pues mientras las células meristemáticas en general presentan una hipersensibilidad ante agentes mutágenicos como la zeocina o la bleomicina, o la radiación UV, el centro quiescente es altamente resistente y sobreexpresa genes responsables de la reparación del ADN (Fulcher y Sablowski, 2009; Curtis y Hays, 2007; Heyman *et al.*, 2014). Las células iniciales se ubican de manera particular respecto al centro quiescente, según la direccionalidad correspondiente del tejido que originarán. En cada división se producen dos células hijas; aquella en contacto con el centro quiescente mantiene la identidad original mientras que la otra se dividirá nuevamente y posteriormente se alargará y diferenciará.

En la Figura 1C, se aprecia que por encima del centro quiescente se localizan de 6 a 8 iniciales de la estela con un patrón de división periclinal que da origen a los haces vasculares y al periciclo. En ambos lados en la parte superior dos iniciales originan el cortex y la endodermis mediante divisiones anticlinales. Hacia ambos lados de la parte inferior se encuentran las iniciales de la epidermis y de la cofia,

que se dividen primero periclinalmente; la célula hija que no conserva la identidad de inicial formará la cofia y la nueva inicial pasa por otra división anticlinal que la renovará y dará origen a la epidermis. Finalmente, por debajo se ubican 4 iniciales de la columela que se dividen periclinalmente para dar origen a este tejido cuya finalidad es la de proteger al meristemo y de llevar a cabo la percepción del estímulo gravitatorio. En la figura 1D se observa en una ampliación de cada uno de los tipos de células iniciales con los patrones de división característicos mencionados en las líneas anteriores (Overvoorde *et al.*, 2010; Bitonti y Chiappetta, 2011).

2.5. Reguladores del crecimiento vegetal

Los procesos del crecimiento y del desarrollo vegetal dependen de la integración de señales ambientales y endógenas, que junto con un programa genético determinan su morfología (Gray, 2004). Los reguladores del crecimiento vegetal o fitohormonas son un conjunto heterogéneo de sustancias químicas producidas endógenamente en bajas concentraciones, que integran cada uno de los estímulos percibidos por las plantas y activan cascadas de señalización que modifican en última instancia la expresión de los genes responsables de los caracteres fenotípicos que les brinden la mejor adaptación posible (Su *et al.*, 2017). De manera general y resumida mencionaremos a los reguladores del crecimiento vegetal que han sido mejor estudiados, así como los procesos en los que intervienen. Las auxinas están implicadas en la regulación de la división y expansión celular, así como en el desarrollo de las raíces laterales y pelos radiculares y la dominancia apical. Las citocininas promueven la división celular en los meristemos y participan en los procesos de germinación y senescencia. El etileno participa en la regulación de las divisiones celulares del meristemo y en la elongación de la raíz primaria, además de promover el desarrollo sexual, la maduración de los frutos y orquestar diferentes respuestas a estrés. El ácido abscísico es un promotor de la latencia de las semillas y participa de forma importante en respuestas adaptativas a estrés. El ácido jasmónico participa también en la regulación de respuestas a estrés y es mejor conocido por desencadenar diferentes mecanismos de defensa. Los brasinoesteroides participan en la regulación de la expansión celular y la fotomorfogénesis. El ácido salicílico es junto con el ácido jasmónico un importante modulador de respuestas de defensa. Las estrigolactonas participan en la regulación de respuestas adaptativas a estrés abiótico (Su *et al.*, 2017; Gray, 2004; Santner *et al.*, 2009; Pacifici *et al.*, 2015).

El número de moléculas con función señalizadora ha ido en aumento con el desarrollo en las técnicas químicas de identificación y cuantificación, así como con el estudio de los procesos del desarrollo siendo influenciados. Actualmente se

reconocen al ácido jasmónico, los brasinoesteroides, el ácido salicílico, las *N*-acil etanolaminas, las estrigolactonas, el glutamato, el ácido nítrico y las especies reactivas de oxígeno como mensajeros celulares en diferentes aspectos de la fisiología vegetal (López Bucio *et al.*, 2006; Pitzschke *et al.*, 2006; Morquecho Contreras y López Bucio, 2007; Santner *et al.*, 2009).

2.6. Las auxinas

Las auxinas conforman un amplio grupo de sustancias, de las cuales el ácido indol-3-acético (AIA) es la más abundante y fisiológicamente relevante en las plantas. Su molécula consiste de un grupo indol (compuesto por un anillo aromático unido a un anillo pirrólico) y un grupo carboxilo que le otorga una carga negativa, en su carbono tres (Taiz y Zeiger, 2002).

2.6.1. Biosíntesis y transporte

Se han descrito dos rutas de síntesis de AIA en plantas, una que inicia con el aminoácido triptófano (Trp) como precursor, y otra independiente de éste (Ouyang *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2008). De aquellas dependientes de Trp, se conocen cuatro ramificaciones, con intermediarios químicos diferentes, y unque estas últimas convergen en diferentes pasos enzimáticos, la más común y fisiológicamente activa es la ruta del ácido indol-3-pirúvico (AIP) (Taiz y Zeiger, 2002; Mano y Nemoto, 2012).

Un primer paso enzimático mediado por la Trp trans-aminasa cataliza la separación del grupo amina del Trp para formar AIP. Posteriormente, una AIP descarboxilasa genera indol-3-acetaldehído (IAId), que en última instancia es oxidado por la IAId deshidrogenasa para producir AIA (Taiz y Zeiger, 2002, Saini *et al.*, 2013). La síntesis de AIA está asociada con todos los eventos del desarrollo vegetal pero es mayor en meristemas y tejidos aéreos en crecimiento, semillas en proceso de germinación, así como en los meristemas, incluido el de la raíz primaria. En esta última, se tiene evidencia de un sitio de síntesis en el nicho de células iniciales, así como en la columnela (Ikeda *et al.*, 2009, Casimiro *et al.*, 2001).

La actividad auxínica depende de su concentración celular y tisular, por lo que posterior al proceso biosintético, se requiere un mecanismo para la formación de gradientes, que pueda satisfacer esta condición. Hay dos tipos de transporte de auxinas. El primero es pasivo y ocurre a través del floema, donde el AIA producido en la parte aérea de la planta puede viajar en disolución, a distancias relativamente largas. El AIA es un ácido débil ($pK_a = 4.75$) y en el apoplasto de los tejidos donde se deposita, que es relativamente ácido ($pH=5$), se encuentra tanto en forma protonada (IAAH) como disociada ($AIA^- + H^+$). El IAAH puede difundir a

través de las membranas celulares bajo gradientes de concentración, y en el citosol con un pH cercano al 7, se disocia casi en su totalidad. Debido a que el AIA^- no puede salir pasivamente, tiende a acumularse en las células, induciendo las respectivas respuestas fisiológicas (Taiz y Zeiger, 2002).

En procesos demandantes de AIA o que ocurren a distancias cortas respecto a otros sitios de síntesis, donde los gradientes necesitan formarse frecuentemente en dirección opuesta a la atracción gravitatoria, la difusión de AIAH proveniente de los órganos aéreos de la planta resulta insuficiente, por lo que la síntesis localizada aporta cantidades adicionales de auxinas. Otro tipo de transporte es llamado polar, pues añade el aspecto de direccionalidad, e involucra la actividad de dos clases de permeasas co-transportadoras de protones que utilizan el gradiente electroquímico formado a través de la membrana plasmática como fuente de energía (Friml, 2003). La primera clase está constituida por proteínas importadoras de AIA^- del medio extracelular, como AUXIN RESISTANT1 (AUX1) y LIKE AUX1 (LAX), cuya localización en la membrana celular es uniforme en toda la célula; la segunda está compuesta por un conjunto de proteínas exportadoras del AIA^- del citosol, de las cuales las mejor caracterizadas son las proteínas PIN-FORMED (PIN). Estas últimas están codificadas por una familia de 8 genes, de los cuales 5 (*PIN1*, 2, 3, 4 y 7) tienen actividad en la raíz. La expresión de algunos de estos elementos es específica en ciertos tejidos, mientras que en otros muestran actividad redundante, y su localización en la membrana celular es diferencial respecto a los planos apical-basal y lateral de las células, dando origen a un flujo auxínico con un patrón multidireccional, esquematizado en la Figura 2A (Křeček *et al.*, 2009).

El transporte polar es un proceso sofisticado e involucra la participación de toda una maquinaria genética que regula la formación de complejos entre las proteínas PIN y otras proteínas, como los transportadores de las familias ATP-BINDING CASSETTE (ABCB's)/ P-GLYCOPROTEIN (PGP's), y otras, involucradas en el transporte vesicular de dichos elementos desde los sitios intracelulares de síntesis, así como la correcta localización de éstos en la membrana celular, proceso en el cual la proteína GNOM (GN) es importante, y la posterior degradación de las mismas (Nagashima *et al.*, 2008; Kleine-Vehn *et al.*, 2008; Grunewald y Friml, 2010). Además de la acumulación de AIA en el citosol, la traducción de las proteínas PIN está regulada por diversos factores ambientales, así como por la interacción con vías de señalización de otros fitoreguladores. Entre los intermediarios moleculares que acoplan estas señales, se conoce la actividad de cascadas accesorias de señalización compuestas por un grupo de proteínas, conocidas como MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAPK's) (Dai *et al.*, 2006). En particular para el meristemo de la raíz primaria, *PIN1* se

expresa en el cilindro vascular y endodermis, y su localización basal en estas células crea un flujo de AIA^- en dirección basipétala (hacia la punta de la raíz). *PIN2* por su parte se expresa en el cortex (en posición basal) y epidermis (posición apical y lateral) y crea un flujo bidireccional. En conjunto, la expresión de estos dos transportadores permite localizar el transporte polar de auxinas abarcando todo el ancho de la zona meristemática.

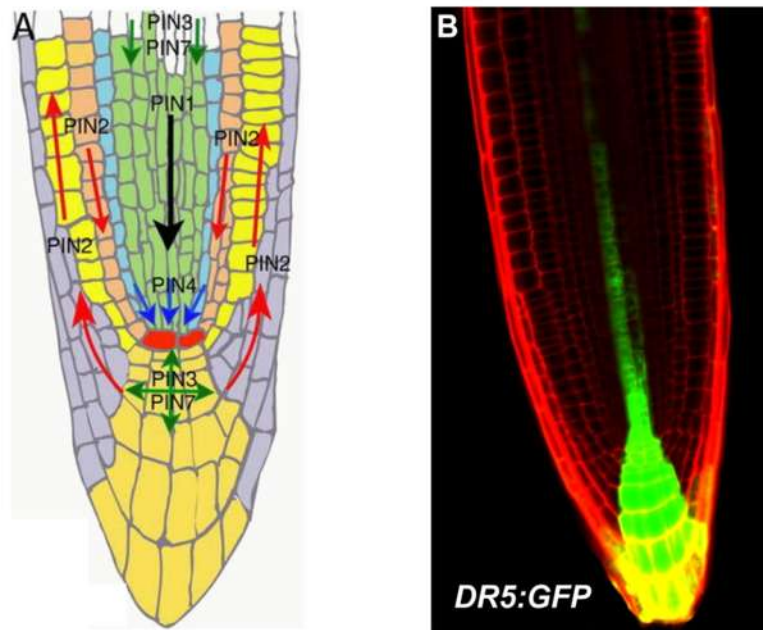


Figura 2. El transporte polar de AIA y el máximo de auxinas. (A) Dirección del flujo polar de AIA^- dado por los patrones de expresión y localización sub-celular de las proteínas exportadoras *PIN1*, 2, 3, 4 y 7, representado por flechas negras, verdes, azules y rojas. (B) Fotografía obtenida por microscopía confocal, de la expresión del reportero de actividad auxínica *DR5::GFP*, en verde, en una planta con fondo genético Col-0, mostrando el máximo de auxinas a los 7 d.d.g.; en rojo se muestran las paredes celulares teñidas con yoduro de propidio. Aumento= 60X (Modificado de Overvoorde *et al.*, 2010).

2.6.2. Mecanismo de percepción y señalización de auxinas

Cuando la concentración intracelular de AIA alcanza cierto nivel, sus moléculas se acoplan con las del receptor TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 (TIR1) y los de la familia AUXIN SIGNALING F-BOX (AFB's), que corresponden a elementos de reconocimiento de un complejo proteínico de ligasas de ubiquitina tipo Skp/Cullin/F-box (SCF), asociado a la membrana nuclear (Abel y Theologis, 1996; Ulmasov *et al.*, 1997a,b; Guilfoyle, 2007). Una vez activado el complejo, las proteínas AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA) ubicadas corriente abajo en la ruta, son marcadas para proteólisis y su degradación permite la función de diversos factores de transcripción conocidos como AUXIN RESPONSE FACTORS

(ARFs), que finalmente controlan la expresión específica de genes responsables de los efectos fisiológicos respectivos. Tanto el complejo que incluye al receptor como las proteínas AUX/IAA, funcionan como reguladores negativos de la ruta (Gray *et al.*, 2001).

En concentraciones limitantes de AIA, las AUX/IAA forman complejos con una serie de proteínas accesorias de las cuáles TOPLESS (TPL) es la mejor caracterizada, reprimiendo la transcripción de los ARFs (Santner *et al.*, 2009).

El modelo vigente del mecanismo de señalización se encuentra esquematizado en la Figura 3. Si bien este es el modelo mejor conocido para explicar la mayoría de los procesos en los que participa el AIA, cabe señalar que algunas respuestas, como la elongación celular y el flujo de iones en la membrana plasmática, son reguladas a través de mecanismos independientes a los receptores TIR1 y AFB1-5 (Schenck *et al.*, 2010). Sin embargo la búsqueda de los elementos señalizadores responsables de estas respuestas permanece bajo investigación pues algunas de las proteínas putativas propuestas han generado resultados en ocasiones contradictorios, como es el caso de la proteína AUXIN BINDING PROTEIN1 (ABP1) que fue propuesta primariamente como un receptor de AIA que mediaba los procesos de elongación celular (Cheng *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2002; Ljung, 2013) y que análisis genéticos de mutantes nulas han refutado su participación en proceso alguno regulado por auxinas (Gao *et al.*, 2015).

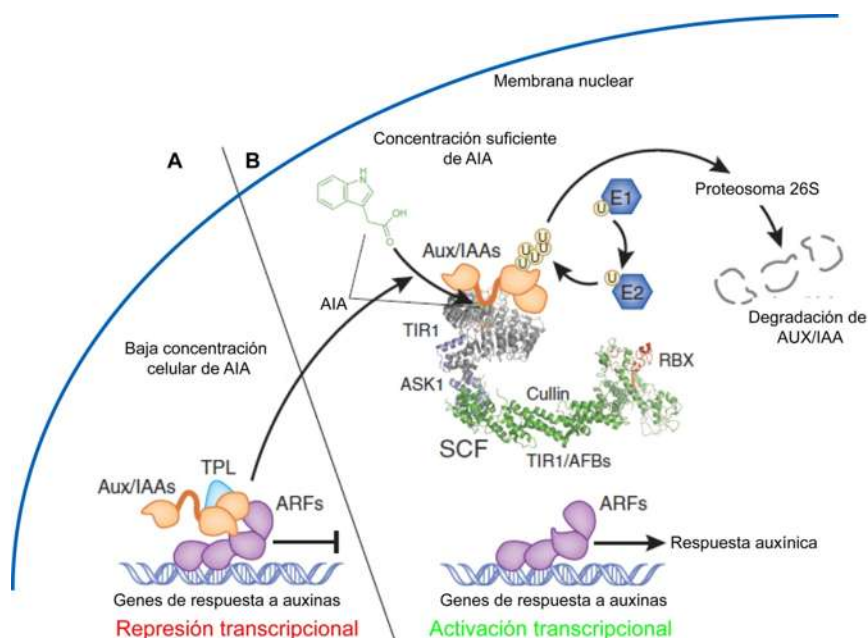


Figura 3. Vía de señalización del AIA en *A. thaliana*. (A) En concentraciones limitantes de AIA, las proteínas de la familia AUX/IAA en complejo con co-represores como TOPLESS (TPL), se unen a los activadores transcripcionales ARFs. Esta unión reprime la transcripción de genes de respuesta a auxinas (B) Cuando la concentración celular de AIA aumenta, se promueve la

ubiquitinación y posterior degradación de las proteínas represoras AUX/IAA mediante el proteosoma 26S, liberando a los ARFs y permitiendo así la transcripción de los genes de respuesta al regulador (Modificado de Santner *et al.*, 2009).

2.6.3. Papel de las auxinas en el desarrollo de la raíz primaria

En concentraciones bajas, el AIA tiene un efecto promotor de la elongación de la raíz primaria, así como de la formación de raíces laterales. De manera dosis dependiente, el aumento de la concentración inhibe la elongación y promueve el desarrollo de pelos radiculares y raíces laterales. Un gradiente auxínico en la zona meristemática y de elongación de la raíz primaria, conocido como máximo de auxinas, puede ser evidenciado por el patrón de expresión de un elemento sintético de respuesta a auxinas llamado *DR5* fusionado al transgen reportero que codifica para la proteína verde fluorescente en plantas con genotipo silvestre (Col-0), que es inducible ante el aumento en las concentraciones del regulador y cuyo patrón de expresión puede visualizarse en la Figura 2B. La formación de este gradiente está mediada tanto por la síntesis como por el transporte polar del AIA y es importante para la expresión de diferentes elementos de respuesta a auxinas; necesarios para la conservación de la identidad del nicho de células iniciales (Woodward y Bartel, 2005).

La correcta expresión así como localización membranal de las proteínas exportadoras PIN, es necesaria para la formación del máximo de auxinas. Las líneas mutantes con pérdida de función de uno o más de estos elementos muestran alteraciones en el fenotipo de la raíz primaria, incluyendo las respuestas al estímulo gravitrópico y al etileno (Blilou *et al.*, 2005). De la misma manera, la aplicación de ácido naftiltalámico (NPA), que interfiere con el transporte vesicular y con la actividad de proteínas necesarias para la localización membranal de las proteínas PIN, provoca una acumulación auxínica en las zonas meristemática y de elongación afectando el crecimiento y la respuesta al estímulo gravitrópico (Bandyopadhyay *et al.*, 2007; Titapiwatanakun y Murphy, 2009).

Una proteína expresada en respuesta a auxinas llamada WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5), cuya traducción ocurre específicamente en el centro quiescente, forma parte de un complejo de factores necesarios para la funcionalidad del mismo. Está codificada por un miembro de una familia genética llamada *HOMEBOX (HOX)* que posee una secuencia de 180 pares de bases altamente conservada en todos los eucariontes. Los factores de transcripción de 60-70 aminoácidos codificados por éstos, participan en la formación y organización de los patrones de división celular implicados en la morfogénesis, de esta manera WOX5 nos marca la identidad del centro quiescente. En el resto de células del nicho, la expresión genética está estrictamente regulada por otros elementos de respuesta a auxinas, como *ARF10* y *ARF16* (Ding y Friml, 2010). Si

bien *WOX5* no se expresa en el resto del nicho, funciona como una señal celular no autónoma, es decir, que migra vía apoplasto a éstas, donde regula la expresión de genes necesarios para mantener el estado indiferenciado. La mutante con pérdida de función de *WOX5* (*wox5-1*), tiene un centro quiescente con menos células que presentan mayor tamaño, y la raíz muestra diferenciación ectópica en las iniciales de la columnela, misma que sucede en el resto del nicho de células iniciales y conlleva a la terminación del crecimiento en tiempos tempranos (Sarkar *et al.*, 2007). La expresión de *WOX5* se reprime en respuesta al bloqueo del transporte polar de auxinas mediante tratamientos con NPA (Ding y Friml, 2010).

Otros elementos de respuesta a auxinas están codificados por 4 genes llamados *PLETHORA* (*PLT 1-4*). Estos se localizan corriente abajo de *WOX5* en las cascadas de señalización que definen la identidad del centro quiescente y el nicho de células iniciales (Ding y Friml, 2010). Su expresión ocurre en todo el meristemo y promueve de manera dosis-dependiente la expresión de la proteína CICLINA B1 (CycB1), implicada en la transición de las fases G2 a M del ciclo celular, así como otras ciclinas y cinasas dependientes de éstas (Chapman y Stele, 2009; Saini *et al.*, 2013). Se ha demostrado también que los factores de transcripción *WOX5* y *PLTs*, reprimen la diferenciación de las células iniciales y sus células hijas mediante la inducción de la transcripción de los genes que codifican para las proteínas HISTONE-DEACETYLASE19 (*HDA19*) y DOF-FACTOR 4 (*CDF4*) (Tanaka *et al.*, 2007; Pi *et al.*, 2015).

Las proteínas *PLT* forman parte de la familia de factores de transcripción *APETALA 2* (*AP2*), caracterizada por dos subunidades conservadas: un elemento *YRG* de aprox. 20 aminoácidos hidrofílicos en el extremo N y un elemento *RAYD* del cual 18 aminoácidos forman una hélice alfa anfipática de unión a ADN (Saleh y Pagés, 2003). Mutantes individuales con pérdida de función de *PLT* (*plt1*, *plt2*, *plt3* y *plt4*) muestran una inhibición moderada en la elongación de la raíz primaria, diferentes grados de inducción de la división de centro quiescente y de la represión de la actividad mitótica en el meristemo, así como alteraciones en los respectivos tamaños de éstos. Además exhiben eventos de diferenciación ectópicos en las iniciales de la columela y desarrollan raíces primarias con crecimiento indeterminado. Por el contrario, la doble mutante *plt1plt2* presenta meristemos con poca actividad mitótica, y entre los días 6 y 8 después de la germinación (d.d.g.); un alto porcentaje de plántulas tienen sus iniciales y meristemos completamente diferenciados y sus raíces entran en un programa de desarrollo determinado. Los resultados mencionados anteriormente, ponen de manifiesto que la actividad de estos factores es altamente redundante y necesaria para el mantenimiento del meristemo (Ding y Friml, 2010; Aida *et al.*, 2004). Por otra parte, la acción conjunta de los transportadores *PIN* expresados en la raíz

primaria funciona como un elemento restrictivo del dominio de expresión de los genes *PLT*, que a su vez funcionan como reguladores de la transcripción de las proteínas PIN (Blilou *et al.*, 2005).

2.6.4. Circuito regulatorio *SHORTROOT/SCARECROW*

Otro nodo regulatorio de la identidad del centro quiescente e iniciales cuya expresión no está regulada por auxinas, está compuesto por dos factores de transcripción de la familia GRAS (nombrada así por las iniciales de sus tres primeros miembros descritos, GIBBERELLIC-ACID INSENSITIVE, REPRESSOR of GAI y SCARECROW) que incluye proteínas de entre 400-700 aminoácidos con motivos altamente conservados en su grupo carboxilo, ubicados corriente arriba de *WOX5* y paralelamente con el circuito regulatorio AIA-*PLT*; llamados *SHORT ROOT* y *SCARECROW* (*SHR* y *SCR*). La transcripción y traducción de *SHR* se llevan a cabo exclusivamente en las células fundadoras del cilindro vascular y sus iniciales, pero su producto proteico difunde al centro quiescente y a las iniciales de cortex y endodermis, donde promueve la expresión de *SCR* (Nakajima *et al.*, 2001; Aida *et al.*, 2004). *SCR* interactúa a su vez con *SHR* para promover la localización nuclear del complejo en el centro quiescente (Wilson *et al.*, 2013). La pérdida de función en estos genes causa defectos progresivos en la división de las células iniciales por la desorganización y pérdida de identidad del centro quiescente, que además implica la pérdida de expresión de *WOX5* y la posterior diferenciación del meristemo (Benfey *et al.*, 1993, Sozzani *et al.*, 2010). Además, la actividad de estos factores de transcripción promueve y especifica las divisiones asimétricas características de las iniciales del cortex y de la endodermis (Aida *et al.*, 2004). Los análisis de la expresión de genes específicos del centro quiescente han revelado que parte de los blancos de los factores de transcripción *PLT*, *SHR* y *SCR* en el centro quiescente son compartidos (QC25, QC46), mientras que otros son independientes (QC184, *WOX7*), por lo que se ha establecido que estos dos mecanismos (*PLT*'s y *SHR/SCR*) funcionan de manera paralela y son necesarios para la manutención del nicho de células iniciales (Cui *et al.*, 2011; Aida *et al.*, 2004).

2.7. El etileno

El etileno (C_2H_4 , P.M.=28 g/mol) es un hidrocarburo sencillo en estado gaseoso. Sus dos átomos de carbono se encuentran unidos mediante un doble enlace y cada uno a su vez con dos átomos de hidrógeno por enlaces sencillos. Todos los tejidos vegetales tienen la capacidad de sintetizar etileno, preferentemente en zonas meristemáticas, semillas en germinación, órganos reproductivos, así como en respuesta a estrés ambiental, defensa y senescencia (Taiz y Zeiger, 2002).

2.7.1. Biosíntesis

El precursor del etileno es el aminoácido metionina, que en un primer paso enzimático se conjuga con una molécula de ATP por medio de la S-adenosil-metionina sintasa, para formar S-AdoMet. Posteriormente, una ácido1-carboxílico-1-aminociclopropano sintasa (ACS) cataliza por una parte la separación de un grupo metilo (CH₃-S) que se exporta al ciclo de Yang para producir nuevamente metionina, y por otra, la producción de ACC (Kende, 1989). Este paso es limitante de la tasa de síntesis de etileno ya que la producción de ACC está codificada por una familia multigenética (ACS1-12), cuya expresión está regulada diferencialmente por diversos estímulos ambientales y otros fitoreguladores (Chae *et al.*, 2003; Abeles *et al.*, 1992). Se conoce un proceso regulatorio de la expresión de ACS2 y ACS6 mediado por MAPK's (Hahn y Harter, 2009). En un último paso, el ACC es oxidado por la ACC oxidasa para formar etileno.

2.7.2. Señalización

Las características químicas del etileno le permiten difundirse libremente a través de membranas y paredes celulares, y es percibido por una familia de receptores en la membrana del retículo endoplásmico, de los cuales ETHYLENE RECEPTOR1 (ETR1) es el mejor caracterizado (McDaniel y Binder, 2012). Posee un dominio de unión a cobre, el cual es donado por el transportador *RAN1* y conforma el sitio de unión a etileno. Además, posee dominios de actividad cinasa con especificidad por residuos de histidina. En ausencia de etileno, ETR1 forma un complejo proteínico con otros receptores como ETR2, EIN4, ERS1 y ERS2 y al menos para el primero, se sabe que fosforila y mantiene con una conformación activa a la proteína cinasa CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1). Una vez acoplada la molécula de etileno, el complejo se disocia y CTR1 se inactiva, permitiendo el inicio propiamente dicho de la cascada de señalización. Por esta razón, tanto *ETR1* como *CTR1* funcionan como reguladores negativos de la ruta (Kieber *et al.*, 1993).

La existencia de más de un regulador responde al hecho de que el desacoplamiento de las moléculas de etileno de ETR1 es un proceso bioquímico que puede tomar hasta 12 horas, por lo que de ser el único provocaría que el sistema fuera saturable y se volviese insensible si la producción de etileno es prolongada; lo cual de hecho sucede *in vivo* bajo condiciones de estrés y ataques por patógenos. Así, la presencia de los demás receptores asegura una regulación precisa que se ve incrementada por una rápida degradación de los receptores y la transcripción de los genes que los codifican. Sin embargo, la interacción directa del resto de receptores con CTR1 no ha sido comprobada a la fecha, lo que sugiere que existen mecanismos de señalización independientes a CTR1

(Stepanova y Alonso, 2009; Galinha *et al.*, 2007; Blilou *et al.*, 2005; Vieten *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2014).

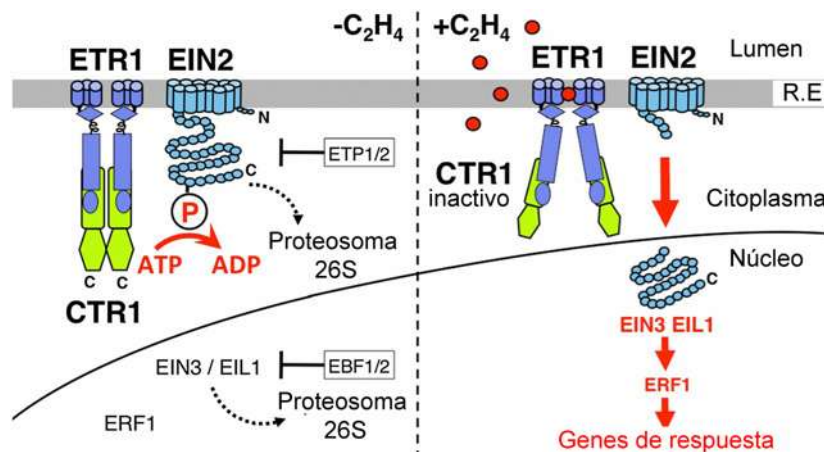


Figura 4. Vía de señalización del etileno en *A. thaliana*. En ausencia de etileno los receptores mantienen activa a la cinasa CTR1 que fosforila a EIN2, la cual se encuentra marcada por las proteínas ETP1 y 2 promoviendo su degradación mediante el proteosoma 26S. Tanto los receptores, CTR1 y EIN2 forman un complejo en la membrana del RE. Una vez que el receptor acopla las moléculas de etileno, la fosforilación sobre CTR1 cesa inactivándose e impidiendo la fosforilación de EIN2. En este escenario, una porción terminal de EIN2 se escinde y migra hacia el núcleo para activar a los factores transcripcionales EIN3 y EIL1 permitiendo la transcripción de distintos genes de respuesta al regulador (Modificado de Ju *et al.*, 2012).

CTR1 codifica una proteína con homología estructural de proteínas tipo RAF, cinasas con alta afinidad por residuos de serina y treonina, asociadas a circuitos MAPK's donde se ubican en la parte más alta (MKKK que fosforila a una MKK que a su vez fosforila a una MPK) (Kieber *et al.*, 1993). Al respecto, se ha demostrado que actúa como un represor de la regulación del circuito MKK9-MPK3/6, implicado en la estabilidad y la localización nuclear del factor de transcripción ETHYLENE INSENSITIVE 3 (EIN3), corriente abajo en la cascada de señalización (Hahn y Harter, 2009). Sin embargo, la actividad de CTR1 ha resultado especialmente compleja y los demás posibles blancos dentro de la cascada de fosforilación que involucra MKK's-MPK's permanecen desconocidos; así como los efectos específicos de los caracteres fenotípicos en cuya regulación pudiesen participar (Yoo y Sheen, 2008). Para complicar aún más el entendimiento de esta proteína, la adición de etileno induce su síntesis y acumulación en el retículo endoplásmico, lo que sugiere un intrincado sistema de regulación cuyos componentes permanecen elusivos (Gao *et al.*, 2003).

En ausencia de etileno, CTR1 fosforila la región carboxi-terminal de EIN2 (Ju *et al.*, 2012), promoviendo su marcaje por ubiquitinación para su posterior degradación. La fosforilación cesa en presencia del etileno permitiendo el progreso

de la ruta de señalización. *EIN2* también se localiza en la membrana del retículo endoplásmico y forma complejos con *ETR1*, otros receptores y *CTR1*; y aunque presenta homología estructural con proteínas transportadoras de metales, evidencia experimental reciente sugiere su participación en cascadas de señalización reguladas por otras fitohormonas o estímulos, y sus características bioquímicas permanecen desconocidas (Chang, 2010; Bisson y Groth, 2011). Corriente abajo, la activación de *EIN2* induce la degradación vía proteosoma de los represores EBF1/EBF2 de los factores de transcripción EIN3 y EIL, respectivamente. Estos últimos migran al núcleo, donde se anclan en las regiones promotoras de ciertos genes, entre los cuales los mejor caracterizados son *ERF1* y *EBF2*; desencadenando las respuestas fisiológicas. Estos genes son llamados en conjunto elementos de respuesta a etileno (*ERE's*) (Stepanova y Alonso, 2009). En la Figura 4 se encuentra un modelo vigente del mecanismo de señalización del etileno en las células.

2.7.3. Papel del etileno en el desarrollo de la raíz primaria

Uno de los efectos del etileno mejor caracterizados en *A. thaliana* es la “triple respuesta”, que se puede visualizar mejor en plantas crecidas en ausencia de luz como se muestra en la Figura 5, y está caracterizada por una fuerte inhibición de la elongación de la raíz primaria y del hipocotilo, ensanchamiento radial de éstos y una curvatura exagerada del gancho apical, estructura con función protectora del meristemo aéreo durante la germinación. Escrutinios genéticos permitieron la identificación de tres tipos generales de mutantes afectadas en la triple respuesta, según el fenotipo de su raíz primaria. El primer grupo de mutantes es llamado *eto* o sobre productor de etileno (por las siglas en inglés de *ethylene overproducer*) con un fenotipo que puede ser revertido por la adición de nitrato de plata (AgNO_3 que se disocia en iones Ag^+) al acaparar el sitio de unión a cobre en *ETR1*, bloqueando la percepción de etileno; este efecto se aprecia en la Figura 5B (Strader *et al.*, 2009). Los blancos de estas mutaciones son algunos de los genes ACS, cuyos productos proteínicos adquieren modificaciones en sus dominios C-terminales que les otorgan mayor estabilidad; produciendo desde 40 (mutante *eto1*, gen ACS5) hasta 100 veces (mutante *eto3*, gen ACS9) más etileno que una planta con genotipo silvestre (Yoshida *et al.*, 2005).

Un segundo grupo, definido por las mutantes *ctr*, se caracteriza por *ERE's* constitutivamente expresados y cuyo fenotipo fuerte de triple respuesta no puede ser revertido por nitrato de plata, a la vez que no producen significativamente más etileno que una planta con genotipo silvestre. Los blancos de estas mutaciones son diferentes alelos del gen *CTR1* (Guzmán y Ecker, 1990).

Finalmente, existe un grupo de mutantes insensibles a la inhibición de la elongación en presencia exógena de etileno, llamadas *ein* (por las siglas en inglés de *ethylene insensitive*). A este corresponden las mutantes por pérdida de función en alelos de *EIN2* y *EIN3* así como del receptor *EIN4*.

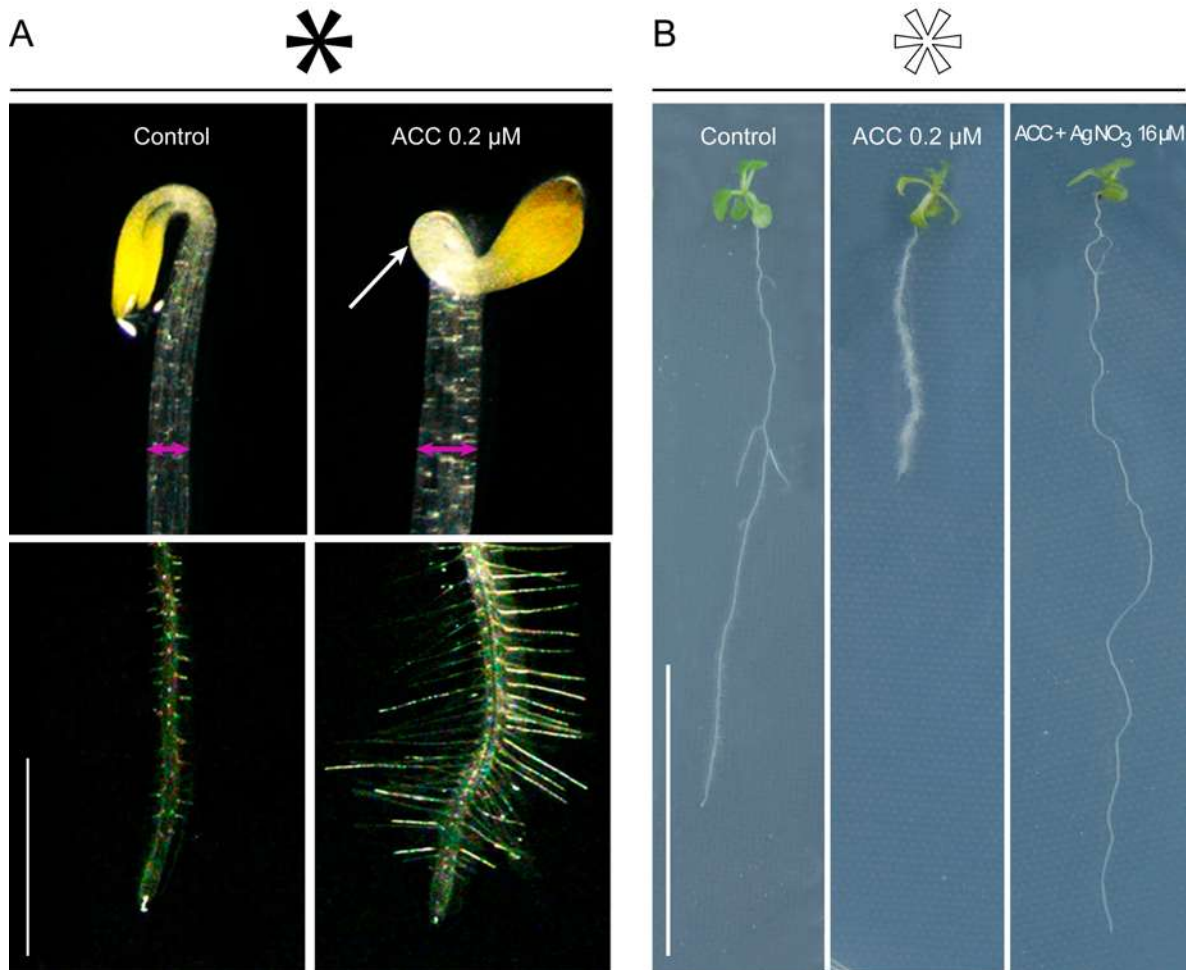


Figura 5. La triple respuesta y el efecto inhibitorio del etileno en la elongación de la raíz primaria de *A.thaliana*. (A) Acercamientos de las regiones que comprenden el hipocotilo y meristemo aéreo, y la punta de la raíz primaria de plántulas con fondo genético Col-0 a los 3 d.d.g. crecidas en oscuridad, en medios control y adicionado con ACC 0.2 μM. Nótese en línea morada la diferencia en el grosor del hipocotilo y la línea blanca que muestra una curvatura exagerada del gancho apical. (B) Plántulas Col-0 a los 6 d.d.g. expuestas a un fotoperiodo 14h luz - 8h oscuridad, crecidas en condiciones control, medio adicionado con ACC 0.2μM, y la misma concentración de ACC suplementada con AgNO₃ 16 μM. Nótese la reversión fenotípica que produce el nitrato de plata. Barras de error, (A)= 1 mm., (B)= 2 cm.

El efecto inhibitorio del etileno sobre la elongación de la raíz primaria mostrado por las mutantes sobre-productoras *eto1* y *eto3*, Figura 6A, interfiere precisamente con el crecimiento rápido que ocurre en la zona de elongación; y en un principio se descartó la inducción de alteraciones en la actividad meristemática (Lee *et al.*, 2001; Swarup *et al.*, 2007; Růžicka *et al.*, 2007). Posteriormente, se encontró que

el tratamiento con el precursor biosintético ACC, aumenta el número de divisiones del centro quiescente que no afectan su identidad ni la de las células iniciales (Ortega *et al.*, 2007).

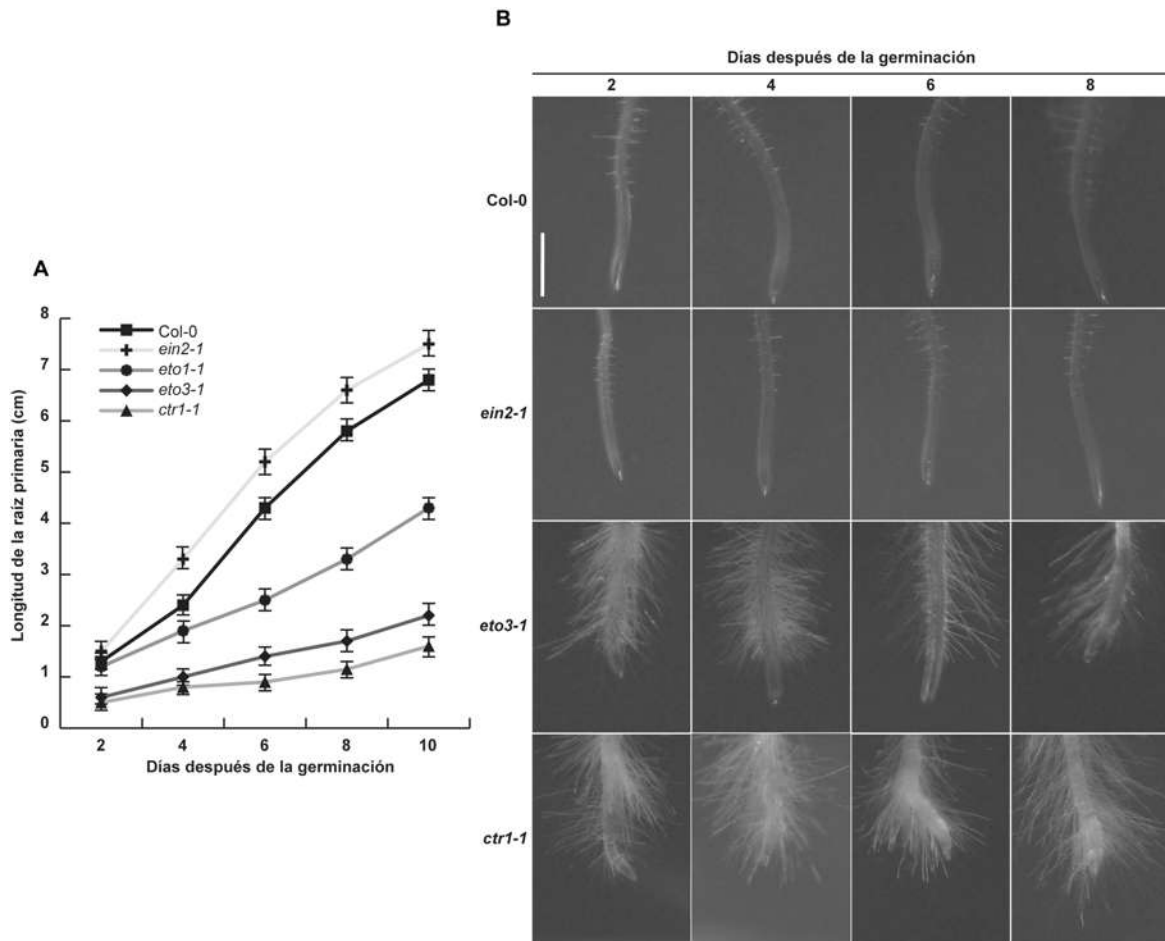


Figura 6. Efecto de las mutaciones en las rutas de síntesis o señalización de etileno en la elongación de la raíz primaria y en la morfología de la zona apical de la raíz. (A) Cinética que muestra la longitud de la raíz primaria a los 2, 4, 6, 8 y 10 días después de la germinación. (B) Fotografías de la región apical de la raíz primaria a los 2, 4, 6 y 8 d.d.g. Se grafican promedios +/- el error estándar. Cada línea pertenece a grupos estadísticos diferentes, obtenidos con una prueba de Tukey (P , 0.05). Barra de error= 0.5 mm.

En nuestro grupo de trabajo mostramos en una investigación previa que la sobreproducción de etileno en la mutante *eto3-1* causa, además de una disminución en la elongación de la raíz primaria, la inducción de la formación y la respectiva elongación de pelos radiculares hacia el ápice de la raíz (Figura 6B); así como una reducción del tamaño del meristemo y de la actividad mitótica en éste. La disminución en la actividad mitótica no compromete en ningún momento analizado, la identidad de la zona meristemática que es visible aún a los 9 días

después de la germinación (Figura 6B). Asimismo, evidenciamos que *CTR1* regula negativamente la elongación de la raíz primaria y la actividad meristemática, misma que ocurre en una zona menor y que a los 9 días después de la germinación se vuelve insuficiente para mantener el crecimiento en la mutante *ctr1-1*. Este último resultado indica que *CTR1* es un elemento clave en la señalización del etileno y en la manutención del meristemo durante las respuestas a este regulador. De manera opuesta, el bloqueo de las respuestas a etileno en *ein2* induce la división mitótica en el meristemo y la elongación de la raíz primaria (Méndez-Bravo, 2012 y 2015).

2.8. Interacción entre el etileno y las auxinas en el desarrollo de la raíz primaria

Fue la observación de que la adición exógena de auxina y etileno, tiene efectos similares en el desarrollo de la raíz primaria, la que planteó en un principio la existencia de una interacción entre ellos. Con el paso del tiempo se ha demostrado que es en los procesos de biosíntesis donde se ubica el primer punto conocido de la interacción etileno-auxinas (Muday *et al.*, 2012).

El AIA regula directamente la expresión de diferentes genes ACS de síntesis de etileno (Yang y Hoffman, 1984). Por su parte, el etileno participa como un regulador de *WEI2* y *WEI7*, dos genes que codifican subunidades de la sintasa de antranilato; enzima limitante de la síntesis de Trp. Por medio de otros trabajos, uno de los cuales incluye la generación de una línea mutante afectada en la regulación de la formación de pelos radiculares, cuyo análisis genético reveló ser un alelo recesivo de *ctr1* (diferente a *ctr1-1*) llamado *btk*, se demostró que *CTR1* actúa corriente arriba de *EIN2*, de manera dependiente de su concentración, como un represor de esta ruta de síntesis de AIA específica del meristemo; y que la alteración en este sitio de síntesis afecta el posicionamiento y desarrollo de los pelos radiculares (Stepanova *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 2009).

La mutación en un alelo recesivo del receptor de auxinas *TIR1* llamada *wei1* (por las siglas en inglés de *weak ethylene insensitive*), que confiere una resistencia parcial a los efectos del etileno, demostró que es necesaria una maquinaria de percepción auxínica intacta para que pueda llevarse a cabo la señalización del etileno; que en última instancia induce la formación del máximo auxínico en el ápice de la raíz primaria. Por otra parte, la expresión de los componentes del transporte polar de auxinas *AUX1*, *PIN2*, *PIN3* y *PIN7* es inducida en la raíz primaria por la aplicación exógena de ACC (Pickett *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 2011). Mutaciones individuales en alelos de los genes que codifican para estos elementos muestran además, diferentes niveles de insensibilidad al etileno, lo que los coloca como blancos importantes de la interacción. Además, el etileno induce

eventos de división en el centro quiescente (Ortega *et al.*, 2007). Acorde con estos trabajos, los efectos del etileno sobre la elongación de la raíz primaria, incluidos la regulación por parte de *CTR1* de la actividad mitótica del meristemo, están acompañados de una fuerte inducción del reportero de actividad auxínica *DR5:uidA*. Con base en lo anterior, resulta plausible proponer que la señalización del etileno no solo conecta con elementos en la biosíntesis de auxinas, sino también de su transporte y percepción molecular, aspectos que demandaron nuestra atención durante el estudio de la biología de la raíz de *Arabidopsis*.

3. JUSTIFICACIÓN

El desarrollo indeterminado que exhiben las plantas es una característica importante de su biología, y los mecanismos genéticos, celulares y moleculares subyacentes al mismo permanecen en gran medida desconocidos. La cinasa CTR1, regulador negativo de las respuestas al etileno, participa en el control del programa de crecimiento de la raíz, pero su impacto en la funcionalidad de los meristemos y los procesos de división y elongación celular, así como su interacción con elementos del transporte y de la señalización de auxinas no está del todo caracterizado. El esclarecimiento de estos aspectos aportará información para el entendimiento del desarrollo vegetal.

4. HIPÓTESIS

El gen *CTR1* de *A. thaliana* es fundamental para la regulación del mantenimiento de la actividad meristemática en la raíz primaria, pues modula la expresión de proteínas exportadoras de auxinas, así como de factores de transcripción necesarios para la conservación de la identidad del centro quiescente y del nicho de células iniciales.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Estudiar la participación del gen *CTR1* de la ruta de señalización del etileno, en la regulación de la expresión de elementos del transporte polar de AIA en el meristemo de la raíz primaria; así como la de factores de transcripción importantes para el mantenimiento de la actividad meristemática.

5.2. Objetivos particulares

- Analizar a nivel tisular en la raíz primaria, la expresión de elementos de respuesta y transporte de AIA, y de la manutención de la actividad meristemática en respuesta a tratamientos con auxinas y etileno.
- Caracterizar los efectos del etileno y las auxinas sobre el crecimiento de la raíz primaria y su estructura tisular, mediados por la ruta de señalización regulada por *CTR1*.
- Establecer si existe una correlación entre la función de *CTR1* y el desarrollo indeterminado de la raíz primaria y proponer un mecanismo que explique esta posibilidad.

6. RESULTADOS

6.1. CAPÍTULO I. *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1* and *PIN2* act in a coordinate manner to support the indeterminate root growth and meristem cell proliferating activity in *Arabidopsis* seedlings

Este capítulo corresponde a un artículo de investigación que expone a la comunidad científica internacional los principales resultados obtenidos en esta tesis. Dicho artículo se encuentra publicado en la revista *Plant Science*; la cual se encuentra indizada en el *Journal Citation Reports* (JCR) y tiene un factor de impacto de 3.7. Se adjunta más adelante el artículo completo con el formato de su publicación.

6.2 CAPÍTULO II. La mitad oculta de las plantas

Este capítulo corresponde a un artículo de divulgación científica publicado en la revista *Saber Más*, la cual es una publicación bimestral editada por la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, a través de la Coordinación de la investigación Científica.

6.1. CAPÍTULO I

Plant Science 280 (2019) 175–186



Contents lists available at ScienceDirect

Plant Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plantsci



CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 and PIN2 act in a coordinate manner to support the indeterminate root growth and meristem cell proliferating activity in *Arabidopsis* seedlings



Alejandro Méndez-Bravo^a, León Francisco Ruiz-Herrera^a, Alfredo Cruz-Ramírez^b, Plinio Guzman^c, Miguel Martínez-Trujillo^d, Randy Ortiz-Castro^e, José López-Bucio^{a,*}

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

^b Molecular and Developmental Complexity Group, Unidad de Genómica Avanzada, Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Campus Irapuato, Guanajuato, Mexico

^c Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Campus Irapuato, Guanajuato, Mexico

^d Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Ciudad Universitaria, C. P. 58030, Morelia, Michoacán, Mexico

^e Red de estudios moleculares avanzados, Instituto de Ecología A. C., Carretera Antigua a Coatepec 351, El Haya, C. P. 91070, Xalapa, Veracruz, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Ethylene
Auxin
Root development
Quiescent center
Root stem cell niche
Determinate growth

ABSTRACT

The plant hormone ethylene induces auxin biosynthesis and transport and modulates root growth and branching. However, its function on root stem cells and the identity of interacting factors for the control of meristem activity remains unclear. Genetic analysis for primary root growth in wild-type (WT) *Arabidopsis thaliana* seedlings and ethylene-related mutants showed that the loss-of-function of *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1* (*CTR1*) inhibits cell division and elongation. This phenotype is associated with an increase in the expression of the auxin transporter *PIN2* and a drastic decrease in the expression of key factors for stem cell niche maintenance such as *PLETHORA1*, *SHORT ROOT* and *SCARECROW*. While the root stem cell niche is affected in *ctr1* mutants, its maintenance is severely compromised in the *ctr1-leir1-1(pin2)* double mutant, in which an evident loss of proliferative capacity of the meristematic cells leads to a fully differentiated root meristem shortly after germination. Root traits affected in *ctr1-1* mutants could be restored in *ctr1-leir1-1* double mutants. These results reveal that ethylene perception via *CTR1* and *EIN2* in the root modulates the proliferative capacity of root stem cells via affecting the expression of genes involved in the two major pathways, AUX-PIN-PLT and SCR-SHR, which are key factors for proper root stem cell niche maintenance.

1. Introduction

Roots provide anchorage to the soil, sense changes of environmental conditions and participate in water and nutrient acquisition. Root development begins with the embryonic formation of the primary root (PR), whose growth and branching patterns determine the root system architecture in adult plants [1]. In *Arabidopsis thaliana*, the primary root is comprised of concentric rings of tissues, each made up with cell files that originate in the root apical meristem (RAM), sustained by root stem cell niche (RSCN), composed by the quiescent center (QC) and peripheral initials or stem cells, which divide asymmetrically for self-renewing [2–5].

In response to challenging factors such as low nutrient availability, and metal or salt stress, the primary root enters a determinate

developmental program that terminates cell division, differentiates stem cells and halts growth [6–9]. The transit between indeterminate to determinate root growth under low phosphate availability enables higher orders of root branching for soil exploration, and although auxin (indole-3-acetic acid, IAA) signalling seems to be an important factor in such transition, the mechanisms triggering meristem differentiation and its relationship with stem cell activity remain unknown [9,10].

Several phytohormones and genetic elements are involved in growth and root patterning. Ethylene affects primary root growth repressing both cell division and elongation and promotes the differentiation of epidermal cells into root hairs [11–14]. Ethylene promotes auxin accumulation in the primary root tip by up-regulating *WEAK ETHYLENE INSENSITIVE2/ANTHRANILATE SYNTHASE alpha1* (*WEI2/ASA1*) and *WEI7/ANTHRANILATE SYNTHASE beta1* (*ASB1*) genes that

* Corresponding author.

E-mail address: jbucio@umich.mx (J. López-Bucio).

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.019>

Received 31 July 2018; Received in revised form 24 November 2018; Accepted 28 November 2018

Available online 30 November 2018

0168-9452/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

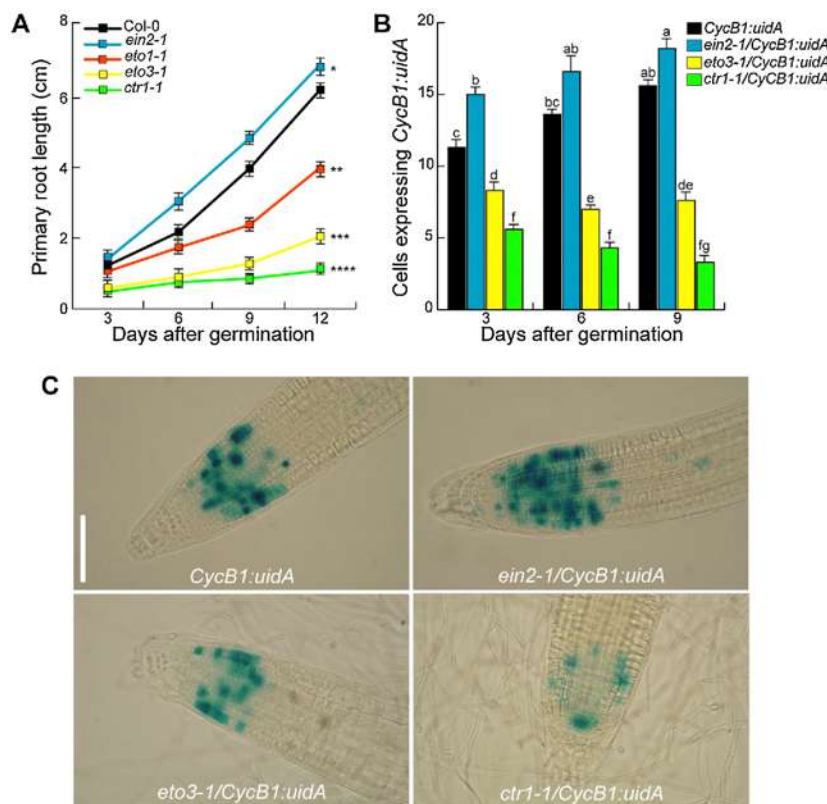


Fig. 1. Ethylene biosynthesis and/or signalling inhibits primary root growth and mitotic cell activity in *Arabidopsis* seedlings. (A) 12-day kinetic experiment showing primary root length for *Arabidopsis* (Col-0) and ethylene-related mutants *ein2-1*, *eto1-1*, *eto3-1* and *ctr1-1*. Values shown are the mean $\pm$ SE, $n = 30$. Double asterisks represent independent statistical groups ($P < 0.05$). (B) Quantification of positive cells for GUS staining of *CycB1:uidA* in the WT and mutants. Values shown represent the mean $\pm$ SE, $n = 30$. Different letters represent means statistically different ($P < 0.05$). (C) Representative images of *CycB1:uidA* expression in Col-0, *ein2-1*, *eto3-1* and *ctr1-1* mutant backgrounds at 9 days after germination. $n = 30$. Scale bar: 100 μ m.

encode alpha- and beta-subunits of a rate-limiting enzyme of tryptophan biosynthesis that further serves as IAA precursor. Loss-of-function mutants in these genes prevent both IAA synthesis and accumulation [15]. Moreover, transport of auxin from the root apex to elongation zone mediates the effects of ethylene on primary root growth [16–21].

Ethylene is perceived by receptor-related histidine kinases, which reside at the endoplasmic reticulum and interact with the CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1) serine/threonine protein kinase [22]. In the absence of ethylene, the receptors promote CTR1 kinase activity via phosphorylation, which represses ethylene responses, whereas when the levels of ethylene increase, the receptors, and therefore CTR1 are inactive [23]. Once an ethylene molecule binds the receptor, it becomes desensitized as both its binding and kinase activity shut off. ETR1, ERS1 and other receptors form heterodimers and higher order complexes that assure fine-tuning in ethylene sensitivity that is further enhanced by rapid receptor degradation [24]. CTR1 phosphorylates EIN2, which encodes a Nrap homolog, whereas inhibition of CTR1 upon ethylene perception leads to cleavage and nuclear localization of the EIN2 C terminus, allowing ethylene signal to reach the transcription factors EIN3 and ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 (ERF1), which mediate transcriptional responses [24].

In *Arabidopsis*, the negative regulation of the ethylene pathway, mediated by CTR1, and the local accumulation of auxin within the QC and meristem initials allows root indeterminacy and cell growth [16–21] but little is known about the molecular mechanisms that act downstream of ethylene signalling to modulate the root stem cell niche

activity and maintenance. The PLETHORA (PLT1-6) family of transcription factors function redundantly to support cell division and prevent cell differentiation and depend on the PIN-FORMED (PIN1, 2, 3, 4 and 7) transporters, whose distribution within root tissues establishes an optimal auxin concentration in the meristem [25–27]. SHORT-ROOT (SHR) and SCARECROW (SCR) belong to the GRAS family of transcription factors required for stem cell maintenance in the root apical meristem as their corresponding mutations cause a disorganization of the QC and loss of stem cell activity, resulting in determinate root growth [28–30]. Establishment of auxin gradients from the QC to stem and daughter cells positively influences the expression of *WUSCHEL RELATED HOMEBOX5* (*WOX5*) and *PLT* genes, which help to establish stem cell fates and control differentiation via the HISTONE DEACETYLASE19 (*HDA19*) and CYCLING DOF FACTOR4 (*CDF4*) [31,32]. Different methods have been developed to monitor auxin responsive gene expression in *Arabidopsis* root tips, including analyses of IAA-responsive promoters or promoter elements driving the transcriptional activity of reporter genes. A widely used marker is *DR5:GFP*, which consists of 9 inverted repeats of the 11-bp sequence 5'-CCTTTT GTCTC-3', a 46-bp CaMV35S minimal promoter element, and a TMV leader sequence fused to the green fluorescent protein (GFP) [33].

According to the above mentioned evidence, a balanced ethylene-auxin cross talk is critical for stem cell niche maintenance and proper root growth and patterning. CTR1 is, to our knowledge, one of the few negative regulators of the ethylene signalling pathway reported to date. However, its role on stem cell niche activity and the possible

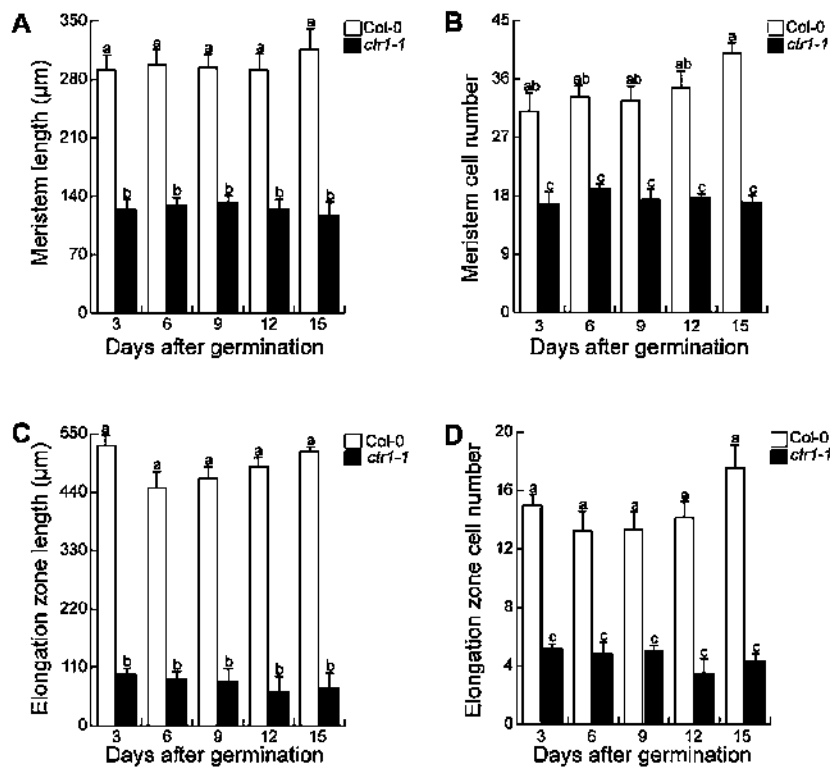


Fig. 2. Meristem and elongation zones of the primary root are shortened in *ctr1-1* *Arabidopsis* mutants. (A) Meristem length, (B) number of cells within meristems, (C) elongation zone length, and (D) number of cells within elongation zones in a 15-day kinetic experiment comparing Col-0 and *ctr1-1* mutants. Meristem length comprised cells from the quiescent center to the first cortex cell showing rapid elongation. Elongation zone sizes were measured from the first cortex cell at rapid elongation to the first trichoblast (differentiated) cell in the epidermis. Values shown represent the mean $\pm$ SE, $n = 30$. Different letters are used to indicate means that statistically differ ($P < 0.05$).

relationship with auxin transport or signaling components for meristem viability remains unknown. Here, we report that *CTR1* loss of function causes plants to form short roots due to a reduced cell division capacity of meristematic cells and impaired cell elongation. This phenotype correlates with the increase in *EIR1/PIN2* expression in cortex and epidermal cell layers and stronger *DR5::GFP* response in these layers. Moreover, *SCR*, *SHR*, and *PLT1* expression decreases in *ctr1-1* single mutant and in *ctr1-1eir1-1* double mutants, the meristem fully differentiates leading to a determinate root developmental program. Thus, constitutive activation of ethylene signaling and reduced transport of auxin to external root cell layers compromises stem cell activity and induces cell differentiation.

2. Materials and methods

2.1. Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana (WT, Col-0), *ein2-1*, *eto1-1* [34], *eto3-1* [35] and *ctr1-1* [36] mutants; and transgenic reporter lines *CycB1::uidA* [37] *DR5::GFP* [33], *PLT1::GFP*, *PLT2::GFP* [26], *PIN1::PIN1::GFP* [38], and *PIN2::PIN2::GFP* [39] were used. Plants expressing each reporter marker were crossed to *ctr1-1*. Homozygous mutants carrying the transgenes were isolated from F2 populations and propagated to F4 generation.

Seeds were surface disinfected with 95% (v/v) ethanol and 20% (v/v) bleach for 7 and 5 min, respectively, washed and soaked in sterile distilled water and placed in darkness at 4°C. After 48 h seeds were

placed over the surface of agar plates containing 0.2X Murashige and Skoog medium (MS basal salts), pH 5.7, 0.6% (w/v) sucrose supplemented or not with compounds: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) dissolved in deionized water, N-1-naphthylphthalamic acid (NPA), indole-3-acetic acid (IAA) in dimethyl sulfoxide (DMSO). The Petri dishes containing the media were sealed with plastic film and placed vertically in a plant growth chamber (Percival AR95L, Percival Scientific, Perry, IA, USA) at 16 h light/8 h darkness photoperiod, light intensity of $100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{second}^{-1}$, temperature of 22°C and 80% relative humidity; and plantlets analysed at ages indicated in the figures. For the analysis of changes in *DR5::GFP* gene expression in response to IAA: plants were grown in standard (control) MS 0.2X medium for 7 days, and then transferred to media with the corresponding concentration of IAA and analysed 12 h later.

2.2. Generation of *ctr1-1eir1* and *ctr1-1ein2* double mutants

Homozygous *ctr1-1*, *eir1-1* and *ein2-1* mutants were selected in vitro on the basis of their short root, agravitropic primary roots or growth resistance to ACC supplementation, respectively, and transferred to soil. *ctr1-1* mutant flowers were outcrossed with pollen from homozygous *eir1-1* or *ein2-1* mutants. All siliques developed yielded WT seedlings and the F1 progeny was allowed to self-pollinate to obtain the F2 population. The *ctr1-1eir1-1* progeny segregated four phenotypes, WT roots, short roots, agravitropic roots and extremely short roots with fully determinate growth. For *ctr1-1ein2-1* double mutant selection, the corresponding F2 seeds were grown in medium supplied with $0.4 \mu\text{M}$

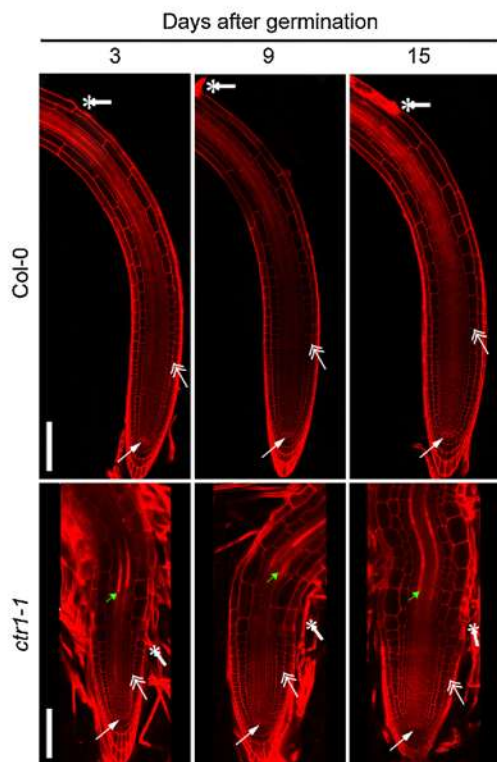


Fig. 3. Differentiation events occur prematurely in *ctr1-1* mutants. Detailed comparison of root growth zones from WT (Col-0) and *ctr1-1* mutant seedlings. Upper panels show representative photographs of Col-0 root tips at 3, 9 and 15 days after germination. Lower panels show representative images of *ctr1-1* root tips at the same times. Full arrows indicate the quiescent center, open arrows the boundary between the last meristem cell and the first cell in elongation zone. Asterisk finished arrows indicate the first differentiated trichoblast in the epidermis and green small arrows show fully developed xylem poles. Images show root tips stained with propidium iodide (red) and taken using a confocal microscope. At least 10 individuals were analyzed for each genotype and time and representative photographs are shown. Scale bar = 100 μ m. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

ACC, in which four phenotypes segregated, namely WT roots, short roots, primary roots resistant to ACC and very short root hairs and ACC resistant roots with normal root hair elongation. In both cases, the proportions of the phenotypes were 9:3:3:1, respectively, which are consistent with a Mendelian segregation of two recessive traits. The primary root of plants showing the four mentioned phenotypes was measured 10 days after germination and cellular measurements or confocal images were taken at this time.

2.3. Histochemical analysis

Transgenic plants expressing the *uidA* reporter gene were stained in 0.1% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide in phosphate buffer (NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 , 0.1 M, pH 7) with 2 mM potassium

ferrocyanide and 2 mM potassium ferricyanide for 12 h at 37 °C. Plants were cleared and fixed by the method of Malamy and Benfey [40], and roots mounted in 50% glycerol on microscope slides. For each line and time analysed, at least 15 plants were mounted and photographed with a microscope (Axio-star Zeiss Plus; Carl Zeiss, Göttingen, Germany) at $\times 100$ magnifications. Images were captured with a digital camera (Sony Cyber-shot DSC-S75, Sony Electronics Inc., Oradell, NJ, U.S.A.) attached to the microscope and processed with the Image J software (Wayne Rasband; National Institute of Health, USA).

2.4. Confocal microscopy and fluorescence quantification

Roots of transgenic lines expressing the *GFP*, *YFP* or *CFP* reporter genes were prepared by soaking them into a 10 μ g/ml propidium iodide (PI) solution, and mounted on microscope slides. Fluorophore and PI were excited by a 488 or 568 wavelength Argon laser, and fluorescent emission was detected at 509 or 585 nm respectively, with a laser scanning confocal microscope (LSCM) (Olympus Fluo-View FV1200-PME, Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Fluorescence was measured by obtaining the green (*GFP* and *YFP*) or blue (*CFP*) pixels in an area comprised by the first 20 cortical cells above the QC using the IMAGEJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), in 10 micrographs per line and treatment. We then obtained an arbitrary unit value (AU = green or blue pixels/ μm^2) for each individual, and means were obtained from whole data sets. AU means for control conditions were given a value of 1, and those for corresponding treatments were adjusted relative to these, and thus referred as relative fluorescence.

2.5. Statistical analysis

All experiments were made by triplicate with an $n = 30$ plants per line and treatment. Primary root length was measured with a ruler directly on the Petri dish. Reporter expression patterns shown in figures are representative from 15 micrographs per line and treatment analysed from the confocal microscope. One-way variance analysis and a Tukey significance test ($P < 0.05$) was performed to all data with the STATISTICA software (Statsoft, 2010).

3. Results

3.1. Activation of ethylene biosynthesis and/or signalling inhibits *Arabidopsis* primary root growth and mitotic activity in the meristem

To understand the role of ethylene biosynthesis and signalling on primary root growth, a 12-day kinetic experiment was performed in which primary roots of *Arabidopsis* WT and mutants affected in ethylene synthesis *eto1-1* and *eto3-1* or signalling *ein2-1* and *ctr1-1* were grown in Petri plates supplied with agar-solidified MS 0.2X medium and were measured every three days. There was a differential phenotype among the *Arabidopsis* lines tested, with ethylene insensitive mutant *ein2-1* showing a longer primary root whereas ethylene overproducing *eto1-1* and *eto3-1*, or *ctr1-1* mutants showed decreased growth (Fig. 1a), which correlated with smaller root meristems and reduced expression of the mitotic marker *CycB1:uidA* (Fig. 1b–c; Figs. S1 and S2). These observations suggest that mitotic activity in the RAM is diminished by enhanced ethylene signalling.

3.2. Mutation of *CTR1* compromises cell division and elongation

The *ctr1-1* mutants develop a short root, that is however able to sustain some growth. To further know the cellular processes affected in

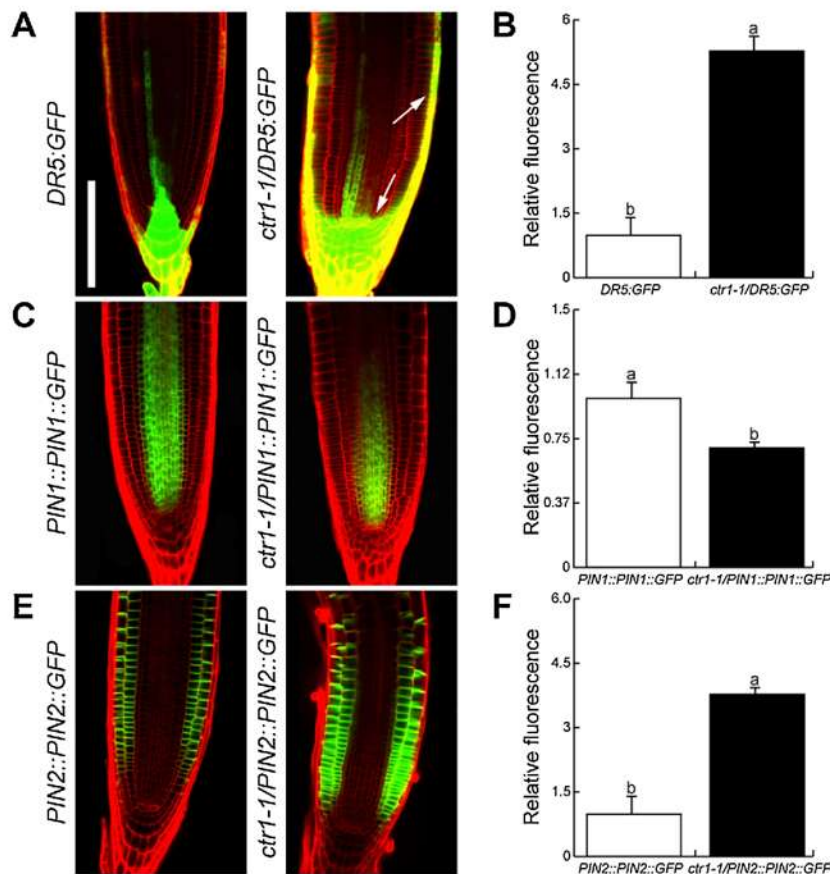


Fig. 4. Loss of *CTR1* induces auxin responsiveness at the root tip and differentially influences *PIN1* and *PIN2* expression. (A) *DR5::GFP* expression in Col-0 and *ctr1-1* seedlings. Arrows are used to indicate IAA redistribution to areas surrounding the stem cell niche and the epidermal cell layer. (C) and (E) *PIN1::PIN1::GFP* and *PIN2::PIN2::GFP* expression in Col-0 and *ctr1-1* seedlings. (B), (D) and (F) show the relative fluorescence quantitation from 10 seedlings analyzed. Note an important decrease in *PIN1::PIN1::GFP* expression domain and enhanced expression of *PIN2::PIN2::GFP* in epidermis and cortex of *ctr1-1* mutants. Representative images from 10 individuals per line and treatment are shown. Micrographs were taken at 7 days after germination and a propidium iodide counter stain was applied to show expression domains. Scale bar: 100 μ m.

this mutant, detailed analyses were performed in WT and *ctr1-1* seedlings at five times (3, 6, 9, 12 and 15 days) after germination to compare meristem length, meristem cell number, elongation zone length and elongation zone number. A roughly 40–50% decrease in meristem length and meristem cell number was evidenced in *ctr1-1* mutants when compared to the WT, while a much more marked inhibition in the total length of the elongation zone (around 80%) and elongation zone cell number (55%) already occurred in the mutants (Fig. 2a–d). These morphometric data correlate with the phenotypes observed in representative confocal images of primary root tips taken from 3, 9 and 15 day-old WT and *ctr1-1* seedlings, where mutants manifested much more reduced elongation and RAM zones at all three times analysed (Fig. 3). These results indicate that diminished mitotic activity and precocious differentiation abates the cell elongation zone and contribute to the short root phenotype in the *ctr1-1* mutant.

3.3. Mutation of *CTR1* increases auxin response and expression of auxin transporter *PIN2* in *Arabidopsis* primary root tips

Ethylene induces auxin biosynthesis and expression of auxin transporters [15,41]. To determine if the short roots of *ctr1-1* mutants are related to an altered auxin redistribution in the meristematic region, we next examined the expression of the auxin-inducible gene construct

DR5::GFP in WT and *ctr1-1* primary root tips of seedlings harbouring this construct. When compared to WT seedlings, a redistribution of auxin was observed in *ctr1-1*, where a dramatic increase was observed in the meristem epidermal, lateral root cap and columella cell layers (Fig. 4a, b, white arrows). To assess if the observed auxin redistribution pattern in *ctr1-1* roots is related to changes in the expression patterns of PIN auxin efflux carriers, WT and *ctr1-1* seedlings expressing *PIN1::PIN1::GFP* and *PIN2::PIN2::GFP* were grown in MS 0.2X medium for 7 days and GFP fluorescence determined through confocal microscopy. In these experiments, differential results were obtained, while *PIN1* decreased its expression level (Fig. 4c, d), *PIN2* expression clearly increased in epidermal and cortex cells of *ctr1-1* seedlings when compared to the WT (Fig. 4e, f). Supplementation of ACC or IAA further increased *PIN2* levels in WT and *ctr1-1* (Fig. 5a, b).

The phenotype of *ctr1-1* mutants is pleiotropic, affecting several growth and developmental programs in roots and in shoots. To more in deep define the contribution of *CTR1* signaling in root growth and its relationship with auxin transport and response, we tested the response of a loss-of-function mutant in its direct target *EIN2* to ACC, IAA supplementation and *PIN2::PIN2::GFP* expression. Interestingly, *ein2-1* mutants showed a marked resistance to auxin induced root growth inhibition (Fig. S3) that correlates with the loss of *PIN2::PIN2::GFP* induction by 0.4 μ M ACC or 0.12 μ M IAA treatments, which clearly

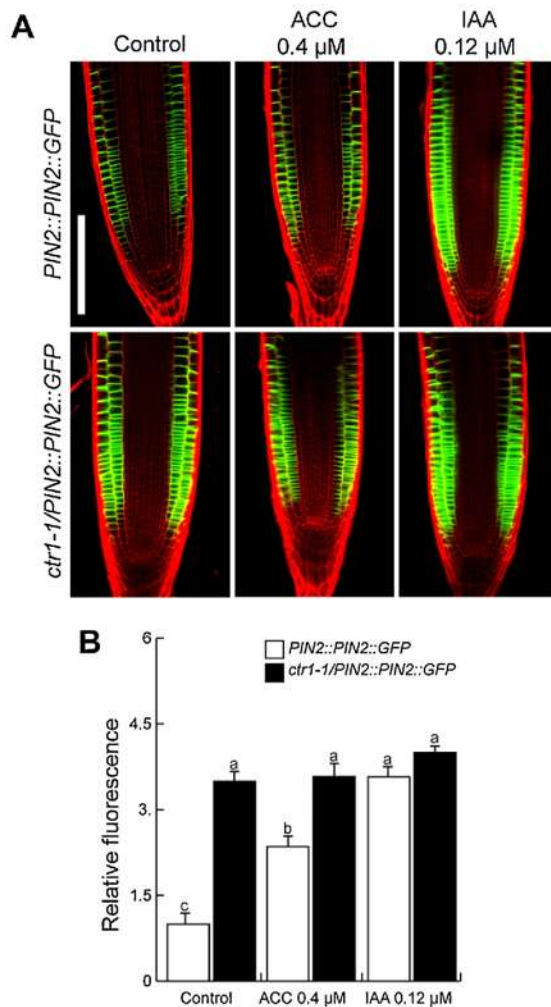


Fig. 5. Activation of ethylene and auxin signaling causes *PIN2* overexpression. (A) *PIN2::PIN2::GFP* expression in Col-0 and *ctr1-1* seedlings grown under standard growth conditions or supplemented with 0.4 μM ACC or 0.12 μM IAA. (B) Relative fluorescence determined from 10 seedlings. Note that reporter fluorescence increases and occurs closer to the stem cell niche in the *ctr1-1* mutant. Confocal micrographs were taken 7 days after germination with a propidium iodide counter stain. Representative images from 10 individuals per genotype and treatment are shown. Scale bar: 100 μm.

promotes GFP fluorescence in the WT (Fig. S3). These data show that perturbation of two signalling elements in the ethylene signalling pathway, CTR1 and EIN2 influences in contrasting manner, auxin transport and redistribution into the RAM.

3.4. Auxin transport inhibitor NPA compromises root growth and increases auxin response in root meristems of WT and *ctr1-1* mutants

To gain insight into the changes in auxin transport, redistribution and response in *ctr1-1* roots and its possible relationship with the

function of the root meristem, we compared root growth of *Arabidopsis* WT and *ctr1-1* seedlings expressing *DR5::GFP* and monitored GFP fluorescence following pharmacological inhibition of auxin transport via using 1-N-naphthylphthalamic acid (NPA). NPA decreased primary root growth in WT seedlings and exacerbated the short root phenotype of *ctr1* mutants (Fig. 6a), while increasing the auxin response in a dose-dependent manner at the quiescent centre, stem cell niche and columella cells (Fig. 6b). NPA treatment clearly inhibited *DR5::GFP* expression at the protoxylem region and lateral root cap cells in WT seedlings, but interestingly, in *ctr1-1/DR5::GFP* seedlings, GFP fluorescence prevailed in protoxylem and lateral root cap cells despite increasing NPA supplementation (Fig. 6b). These results show that enhanced auxin response at the root meristem of WT seedlings somewhat mimic the *ctr1-1* phenotype, and suggest that CTR1 may act upstream of PIN2.

3.5. CTR1 loss of function affects expression of essential transcription factors for root stem cell niche activity and maintenance

The spatio-temporal expression of AP2 transcription factors such as *PLT1* and *PLT2*, major players in the AUXIN-PLETHORA pathway, are key factors to establish and maintain the root meristem. To determine if the expression of *PLT* genes may be affected in the roots of *ctr1-1* mutant seedlings, we analysed the expression patterns of the transcriptional fusions *PLT1::GFP* and *PLT2::CFP*. The transcription of *PLT1*, revealed by *PLT1::GFP*, increases from 3 to 12 days in WT seedlings (Fig. 7a, b), but in *ctr1-1* seedlings, it decreased gradually over time (Fig. 7b), and by day 12 GFP expression was restricted to the quiescent center and surrounding stem cells (Fig. 7a). By analyzing the spatio-temporal expression pattern of *PLT2::CFP* we observed that *PLT2* transcription is reduced in the roots of *ctr1-1* mutants when compared with WT, although it remained constant over time (Fig. 7c, d).

We also analysed the expression patterns of *SHR::SHR::GFP* and *SCR::SCR::YFP* both in WT and *ctr1-1* genetic backgrounds. In roots of WT seedlings, *SHR* expression slightly increased with time from 3 to 12 days (Fig. 8a, b), while in *ctr1-1* *SHR* expression is reduced by day 3 after germination and almost absent from day 6 onwards (Fig. 8a, b). Similar results were obtained from *SCR::SCR::YFP* expression, which decreased in *ctr1-1* by 6 days after germination (Fig. 8c, d). From these findings, we propose that enhanced ethylene perception in *ctr1-1* roots negatively affects the expression of *PLT1*, *PLT2*, *SHR* and *SCR*.

3.6. Indeterminate developmental program in the WT *Arabidopsis* primary root was transformed into determinate in *ctr1eir1* double mutants

The enhanced expression of *PIN2* in the *ctr1-1* background suggested that the activation of ethylene signaling drastically changes auxin redistribution revealed by the high expression of auxin-responsive marker in the epidermal, columella and lateral root cap cell layers. Such redistribution of auxin may contribute to alter *PLT1*, *PLT2*, *SHR* and *SCR* expression, perhaps in a feedback loop in the case of *PLT* genes. The combinatorial changes in these two major pathways may affect cell division, elongation and/or differentiation processes in *ctr1-1* roots. Although severely affected in size and activity, *ctr1-1* root meristems are still functional in 15 d seedlings. These may be related to the enhanced expression of *PIN2* that secures a minimal transcription of *PLT1* and especially of *PLT2* in the root stem cell niche, as observed in 12 day-old mutant seedlings (Fig. 7). To test this hypothesis, the genetic interaction between CTR1 and PIN2 was explored by generating and analyzing the root phenotypes of the *ctr1-1eir1-1* (an allelic mutant of *PIN2*) double mutants. Seeds from WT (Col-0), *ctr1-1*, *eir1-1* and *ctr1-1eir1-1* backgrounds were germinated and grown for 8 d on 0.2X MS

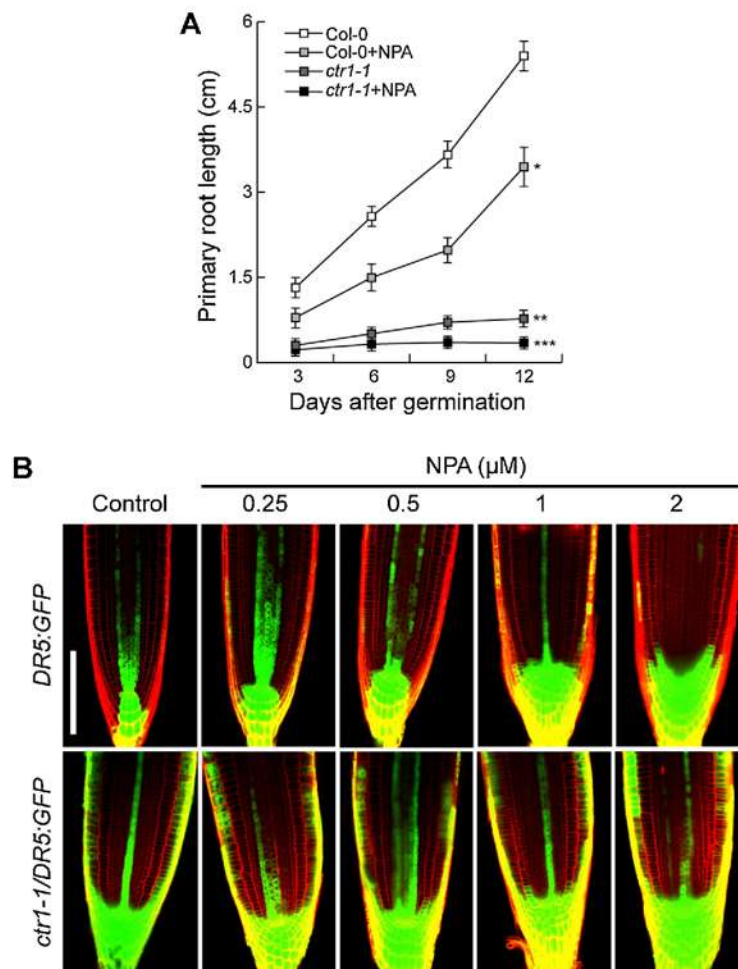


Fig. 6. NPA induces auxin accumulation at the root tip in WT and *cr1* seedlings. (A) Quantification of primary root growth during a 12-day kinetic experiment for Col-0 and *cr1-1* seedlings supplied or not with 2 μ M NPA. Single, double or triple asterisks represent independent statistical groups ($P < 0.05$). (B) *DR5::GFP* expression on Col-0 and *cr1-1* seedlings grown in medium supplied with increasing NPA concentrations. Confocal micrographs were taken 7 days after germination with a propidium iodide counter stain. Representative images were taken from at least 10 individuals analysed per line and treatment. Scale bar: 100 μ m.

medium and primary root length, meristem length and meristem cell numbers were quantified. Whereas the WT and *ein1-1* seedlings showed sustained root growth, *cr1-1* mutants were defective in root meristematic activity. Notably, in *cr1-1ein1-1* seedlings, primary root growth was arrested at the first days following germination, which correlated with the complete loss of meristematic activity (Fig. 9a-c) and accounts for the immediate terminal differentiation of cells as indicated by root hair formation and xylem development at the root tip (Fig. 9d). These data show that PIN2 plays a critical role in the maintenance of the root stem cell niche of *cr1-1* still observed in 15 days seedlings (Fig. 3). It also indicates that CTR1 action (as a negative regulator of the ethylene signaling pathway) and proper auxin transport, redistribution and response act coordinately to sustain the indeterminate developmental program of *Arabidopsis* primary roots.

3.7. *EIN2* loss-of-function restores root growth in *cr1-1* mutants

To test the specificity of CTR1 in the maintenance of primary root meristem identity and activity, we developed a *cr1-1ein2-1* double mutant. F2 segregating seeds were grown in 0.4 μ M ACC supplied medium, which inhibits primary root growth in the WT, in order to select and isolate *cr1-1ein2-1* homozygous double mutants. Via characterization of the primary root growth and root meristem structure of WT, *cr1-1*, *ein2-1* and *cr1-1ein2-1* lines, it was evident that root traits affected in *cr1-1* mutants could be restored in *cr1-1ein2-1* double mutants (Fig. 10). These data indicate that the short root phenotype of *cr1-1* mutants is unlikely due to pleiotropic, unspecific effects of this mutation and could be correlated to a signaling mechanism involving downstream signaling components.

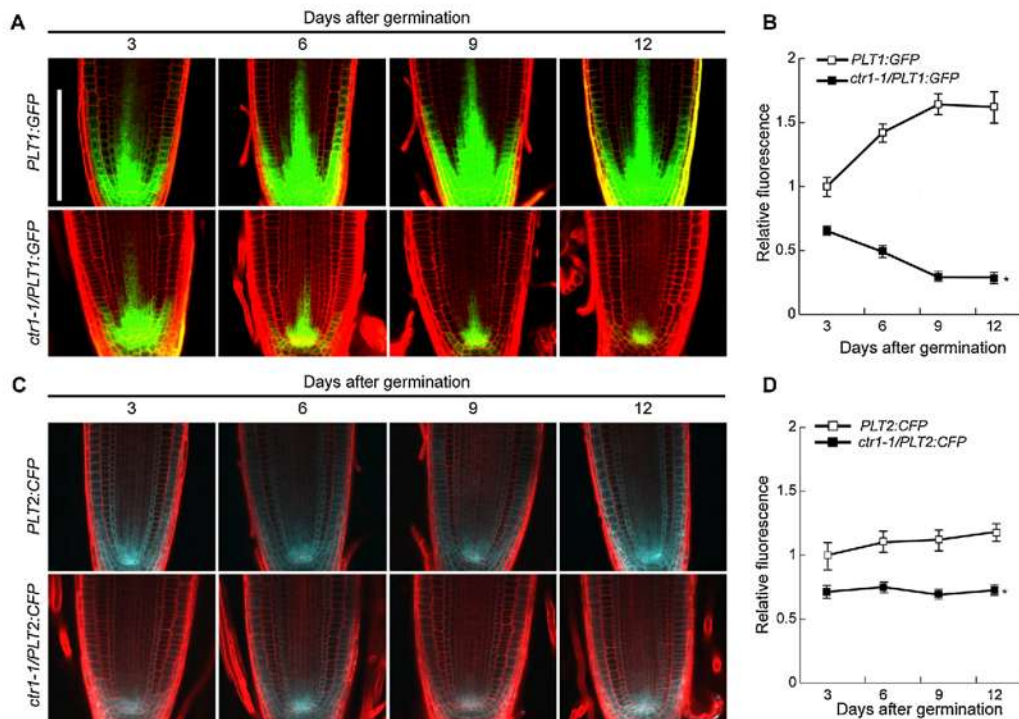


Fig. 7. The effect of mutation of CTR1 in *PLT1* and *PLT2* expression. (A) *PLT1:GFP* and (C) *PLT2:CFP* expression in Col-0 and *ctr1-1* seedlings in a 12-day kinetic experiment. (B and D) Relative fluorescence quantification from 10 independent seedlings analysed. Note that *PLT1* increases in the WT with time, whereas in *ctr1-1* is reduced since day 3 after germination, but in contrast *PLT2* is lower in the mutants and its expression level is maintained over time. Representative images were taken from 10 seedlings analyzed per line and treatment. Scale bar: 100 μ m.

4. Discussion

This study unravels the role of a crucial genetic element in the canonical ethylene signalling pathway, *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1* in the modulation of cell division and elongation in the root meristem of *Arabidopsis* seedlings. The *Arabidopsis ctr1-1* mutant was initially identified on the basis of seedling and adult phenotypes, which are similar to those observed in plants treated with ethylene and render constitutive expression of ethylene-response genes [36]. Overall, our detailed characterization of the short roots of *ctr1-1* mutants is in agreement with previous reports, in which reduced primary root growth correlates with activation of ethylene signaling [14,15,36]. Moreover, the data presented imply a direct role of CTR1 and its downstream interacting protein EIN2 on root developmental programs not yet previously described, such as in support of the indeterminate growth of the primary root in *Arabidopsis* seedlings.

Our results first confirm that ethylene negatively regulates *Arabidopsis* primary root growth based on analysis of WT, *eto1-1*, *eto3-1*, *ctr1-1* and *ein2-1* mutants, which show differential growth in time-course experiments. In *Arabidopsis* seedlings lacking CTR1 primary root growth was drastically reduced, which correlated with diminished cell elongation and expression of the mitotic marker *CycB1:uidA* few days after germination, consistent with its role in fundamental cellular programs that keep roots growing. Besides, *DR5:GFP* fluorescence in *ctr1-1* primary roots revealed an increased auxin response in specific regions of the root tip, namely, the initial cell layers, lateral root cap, columella and epidermal cells, implying a redistribution and change in auxin

concentrations to these regions and explaining the effects of ethylene in promoting root hair development near the tip of the root [11,12,19].

Auxin moves within the root tip in an NPA-sensitive auxin-circulating loop via both acropetal and basipetal streams [42]. Asymmetric release of IAA from the quiescent center and columella initial cells to the epidermis and lateral root cap through the PIN2 transporter drives differential cell expansion in elongation zone tissues and controls root gravitropism [42]. Our analysis of *DR5:GFP* distribution in primary root tips of *ctr1* mutants suggests that ethylene signaling promotes the basipetal (that is, root apex to base) auxin transport system via inducing PIN2 levels in lateral root cap and epidermal cells. The activity of the PIN family of auxin transporters is tightly linked to regulation of activity of stem cell niche, comparison of PIN1 and PIN2 protein localization in WT and *ctr1* seedlings, which was performed up to 12 days after germination, revealed an increased expression of *PIN2* in *ctr1* roots, which is in contrast with the decrease in *PIN1* expression. PIN proteins are involved in a positive feed-forward loop with auxin, where they not only transport auxin but also depend on the auxin-driven transcriptional program for their expression. Therefore, changes in PIN2 affect directly auxin redistribution and their own mis-regulation. Since auxin transport influences root growth and meristem activity by maintaining auxin homeostasis and a stable asymmetric auxin distribution [43–45], a possible explanation is that the changes in expression in *PIN2* in *ctr1-1* seedlings alter auxin redistribution and response, which in turn, result in the short root phenotype, and the reduced cell elongation zone in *ctr1-1* primary roots. In support of this hypothesis, a very recent article by Vaseva et al. (2018) showed that the

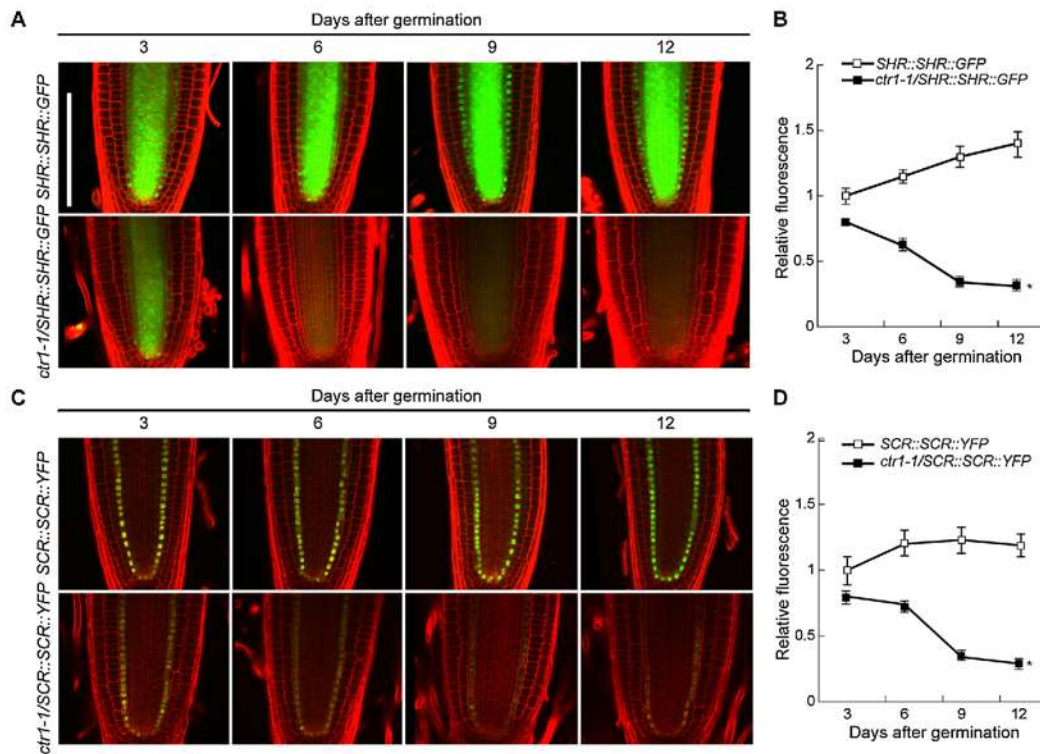


Fig. 8. *CTR1* positively regulates *SHR* and *SCR* expression. (A) *SHR::SHR::GFP* and (C) *SCR::SCR::YFP* expression in Col-0 and *cr1-1* in a 12-day kinetic experiment. (B, D) Relative fluorescence quantitation from 10 independent seedlings. Both *SHR* and *SCR* expression gradually diminishes with time in *cr1-1* mutants. Representative images were taken from 10 seedlings per line and treatment. Scale bar: 100 μ m.

short roots and ectopic root hair formation in *cr1-1* mutants was related to an ethylene-auxin signaling crosstalk in the epidermis, and suggested that the master controller of cell expansion resides in this cell layer, where it senses the environment and, subsequently drives growth [45]. Our data clearly supports this assumption by demonstrating that both *CTR1* and *PIN2* are required for indeterminate root growth.

Confirmation that aberrant auxin redistribution and concentration alters root development, are data from NPA treatment, which induced the accumulation of auxin in the root meristem of WT seedlings via inhibiting basipetal auxin transport [46]. The importance of the basipetal auxin stream for ethylene sensitivity of root growth depends on expression of auxin transporter proteins such as *PIN1*, *PIN2*, and the influx carrier *AUX1*, which are transcriptionally up-regulated in response to ethylene. Hence, that either IAA or ACC treatment up-regulates *PIN2* in the external cell layers of the root tip in WT seedlings, may reflect an increased capacity to redistribute auxin. Moreover, in *cr1-1* mutants, the increased *PIN2* levels provide a means for auxin to reach elongating cells because it is the pivotal transporter in the basipetal distribution pathway that impacts root hair formation and growth. Accordingly, loss of function in *PIN2* renders roots agravitropic and affects root hair formation, which correlates with ethylene insensitivity [47–50].

In the past decades, two major pathways have been proposed as indispensable for the maintenance of the RSCN, proper RAM activity and root growth. In one hand, the *SCR*-*SHR* pathway plays a critical role in RSCN maintenance since single and double mutants in *SCR* and

SHR develop differentiated meristems soon after germination [30]. On the other hand, the AUXIN-PLETHORA pathway, which involves as important players *PIN* proteins, supports the indeterminate program of the roots. Halted root growth has been reported for *Arabidopsis plt1plt2* double mutants between 6–9 days after germination [25]. Our data provide an important insight for a direct role of ethylene in regulating meristem activity that is likely dependent upon the activity of *CTR1* and its downstream interacting protein *EIN2* (Fig. S4), since the root phenotype correlates with the drastic change in *PLT1::GFP* expression and the mild, but evident, reduction in *PLT2::CFP* in the roots of *cr1-1* mutant. This conclusion is reinforced by the facts that *ein2-1* mutants had a marked resistance to auxin induced root growth inhibition that correlates with the loss of *PIN2::PIN2::GFP* induction by ACC or IAA treatments and because root traits affected in *cr1-1* mutants could be restored in *cr1-1ein2-1* double mutants.

We also report that both *SCR* and *SHR* expression patterns are diminished in the roots of *cr1-1* mutant seedlings. These observations suggest that *CTR1* acts as a negative regulator of the ethylene response in the RAM, upstream of *PLT1*, *SCR* and *SHR* and is important to sustain RSCN maintenance. In *cr1-1* mutant seedlings, the RAM function is affected but still active by 15 days, while seedlings of *cr1-1eir1-1* (*pin2*) double mutants develop a fully differentiated RAM few days after germination, similarly to that observed in *plt1plt2* double mutant and in *SCR* and *SHR* mutants. This suggests that in a situation where ethylene response is active in the RAM, such as under stressing growth conditions, *PIN2* action attenuates the transit from indeterminate to

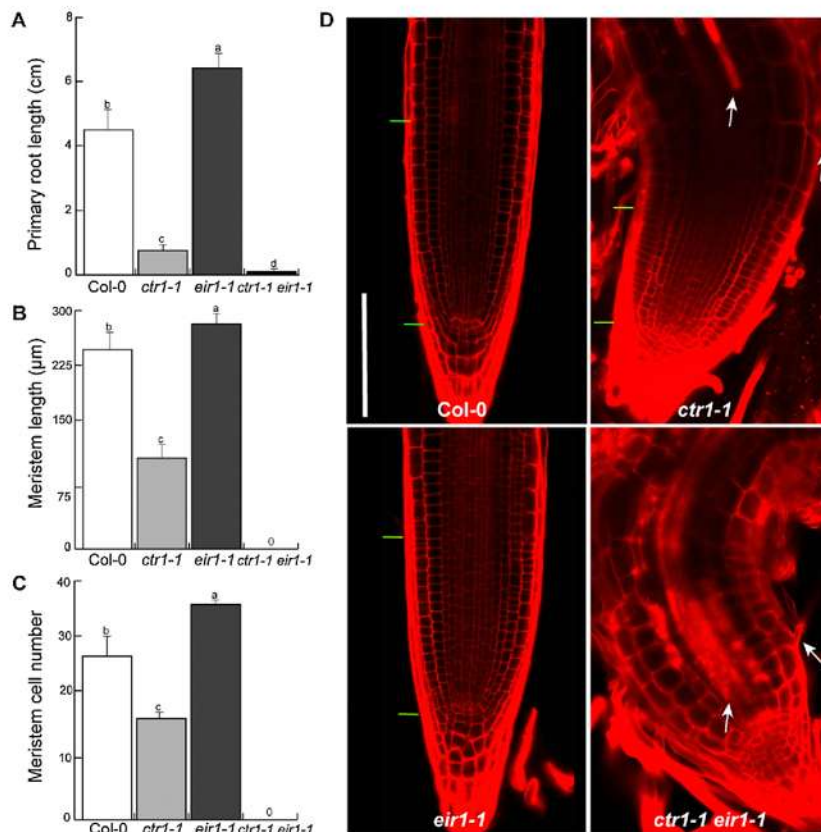


Fig. 9. Mutation of *ctr1* and *eir1* causes primary root to enter a determinate root developmental program. (A) Primary root length, (B) meristem length and (C) meristem cell number in Col-0, *ctr1-1*, *eir1-1* single mutants and *ctr1-1eir1-1* double mutant. At 7 days after germination, double mutants show an extremely short root with determinate growth as show by the absence of meristematic cells. (D) Confocal micrographs showing internal root structure, with protoxylem approaching the quiescent centre zone. Green lines show beginning and end of meristem. Arrows indicate xylem and root hairs. Values shown are the mean $\pm$ SE, $n = 30$ for Col-0 and single mutants and 10 for double mutant. Different letters represent independent statistical groups ($P < 0.05$). Micrographs were taken at 7 days after germination with a propidium iodide counter stain. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

determinate growth.

Roots play the critical functions of anchoring the plant and taking up water and nutrients and thus, sensing the environment may help plants to adjust their growth rate and developmental patterns. An important question is how the quiescent center, initial cells and the meristem respond to changes in biotic and abiotic conditions, but this remains to be investigated. The crosstalk between ethylene and auxin signalling during plant adaptation to low nutrient or metal stress is emerging as a key element in signal integration processes in root meristems. For instance, plants adjust their root architecture to low phosphate (Pi) conditions through determinate growth of primary roots, which promotes lateral root formation and root hair development. These responses are thought to strengthen the plant adaptive capacity for a better P acquisition and use [6,51,52]. A hallmark of low Pi stress in the primary root is a strong reduction of cell division and elongation, and promotion of differentiation events [7,53]. Although the precise role of ethylene signaling working either independently [54] or in concert with auxin [10] to regulate the stem cell niche and root growth is under ongoing research, our findings that mutation of *CTR1* and *EIR1*(PIN2) extend the roles of ethylene in the regulation of the stem cell niche, which may also occur under environmental stress and will help us to gain a better understanding of the possible connection between *CTR1*-dependent signaling and the recently reported function of the root cap in phosphate nutrition [55]. Together our data positions the *Arabidopsis* *CTR1* kinase and the auxin transporter *PIN2*

for the genetic regulation of indeterminate primary root growth. Ethylene has been traditionally considered a stress hormone, investigating the possible roles of environmental stressors on stem cells, cell division or differentiation programs and their possible connection with *CTR1* and downstream effectors likely via phosphorylation events will help clarify the adaptive relevance of determinate root growth programs.

Author contribution statement

Alejandro Méndez-Bravo: performed the research, data analysis and manuscript writing.

León Francisco Ruiz-Herrera: experiment performance and conceptualization.

Alfredo Cruz-Ramírez: provided biological materials, review & editing.

Plinio Guzman: provided biological materials, review & editing.

Miguel Martínez-Trujillo: review & editing.

Randy Ortiz-Castro: review & editing.

José López-Bucio: conceptualization, applied for funding, project supervision, data analysis and manuscript writing.

Declarations of interest

The authors declare they have no conflict of interest.

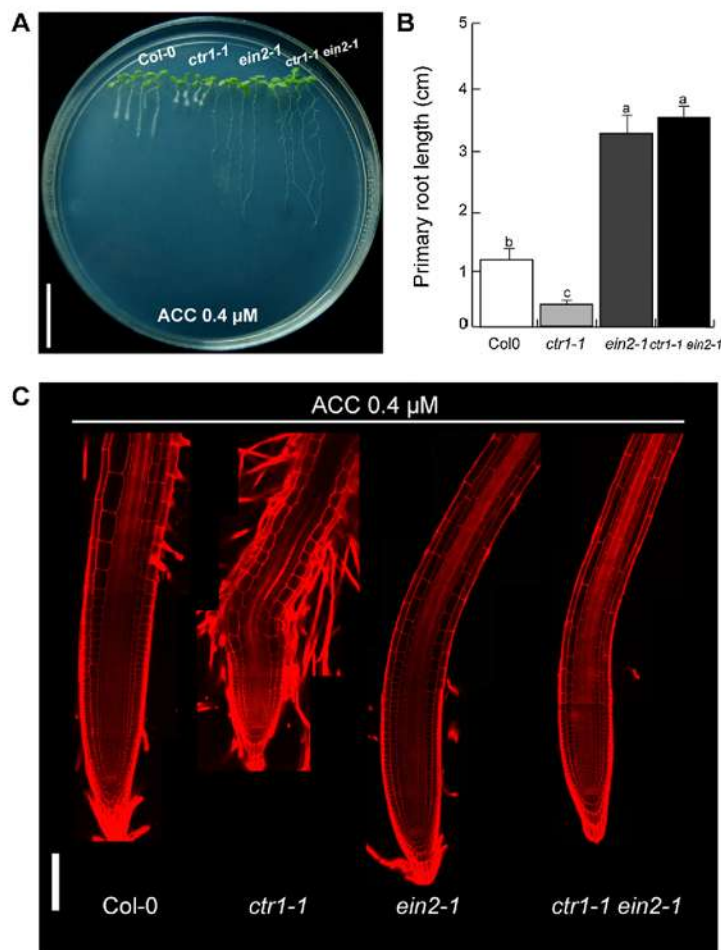


Fig. 10. Root growth and ACC resistance is restored in *ctr1-1ein2-1* double mutants. (A) Representative image of growth of WT (Col-0), *ctr1-1*, *ein2-1*, and *ctr1-1ein2-1* homozygous seedlings, side by side on MS 0.2X agar-plates supplemented with 0.4 μ M ACC 7 days after germination. Scale bar: 2 cm. (B) Primary root length quantification. Values shown are the mean $\pm$ SE, $n = 15$. Different letters in graph represent means statistically different ($P < 0.05$). (C) Comparative details of root growth zones of Col-0, *ctr1-1*, *ein2-1* and *ctr1-1ein2-1* mutants. Representative images at 7 days after germination seedlings grown in ACC supplemented medium were taken. Scale bar: 100 μ m. Representative images from 15 seedlings analyzed. Scale bar: 500 μ m.

Acknowledgments

The authors are indebted to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, research project 177775) and the Marcos Moshinsky foundation for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.11.019>.

References

- [1] B. Scheres, H. Wolkenfelt, V. Willemsen, M. Terlouw, E. Lawson, C. Dean, P. Weisbeek, Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root meristem initials, *Development* 120 (1994) 2475–2487.
- [2] L. Dolan, K. Janmaat, V. Willemsen, P. Linstead, S. Poethig, K. Roberts, B. Scheres, Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root, *Development* 119 (1993) 71–84.
- [3] C. Kidner, V. Sundaresam, K. Roberts, L. Dolan, Clonal analysis of the *Arabidopsis* root confirms that position, not lineage, determines cell fate, *Planta* 211 (2000) 191–199.
- [4] B. Scheres, P. Benfey, L. Dolan, *Root Development. The Arabidopsis Book Vol. 1* (2002), p. e0101, <https://doi.org/10.1199/tab.0101>.
- [5] H.M. Cederholm, A.S. Iyer-Pascuzzi, P. Benfey, Patterning the primary root in *Arabidopsis*, *WIREs Dev. Biol.* 1 (2012) 675–691.
- [6] J. López-Bucio, E. Hernández-Abreu, L. Sánchez-Cakderón, M. Nieto-Jacobo, J. Simpson, L. Herrera-Estrella, Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system, *Plant Physiol.* 129 (2002) 244–256.
- [7] L. Sánchez-Cakderón, J. López-Bucio, A. Chacón-López, A. Cruz-Ramírez, L. Herrera-Estrella, Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 46 (2005) 174–184.
- [8] L.F. Ruiz-Herrera, J. López-Bucio, Aluminum induces low phosphate adaptive responses and modulates primary and lateral root growth by differentially affecting auxin signaling in *Arabidopsis* seedlings, *Plant Soil* 371 (2013) 593–609.
- [9] J. Heyman, R. Kumpf, L. De Veylder, A quiescent path to plant longevity, *Trends Cell Biol.* 24 (2014) 443–448.
- [10] C.A. Pérez-Torres, J. López-Bucio, A. Cruz-Ramírez, E. Ibarra-Laclette, S. Dhamasiri, M. Estelle, L. Herrera-Estrella, Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor, *Plant Cell* 20 (2008) 3258–3272.
- [11] M. Tanimoto, K. Roberts, L. Dolan, Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.* 8 (1995) 943–948.
- [12] J.R. Pitts, A. Cernac, M. Estelle, Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*, *Plant J.* 16 (1998) 553–560.
- [13] A. Thomann, E. Lechner, M. Hansen, E. Dumbalskauskas, Y. Pamentier, J. Kieber, B. Scheres, P. Genschik, *Arabidopsis* CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms, *PLoS Genet.* 5 (2009) e1000328.
- [14] I. Street, S. Aman, Y. Zubo, A. Ramzan, X. Wang, S. Shakeel, J. Kieber, G. Schaller, Ethylene inhibits cell proliferation of the *Arabidopsis* root meristem, *Plant Physiol.* 169 (2015) 338–350.
- [15] A. Stepanova, J. Hoyt, A. Hamilton, J. Alonso, A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 17 (2005) 2230–2242.
- [16] F. Pickett, A. Wilson, M. Estelle, The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance, *Plant Physiol.* 94 (1990) 1462–1466.

- [17] J. Le, F. Vandenbussche, D. Van der Straeten, J. Verbelen, In the early response of *Arabidopsis* roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation, *Plant Physiol.* 125 (2001) 519–522.
- [18] R. Swarup, P. Perry, D. Hagenbeek, D. Van Der Straeten, G. Beemster, G. Sandberg, R. Bhalerao, K. Ljung, M. Bennett, Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation, *Plant Cell* 19 (2007) 2186–2196.
- [19] K. Růžička, K. Ljung, S. Vanneste, R. Podhorská, T. Beeckman, J. Friml, E. Benková, Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution, *Plant Cell* 19 (2007) 2197–2212.
- [20] L.C. Strader, G. Chen, B. Bartel, Ethylene directs auxin to control root cell expansion, *Plant J.* 64 (2010) 874–884.
- [21] G. Muday, A. Rahman, M. Binder, Auxin and ethylene: collaborators or competitors? *Trends Plant Sci.* 17 (2012) 181–195.
- [22] B. McDaniel, B. Binder, Ethylene receptor 1 (ETR1) is sufficient and has the predominant role in mediating inhibition of ethylene responses by Silver in *Arabidopsis thaliana*, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 26094–26103.
- [23] C. Ju, G. Yoon, J. Shemansky, D. Lin, J. Chang, W. Garrett, M. Kessenbrock, G. Groth, M. Tucker, B. Cooper, J. Kieber, C. Chang, CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signalling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 19486–19491.
- [24] A. Stepanova, J. Alonso, Ethylene signaling and response: where different modules meet, *Curr. Opin. Plant Biol.* 19 (2009) 909–914.
- [25] C. Galinha, H. Hofhuis, M. Luitjen, V. Willemsen, I. Bilhou, R. Heidstra, B. Scheres, PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development, *Nature* 449 (2007) 1053–1057.
- [26] I. Bilhou, J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, B. Scheres, The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots, *Nature* 443 (2005) 39–44.
- [27] A. Vieten, S. Vanneste, J. Wiśniewska, E. Benková, R. Benjamins, T. Beeckman, C. Luschig, J. Friml, Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression, *Development* 132 (2005) 4521–4531.
- [28] L. Di Laurenzio, J. Wysocka-Diller, J.E. Malamy, L. Pysh, Y. Helariutta, G. Freshour, M.G. Hahn, K.A. Feldmann, P.N. Benfey, The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root, *Cell* 86 (1996) 423–433.
- [29] Y. Helariutta, H. Fukaki, J. Wysocka-Diller, K. Nakajima, J. Jung, G. Sena, M.T. Hauser, P.N. Benfey, The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling, *Cell* 101 (2000) 555–567.
- [30] M. Lucas, R. Swarup, I.A. Paponov, K. Swarup, I. Casimiro, D. Lake, B. Peret, S. Zappala, S. Mairhofer, M. Whitworth, J. Wang, K. Ljung, A. Marchant, G. Sandberg, M.J. Holdsworth, K. Palme, T. Pridmore, S. Mooney, M.J. Bennett, SHORT-ROOT regulates primary, lateral, and adventitious root development in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 155 (2011) 384–398.
- [31] M. Tanaka, A. Kikuchi, H. Kamada, The *Arabidopsis* histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination, *Plant Physiol.* 146 (2007) 149–161.
- [32] L. Pi, E. Aichinger, E. van der Graaf, C.I. Llavata-Peris, D. Weijers, L. Hernig, E. Groot, T. Laux, Organizer-Derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of *CDE4* expression, *Dev. Cell* 33 (2015) 576–588.
- [33] I. Ottenschläger, P. Wolff, Ch. Wolverton, R. Bhalerao, G. Sandberg, H. Ishikawa, Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 2987–2991.
- [34] P. Guzmán, J. Ecker, Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants, *Plant Cell* 2 (1990) 513–523.
- [35] H. Chae, F. Faure, J. Kieber, The *eto1*, *eto2* and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein, *Plant Cell* 15 (2003) 1–15.
- [36] J. Kieber, M. Rothenberg, G. Roman, K. Feldmann, J. Ecker, CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases, *Cell* 72 (1993) 427–441.
- [37] A. Colón-Carmona, R. You, T. Haimovich-Gal, P. Doerner, Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein, *Plant J.* 20 (1999) 503–508.
- [38] E. Benková, M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens, J. Friml, Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation, *Cell* 115 (2003) 591–602.
- [39] J. Xu, B. Scheres, Dissections of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity, *Plant Cell* 17 (2005) 525–536.
- [40] J. Malamy, P. Benfey, Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*, *Development* 124 (1997) 33–44.
- [41] D. Lewis, S. Negi, P. Sukumar, G. Muday, Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers, *Development* 128 (2011) 3485–3495.
- [42] R. Swarup, E.M. Kramer, P. Perry, K. Knox, H.M.O. Leyser, J. Haseloff, G.T.S. Beemster, R. Bhalerao, M.J. Bennett, Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal, *Nat. Cell Biol.* 7 (2005) 1057–1065.
- [43] S. Sabatini, D. Beis, H. Wolkenfelt, J. Murfett, J. Guilfoyle, J. Malamy, P. Benfey, O. Leyser, N. Bechtold, P. Weisbeek, B. Scheres, An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root, *Cell* 99 (1999) 463–472.
- [44] J. Friml, E. Benková, I. Bilhou, J. Wiśniewska, T. Hamann, K. Ljung, S. Woody, G. Sandberg, B. Scheres, G. Jürgens, K. Palme, AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*, *Cell* 108 (2002) 661–673.
- [45] I. Vaseva, E. Qudeimat, T. Potuschk, Y. Du, P. Genschik, F. Vandenbussche, D. Van Der Straeten, The plant hormone ethylene restricts *Arabidopsis* growth via the epidermis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) E4130–E4139.
- [46] A.M. Rashotte, S.R. Brady, R.C. Reed, S.J. Ante, G.K. Muday, Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 122 (2000) 481–490.
- [47] R. Chen, P. Hilson, J. Sedbrook, E. Rosen, T. Caspar, P.H. Masson, The *Arabidopsis thaliana* AGRATROPIC 1 gene encodes a component of the polar-auxin-transport efflux carrier, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 15112–15117.
- [48] C. Luschig, R.A. Gaxiola, P. Grisafi, G.R. Fink, EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*, *Genes Dev.* 12 (1998) 2175–2187.
- [49] A. Müller, C. Guan, L. Gölweiler, P. Tänzler, P. Huijser, A. Marchant, G. Parry, M. Bennett, E. Wisman, K. Palme, AtPIN2 defines a locus of *Arabidopsis* for root gravitropism control, *EMBO J.* 17 (1998) 6903–6911.
- [50] Z. Ding, J. Friml, Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 12046–12051.
- [51] J. López-Bucio, A. Cruz-Ramírez, L. Herrera-Estrella, The role of nutrient availability in regulating root architecture, *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (2003) 280–287.
- [52] L.F. Ruiz-Herrera, M.W. Shane, J. López-Bucio, Nutritional regulation of root development, *WIREs Dev. Biol.* 4 (2015) 431–443.
- [53] S. Svistoonoff, A. Creff, M. Raymond, C. Sigot-Claude, L. Ricaud, A. Blanchet, L. Nussaume, T. Desnos, Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture, *Nat. Genet.* 39 (2007) 792–796.
- [54] M. Lei, C. Zhu, Y. Liu, A.S. Karthikeyan, R.A. Bressan, K.G. Raghothama, D. Liu, Ethylene signalling is involved in regulation of phosphate starvation-induced gene expression and production of acid phosphatases and anthocyanin in *Arabidopsis*, *New Phytol.* 189 (2011) 1084–1095.
- [55] S. Kanno, J.F. Arrighi, S. Chiarenza, V. Bayle, R. Berthomé, B. Péret, H. Javot, E. Delannoy, E. Marin, T.M. Nakanishi, M.C. Thibaud, L. Nussaume, A novel role for the root cap in phosphate uptake and homeostasis, *eLife* 5 (2016) e14577.

Supplementary material

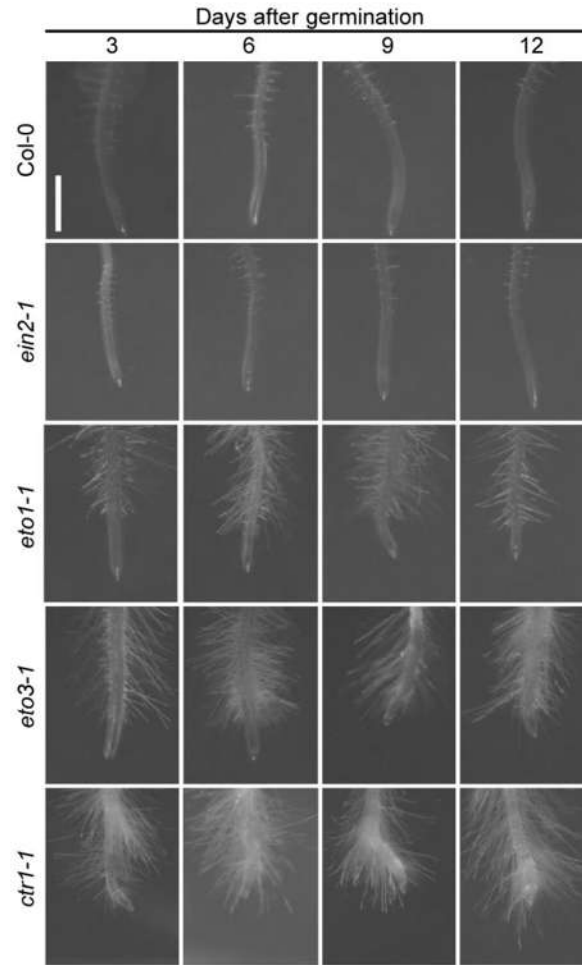


Figure S1. Ethylene signaling inhibits *Arabidopsis* primary root growth and promotes root hair growth and development. Representative images of the primary root tip of WT (Col-0), and *ein2-1*, *eto1-1*, *eto3-1* and *ctr1-1* mutant seedlings in a 12-day kinetic experiment. Ethylene overproducing and constitutive response mutants *eto1-1*, *eto3-1* and *ctr1-1* develop longer and denser root hairs at the root tip. n=30. Scale bar: 250 μ m.

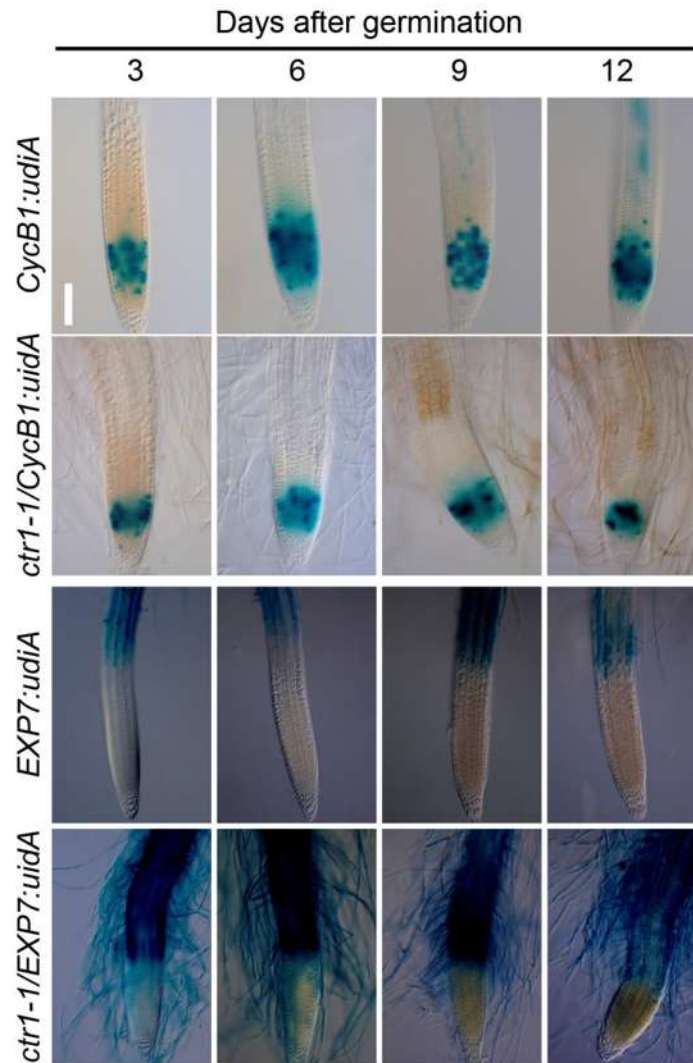


Figure S2. Mitotic activity and cell differentiation in WT and *ctr1-1* mutants. Representative photographs of *CycB1:uid* and *EXP7:uidA* in WT (Col-0) and *ctr1-1* mutants in a 12-day kinetic experiment. Note that *CycB1* domain occurs in fewer cells; and concomitantly *EXP7* is expressed closer to the root tip in *ctr1-1* mutants. Representative images were taken from at least 10 individuals per line and treatment. Scale bar: 100 μ m.

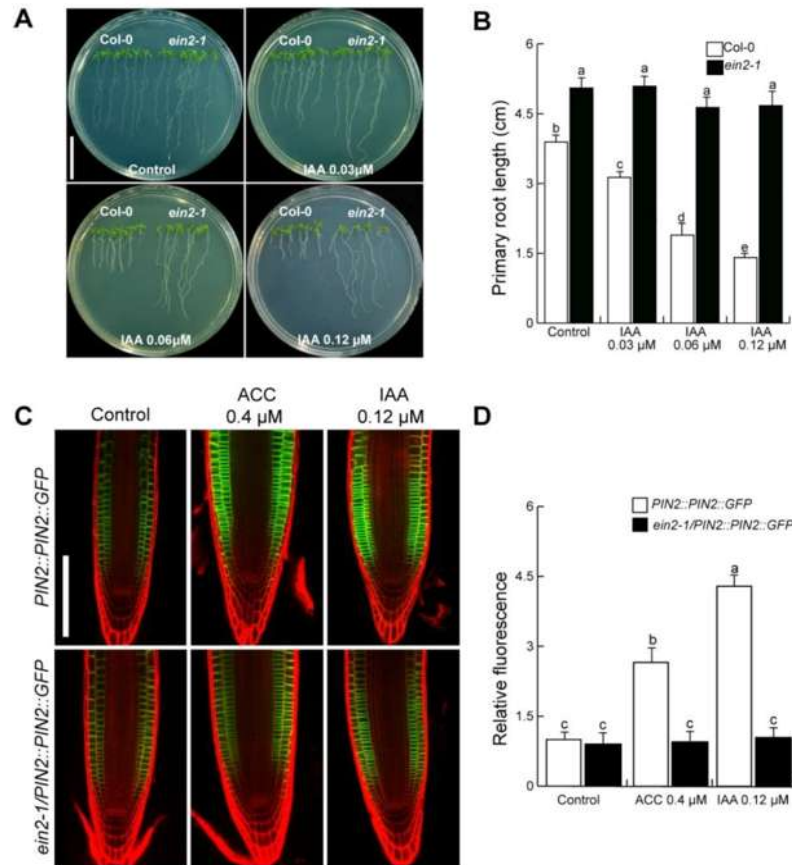


Figure S3. *EIN2* loss-of-function confers IAA resistance and disrupts inducible expression of *PIN2* by ACC and IAA. (A) Growth of WT (Col-0) and *ein2-1* mutants side by side in medium without auxin or supplemented with increasing IAA concentrations. (B) Primary root length of plants 7 days after germination. (C) *PIN2::PIN2::GFP* expression in WT and *ein2-1* seedlings under standard growth conditions or supplemented with 0.4 μM ACC or 0.12 μM IAA. (D) Relative fluorescence quantification for 10 seedlings. Micrographs were taken 7 days after germination and a propidium iodide counter stain was applied to show expression domains. Scale bar: 100 μm. Different letters in graphs represent means that differ statistically ($P < 0.05$). The experiments were repeated three times with similar results.

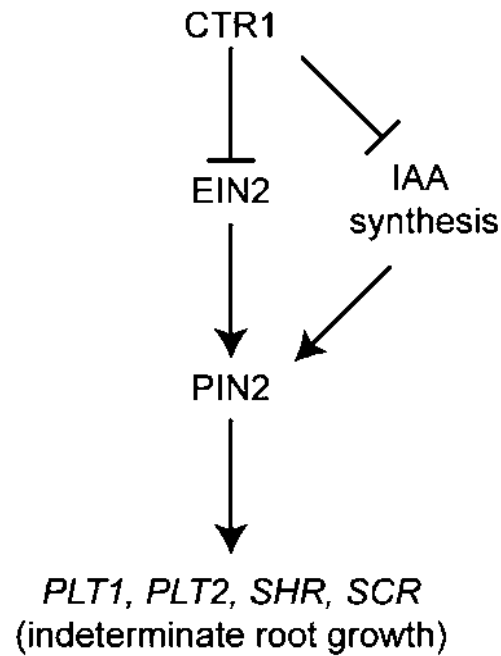


Figure S4. Role of CTR1 in modulating indeterminate/terminate primary root growth. Under normal conditions and in absence of ethylene, CTR1 negatively regulates EIN2 and IAA synthesis. Auxin accumulation triggers PIN2 induced auxin redistribution in the meristem, which positively regulates *PLT1*, *PLT2*, *SHR* and *SCR* expression that ultimately allows the primary root to grow in an indeterminate fashion. Loss-of-function of *CTR1* or *EIN2* triggers opposite phenotypes, affecting both cell division and elongation that depend upon auxin synthesis and/or transport. Mutation of *CTR1* and *PIN2* triggers determinate primary root growth.

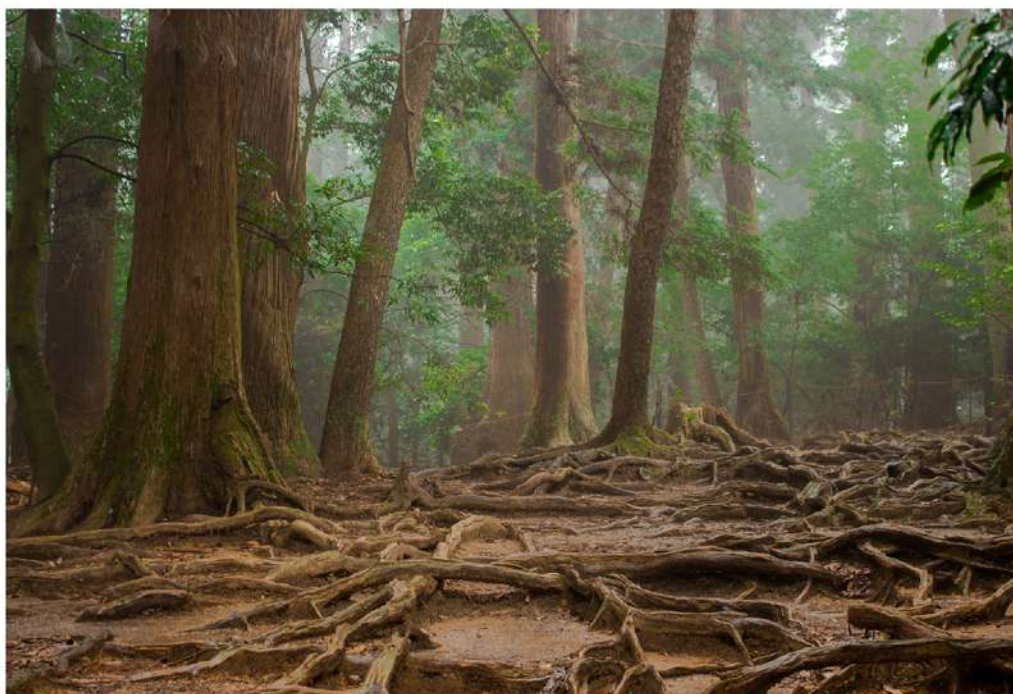
6.2. CAPÍTULO II



ARTÍCULO

La mitad oculta de las plantas

Alejandro Méndez Bravo

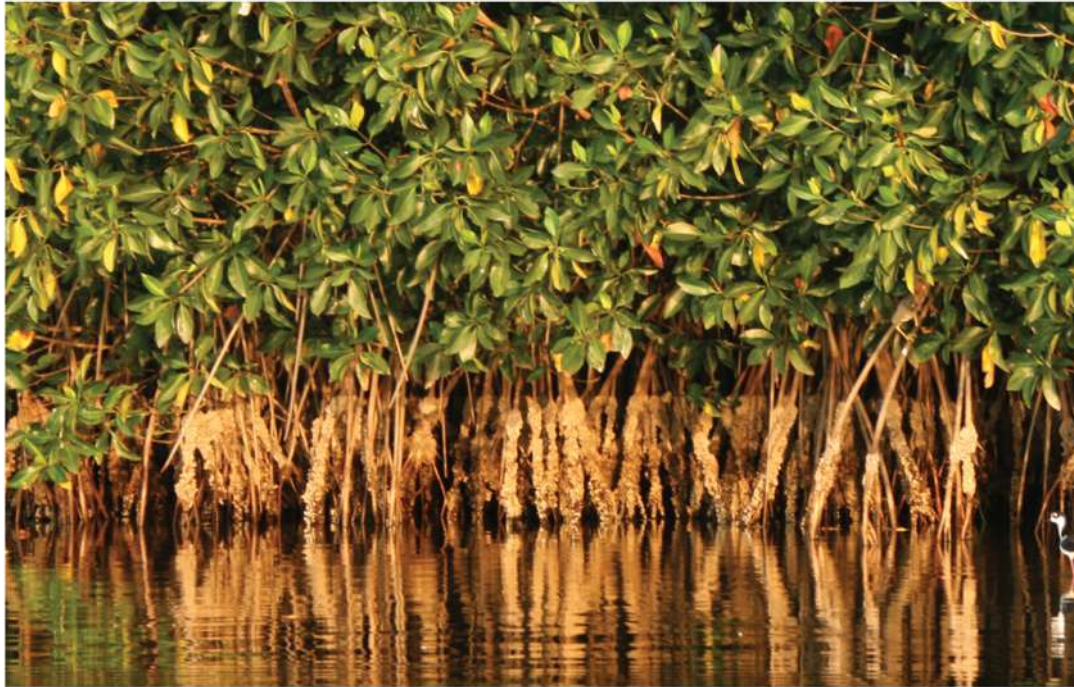


Las plantas presentan una gran variedad de formas, tamaños y estilos de vida, y ya sea que habiten un bosque, un huerto o un jardín, existen elementos comunes entre ellas. La mayoría tiene un tallo o un tronco que le sirve de sostén, hojas donde producen energía mediante la fotosíntesis, y frecuentemente flores y frutos que permiten su reproducción. Si bien, estas estructuras parecen suficientes para definir a una planta, existen otras, frecuentemente ocultas ante nuestra vista; sin las cuales su existencia sería imposible. Estamos hablando de las raíces.

El origen de las raíces

Las plantas evolucionaron en tierra firme, a partir de las algas verdes. Entonces, estaban representadas por parientes de los musgos y las hepáticas modernas; las cuales carecían de raíces y tejidos transportadores. Todos sus tejidos poseían la capacidad de absorber agua y minerales disueltos en ella, pero no podían vivir más que en

M. en C. Alejandro Méndez Bravo es estudiante del Programa Institucional de Doctorado en Ciencias, en la opción de Biología Experimental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo.
mendezbravoamb@gmail.com



zonas con humedad constante y agua corriente. Hace aproximadamente 416 millones de años, en el periodo Devónico, aparecieron las primeras raíces, que evolucionaron a partir de los rizoides, estructuras encargadas de anclar las plantas al suelo y a las rocas.

En un principio eran raíces sencillas que penetraban el suelo en el orden de los milímetros, y seguían dependiendo de la acumulación de agua en estos estratos superficiales. Conforme aumentaron en complejidad, fueron desarrollando tejidos especializados para el transporte (el xilema lleva la solución de agua y minerales a la parte aérea y el floema los productos de la fotosíntesis hacia la raíz) que adquirieron además la capacidad de engrosar radialmente; lo que les permitió explorar suelos más profundos y adquirir el agua de estratos cada vez más inferiores. Este fortalecimiento hizo las raíces más resistentes y permitió a las plantas adquirir tamaños cada vez mayores. Basados en el registro fósil, hoy se sabe que, para finales del Devónico (hace unos 360 millones de años), existieron bosques de licopodios, helechos y coníferas de hasta 30 metros de altura.

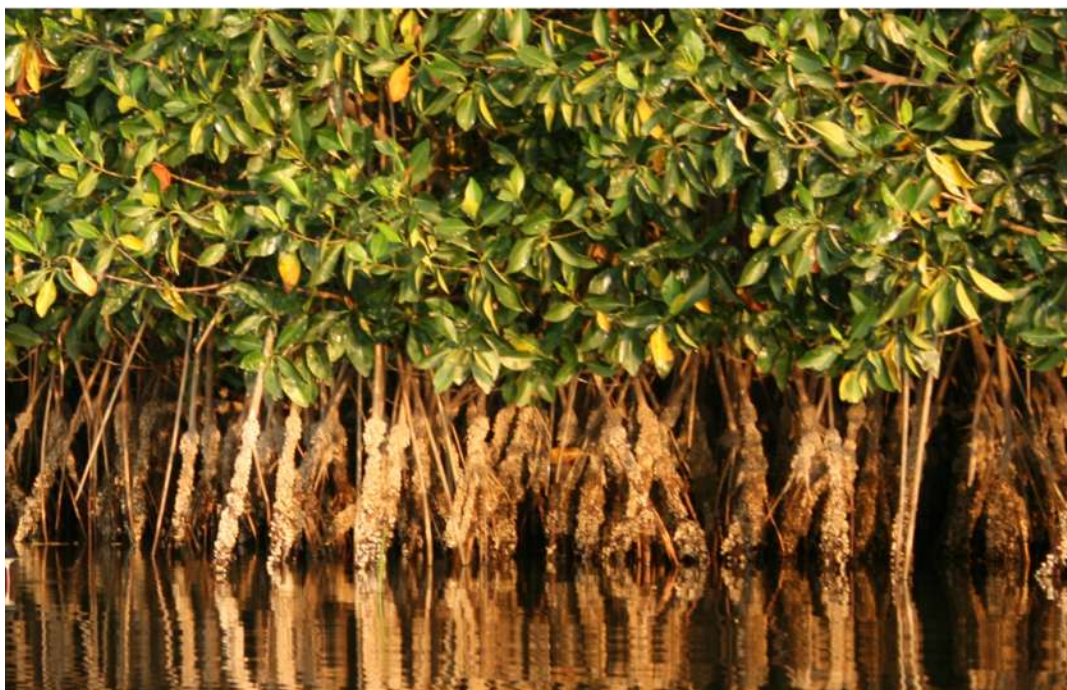
Funciones y datos interesantes de las raíces

Las raíces ramifican irregularmente en patrones generalmente complejos que les permiten explorar el suelo tanto de forma vertical como hori-

zontal. Dichas ramificaciones aumentan el área de contacto para la adquisición de agua y nutrientes. Se sabe por ejemplo que la raíz de una sola planta de centeno (*Secale cereale*), está compuesta hasta por 14 millones de ramificaciones que dispuestas una tras otra pueden medir hasta 623 km de longitud (sin incluir a unos 14 billones de pelos radiculares). ¡Todo contenido en un cubo de 23x23 cm! De tal manera que el peso seco de la biomasa de la raíz, puede igualar, e incluso duplicar el de las partes aéreas de muchas plantas.

Además, las numerosas ramificaciones funcionan como contrafuertes que le permiten a las partes aéreas acumular enormes cantidades de materia y lidiar al mismo tiempo contra las fuerzas de la gravedad, del viento y de las corrientes de agua. Es esta capacidad de anclaje en el suelo la que hace posible que algunos árboles puedan alcanzar más de 100 metros de altura (*Sequoia sempervirens*).

Las raíces de algunas especies como la papa (*Solanum tuberosum*) o la zanahoria (*Daucus carota*) tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de agua y reservas energéticas y representa una adaptación para lidiar contra climas hostiles y suelos pobres en nutrientes. Las raíces de algunas plantas como las orquídeas (familia Orchidaceae) crecen en los árboles o rocas y no en el suelo, y son capaces de realizar fotosíntesis para optimizar su desarrollo. Otras plantas como los manglares (di-



ferentes especies) forman en sus raíces tejidos especializados para permitir la oxigenación, ya que crecen en aguas estancadas pobremente aireadas.

¿Por qué estudiar las raíces?

El crecimiento continuo de las raíces se debe a la generación de células en regiones ubicadas en sus extremos, llamadas meristemos. Las células de los meristemos mantienen un estado indiferenciado, lo que quiere decir que tienen la capacidad de formar parte posteriormente de cualquiera de los tejidos que componen a una raíz.

Este estado indiferenciado es producto de un complejo sistema de regulación genética que funciona mediante un conjunto de sustancias conocidas como reguladores del crecimiento vegetal o, fitohormonas. Las fitohormonas son producidas por las plantas o por microorganismos en el suelo y variaciones en sus concentraciones o interacciones entre ellas modifican el funcionamiento de los meristemos y por ende el crecimiento de las raíces.

Si un meristemo pierde su estado indiferenciado, la raíz pierde la capacidad de seguir creciendo pero en cambio puede dar lugar a ramificaciones que moldearán la forma de la raíz para conferirle la mejor adaptación posible ante determinadas condiciones ambientales (presencia de contaminantes, obstáculos como rocas o suelos altamente compactados).

El conocimiento de los efectos de estas fitohormonas, así como de los genes que controlan la actividad de los meristemos representa una herramienta biotecnológica muy importante. Así por ejemplo, si se identifican los genes responsables de permitir el crecimiento a plantas resistentes a altas concentraciones de contaminantes, o a bajas concentraciones de nutrientes; se vuelve posible generar cultivos modificados genéticamente con dichas características y solventar así problemas del campo que benefician directamente a la calidad de vida de las personas.



<http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/LaPlantas/7777/LaRaiz.html>
http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_18.pdf
 González, C. Blog La Planta. La Raíz
<http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/3er/LaPlantas/7777/LaRaiz.html>

Dubrovsky, J.D. y Shishkova S. (2007). *Enigmas de la raíz: la parte oculta de la planta*. En: *Biotecnología*, Capítulo 18, pp. 201-212.
http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_18.pdf

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El etileno es un regulador del crecimiento vegetal cuya síntesis ocurre a lo largo de todo el ciclo de vida de las plantas, desde la germinación hasta la reproducción y senescencia. Cabe destacar que a pesar de estar presente en la mayor parte de los procesos del desarrollo, su producción se ve estimulada bajo condiciones de estrés y de manera general, se puede decir que promueve respuestas adaptativas. En lo que compete al sistema radicular, está bien caracterizado que tiene un efecto represor de la elongación de la raíz primaria, a la vez que estimula la formación de pelos radiculares (Pierick *et al.*, 2006; Feng *et al.*, 2017). Desde el punto de vista adaptativo, bajo condiciones como de sequía o escasez de nutrientes minerales, estas respuestas indican que hay una optimización de recursos para aumentar la capacidad de exploración y absorción (Voeselek *et al.*, 2015).

Durante varias décadas se aceptó de manera general que el etileno reprime el crecimiento de la raíz primaria mediante la inhibición de la elongación celular promoviendo un tránsito celular incrementado hacia la zona de diferenciación, descartándose su intervención en la actividad del meristemo (Le *et al.*, 2001; Swarup *et al.*, 2007; Růžicka *et al.*, 2007). Contrario a esta observación, Ortega *et al.* (2007), mostraron que la aplicación exógena de etileno promueve la división de las células del centro quiescente sin alterar su identidad, o aquella de las células iniciales que lo rodean. Con base en estos antecedentes, en nuestro grupo de trabajo se observó que mutantes inducidas en la síntesis de etileno (*eto1-1*, *eto3-1*) así como la mutante *ctr1-1* cuya ruta señalización está inducida constitutivamente presentaba alteraciones en la morfología de su región meristemática, por lo que nos avocamos a investigar si el etileno, o bien alguno de los componentes de su señalización pudieran estar afectando dicha actividad. Efectivamente, encontramos que estas mutantes presentan una disminución en la expresión del reportero de actividad mitótica *CycB1:uidA* y que por el contrario, la mutante insensible al regulador *ein2-1*, en elemento corriente debajo de *CTR1*, presenta una mayor actividad mitótica respecto a plantas con genotipo silvestre Col-0. Mediciones tisulares muestran que *ctr1-1* presenta un meristemo 50% menor que está compuesto por apenas el 45% de células respecto a las de Col-0. (Méndez-Bravo *et al.*, 2019). En este tenor, se mostró en otro trabajo que el etileno disminuye el número de células que conforman el meristemo mediante la interacción del receptor *ETR1* con *SHORT HYPOCOTYL2*, un represor de la señalización de auxinas (Street *et al.*, 2015). Este último resultado es interesante, sin embargo soporta la hipótesis de la existencia de un mecanismo de señalización de etileno diferente al canónico donde en presencia de etileno *ETR1*

desfosforila e inactiva a CTR1, que desfosforila a EIN2 y promueve la activación de EIN3 y EIL para promover la transcripción de los ERFs que desencadenan en las respuestas fisiológicas características mencionada en los antecedentes, lo cual a falta de mayor evidencia experimental resulta complicado de explicar (Zhang *et al.*, 2014).

Los fenotipos mostrados por las mutantes en la ruta canónica del etileno *ctr1-1*, y *ein2-1*, así como la modificación diferencial en la actividad mitótica en los meristemos de mutantes sobreproductoras de etileno, nos indican que estos elementos forman parte importante del mecanismo regulatorio responsable de estos procesos. Además, acorde con la literatura, de donde sabemos que entre los elementos de respuesta a etileno, se encuentran los genes *WEI2/ASA1* y *WEI7/ASB1* que codifican proteínas que intervienen en la síntesis de AIA en el meristemo; obtuvimos que *ctr1-1* presenta una actividad auxínica incrementada en el centro quiescente, células iniciales, columela, cofia y epidermis, evidenciada por la fluorescencia del reportero *DR5:GFP* (Stepanova *et al.*, 2005; Ikeda *et al.*, 2009). Este evidente incremento en la actividad auxínica sugiere que además de un incremento en la síntesis del AIA, se lleva a cabo una distribución aberrante del mismo en la región meristemática y en conjunto pueden explicar en parte, el fenotipo corto de su raíz. Así, disminuye la zona de elongación celular, que en *ctr1-1* equivale al 20% y está compuesta por una fracción similar de células respecto a las de las plantas normales (Méndez-Bravo *et al.*, 2018); en tanto se observa la formación acelerada e incremento en la longitud de los pelos radiculares hacia la punta de la raíz (Tanimoto *et al.*, 1995; Pitts *et al.*, 1998; Ruzica *et al.*, 2007).

De manera normal, el AIA producido en el nicho de células iniciales circula en sentido basipétalo (de la base hacia la punta) y acropétalo (de la punta hacia la base) formando un flujo que asemeja una fuente y que provee una concentración óptima para el funcionamiento del meristemo y promueve la formación de pelos radiculares en la epidermis diferenciada (Swarup *et al.*, 2007). El transporte acropétalo en la epidermis está dado por la actividad del transportador de AIA, PIN2. La redistribución del flujo auxínico mostrada en *ctr1-1* sugiere que las respuestas al etileno inducen el movimiento acropétalo de AIA mediante la inducción de los niveles de PIN2. A continuación se analizó la expresión de *PIN1* y *PIN2* en *ctr1-1* mostrando que efectivamente, la expresión de *PIN2* se encuentra incrementada mientras que *PIN1* muestra una clara represión, indicando que se interrumpe el flujo en el sentido basipétalo promoviendo la acumulación de AIA. Los transportadores PIN participan en la regulación de la actividad del meristemo, y su transcripción está a su vez inducida en respuesta al AIA, por lo que la alteración de sus niveles y patrones específicos tiene consecuencias directas

sobre los procesos de división, elongación y diferenciación celular (Sabatini *et al.*, 1999; Friml *et al.*, 2002; Vaseva *et al.*, 2018).

Para reforzar este punto, crecimos plantas silvestres Col-0 y *ctr1-1* en medio suplementado con ácido naftil-talámico (NPA) el cual impide la correcta localización de los transportadores PIN en la membrana plasmática, reprimiendo su actividad e induciendo una acumulación de AIA en la región apical de la raíz, lo que inhibe la elongación de la misma e induce la formación de pelos radiculares (Swarup *et al.*, 2007) de manera similar a *ctr1-1*; indicándonos que CTR1 juega un papel importante en la regulación de los transportadores de AIA, específicamente de PIN2. Además estos datos sugieren que CTR1 se encuentra corriente arriba de PIN2 en la regulación de la elongación y la diferenciación celular de la raíz primaria.

Respecto a la regulación genética del mantenimiento en la actividad del meristemo, se conocen dos rutas. Una involucra a los factores de transcripción PLETHORA (PLT1-4), cuyos niveles de transcripción coinciden con la formación del gradiente de concentración de auxinas en el meristemo mediante la actividad de los transportadores PIN y se incrementan mediante la adición exógena de AIA. Entre sus blancos genéticos se ha descrito la activación de varias ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas que promueven la actividad mitótica, así como la represión de genes que favorecen la diferenciación celular. Acorde a esto, su transcripción y la concentración de sus productos disminuyen progresivamente hacia las zonas de elongación y diferenciación (Santuari *et al.*, 2016).

Las mutantes sencillas en *plt1* y *plt2* presentan distintos grados de alteraciones en la morfología de su meristemo mientras que la doble mutante *plt1plt2* presenta un crecimiento determinado a los pocos días después de la germinación, indicando que de esta familia genética, estos dos elementos son esenciales para el correcto desarrollo de la raíz (Galinha *et al.*, 2007; Blilou *et al.*, 2005; Ding y Friml, 2010). Debido a que *ctr1-1* presenta alteraciones importantes en la expresión de *PIN1* y *PIN2*, así como un meristemo con actividad mitótica reprimida, pensamos que la expresión de los genes *PLT* se encontraría afectada. Analizamos la expresión de *PLT1* y *PLT2* durante 12 días después de la germinación mediante construcciones reporteras transcripcionales y obtuvimos que sucede una disminución progresiva de la expresión de *PLT1* que cae abruptamente entre los días 6 y 9 después de la germinación. *PLT2* por su parte mantiene niveles constantes a lo largo de la cinética, pero significativamente menores que los de plantas silvestres. Previamente habíamos observado que la adición del precursor biosintético del etileno ACC tiene un efecto inhibitorio sobre *PLT1* y *PLT2* que es independiente a la inducción que provoca en la síntesis, transporte y respuestas a AIA. Estos datos indican que el etileno tiene un efecto represor sobre la expresión de estos factores

de transcripción y que por lo tanto su papel en el mantenimiento del desarrollo indeterminado de la raíz es importante y se encuentra regulado en gran parte por CTR1, independientemente del incremento en la biosíntesis y las subsecuentes respuestas al AIA inducidos como parte de las respuestas a etileno.

La otra ruta implicada en el mantenimiento del meristemo está constituida por los factores de transcripción SHR y SCR. Mutantes sencillas y dobles en estos genes provocan un fenotipo de raíz con crecimiento determinado en tiempos que coinciden con los de la doble mutante *plt1plt2* (Lucas *et al.*, 2011; Helariutta *et al.*, 2000). La expresión de estos factores de transcripción no se ve alterada ni por la adición de AIA ni de ACC en el medio de crecimiento, sin embargo, en *ctr1-1* se observa una disminución progresiva que alcanza niveles mínimos entre los días 6 y 9 después de la germinación. En conjunto, estos datos indican que CTR1 ejerce una regulación importante y positiva sobre *PLT1*, *PLT2*, *SHR* y *SCR*; y que se encuentra corriente arriba de estos en la regulación de la actividad del meristemo. Si bien los niveles y la actividad de los factores de transcripción son mínimos, son suficientes para mantener un crecimiento indeterminado de la raíz primaria, ya que se detectan rastros de actividad incluso hasta los 18 días después de la germinación. En los mismos tiempos analizados, el reportero *CycB1:uidA* continúa expresándose, si bien en una región equivalente a un 40% a la de plantas silvestres, así como el reportero *EXP7:Uida* de diferenciación, cuya expresión no se llega a detectar en la región más apical la raíz primaria de las mutantes *ctr1-1*. Específicamente, el hecho de que los niveles de expresión de *PLT2* se mantengan constantes, indica que este elemento en particular tiene un papel preponderante en la promoción del desarrollo indeterminado bajo condiciones de estrés ambiental y exposición prolongada al etileno. Por otra parte, la regulación de CTR1 sobre la expresión de *SHR* y *SCR* genera nuevos cuestionamientos, pues la expresión de construcciones reporteras de la misma no muestra alteraciones ante la adición de AIA o ACC en los medios de crecimiento (Yoo y Sheen, 2008).

La raíz primaria de *ctr1-1* como ya vimos, presenta alteraciones en los procesos de transporte de AIA, así como los niveles de expresión de los factores de transcripción PLT, SHR y SCR y sin embargo, no cambia a un programa determinado de crecimiento. Para ahondar en la importancia biológica de la regulación de CTR1 sobre *PIN2* decidimos elaborar una mutante doble *ctr1-1eir1-1(pin2)*. Se obtuvo una población segregante cuyos fenotipos arrojaron proporciones de 9 plantas silvestres: 3 *ctr1-1*: 3 *eir1-1*: 1 *ctr1-1eir1-1*, esperada para dos mutaciones recesivas. A diferencia de *ctr1-1*, *eir1-1* tiene una raíz primaria más larga con una escasa formación de pelos radicales y crecimiento agravitrópico, por lo que la selección de los fenotipos fue un proceso metodológicamente sencillo. El fenotipo correspondiente a la doble mutación es el

de una raíz primaria extremadamente pequeña cuyo crecimiento se vuelve determinado y por ende se diferencia completamente, proceso evidenciado por la presencia de pelos radiculares en la punta de la raíz, haces vasculares completamente desarrollados en esta misma región y ausencia de meristemo en tiempos menores a los 7 días después de la germinación. Este resultado nos indica que la correcta expresión y actividad tanto de *CTR1* como de *PIN2* es necesaria para la persistencia de un desarrollo indeterminado. Así mismo, sugiere que bajo condiciones de estrés donde la síntesis de etileno se mantiene inducida durante periodos prolongados, *PIN2* funciona como un mecanismo atenuante de las respuestas negativas del mismo sobre la actividad del meristemo de la raíz primaria, e impide el cambio a un programa determinado del desarrollo. Las implicaciones fenotípicas obtenidas pueden corresponder a una respuesta adaptativa ante situaciones como la sequía, la baja concentración de fosfato en el suelo y la contaminación por metales pesados en los que se observan fenotipos similares a los de *ctr1-eir1-1* (López-Bucio *et al.*, 2002; Sánchez-Calderón *et al.*, 2005; Ruíz-Herrera y López-Bucio, 2013).

Un aspecto débil de nuestros resultados era el hecho de que solamente se estudió un alelo mutante de *CTR*. Si bien existen reportes de otros alelos como *btb* (Ikeda *et al.*, 2009) y *ctr1-2* (Kieber *et al.*, 1993; Street *et al.*, 2015), cuyos fenotipos de raíz primaria son más moderados que *ctr1-1*, los procesos alterados son básicamente los mismos. Además, el tiempo que implicó la movilización de transgenes reporteros a esta mutante, así como la elaboración de dobles mutantes hacían inviables análisis similares con otros alelos. El hecho de usar un solo alelo mutante, obtenido por tratamientos con etil metano sulfonato (EMS) no descarta la existencia de mutaciones en otros genes y/o efectos pleiotrópicos inespecíficos. Por esta razón, decidimos realizar una doble mutante *ctr1-ein2-1*, y así corroborar que el fenotipo observado en *ctr1-1* está relacionado con su participación en la ruta de señalización del etileno. La generación F2 segregante se creció en medio suplementado con ACC 0.4 μ M, que inhibe el crecimiento de la raíz de las plantas silvestres, y nos permitió seleccionar las diferentes combinaciones genéticas.

Los fenotipos obtenidos ocurrieron en una proporción de 9 plantas silvestres (con inhibición de la elongación de la raíz primaria equivalente a un 50% por el ACC y pelos radiculares largos): 3 mutantes *ctr1-1* (raíz corta y pelos radiculares característicos de la mutante): 3 mutantes *ein2-1* (insensibles a la inhibición de la elongación de la raíz y pelos radiculares cortos): 1 doble mutante *ctr1-1 ein2-1* (raíz primaria insensible al ACC en la elongación de la raíz primaria, pelos radiculares con longitud intermedia entre Col-0 con ACC y *ein2-1*). De esta manera, con un fenotipo que restaura la afectación de *ctr1-1* en las zonas

meristemática y de elongación de la raíz primaria, la doble mutante refuerza la localización de *CTR1* corriente arriba de *EIN2* en la ruta de señalización del etileno y nos permite concluir que el fenotipo de *ctr1-1* no es inespecífico, sugiriendo que los mecanismos involucrados en los procesos analizados involucran elementos corriente abajo en la misma ruta de señalización. Complementariamente y con el fin de reforzar estos resultados, analizamos la expresión del transgen reportero *PIN2::PIN2::GFP* en la mutante sencilla *ein2-1* crecida en adición de ACC 0.4 μ M y AIA 0.12 μ M y obtuvimos que este mantiene niveles de expresión que no varían significativamente de los obtenidos por la mutante en condiciones control, al mismo tiempo que la raíz primaria presenta una resistencia marcada a los efectos de la adición de auxinas.

Por otra parte, la elongación de los pelos radiculares en respuesta al ACC presente en la doble mutante *ctr1-1 ein2-1* no era esperada en el fenotipo. Este fenómeno sugiere dos posibles escenarios. Uno de ellos es el que este proceso involucra una inducción de la expresión de *PIN2*, regulador positivo de la diferenciación de la epidermis, por parte de *CTR1*; independientemente de *EIN2*. La estructura terciaria de *CTR1* así como su actividad de cinasa la relacionan con la familia RAF de MAPKKK's, que se encuentran corriente debajo de un receptor y activan por fosforilación a una MAPKK que finalmente activa a una MAPK (Morrison, 2012). Estos circuitos regulatorios se encuentran ampliamente conservados en los eucariontes y conllevan a la percepción de una gran variedad de estímulos ambientales para conferir una respuesta adaptativa o deletérea, según la naturaleza e intensidad del estímulo. Esta posibilidad se vuelve plausible pues se ha comprobado que existen en todos los transportadores PIN, secuencias específicas para el reconocimiento de MPK's con subsecuentes modificaciones postraduccionales que alteran su actividad (Dory *et al.*, 2018). Por ejemplo, se sabe que un circuito integrado por MKK7-MPK6 fosforila a PIN1, impidiendo la polaridad en su localización en la membrana plasmática e induciendo así las ramificaciones en el meristemo floral de *A. thaliana* (Jia *et al.*, 2016). De esta manera, bajo condiciones favorables para el crecimiento, *CTR1* podría estar activando una MKK-MPK que previene la localización de *PIN2* y mantiene el flujo de AIA en niveles óptimos para la formación del máximo de auxinas en el meristemo. A la fecha ha resultado complicado demostrar, o bien refutar la posibilidad de que *CTR1* forme parte de estos complejos y pueda así esclarecerse este supuesto (Hahn y Harter, 2009).

El otro escenario abonaría a la teoría de una ruta alternativa de señalización del etileno donde interviene la actividad de elementos diferentes a *CTR1* y a *EIN2* actuando corriente debajo de los receptores y cuya identidad es a la fecha, putativa (Zhang *et al.*, 2014). Así, estos resultados abren un panorama más amplio

para el estudio de los procesos de elongación de los pelos radiculares, que de manera general se atribuye al AIA, e indican que la interacción entre elementos señalizadores del etileno y de las auxinas involucra procesos regulatorios bastante complejos.

Finalmente, los conceptos que emergen de los resultados de este trabajo pueden ser representados en un modelo presente en el material suplementario del CAPÍTULO I, en el cual se presenta a CTR1 en la parte superior que se encuentra regulando negativamente la actividad de EIN2 por una parte y la síntesis de AIA por la otra. En un escenario donde esto sucede normalmente, la actividad de PIN2 se mantiene en niveles suficientes para promover la correcta expresión y actividad de los factores de transcripción *PLT1* y *PLT2*, *SHR* y *SCR* permitiendo el crecimiento indeterminado de la raíz primaria.

7.1 Resumen de resultados

1. Mutantes en los procesos de síntesis y señalización del etileno alteran la elongación de la raíz primaria y la actividad mitótica de sus meristemas.
2. De estas, la pérdida de la función del regulador negativo CTR1, disminuye en un 50% la longitud y el número de células del meristemo y muestra un impacto más profundo en la inhibición de la zona de elongación.
3. Estos efectos correlacionan con un incremento en la concentración de AIA y la actividad auxínica en la región del meristemo, así como una disminución en el transporte basipétalo de AIA propiciado por una disminución de la expresión de *PIN1* y un aumento en el sentido acropétalo por un aumento de *PIN2*.
4. *CTR1* es un regulador positivo de la expresión de los factores de transcripción *PLT1* y *PLT2*.
5. *CTR1* es un regulador positivo de la expresión de los factores de transcripción *SHR* y *SCR*.
6. La doble mutante *ctr1-1 eir1-1 (pin2)* muestra un crecimiento determinado.
7. La doble mutante *ctr1-1 ein2-1* restaura la actividad meristemática y de la zona de elongación de la raíz primaria de *ctr1-1*.

7.2 Conclusiones Generales

Los resultados principales de este trabajo de investigación aportan información respecto a los mecanismos genéticos y celulares de un proceso inherente a la naturaleza de las plantas como lo es el desarrollo indeterminado. Primeramente, queda de manifiesto que el etileno participa de manera importante en la actividad e identidad del meristemo de la raíz primaria y que parte de los efectos son independientes a la ampliamente estudiada interacción de componentes de las rutas del etileno y de las auxinas. Particularmente, el etileno reprime la expresión

de los factores de transcripción *PLT1* y *PLT2* mientras que el AIA la estimula. Además se muestra que la pérdida de la función del regulador negativo de las respuestas al etileno, *CTR1*, que muestra alteraciones importantes en los procesos de división y de elongación celular en la raíz primaria, inhibe la expresión de *SHR* y *SCR* cuya actividad es redundante con la de *PLT1* y *2* en la promoción de la actividad meristemática. Mediante estudios de dobles mutantes se muestra que estos efectos ocurren mediante la interacción corriente debajo con *EIN2* y que dichas afectaciones fenotípicas conllevan a un desarrollo determinado cuando se pierde la función del transportador de AIA, *PIN2*. De esta manera se propone que los niveles celulares de *PIN2* aumentan, incrementando su función como un mecanismo atenuante de las respuestas a la exposición prolongada a altas concentraciones de etileno, propiciadas por ejemplo por estrés ambiental de diversas índoles. Como perspectivas de investigación, queda esclarecer los elementos, posiblemente corriente debajo de *EIN2*, o independientes de este; que conllevan a la inhibición de la expresión de *SHR* y *SCR*, así como estudiar bajo el enfoque de las evidencias comentadas en la discusión, los procesos del desarrollo de los pelos radiculares y la participación de *CTR1* en la morfología de la cofia y la columnela.

8. REFERENCIAS

1. Abel S., Theologis A. (1996) Early genes and auxin action. *Plant Physiology* 111: 9-17.
2. Abeles F.B., Morgan P.W., Saltveit M.E. (1992) Ethylene in Plant Biology. Academic Press. San Diego, California E.U.A. 414 pp.
3. Aichinger E., Noortje K., Friedrich T., *et al.* (2012) Plant Stem Cell Niches. *Annual Review of Plant Biology*. 63: 615-636.
4. Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y., Amasino R. y Scheres B. (2004) The PLETHORA genes mediate patterning of the Arabidopsis root stem-cell niche. *Cell* 119:109–120.
5. Bandyopadhyay A., Blakeslee J.J., Lee O.R., Sauer M., Titapiwatanakun B., Makam S.N., Bouchard R., Geisler M., Martinoia E., Friml J., Peer W.A., Murphy A.S. (2007) Interactions of PIN and PGP auxin transport mechanisms. *Biochemical Society Transactions* 35: 137-141
6. Beemster G.T.S., Baskin T.I. (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 116: 515-526.
7. Benfey P., Linstead P., Roberts K., *et al.* (1993) Root development in Arabidopsis: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 119(1): 57-70.
8. Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G., Friml J. (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115: 591–602.
9. Bevan M. y Walsh S. (2005) The Arabidopsis genome: a foundation for plant research. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 15:1632-1642.
10. Bisson M. y Groth G. (2011) New paradigm in ethylene signaling. EIN2, the central regulator of the signaling pathway, interacts directly with the upstream receptors. *Plant Signaling & Behavior* 6 (1):164-166.
11. Bitonti M.B., Chiappetta A. (2011) Root Apical Meristem Pattern: Hormone Circuitry and Transcriptional Networks. *Progress in Botany* 72: 37-71.
12. Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K., Scheres B. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433: 39-44.
13. Brunoud G., Wells D., Oliva M., Larrieu A., Mirabet V., Burrow A., Beeckman T., Kepinski S., Traas J., Bennett M., Vernoux T. (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* 482: 103-106.

14. Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R. *et al.* (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell Physiology* 13: 843-852.
15. Chae H.S., Faure F., Kieber J. (2003) The *eto1*, *eto2* and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* 15:1-15.
16. Chen J., Ullah H., Young J., *et al.* (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes & Development* 15:902-911.
17. Chapman E.J., Estelle M. (2009) Mechanisms of Auxin-Regulated Gene Expression in Plants. *Annual Review on Genetics* 43: 265-285.
18. Christenhusz M. y Byng J. (2016) The number of known plants species in the world and its annual increase. *Phytotaxa* 261(3): 201-217.
19. Contreras-Cornejo H., López-Bucio J.S., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L., Ramos-Vega M., Guevara-García A., López Bucio J. (2015) Mitogen-Activated Protein Kinase 6 and Ethylene and Auxin Signaling pathways Are Involved in *Arabidopsis* Root-System Architecture Alterations by *Trichoderma atroviridae*. *Molecular Plant- Microbe Interactions*. Aceptado para publicación y en proceso de asignación de volumen y número.
20. Cui H., Hao Y., Kovtun M., *et al.* (2011) Genome-wide direct target analysis reveals a role for SHORT-ROOT in root vascular patterning through Cytokinin Homeostasis. *Plant Physiology* 157(3):1221-1231.
21. Curtis M.J., Hays J.B. (2007) Tolerance of dividing cells to replication stress in UVB-irradiated *Arabidopsis* roots: requirements for DNA transletion polymerases eta and zeta. *DNA Repair* 6(9): 1341-1358.
22. 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*. *The Plant Cell* 18: 208-320.
23. Dello Ioio R., Linhares F., Scacchi E., Casamitjana-Martínez, Heidstra R., Costantino P., Sabatini S. (2007) Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Development* 138: 849-859.
24. Ding Z., Friml J. (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Procedures of the Natuional Academy of Sciences of the United States* 107(26): 12046-12051.
25. Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B. (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.
26. Dolan L., Duckett C:M:, Grierson, C. *et al.* (1994) Clonal Relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 120:2465-2474.

27. Dory M., Hatzimasoura E., Kállai B., *et al.* (2018) Coevolving MAPK and PID phosphosites indicate an ancient environmental control of PIN auxin transporters in land plants. *FEBS Letters* 592(1):89-102.
28. Feng Y., Ping X., Bosheng L., *et al.* (2017) Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(52): 13834-13839.
29. Foreman J., Dolan L. (2001) Root hairs as a model system for studying plant cell growth. *Annals of Botany* 88:1-7.
30. Friml, J., Benková E., Blilou I. (2002) AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 108(5):661-673.
31. Friml, J. (2003) Auxin transport- shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology* 6(1): 7-12.
32. Fulcher N. y Sablowski R. (2009) Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Procedures of the National Academy of Sciences of the United States* 106(49): 20984-20988.
33. Galinha C., Hofhuis H., Luijten M., *et al.* (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449: 1053-1057.
34. Gao Y., Zhang Y., Zhang D., *et al.* (2015) Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signalling or *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112: 2275-2280
35. Gao Z., Chen Y.F., Randlett M.D., *et al.* (2003) Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry* 278:34725-34732.
36. Gray W., Kepinski S., Rouse D., Estelle M. (2001) Auxin regulates SCF-TIR1 dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414: 271-276.
37. Gray W. (2004) Hormonal regulation of plant growth and development. *Plos Biology* <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020311>.
38. Grundewald W., Friml J. (2010) The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO Journal* 29:2700-2714.
39. Guilfoyle T. (2007) Sticking with Auxin. *Nature* 446:621-622.
40. Guzmán P., Ecker J.R. (1990) Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2:513–523.
41. Hahn A., Harter K. (2009) Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades and Ethylene: Signaling, Biosynthesis, or Both? *Plant Physiology* 149:1207–1210.

42. Helariutta Y., Fukaki H., Wesocka-Diller J., *et al.* (2000) The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101(5): 555-567.
43. Heyman J., Cools T., Vandenbussche F., *et al.* (2014) ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science* 342(6160):860-863.
44. Himanen K., Boucheron E., Vaneste S. (2002) Auxin mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* 14: 2339-2351.
45. Ikeda Y., Men S., Fischer U., *et al.* (2009) Local auxin biosynthesis modulates gradient-directed planar polarity in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology* 11(6): 731-740.
46. Ivanov V., Dubrovsky J. (2013) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends in Plant Science* 18(5): 237-243.
47. Jia W., Li B., Liang Y., *et al.* (2016) Mitogen-activated protein kinase cascade MKK7-MPK6 plays important roles in plant development and regulates shoot branching by phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLOS Biology* 14(9): e1002550. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002550>
48. Ju Ch., Yoon G.M., Shemansky J.M., Lin D., Ying I., Chang J., Garrett W., Kessenbrock M., Groth G., Tucker M., Cooper B., Kieber J.J., Chang C. (2012) CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 109 (47): 19486–19491.
49. Karcher S. (2002) Proceedings of the 23rd Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE). University of Toronto, Canada. 392 pp.
50. Kende H. (1989) Enzymes of ethylene Biosynthesis. *Plant Physiology* 91:1-4.
51. Kieber J.J., Rothenberg M., Roman G., *et al.* (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases. *Cell* 72:427–441.
52. Kleine-Vehn J., Leitner J., Zwiewka M., *et al.* (2008) Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *PNAS* 105(46):17812-17817
53. Křeček P., Skúpa P., Libus J., *et al.* (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* 10(249).
54. Le J., Vandenbussche F., Van Der Straeten D., Verbelen J.P. (2001) In the early response of *Arabidopsis* roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. *Plant Physiology* 125: 519–522.

55. Lee M.M., Schiefelbein J. (2002) Cell pattern in the Arabidopsis root epidermis determined by lateral inhibition with feedback. *Plant Cell* 14(3):611-8.
56. Lewis D.R., Negi S., Sukumar P., Muday G.K. (2011) Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development* 128: 3485-3495.
57. Ljung K. (2013) Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140(5):943-950.
58. Ljung K., Bhalerao R., Sandberg G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant Journal* 28: 465-474.
59. López-Bucio J., Acevedo-Hernández G., Ramírez-Chávez E., *et al.* (2006) Novel Signals for plant development *Current Opinion in Plant Biology* 6:280-287.
60. López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., *et al.* (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiology* 129(1):244-256.
61. Lucas M., Swarup R., Paponov I., *et al.* (2011) SHORT-ROOT regulates primary, lateral and adventitious root development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 115:384-398.
62. Malamy J.E. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell & Environment* 28: 67-77
63. Malamy J.E., Benfey P.N. (1997) Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.
64. Mano Y., Nemoto, K. (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* 63: 2853-2872.
65. McDaniel B., Binder B.M. (2012) Ethylene receptor 1 (ETR1) is sufficient and has the predominant role in mediating inhibition of ethylene responses by Silver in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 26094-26103.
66. Méndez-Bravo A., Ruiz-Herrera L., Cruz-Ramírez A., *et al.* (2018) *CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1* and *PIN2* act in a coordinate manner to support the indeterminate root growth and meristem cell proliferating activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 280: 175-186.
67. Morrison D. (2012) MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(11):a011254.
68. Morquecho-Contreras A., López-Bucio J. (2007) Cannabinoid-like signaling and other new developmental pathways in plants. *International Journal of Plant Developmental Biology* 1:34-41.
69. Müller J., Beck M., Mettbach U., *et al.* (2010) 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* 61: 234-248
70. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15 (3): 473–497.
 71. Nagashima A., Uehara Y., Sakai T. (2008) The ABC Subfamily B Auxin Transporter AtABCB19 is Involved in the Inhibitory Effects of N-1-Naphthylphthalamic Acid on the Phototropic and Gravitropic Responses of Arabidopsis Hypocotyls. *Plant Cell Physiology* 49(8): 1250-1255.
 72. Nakajima K., Sena G., Nawy T., Benfey P. (2001) Inter cellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413:307-311.
 73. Nawy T., Lee J., Colinas J., *et al.* (2005) Transcriptional Profile of the Arabidopsis Root Quiescent Center. *The Plant Cell* 17(7): 1908-1925.
 74. Ortega-Martínez O., Pernas M., Carol R.J., Dolan L. (2007) Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* 317: 507–510.
 75. Ottenshläger I., Wolff P., Wolverton Ch., *et al.* (2002) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *PNAS* 100(5): 2987-2991.
 76. Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* a001537 (2): 1-16.
 77. Pacifici E., Poverari L., Sabatini S. (2015) Plant hormone cross-talk: the pivot of root growth. *Journal of Experimental Botany* 66(4): 1113-1121.
 78. Pi L., Aichinger E., van der Graaf E., *et al.* (2015) Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through Chromatin-mediated repression of CDF4 expression. *Developmental Cell* 33(5): 576-588.
 79. Pierick R., Tholen D., Poorter H., *et al.* (2006) The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science* 11:176-183.
 80. Pickett F.B., Wilson A.K., Estelle M. (1990) The aux1 mutation of Arabidopsis confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* 94:1462–1466.
 81. Pigliucci M. (2002) Ecology and Evolutionary Biology of Arabidopsis. *The Arabidopsis Book. American Society of Plant Biologists.* URL:<https://doi.org/10.1199/tab.0003>.
 82. Pitts J., Cernac A., Estelle M. (1998) Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 16:553-560.
 83. Pitzschke A., Forzani C., Hirt H. (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Plants. *Antioxidants Redox Signaling* 8: 1757-1764.
 84. Prasher D.C., Eckenrode V., Ward W., *et al.* (1992) Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. *Gene* 111(2): 229-233.
 85. Robles L., Stepanova A., Alonso J. M. (2013) Molecular Mechanisms of Ethylene–Auxin Interactions. *Molecular Plant* 6(6): 1734-1737.

86. Ruiz-Herrera L., López-Bucio J. (2013) Aluminum induces low phosphate adaptative responses and modulates primary and lateral root growth by differentially affecting auxin signaling in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Soil* 371:593-609.
87. Růžicka K., Ljung K., Vanneste S., *et al.* (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport – dependent auxin distribution. *Plant Cell* 19: 2197–2212.
88. Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., *et al.* (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99: 463–472.
89. Saini S., Sharma I., Kaur N., Pati P.K. (2013) Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant Cell Reports* DOI 10.1007/s00299-013-1430-5
90. Saleh A., Pagés M. (2003) Plant AP2/ERF Transcription Factors. *Genetika* 35(1): 37.50.
91. Sánchez-Calderón L., López-Bucio J., Chacón-López A., *et al.* (2005) Phosphate starvation induces a determinate Developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 46:174-184.
92. Santner A., Calderon-Villalobos L., Estelle M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 301–307
93. Santuari L., Sanchez-Peres G., Luijten M., *et al.* (2016) The PLETHORA gene regulatory network guides growth and cell differentiation in Arabidopsis Roots. *The Plant Cell* 28:2937-2951.
94. Sarkar A., Luijten M., Miyashima S., *et al.* (2007) Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446: 811-814.
95. Shenck D., Christian M., Jones A. (2010) Rapid Auxin-Induced cell expansion and gene expression: a four-decade-old question revisited. *Plant Physiology* 152(3): 1183-1185.
96. Scheres B. (2007) Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8: 345-354.
97. Scheres B., Benfey P., Dolan L. (2002) Root Development. *The Arabidopsis Book* 1:e0101.
98. Smalle J., Van Der Straeten D. (1997) Ethylene and vegetative development. *Physiologia Plantarum*. 100: 593–605.
99. Smith S., De Smet I. (2012) Root system architecture: insights from Arabidopsis and cereal crops. *Philosophical transactions of the Royal Society B*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0234>.
100. Stahl Y., Wink R., Ingram G. Simon R. (2009) A signalling module controlling the stem cell niche in Arabidopsis root meristems. *Current Biology* 19: 909-914.

101. Sozzani R., Cui H., Moreno-Risueno M., *et al.* (2010) Spatiotemporal regulation of cell- cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466(7302): 128-132.
102. Stepanova A., Alonso J.M. (2009) Ethylene signaling and response: where different modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* 12:548-555.
103. Stepanova A., Hoyt J., Hamilton A., Alonso J. (2005) A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 2230–2242
104. Strader L.C., Beisner E. R, Bartel B. (2009) Silver ions increase auxin efflux independently of effects on ethylene response. *Plant Cell* 21: 3585–3590.
105. Street I., Aman S., Zubo Y., *et al.* (2015) Ethylene inhibits cell proliferation of the *Arabidopsis* root meristem. *Plant Physiology* 169: 338-350.
106. Su Y., Liu Y., Zhang X. (2011) Auxin-Cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant* 4:616-625.
107. Swarup R., Perry P., Hagenbeek D., *et al.* (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *The Plant Cell* 19: 2186-2196.
108. Taiz L., Zeiger E. (2002) *Plant Physiology*, Third edition. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts E.U.A. 621pp.
109. Tanaka S., Umemori T., Hirai K. *et al.* (2007) CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445(7125):328-32.
110. Tanimoto M., Roberts K., Dolan L. (1995) Ethylene is a positive regulator of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 8(6):943-948.
111. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815.
112. Tian H., Klämbt D., Jones M. (1994) Auxin-binding Protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor. *Journal of Biological Chemistry* 270: 26962-26969.
113. Titapiwatanakun B., Murphy A. (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 57(1): 27-44.
114. Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T. (1997a) ARF1, a transcription factor that binds auxin response elements *Science* 276: 1865-1868.
115. Ulmasov T., Murfett J., Hagen G. *et al.* (1997b) AUX/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963-1971.

116. Vaseva I., Qudeimat E., Potuschak T., *et al.* (2018) The plant hormone ethylene restricts *Arabidopsis* growth via the epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(17): E4130-E4139.
117. Vieten A., Vanneste S., Wisniewska J., *et al.*, (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132(20): 4521-4531.
118. van den Berg C., Willemsen V., Hendriks G., *et al.* (1997) Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390: 297-289.
119. Voeseek L., Pierik R., Sasidharan R. (2015) Plant life without ethylene. *Trends in Plant Science* 20: 783-786.
120. Wilson M., Goh T., Voß U., *et al.* (2013) SnapShot:Root Development. *Cell*. 155: 1190-1191e.
121. Woo E., Marshall J., Baulry J., Jin-Gui Ch. *et al.* (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *The EMBO Journal* 21(12): 2877-2885.
122. Woodward A.W., Bartel B. (2005) Auxin: Regulation and interaction. *Annals of Botany* 95: 707-735.
123. Xu J. y Scheres B. (2005). Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity. *Plant Cell* 17: 525–536.
124. Yang S.F., Hoffman N.E. (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35:155-189.
125. Yoo S.D., Sheen J. (2008) MAPK signaling in plant hormone ethylene signal transduction. *Plant Signaling & Behavior* 3(10): 848-849.
126. Yoshida H., Nagata M., Saito K., Wang K.L. and Ecker J.R. (2005) *Arabidopsis* ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biology* 5:14.
127. Zhang J., Yu J., Chi-Kuang W. (2014) An alternate route of ethylene receptor signaling. *Frontiers in Plant Science* 5:648.

9. ADDENDA

9.1. Addendum I. The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atriviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning

Este suplemento corresponde a un artículo de investigación de nuestro grupo de trabajo en el que se participó como co-autor. El mismo se publicó en el año 2016 en la revista *New Phytologist*, indizada en el *Journal Citation Reports* (JCR).

9.2. Addendum II. Mecanismos de tolerancia de las plantas a los metales pesados

Este suplemento corresponde al capítulo número 10 del libro FRONTERAS EN LA BOLOGÍA: SEÑALIZACIÓN Y COMUNICACIÓN DE LAS PLANTAS, mismo que se terminó de editar en el 2018 por los Doctores en Ciencias, Elda Beltrán Peña (i), José López Bucio (ii) y Miguel Martínez Trujillo (iii); investigadores del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (i y ii) y de la Facultad de Biología (iii) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Se participó como co-autor del capítulo.

The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* functioning

Amira Garnica-Vergara, Salvador Barrera-Ortiz, Edith Muñoz-Parra, Javier Raya-González, Alejandro Méndez-Bravo, Lourdes Macías-Rodríguez, León Francisco Ruiz-Herrera and José López-Bucio

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

Author for correspondence:

José López-Bucio

Tel: +52 5 443 3265788

Email: jlbucio@umich.mx

Received: 13 July 2015

Accepted: 23 September 2015

New Phytologist (2016) 209: 1496–1512

doi: 10.1111/nph.13725

Key words: 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP), auxin, ethylene (ET), phytostimulation, root development, *Trichoderma*.

Summary

- Plants interact with root microbes via chemical signaling, which modulates competence or symbiosis. Although several volatile organic compounds (VOCs) from fungi may affect plant growth and development, the signal transduction pathways mediating VOC sensing are not fully understood.
- 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP) is a major VOC biosynthesized by *Trichoderma* spp. which is probably involved in plant–fungus cross-kingdom signaling. Using microscopy and confocal imaging, the effects of 6-PP on root morphogenesis were found to be correlated with *DR5::GFP*, *DR5::VENUS*, *H2B::GFP*, *PIN1::PIN1::GFP*, *PIN2::PIN2::GFP*, *PIN3::PIN3::GFP* and *PIN7::PIN7::GFP* gene expression. A genetic screen for primary root growth resistance to 6-PP in wild-type seedlings and auxin- and ethylene-related mutants allowed identification of genes controlling root architectural responses to this metabolite.
- Trichoderma atroviride* produced 6-PP, which promoted plant growth and regulated root architecture, inhibiting primary root growth and inducing lateral root formation. 6-PP modulated expression of *PIN* auxin-transport proteins in a specific and dose-dependent manner in primary roots. *TIR1*, *AFB2* and *AFB3* auxin receptors and *ARF7* and *ARF19* transcription factors influenced the lateral root response to 6-PP, whereas *EIN2* modulated 6-PP sensing in primary roots.
- These results indicate that root responses to 6-PP involve components of auxin transport and signaling and the ethylene-response modulator *EIN2*.

Introduction

Providing healthy food sources, grains, fuels and fiber to an ever-increasing global population is one of the greatest challenges of this century. New techniques and products are needed for sustainable crop productivity without damaging soil and water resources. The *Trichoderma* genus includes species that naturally associate with plant roots and are considered highly versatile beneficial fungi (Harman *et al.*, 2004; Harman, 2011; Mukherjee *et al.*, 2013). Among their various attributes, *Trichoderma* spp. benefit agricultural activities, acting as biofungicides and in bioremediation of soils contaminated with metals or chemical wastes, and eliciting plant development and defense (Chang *et al.*, 1986; Björkman *et al.*, 1998; Björkman, 2004; Vargas *et al.*, 2009; Velázquez-Robledo *et al.*, 2011; Samolski *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014). These fungi produce plant growth-promoting compounds, which have the capacity to increase photosynthesis and biomass production and to elicit developmental programs via regulation of gene expression (Chacón *et al.*, 2007; Shores & Harman, 2008; Vargas *et al.*, 2009,

2011; Harman, 2011; Studholme *et al.*, 2013; Martínez-Medina *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2014; Rubio *et al.*, 2014).

Trichoderma virens and *Trichoderma atroviride* produce the auxins indole-3-acetic acid (IAA), indole-3-ethanol (IET), indole-3-acetaldehyde (IALD) and indole-3-carboxaldehyde (ICALD). These compounds stimulate cell division, elongation and/or differentiation processes, ultimately increasing the growth and yield of the plant host (Contreras-Cornejo *et al.*, 2009, 2011). The role of auxins from *Trichoderma* in plant morphogenesis was investigated in detail in *Arabidopsis thaliana* by Contreras-Cornejo *et al.* (2009). Fungal colonization of *A. thaliana* roots induced the expression of the auxin-inducible gene marker *DR5::uidA* and increased development of lateral roots and root hairs. It was found that mutations in genes involved in auxin transport or signaling, including *AUX1*, *BIG*, *EIR1* and *AXR1*, reduced the beneficial effects of *Trichoderma* on biomass production and root branching. Interestingly, supplementation of *A. thaliana* seedlings with all identified *Trichoderma* auxins showed a dose-dependent effect on biomass production, increasing yield in small amounts (nM range) but repressing growth at higher concentrations (mM range). In particular, application of ICALD

inhibited primary root growth, induced adventitious root formation and increased the camalexin concentration in leaves, thus suggesting a possible connection of auxin signaling with defense and development (Contreras-Cornejo *et al.*, 2011). Recent research has further highlighted the critical role of auxin production by *Trichoderma* in phystostimulation not only under standard growth conditions but also under stress imposed by abiotic factors (Mastouri *et al.*, 2010, 2012; Rawat *et al.*, 2013, Contreras-Cornejo *et al.*, 2014a; Hashem *et al.*, 2014).

The relationship between fungal produced auxins and root developmental programs elicited by *Trichoderma* was found to depend on mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling (Contreras-Cornejo *et al.*, 2015). Co-cultivation of *A. thaliana* roots with *T. atroviride* modulated lateral root growth and root hair formation and increased MPK6 activity, these effects probably being dependent on ethylene (ET) and auxin signaling. It was also found that ET, IAA and IALD produced by the fungus induced MPK6 activity, while auxin-inducible *DR5::uidA* gene expression was concomitantly enhanced in *A. thaliana* mutants defective in the CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 (CTR1) protein, a negative regulator of the ethylene response pathway, which is thought to function as a MAPK kinase. Detailed analysis of root hair and lateral root responses to *T. atroviride* in *A. thaliana* wild-type (WT) seedlings and ethylene-related mutants *etr1*, *ein2* and *ein3* showed that the effect of ET on root morphogenesis was apparently mediated by auxin-ethylene crosstalk involving MPK6, which fine-tunes seedling growth and development in response to *Trichoderma* (Contreras-Cornejo *et al.*, 2015). As a consequence, MPK6, and its MAP kinase associated cascade, probably involving CTR1 and other components still to be identified, seems to be a regulation node to maintain and/or amplify the hormonal effects underlying plant development and/or defense.

The production of bioactive metabolites in *Trichoderma* spp. is strain-dependent and, along with auxins, these metabolites include volatile and nonvolatile substances such as sesquiterpenes, 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP), gliotoxin, viridin, harzianopyridone, harzianidione and peptaibols (Reino *et al.*, 2008; Vinale *et al.*, 2008). Exposure of *A. thaliana* seedlings to volatile organic compound (VOC) blends emitted by *Trichoderma* increased root branching and biomass production and accelerated flowering (Hung *et al.*, 2013; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014b). Harzianolide and 6-PP promoted growth of pea (*Pisum sativum*) stems and tomato (*Lycopersicon esculentum*) and canola (*Brassica napus*) seedlings. Tomato plants sprayed with 6-PP had increased biomass and a highly branched root system, which may account for improved water and nutrient acquisition (Vinale *et al.*, 2008). These findings suggest that some *Trichoderma* metabolites may be interpreted by plants as transkingdom signals to modulate plant morphogenesis, but, currently, little is known about the cellular, genetic and molecular mechanisms by which plants sense these fungal metabolites.

Because 6-PP is involved in many developmental processes of fungal growth and has emerged as a plant bioactive metabolite (Vinale *et al.*, 2008), it is important to uncover molecular components specific to root architecture remodeling and their

relationship with plant genetic programs. Here, we show that *Trichoderma atroviride* produces 6-PP, whose concentrations increase in co-cultivation with *A. thaliana* seedling. Supplying *A. thaliana* seedlings with 6-PP enhanced shoot and root biomass production in a dose-dependent manner and improved root branching and root hair growth. 6-PP did not induce an auxin or ethylene response in primary root tips or aerial plant parts, but increased auxin responsiveness in lateral root primordia and differentially modulated expression of auxin transporters PIN1, PIN2, PIN3 and PIN7. A genetic screen for 6-PP resistance established that this compound required auxin receptors TIR1, AFB2 and AFB3 and downstream transcription factors ARF7 and ARF19 to stimulate lateral root development. Intriguingly, strong primary root growth resistance to 6-PP was conferred by a loss-of-function mutant of the ethylene response regulator EIN2, which indicates that root response to 6-PP did not occur constitutively in all tissues but rather showed clear preference for specific root tissues and signaling components. The plant response to 6-PP further uncovered the contribution of a specific component in the ethylene pathway in root architectural remodeling and highlights the complex network of signaling molecules involved in the fungal-plant interaction.

Materials and Methods

Plant material and growth conditions

Arabidopsis thaliana (L., Heynh.) Columbia (Col-0) ecotype, the transgenic *A. thaliana* lines *DR5::GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003), *DR5::VENUS* (Brunoud *et al.*, 2012); *H2B::RFP* (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001); *CycB1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999); *PIN1::PIN1::GFP* (Benkova *et al.*, 2003), *PIN2::PIN2::GFP* (Blilou *et al.*, 2005), *PIN3::PIN3::GFP* (Žádníková *et al.*, 2010) and *PIN7::PIN7::GFP* (Blilou *et al.*, 2005) and the mutant lines *axr1-3* (Lincoln *et al.*, 1990), *aux1-7* (Pickett *et al.*, 1990), *tir1/afb2/afb3* (Parry *et al.*, 2009), *arf7-1/arf19-1* (Wilmoth *et al.*, 2005), *etr1* (Roman *et al.*, 1995), *etr1* (Hua & Meyerowitz, 1998), *ein2* (Guzmán & Ecker, 1990), and *ein3* (Chao *et al.*, 1997) were used for the different experiments. Seeds were surface-sterilized with 95% (v/v) ethanol for 5 min and 20% (v/v) bleach for 7 min. After five washes in distilled water, seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2 × Murashige and Skoog (MS) medium (Murashige and Skoog basal salts mixture). The MS medium was purchased from Sigma. Phytagar (commercial grade) was purchased from Gibco-BRL (Grand Island, NY, USA). Plates were placed vertically at an angle of 65° to allow root growth along the agar surface and unimpeded aerial growth of the hypocotyls. Plants were placed in a plant growth chamber (Percival AR-95L; Percival Scientific, Perry, IA, USA), with a photoperiod of 16 h : 8 h, light : dark, a light intensity of 300 μmol m⁻² s⁻¹, and a temperature of 22°C.

Fungal growth and plant inoculation experiments

Trichoderma atroviride Karsten (formerly *Trichoderma harzianum*) IMI 206040 was used. An inoculum of 1 × 10⁶

spores was placed at 5 cm from *A. thaliana* primary roots germinated and grown for 4 d on agar plates containing $0.2 \times$ MS medium. The plates, which included 10 *A. thaliana* seedlings each, were arranged in a completely randomized design in a Percival AR95L growth chamber. After 3 and 5 d of co-cultivation, determinations of 6-PP accumulation and plant growth were performed.

Effect of 6-PP on plant growth and development

6-PP (purchased from Sigma) was dissolved in ethanol. To investigate whether 6-PP could have an effect on *A. thaliana* growth, the compound was supplied at different doses (0, 50, 75, 100, 125, 150, 175 and 200 μ M) to the plant growth medium. In control conditions ('C' in most figure panels), we added an ethanol volume equal to that present in the highest compound concentration. Petri plates containing 30 plants under different treatments were placed in a Percival AR95L growth chamber for 10 d to estimate biomass production.

Arabidopsis thaliana root system and primary root (PR) meristem integrity were analyzed with a stereoscopic microscope (Leica MZ6; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). All lateral roots (LRs) that emerged from the PR were counted at $\times 30$ magnification. Images were taken with a Samsung SCC 131-A digital color camera adapted to the microscope and processed with the Zeiss AXIO VISION 4AC software (Carl Zeiss). PR length was measured for each root using a ruler. LR density was determined by dividing the LR number by the PR length for each seedling analyzed.

Propidium iodide staining and GFP, VENUS and RFP detection

For confocal microscopy, solvent- or 6-PP-treated transgenic *A. thaliana* seedlings were transferred from the growth medium to 10 mg ml^{-1} propidium iodide solution for 1 min. Seedlings were rinsed in water and mounted in 50% (v/v) glycerol on microscope slides. Each sample was analyzed separately for propidium iodide (with a 568-nm wavelength argon laser for excitation, and an emission window of 585–610 nm) and GFP, VENUS or RFP fluorescence (488 nm excitation/505–550 nm emission, 514 nm excitation/527 nm emission, and 532 nm excitation/588 nm emission, respectively), using a confocal microscope (Olympus FV1000; Olympus Corp., Tokyo, Japan), after which the two micrographs were merged to produce a final image. Fifteen independent seedlings were analyzed per line, and treatment representative images were selected for figure construction.

Determination of developmental stages of lateral root primordia

Lateral root primordia (LRPs) were quantified 6 d after germination. Seedling roots were first cleared to enable LRPs at early stages of development to be visualized and counted. Each LRP was classified according to its stage of development as reported by Malamy & Benfey (1997). The developmental stages are as

follows. Stage I: LRP initiation (in the longitudinal plane, approximately eight to 10 'short' pericycle cells are formed). Stage II: the LRP is divided into two layers by a periclinal division. Stage III: the outer layer of the primordium divides periclinally, generating a three-layer primordium. Stage IV: an LRP with four cell layers. Stage V: the LRP is midway through the parent cortex. Stage VI: the LRP has passed through the parent cortex layer and has penetrated the epidermis. It begins to resemble the mature root tip. Stage VII: the LRP appears to be just about to emerge from the parent root.

Analysis of VOCs and 6-PP determinations

The VOCs released by *T. atroviride* were analyzed in Petri dishes containing $0.2 \times$ MS medium with a solid-phase microextraction (SPME) technique and GC-MS. The compounds were collected for 1 h with a blue SPME fiber (PDMS/DVB; Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA) and desorbed at 180°C for 30 s in the injector port of a gas chromatograph (Agilent 7890B; Agilent, Foster City, CA, USA), equipped with an MS detector (5977A; Agilent) and Mass Hunter Workstation Software (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) for data acquisition and processing. A free fatty acid-phase capillary column (HP-FFAP) ($30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm ID}$; film thickness $0.25 \mu\text{m}$) was used. In the operating conditions, helium was used as the carrier gas (1 ml min^{-1}) and the detector temperature was 250°C . The column was held for 1 min at 60°C , and then programmed to rise at a rate of 3°C min^{-1} to a final temperature of 180°C , which was maintained for 1 min. Three independent determinations were made. The mass fragments were analyzed using electron impact ionization at 70 eV and a scan rate of 1.9 scan s^{-1} . Fragments were read from 40 to 450 Da, and data were evaluated using total ion count (TIC). The chromatograms of the eluted compounds were deconvoluted and their mass spectra matched with those of the NIST 11 mass spectral database.

The identification of 6-PP was performed by comparing retention time (R_t) and the mass spectra from an authentic standard with those obtained in the sample. To estimate the amount of 6-PP produced by *T. atroviride* from 3 and 5 d of growth and during the interaction *T. atroviride*–*A. thaliana*, we constructed an external calibration curve using a 6-PP standard following a similar method to that established by Polizzi *et al.* (2011). A diluted solution of 6-PP in ethanol was prepared. Petri dishes were filled with $0.2 \times$ MS medium; upon cooling of the agar, a piece of foil (1 cm^2) was placed on the top with different concentrations ($10 \mu\text{M}$ to 10 mM) of 6-PP. The Petri plates were immediately closed and sealed with parafilm and analyzed under the same conditions as used for the fungal samples. A good linearity of the calibration curve ($r^2 = 0.999$) was found.

Data analyses

For all experiments with WT and mutant lines, the overall data were statistically analyzed using SPSS 10 Software (IBM Corp., Endicott, NY, USA). Univariate and multivariate analyses with Tukey's post hoc test were used to assess the significance of

differences in growth and root development responses. Different letters are used to indicate means that differ significantly ($P < 0.05$). GFP fluorescence in primary root tips was quantified by determining the green pixels present in an area comprised of the first 20 cells upward from the quiescent center, using the IMAGEJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), in 15 micrographs per line and treatment. We then obtained an arbitrary unit value (AU = green pixels μm^{-2}) for each individual, and means were obtained from whole data sets. AU means for control conditions were given a value of 1, and those for 6-PP treatments were adjusted relative to these, and are thus referred to in figures as relative fluorescence. *DR5::GFP* fluorescence in LR formation zones was quantified similarly, except that the area measured comprised the whole micrographs and statistics for these were omitted because of technical difficulties in obtaining images on the same focal plane.

Results

6-PP is the most abundant compound within the VOC profile of *T. atroviride*

Previous reports have shown the VOC profile from *T. atroviride* grown in potato dextrose agar (PDA), malt extract agar (MEA), or biomalt medium (BM) (Keszler *et al.*, 2000; Stoppacher *et al.*, 2010; Siddiquee *et al.*, 2012; Jeleń *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). All this research identified the compound 6-PP within the corresponding VOC profile. To assess the possible roles of 6-PP during the interaction of *T. atroviride* with plants, in this study we analyzed the VOCs emitted from *T. atroviride* in fungal colonies grown for 5 d in Petri plates supplied with $0.2 \times$ MS agar solidified medium. This medium was chosen because it is commonly used for *A. thaliana* growth and the effects of 6-PP on plants

could then be evaluated. Table 1 shows that 6-PP is the major compound within the VOC profile (57.94%) from *T. atroviride*. This compound is an alkyl lactone, with an unsaturated six-membered ring containing one oxygen atom and a ketone functional group. The isomer found in *T. atroviride* according to GC-MS analysis is denoted 2-pyrone, with an alkyl group at the 6-position (Fig. 1a). The identification of 6-PP was made by comparison of the Rt (37.21 min) and mass spectra of a standard (Fig. 1b) with those obtained from *T. atroviride* colonies (Fig. 1c).

To determine whether plant interaction could affect 6-PP production by the fungus, we next estimated 6-PP amounts in the plates containing single *T. atroviride* colonies and at 3 and 5 d of direct interaction with *A. thaliana* seedlings. It was observed that 6-PP emission increased with time (Fig. 1d). Interestingly, at 5 d of interaction with plants, when fungi had physical contact with the root system, the emission of the compound increased by 40% compared with the level recorded for single colonies (Fig. 1d). At this stage, an induction of root branching by *T. atroviride* was evident (Fig. 1e), indicating the possible participation of 6-PP in the lateral root formation process.

6-PP increases biomass production, root branching and root hair development in *A. thaliana* seedlings

To investigate the plant growth-regulating activity of 6-PP, we tested the effects of increasing, low micromolar doses of this compound in *A. thaliana* (Col-0) seedlings, germinated and grown on Petri plates containing agar-solidified $0.2 \times$ MS medium. The seedlings were treated with ethanol (control treatment) or with 50–200 μM 6-PP dissolved in ethanol. After 10 d of growth in medium supplied with 50–175 μM 6-PP, a roughly two-fold increase in shoot, root and total plant biomass was observed (Fig. 2a–c). By contrast, the greatest concentration (200 μM) of the compound did not increase biomass accumulation (Fig. 2a–c). Representative photographs of plates illustrating the effects of 6-PP are shown in Fig. 2(d–g) and photographs of individual plants are provided in Supporting Information Fig. S1. It is noteworthy that 6-PP treatments increased both lateral root number and density in a dose-dependent manner, while an inhibition of primary root growth was observed from 125 μM onwards (Fig. 3a–c). To determine if the toxic effects of high 6-PP are responsible for primary root growth inhibition, we analyzed the expression of the vital marker *H2B::RFP*, which is specifically expressed in the nuclei of living cells (Boisnard-Lorig *et al.*, 2001), by confocal microscopy. Our data indicate that 6-PP did not affect cell integrity in primary roots, as cells of roots supplied with 200 μM 6-PP did not show cell damage or an absence of nuclei (Fig. S2a–d). To investigate the pattern of cell division in response to 6-PP, we analyzed the expression of *CyCB1::uidA*, which is expressed only in cells in the G2/M transition of the cell cycle in the primary root meristem (Colón-Carmona *et al.*, 1999). Strong primary root growth inhibition under 150 μM or greater concentrations of 6-PP correlated with a reduction of GUS expression in the primary root meristem of *CyCB1::uidA*-expressing seedlings

Table 1 Volatile organic compounds produced by *Trichoderma atroviride* after 5 d of growth in $0.2 \times$ MS medium, analyzed by solid-phase microextraction (SPME)-GC-MS

Compound	Normalized amount of volatile compound (%)
1,3-Octadiene	1.24 $\pm$ 0.17
2-Heptanone	7.17 $\pm$ 0.83
3-Octanone	11.4 $\pm$ 1.17
2-Nonanone	1.11 $\pm$ 0.08
3-Octanol	1.08 $\pm$ 0.05
1-Octen-3-ol	6.82 $\pm$ 2.15
α -Bergamotene	5.51 $\pm$ 0.11
2-Undecanone	1.72 $\pm$ 0.13
3-Methyl-1-octene	0.88 $\pm$ 0.04
β -Sesquiphellandrene	1.49 $\pm$ 0.15
Unknown (a 204 mw sesquiterpene)	0.86 $\pm$ 0.08
Unknown (a 204 mw sesquiterpene)	1.71 $\pm$ 0.18
Unknown (a 204 mw sesquiterpene)	1.07 $\pm$ 0.09
6-Pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP)	57.94 $\pm$ 2.70

Compounds were tentatively identified on the basis of NIST 11 MS Spectral library searches. Mean values $\pm$ SE of the sum of three independent determinations are given.

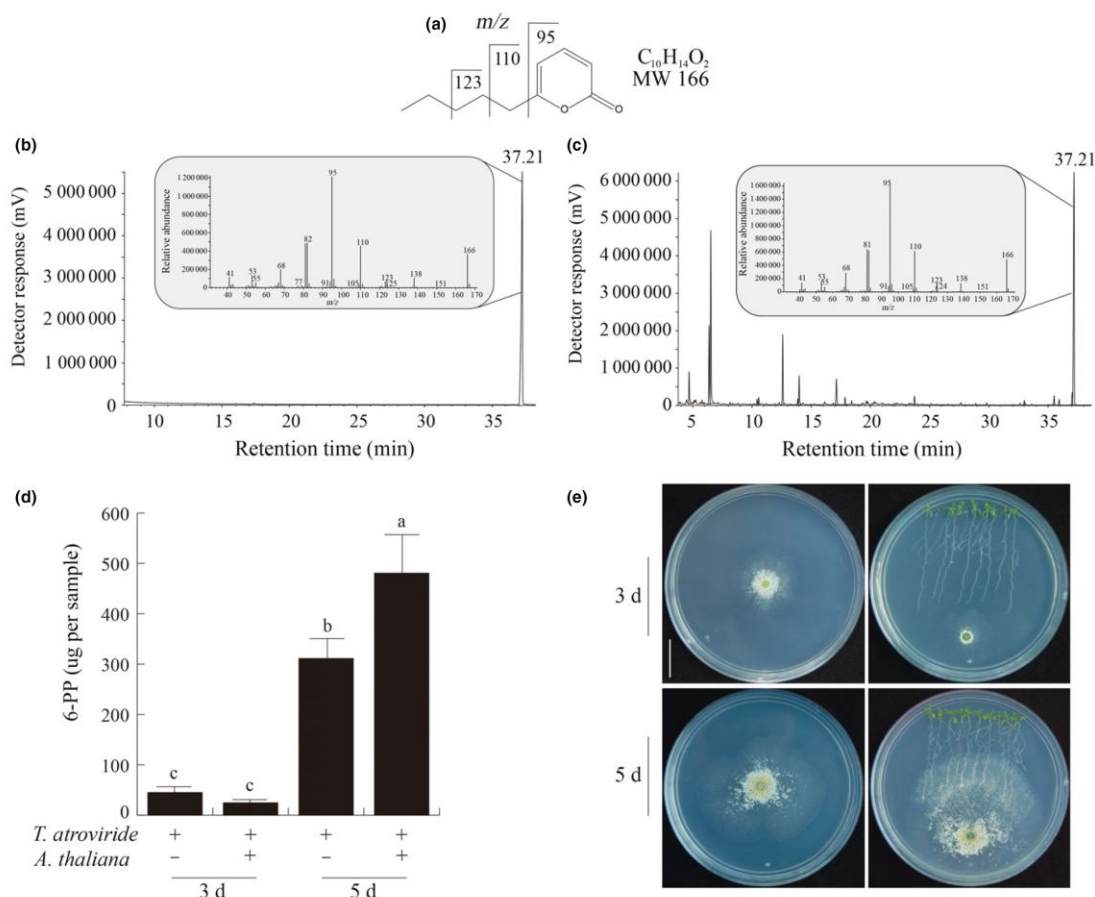


Fig. 1 Molecular characterization and production of 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP) by *Trichoderma atroviride* IMI 206040. (a) Chemical structure of 6-PP showing the major fragment ions (m/z) of electron ionization mass spectra. (b) Total ion chromatogram and mass spectra from commercial standard (6-PP; Rt = 37.21 min). (c) Total ion chromatogram of volatile organic compounds (VOCs) from the fungus, indicating the presence of 6-PP at a retention time (Rt) of 37.21 min. 6-PP was identified by comparison of mass spectra in the NIST 2011 library and those of a commercial standard. (d) Estimation of 6-PP content in *T. atroviride* and the *Arabidopsis thaliana*-*T. atroviride* interaction system. (e) Representative photographs of the fungal colonies at 3 and 5 d of growth and during the interaction with plants. Bar, 1 cm.

(Fig. S3a–j). The 6-PP effects on primary root growth were accompanied by increased root hair formation and elongation, but decreased mature trichoblast cell length (Fig. S4a–k), suggesting that high 6-PP concentrations inhibit root growth, affecting cell division and elongation programs.

We next determined the stages of LRP development affected by 6-PP by quantifying the number of stage I–VII LRPs originating from primary roots 6 d after germination (dag) in seedlings treated with the solvent (control) or 75 or 150 μ M 6-PP; this last treatment strongly increased LR density (Fig. 3c). We found that the stage distribution of LRPs was clearly modulated by treatment with 6-PP. In particular, LRP stages I–VI, which represent young LRPs, were significantly decreased in 6-PP-treated seedlings (Fig. 4a). By contrast, the number of emerged LRPs was

increased two- or three-fold by 150 μ M 6-PP in seedlings at 4 and 6 dag, respectively (Fig. 4b). The total number of LRPs per seedling decreased in response to 6-PP treatments (Fig. 4c), whereas the LRP density decreased (75 μ M 6-PP) or did not significantly differ (150 μ M 6-PP) among treatments (Fig. 4d). These data indicate that 6-PP probably increases LR branching by inducing the emergence of preformed LRPs from pericycle cells and accelerating the growth of LR.

6-PP regulates primary and lateral root development through auxin signaling

LR development is tightly correlated with auxin signaling (Fukaki *et al.*, 2007). To understand the role played by 6-PP in

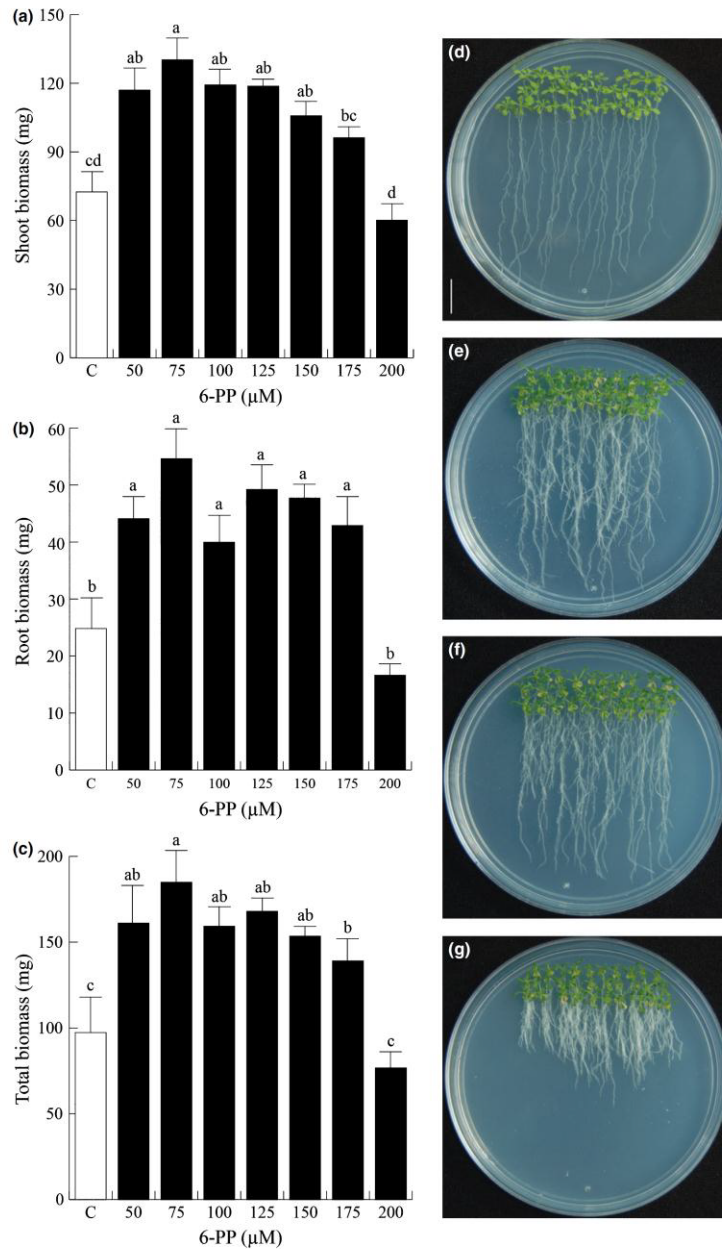


Fig. 2 Effect of 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP) on plant biomass production. *Arabidopsis thaliana* (Col-0) seedlings were germinated and grown for 12 d under increasing 6-PP concentrations. (a) Shoot biomass. (b) Root biomass. (c) Total biomass. (d) Representative photographs of seedlings grown in (d) 0.2 × MS medium supplied with the solvent or (e) 75, (f) 125, and (g) 175 μM 6-PP supplemented media. Photographs show representative plates; each treatment included three plates. Data from (a–c) show the mean ± SD for three groups of 30 seedlings that were recovered from the medium, excised at the root–shoot junction, and weighed using an analytical scale. Different letters represent means statistically different at the 0.05 level. The experiment was repeated three times with similar results. Bar, 1 cm.

root system architecture remodeling and its possible relationship with auxin signaling, we analyzed the expression of the auxin responsive marker *DR5::GFP* in primary root tips, emerging LRs and LRP in transgenic *A. thaliana* seedlings expressing this marker and exposed to 75 and 150 μM 6-PP. *DR5::GFP*

expression did not increase in primary root tips or in emerging LRs at 75 μM or higher 6-PP concentrations (Fig. 5a–f). However, an analysis of *DR5::GFP* expression in stage II and V LRPs showed an enhanced auxin-inducible expression in the vasculature of primary roots and in developing primordia (Fig. 5g–l).

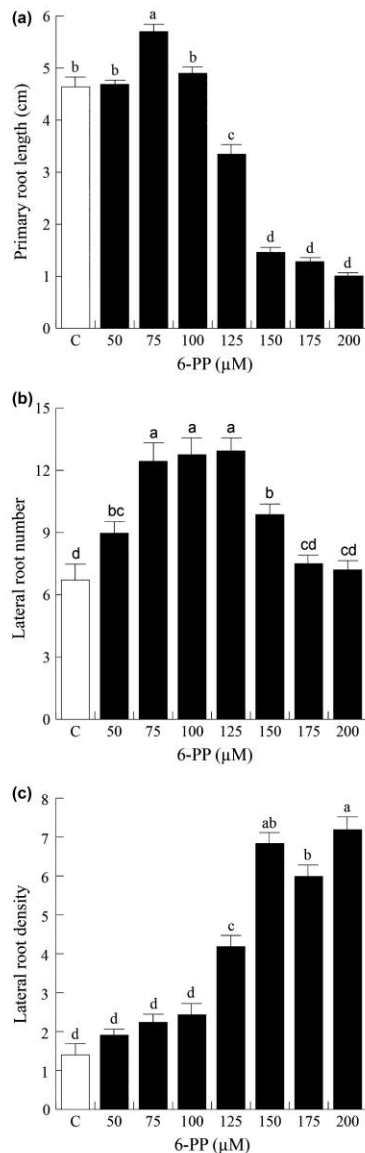


Fig. 3 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP) regulates *Arabidopsis thaliana* root system architecture. *Arabidopsis thaliana* (Col-0) seedlings were germinated and grown for 10 d under increased 6-PP concentrations. (a) Primary root length. (b) Number of emerged lateral roots. (c) Lateral root density (number of emerged lateral roots cm⁻¹). Values represent the means of 30 seedlings $\pm$ SD. Different letters represent means that are statistically different ($P < 0.05$). The experiment was repeated three times with similar results.

To further analyze possible changes in auxin accumulation and/or responsiveness in primary root tips caused by 6-PP, a detailed analysis was conducted in *A. thaliana* seedlings expressing *DR5*:

VENUS treated with a concentration of auxin (IAA), or an auxin transport inhibitor (*N*-(1-naphthyl)phthalamic acid (NPA)), which represses root growth, or with increasing 6-PP concentrations. As expected, both IAA and NPA treatments increased the auxin maximum domains in primary root tips, whereas only the highest 6-PP concentrations tested (175 and 200 µM) produced slightly decreased *DR5* expression in root tips (Fig. S5a–i). These data indicate that 6-PP did not induce auxin accumulation and/or response in primary root tips but increased the auxin response at early stages of LR development.

6-PP modulates the expression and distribution of auxin transporters in primary roots

Auxin is transported through the PIN family of proteins, which are expressed in a tissue-specific manner (Vieten *et al.*, 2005). To test whether 6-PP could regulate primary root growth and/or LR formation through differential expression of the PIN family of auxin transporters, we analyzed the pattern of PIN1, PIN2, PIN3 and PIN7 localization in primary roots and LRP of seedlings expressing *PIN1::PIN1::GFP*, *PIN2::PIN2::GFP*, *PIN3::PIN3::GFP* and *PIN7::PIN7::GFP*. In seedlings grown in medium lacking 6-PP, GFP fluorescence driven by PIN1, PIN3 and PIN7 was detected mainly in the stele of primary roots (Fig. 6a,i,m). By contrast, PIN2 expression was detected in the cortex and epidermal cells (Fig. 6e). In transgenic seedlings expressing GFP fusions with PIN1, PIN2 and PIN3 supplied with 75 µM 6-PP, the GFP fluorescence was significantly increased (Fig. 6b,f,j), whereas when treated with 150 µM 6-PP the opposite effect was observed for PIN1, PIN2 and PIN7 localization, as shown by decreased GFP fluorescence (Fig. 6c,g,o). In marked contrast to the other PIN transporters, PIN3 localization in response to 150 µM 6-PP still displayed a strong expression in the stele (Fig. 6k). These findings suggest that 6-PP affects the expression and distribution of the PIN auxin transporters in primary roots and that root responses to 6-PP did not occur in all tissues but rather showed clear preference for specific tissues and transport components.

Effect of 6-PP on primary and lateral root development of auxin- and ethylene-related *A. thaliana* mutants

Ethylene–auxin interactions regulate primary root growth and LR initiation and emergence in *A. thaliana* (Ivanchenko *et al.*, 2008). To further determine whether there is crosstalk between auxin and ethylene in controlling root responses to 6-PP, we analyzed the response of WT and *A. thaliana* triple, double or single mutants affected in genes related to auxin transport or response (*tir1afb2afb3*, *arf7arf19*, *axr1-3*, *aux1-7* and *ein1*) and ethylene response (*etr1*, *ein2* and *ein3*) to 6-PP treatments. To investigate the involvement of auxin in primary and lateral root responses to 6-PP, *A. thaliana* WT and mutant lines were grown in medium supplemented with the solvent only or with 150 µM 6-PP, and primary root growth and LR formation were analyzed at 10 dag. It was found that all five auxin-related mutants tested showed WT responses to 6-PP in terms of primary root growth

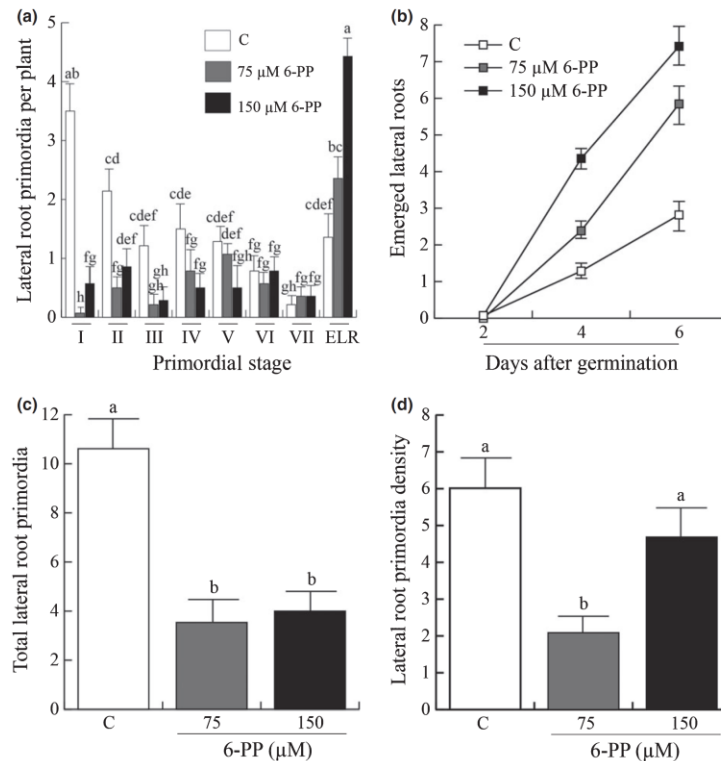


Fig. 4 Effect of 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP) on lateral root (LR) development in *Arabidopsis thaliana*. Wild-type (Col-0) seedlings were germinated and grown for 2, 4 and 6 d on $0.2 \times$ MS media supplemented with the solvent (control (C)), or 75 or 150 μ M 6-PP. (a) Lateral root primordia (LRPs) per plant in 4-d-old seedlings. (b) Kinetics of emerged LRs in seedlings grown for 2, 4 and 6 d. (c) Total LRPs per plant. (d) LRP density in 4-d-old seedlings. Error bars represent $\pm$ SE for 15 *GUS*-stained seedlings analyzed. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. The experiment was repeated two times with similar results.

inhibition (Fig. 7a). By contrast, an induction of LR formation was lacking in *tir1afb2afb3*, *arf7arf19*, *axr1-3* and *aux1-7*, while *ein1* seedlings showed increased LR formation in response to 6-PP (Fig. 7b,c). To analyze possible auxin resistance in some selected auxin-related mutants, we performed an experiment comparing primary root growth of WT (Col-0), *axr1-3*, *aux1-7* and *arf7arf19* seedlings in medium supplied with concentrations of NPA or IAA that strongly repress primary root growth in the WT (Fig. S6). As expected, all three mutants tested had clear resistance to inhibition of primary root growth by either NPA or auxin (Fig. S6). These data, together with the observation that the auxin-related mutants *axr1-3*, *aux1-7* and *arf7arf19* sustain normal primary root growth inhibition in response to 6-PP (Fig. 7a), suggest that an auxin-independent pathway is responsible of sensing 6-PP in primary roots.

In opposition to auxin, ethylene has been found to repress LR formation (Lewis *et al.*, 2011). Therefore, we focused our analysis on root response to 6-PP, considering primary root growth. Interestingly, the *ein2* mutant was clearly resistant to primary root growth inhibition even at growth-repressing concentrations of 150 μ M 6-PP (Fig. 8a). This resistance was confirmed in a dose-response curve of growth from 75 to 200 μ M 6-PP (Fig. 8b, c). Together, these data indicate that auxin signaling components mediate the LR responses to 6-PP, while EIN2 is a crucial

component mediating the primary root growth inhibition response to this fungal signal molecule.

6-PP fails to induce an ethylene response

The sustained primary root growth of *ein2* mutants under growth-repressing concentrations of 6-PP suggested the possibility that the ethylene response could be induced after treatment with 6-PP. This possibility was investigated by comparing the effects of the ethylene precursor 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and 6-PP on the morphology of etiolated seedlings. After 4 d of incubation at 22°C in darkness, seedlings germinated on agar plates containing $0.2 \times$ MS medium were readily distinguished from seedlings germinated in medium supplied with 2 μ M ACC, exhibiting highly elongated hypocotyls and forming an apical hook at the terminal part of the shoot axis (Fig. 9a). Conversely, ACC-treated seedlings developed the so-called 'triple-response' consistent with its role as an ethylene precursor (Guzmán & Ecker, 1990), which consists of exaggerated tightening of the apical hook and swelling of the hypocotyl (Fig. 9b), and inhibition of root and hypocotyl elongation (Fig. 9s,t). ACC also induced root hair development in dark-grown seedlings (Fig. 9u,v). The visual features of the root-stem transition zone treated with ACC and 6-PP are shown in

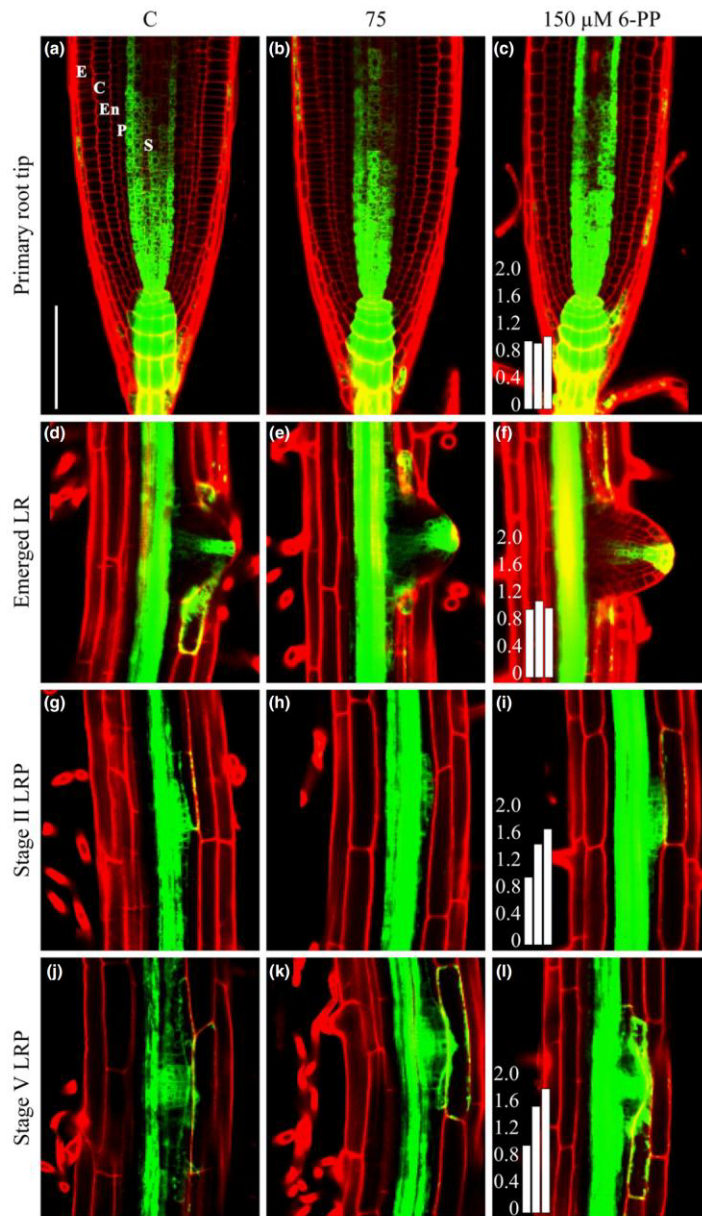


Fig. 5 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP) modulates auxin-responsive gene expression in the lateral root formation zone. *Arabidopsis thaliana* transgenic *DR5:GFP* seedlings were grown in solvent added to $0.2 \times$ MS medium (C), or supplemented with 75 or 150 μ M 6-PP. Five days after germination, seedlings were stained with propidium iodide and analyzed by confocal microscopy. Micrographs show individuals representative of at least 15 seedlings. (a–c) Primary root tip; (d–f) emerged lateral roots; (g–i) stage II lateral root primordia; (j–l) stage V lateral root primordia. Note that 6-PP treatments increase *DR5:GFP* reporter expression in the lateral root formation zone, while it remains largely unchanged in root tips and emerged lateral roots. The graphs in (c, f, i, l) illustrate the differences in *DR5:GFP* expression between control (left bar) and 6-PP treatments (middle and right bars), assessed as relative fluorescence intensity. Bars, 100 μ m.

Fig. 9(g–l), and those of the root tip in Fig. 9(m–r). Interestingly, 6-PP-treated seedlings did not develop the ‘triple response’ (Fig. 9c–f,s,t), and failed to form long root hairs at the differentiation zone of the primary roots (Fig. 9m–r,u,v). We also compared the growth of *A. thaliana* seedlings supplied with ACC or 6-PP and the ethylene inhibitor AgNO_3 simultaneously under

16h : 8 h, light : dark photoperiod conditions. Although both ACC and 6-PP were able to repress primary root growth, AgNO_3 specifically antagonized the ACC response, normalizing root growth without affecting the 6-PP response (Fig. S7). These data show that 6-PP did not induce an ethylene response in *A. thaliana* seedlings.

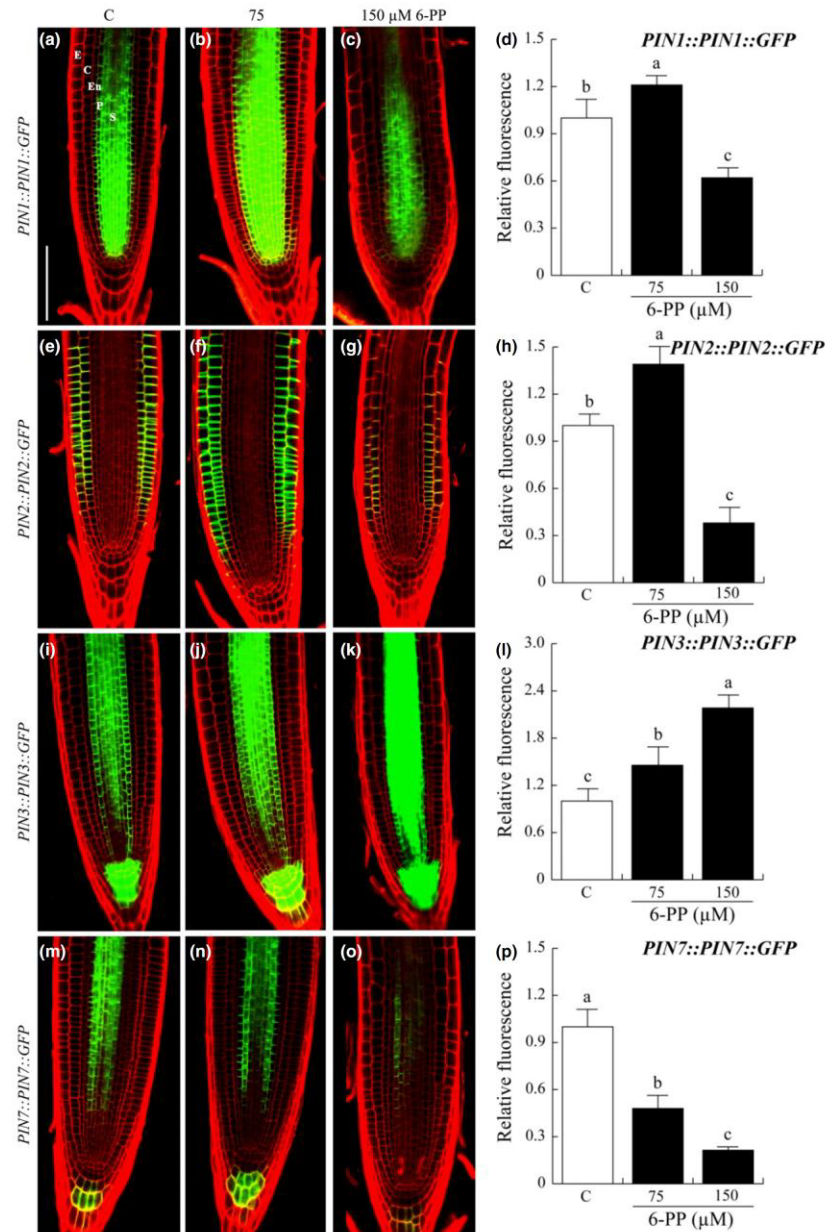


Fig. 6 Expression of auxin efflux transporters in response to 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP) in primary roots. *Arabidopsis thaliana* transgenic *PIN1::PIN1::GFP*, *PIN2::PIN2::GFP*, *PIN3::PIN3::GFP* and *PIN7::PIN7::GFP* seedlings were grown in solvent (C), or 75 or 150 μ M 6-PP supplemented medium. Five days after germination, the seedlings were stained with propidium iodide and analyzed by confocal microscopy. Representative micrographs of primary root tips of (a–c) *PIN1::PIN1::GFP*, (e–g) *PIN2::PIN2::GFP*, (i–k) *PIN3::PIN3::GFP* and (m–o) *PIN7::PIN7::GFP* are shown ($n = 15$). Note that the increase of *PIN3::PIN3::GFP* expression is proportional to the increase in 6-PP treatments. Graphs in (d, h, j, p) illustrate differences in each reporter expression, assessed as relative fluorescence intensity. Values shown represent the means for 15 seedlings $\pm$ SD. Different letters indicate means that are statistically different ($P < 0.05$). Bar, 100 μ m. Letters in (a) are used to indicate cell files: E, epidermis; C, cortex; En, endodermis; P, pericycle; S, stele.

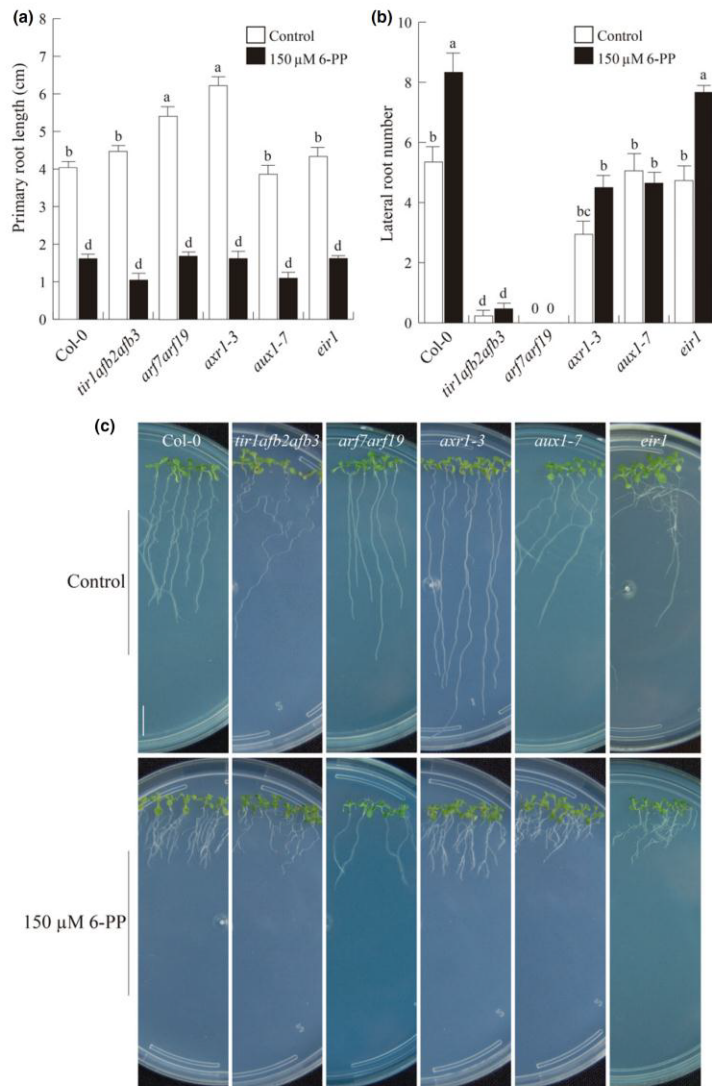


Fig. 7 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP) requires components of auxin response and transport to modify *Arabidopsis thaliana* root system architecture. *Arabidopsis thaliana* wild-type (Col-0) and *tir1/afb2/afb3*, *arf7-1/arf19-1*, *aux1-3*, *aux1-7* and *eir1*, triple, double or single mutant seedlings, respectively, were germinated and grown for 10 d in 0.2 $\times$ MS medium supplemented with the solvent (control) or 150 μ M 6-PP. (a) Primary root length. (b) Lateral root number. (c) Representative photographs of *A. thaliana* seedlings grown in the indicated 6-PP treatment. Values shown represent the means of 15 seedlings $\pm$ SD. Different letters indicate means that are statistically different ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results. Bar, 1 cm.

Discussion

This study reveals a novel mechanism by which *T. atroviride* could promote plant growth and root branching via production of 6-PP. Recently, the production of auxins and auxin precursors has been reported from several *Trichoderma* species. In addition, over 180 secondary metabolites have been characterized to date, representing different classes of chemical compounds. These compounds can be classified as volatiles, diffusible compounds and peptaibols (Gams & Bissett, 1998; Reino *et al.*, 2008; Stopacher *et al.*, 2010).

The current work builds on previous observations that fungal released volatiles increases biomass production and lateral root formation (Hung *et al.*, 2013; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014b). *Trichoderma viride*, *T. harzianum*, and *T. koningii* are able to produce 6-PP, which plays a role in biocontrol of phytopathogens such as *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*, and a strong relationship exists between the biosynthesis of this metabolite and the biocontrol ability of the producing strains (Scarselletti & Faull, 1994; Worasatit *et al.*, 1994). Interestingly, 6-PP may be involved in cross-kingdom signaling, as plants are able to respond to 6-PP by increasing growth

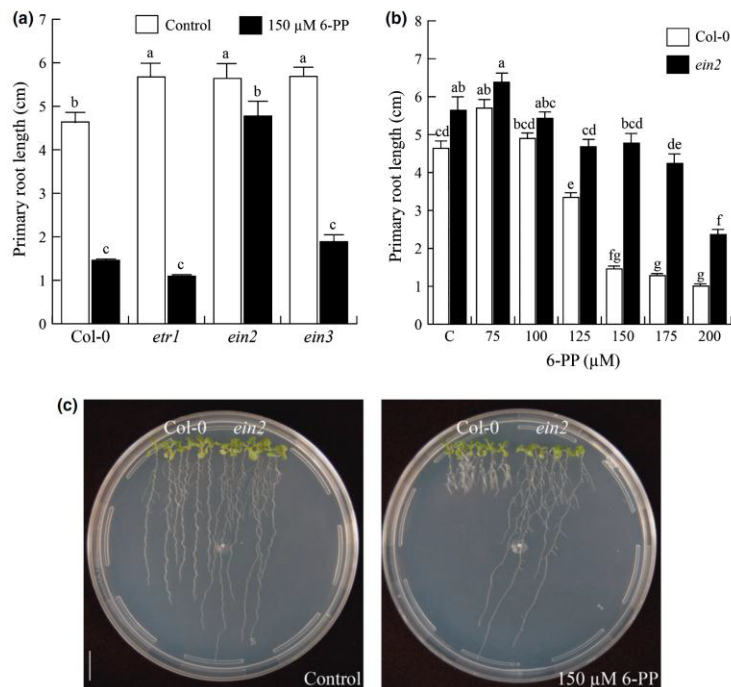


Fig. 8 *EIN2* is necessary for 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP)-modulated primary root growth. *Arabidopsis thaliana* wild-type (Col-0) and *etr1-1*, *ein2-1*, and *ein3-1* ethylene-related mutant seedlings were germinated and grown for 10 d in $0.2 \times$ MS medium supplemented with the solvent (control) or 150 μ M 6-PP. (a) Primary root length. (b) Primary root growth of *ein2* mutants in response to increasing concentrations of 6-PP. (c) Representative photographs of Col-0 and *ein2* seedlings grown side by side in the indicated 6-PP treatment. Values shown represent the means of 15 seedlings $\pm$ SD. Different letters indicate means that are statistically different ($P < 0.05$). The experiment was repeated twice with similar results. Bar, 1 cm.

and producing more branched root systems (Vinale *et al.*, 2008). 6-PP is, to our knowledge, the first non-auxin-like natural molecule that has been found to induce LR formation and root hair development, but its mechanism of action has not been previously examined.

To understand the possible role of 6-PP in phytostimulation, we first monitored 6-PP production by *T. atroviride* as part of the blend of volatiles emitted by single fungal colonies alone or in interaction with *A. thaliana* seedlings. GC-MS analysis showed that the production of 6-PP was induced by the presence of plants, which indicates its possible role in *Trichoderma*-plant interactions. For instance, a recent report showed that tomato plants elicited the production of harzianic acid (HA) but negatively modulated the biosynthesis of its analog iso-HA, suggesting that different forms of the same metabolite have specific roles in the molecular mechanism regulating the *Trichoderma*-plant interaction (Vinale *et al.*, 2014). Very little is known about the mechanisms of 6-PP biosynthesis. Mutation in the G α subunit gene TGA1 of *T. atroviride* leads to decreased 6-PP production, continuous sporulation and elevated internal cAMP concentrations, which correlates with loss of mycoparasitic and antagonistic properties against *R. solani*, *B. cinerea*, and *Sclerotinia sclerotiorum* during direct confrontation (Reithner *et al.*, 2005). The transcription factor ThCTF1 also regulates the biosynthesis of 6-PP in *T. harzianum*. In *Thctf1* mutants, the yellow pigmentation and coconut aroma attributed to 6-PP production observed in the WT strain were

affected, as was its antimicrobial activity (Rubio *et al.*, 2009). Although the interaction of *Trichoderma* strains defective in 6-PP production with plants remains to be investigated, one possibility is that such strains may still stimulate plant growth and LR formation, as these might be able to produce auxins; alternatively, the net effect on root branching may rather depend on the balance of auxin/6-PP production and release by *Trichoderma*. Our data clearly anticipate the existence of *Trichoderma* species and/or strains that promote growth without producing auxins, suggesting that 6-PP is another critical factor in fungal phytostimulation.

6-PP improved shoot and root growth and total biomass production of *A. thaliana* seedlings, and this was related to changes in root morphogenesis. LRs and root hairs are critical for water and nutrient acquisition and are important traits for plant adaptation to soil heterogeneity. The mechanism of LR formation is directly or indirectly related to primary root growth inhibition, which is mediated by the synergistic action of ethylene and auxin signaling (Ruzicka *et al.*, 2007; Stepanova *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2007; Strader *et al.*, 2010). Contreras-Cornejo *et al.* (2015) showed that the short root phenotype of mutants defective on CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1 was probably caused by auxin being accumulated in primary root tips and that both auxin and ethylene signaling are important for *Trichoderma*-induced root hair and LR formation. LR development consists of two successive steps: LR initiation and LR emergence from the parent root, which are controlled by auxin fluxes mediated by

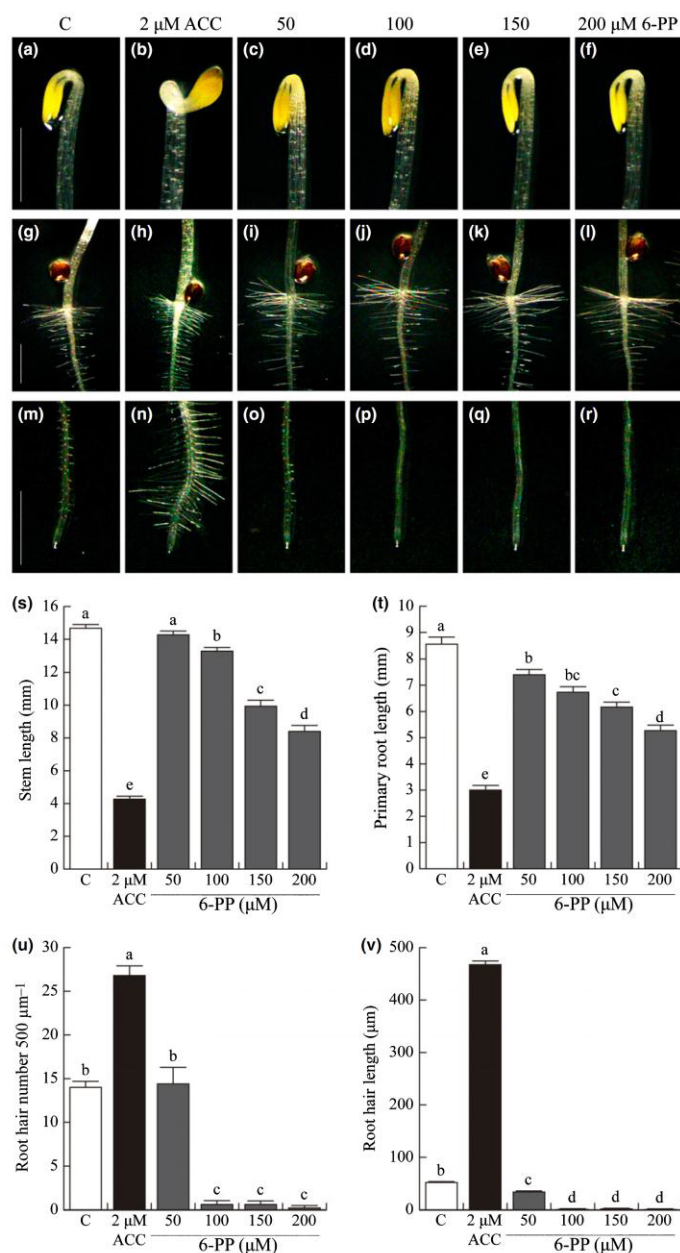


Fig. 9 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6PP) does not induce ethylene responses in dark-grown *Arabidopsis thaliana* seedlings. Representative photographs of (a–f) stem, (g–l) root–shoot transition zone and (m–r) root tip are shown. Quantitative data are for (s) stem length, (t) primary root length, (u) root hair number at the root tip region and (v) root hair length at the root tip region. *Arabidopsis thaliana* Col-0 seedlings were grown in darkness for 4 d on 0.2 $\times$ MS supplemented with the indicated concentrations of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) or 6-PP. Note that only ACC is able to induce the pronounced apical hook on the tip of the stem (b), and root hair development, whereas 6PP inhibits root hair formation. Data shown are mean $\pm$ SD ($n = 30$ for stem and primary root length; 500 root hairs from 10 independent seedlings were counted and measured). This experiment was repeated twice with similar results. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. Bars, 1 mm. C, control.

PIN family membrane transporters (Zazimalova *et al.*, 2010). To further explore the mechanisms of auxin and ethylene crosstalk in response to 6-PP, we tested the effects of 6-PP concentrations that either promote (75 μ M) or repress (150 μ M) primary root growth on the expression of *DR5:GFP* and *DR5:VENUS* auxin-

inducible markers. Interestingly, GFP fluorescence did not increase in the root tip in response to 6-PP treatment, consistent with an auxin-independent mechanism mediating the bioactivity of this compound. By contrast, we observed enhanced *DR5:GFP* fluorescence after 6-PP treatment in the LR-forming regions of

roots, particularly in the vascular tissue and during LR primordium development, which indicates an activation of auxin signaling during the LR initiation program. The structure/activity relationship of auxin signaling with small molecules has been extensively investigated. More than 200 natural or synthetic auxinic compounds have been identified, including the bacterial cyclodipeptides cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Tyr), and cyclo(L-Pro-L-Phe). These small molecules possess weak auxin activity and were able to activate auxin-response gene markers in the *A. thaliana* root system (Ortiz-Castro *et al.*, 2011). An interesting possibility is that 6-PP could modulate auxin homeostasis in specific root regions, or, possibly, its positive effect in inducing LRP emergence is explained as an adaptive response to primary root growth inhibition.

IAA enters cells through the action of influx carriers such as AUXIN RESISTANT 1 (AUX1) and Like AUX (LAX1, 2 and 3) (Bennett *et al.*, 1996; Marchant *et al.*, 2002; Swarup *et al.*, 2008), and moves to adjacent cells via efflux proteins such as PIN FORMED 1 (PIN1) and ATP BINDING CASSETTE B 19/P-GLYCOPROTEIN 19/MULTIDRUG RESISTANT 1 (ABCB19/PGP19/MDR1) (Galweiler *et al.*, 1998; Noh *et al.*, 2001). Defects in AUX1, LAX3, PIN1, PIN2 and ABCB19 decrease initiation and/or elongation of LR or negatively affect root gravitropism as a result of reduced auxin transport (Marchant *et al.*, 2002; Benkova *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2008). Changes in the abundance and localization of auxin transport proteins may define the growth of primary roots or the initiation of LR (Raya-González *et al.*, 2014). Our finding that 6-PP increased auxin-induced gene expression in regions of LR initiation suggests that 6-PP affects root development by altering auxin distribution. Consistent with this idea, PIN1, PIN2 and PIN7-GFP fluorescence was increased or decreased after 6-PP treatment, respectively, indicating the possible role of PIN transporters in 6-PP root responses. At high 6-PP concentrations (i.e. 150 μ M), localized depletion of the fluorescence of PIN1- and PIN7-GFP, normally found below the primary root meristem, was evidenced. These results suggest that 6-PP treatment increased PIN transporter expression at low doses, resulting in elevated auxin transport to the sites of LR initiation to drive LR growth, whereas higher concentrations repress primary root growth, probably blocking expression of PIN1 and PIN7. The increased LR branching associated with elevated expression of auxin transporters is not surprising, as recent studies have shown that auxin positively regulates PIN1 and PIN2 expression (Raya-González *et al.*, 2014).

To investigate whether the TIR1 family of auxin receptors and downstream signaling components are involved in *A. thaliana* responses to 6-PP, we evaluated primary root growth and LR formation in response to this metabolite in WT (Col-0) *A. thaliana* seedlings and in *tir1afb2afb3*, *arf7arf19*, *axr1-3*, *aux1-7* and *eir1* triple, double and single mutants, respectively. In solvent-treated WT seedlings, 6-PP decreased primary root length in WT and all five auxin-related mutants. Interestingly, the increase in LR formation observed in WT seedlings when treated with 6-PP was clearly reduced in *tir1afb2afb3*, *arf7arf19* and *aux1-7* mutants. Additional experiments testing primary root growth responses to

6-PP in WT and ethylene-related mutants *etr1*, *ein2* and *ein3* revealed that this compound similarly inhibited primary root growth in WT, *etr1* and *ein3* lines, whereas *ein2* was resistant to primary root growth inhibition by 6-PP, which was further confirmed in a kinetic experiment monitoring primary root growth in response to a wide range of 6-PP concentrations. Alterations in the response of dark-grown seedlings to ethylene (the 'triple response') have been used to characterize the ethylene signaling pathway in plants. In response to exogenously applied ACC, etiolated *A. thaliana* seedlings show inhibition of hypocotyl and root elongation, swelling of the hypocotyl, exaggerated tightening of the apical hook, and induced root hair development. Although ACC and 6-PP inhibit primary root growth, the phenotypes of seedlings treated with ACC or 6-PP are clearly different. In fact, 6-PP-treated seedlings did not develop the 'triple response' and failed to form long root hairs at the differentiation zone of primary roots. An additional experiment comparing the growth of *A. thaliana* seedlings supplied with ACC or 6-PP and the ethylene inhibitor AgNO₃ simultaneously showed that AgNO₃ specifically antagonized the ACC response, normalizing primary root growth without affecting the 6-PP response. These data show that 6-PP did not induce an ethylene response in *A. thaliana* seedlings and that *EIN2* is a specific and critical element mediating root responses to this fungal molecule.

These results showing the involvement of 6-PP in root development add to the emerging functions of fungal molecules in plants. Based on its growth-promoting activity and the involvement of *EIN2* in its signaling pathway, 6-PP can be regarded as a broad-spectrum molecule used to modulate both root growth and defense responses, and thus represents a novel compound enabling cross-kingdom communication. Manipulating 6-PP-dependent fungal-plant signaling and 6-PP biosynthesis in *Trichoderma* may be a promising strategy for development of fungal inoculants to enhance crop yields and plant protection in *A. thaliana* and crop plants.

Acknowledgements

We are grateful to Drs Mark A. Estelle, Plinio Guzman, and Alfredo Cruz-Ramírez for kindly providing us with *A. thaliana* mutant and transgenic seeds. The authors are indebted to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México) for financial support (research projects 231585, 177775, and 165738).

Author contributions

J.L-B., L.F.R-H., L.M-R. and A.G-V. planned and designed the research. A.G-V., A.M-B., J.R-G., L.F.R-H., S.B-O. performed experiments. A.G-V., A.M-B, E.M-P, S.B-O. and J.L-B analyzed data. A.G-V. and J.L-B. wrote the manuscript.

References

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

- Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA. 1996. *Arabidopsis* AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* 273: 948–950.
- Björkman T. 2004. Effect of *Trichoderma* colonization on auxin-mediated regulation of root elongation. *Plant Growth Regulation* 43: 89–92.
- Björkman T, Blanchard LM, Harman GE. 1998. Growth enhancement of *shrunken-2* sweet corn when colonized with *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123: 35–40.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B. 2005. The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433: 39–44.
- Boisnard-Lorig C, Colon-Carmona A, Bauch M, Hodge S, Doerner P, Bancharel E, Dumas C, Haseloff J, Berger F. 2001. Dynamic analyses of the expression of the HISTONE:YFP fusion protein in *Arabidopsis* show that syncytial endosperm is divided in mitotic domains. *Plant Cell* 13: 495–509.
- Brunoud G, Wells DM, Oliva M, Learrieu A, Mirabet V, Burrow AH, Beckman T, Kepinski S, Traas J, Bennett MJ *et al.* 2012. A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* 482: 103–106.
- Chacón MR, Rodríguez-Galán O, Benítez T, Sousa S, Rey M, Llobell A, Delgado-Jarana J. 2007. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *Trichoderma harzianum*. *International Microbiology* 10: 19–27.
- Chang YC, Baker R, Klefield O, Chet I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70: 145–148.
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker JR. 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 27: 1133–1144.
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P. 1999. Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant Journal* 20: 503–508.
- Contreras-Cornejo HA, López-Bucio JS, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez LI, Ramos-Vega M, Guevara-García A, López-Bucio J. 2015. *Trichoderma atroviride* alters *Arabidopsis* root-system architecture modulating the mitogen-activated protein kinase 6 activity through ethylene and auxin signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28: 701–710.
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez LI, Alfaro-Cuevas R, López-Bucio J. 2014a. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolyte production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 503–514.
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez LI, Beltrán-Peña E, Herrera-Estrella A, López-Bucio J. 2011. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. *Plant Signaling and Behavior* 6: 1554–1563.
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez LI, Cortés-Penagos C, López-Bucio J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149: 1579–1592.
- Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez LI, Herrera-Estrella A, López-Bucio J. 2014b. The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. *Plant and Soil* 379: 261–274.
- Fukaki H, Okushima Y, Tasaka M. 2007. Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *International Review of Cytology* 256: 111–137.
- Galweiler L, Guan CH, Muller A, Wisman E, Mendgen K, Yephremov A, Palme K. 1998. Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226–2230.
- Gams W, Bissett J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Harman GE, Kubicek CP, eds. *Trichoderma and gliocladium*. London, UK: Taylor & Francis, 3–34.
- Guzmán P, Ecker JR. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2: 513–523.
- Harman GE. 2011. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist* 189: 647–649.
- Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. 2004. *Trichoderma* species – opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43–56.
- Hashem A, Allah EF, Alqarawib AA, Al Huqaila A, Egamberdieva D. 2014. Alleviation of abiotic salt stress in *Ochradenus baccatus* (Del.) by *Trichoderma hamatum* (Bonord.) Bainier. *Journal of Plant Interactions* 9: 857–868.
- Hua J, Meyerowitz E. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94: 262–271.
- Hung R, Lee S, Bennett JW. 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecology* 6: 19–26.
- Ivanchenko MG, Muday GK, Dubrovsky JG. 2008. Ethylene–auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 55: 335–347.
- Jeleń H, Błaszczyk L, Chelkowski J, Rogowicz K, Strakowska J. 2014. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycological Progress* 13: 589–600.
- Kezler Á, Forgács E, Kótai L, Vizcaino JA, Monte E, García-Acha I. 2000. Separation and identification of volatile components in the fermentation broth of *Trichoderma atroviride* by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* 38: 421–424.
- Lee S, Hung R, Yap M, Bennett JW. 2015. Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. *Archives of Microbiology* 197: 723–727.
- Lewis DR, Negi S, Sukumar P, Muday GK. 2011. Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers. *Development* 138: 3485–3495.
- Lincoln C, Britton JH, Estelle M. 1990. Growth and development of the *axr1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 1071–1080.
- Malamy JE, Benfey PN. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124: 33–44.
- Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklof J, Casero PJ, Bennett M, Sandberg G. 2002. AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* 14: 589–597.
- Martínez-Medina A, Alguacil M, Pascual JA, Van Wees SCM. 2014. Phytohormone profiles induced by *Trichoderma* isolates correspond with their biocontrol and plant growth-promoting activity on Melon plants. *Journal of Chemical Ecology* 40: 804–815.
- Mastouri F, Björkman T, Harman GE. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology* 100: 1213–1221.
- Mastouri F, Björkman T, Harman GE. 2012. *Trichoderma harzianum* enhances antioxidant defense of tomato seedlings and resistance to water deficit. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 1264–1271.
- Mukherjee PK, Horwitz BA, Herrera-Estrella A, Schmol M, Kenerley CM. 2013. *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology* 51: 105–129.
- Noh B, Murphy AS, Spalding EP. 2001. Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* 13: 2441–2454.
- Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río R, Campos-García J, López-Bucio J. 2011. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proceedings of the National Academic of Sciences, USA* 108: 7253–7258.
- Ottenschlager I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, 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 Academic of Sciences, USA* 100: 2987–2991.
- Parry G, Calderon-Villalobos LI, Prigge M, Peret B, Dharmasiri S, Itoh H, Lechner E, Grayd WM, Bennett M, Estelle M. 2009. Complex regulation of

- the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 22540–22545.
- Pereira JL, Queiroz RML, Charneau S, Felix CR, Ricart CA, Lopes da Silva F, Stecca A, Steindorff C, Ulhoa CJ, Noronha EF. 2014. Analysis of *Phaseolus vulgaris* response to its association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the presence or absence of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *PLoS ONE* 9: e8234.
- Pickett FB, Wilson AK, Estelle M. 1990. The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance. *Plant Physiology* 94: 1462–1466.
- Polizzi V, Adams A, Picco AM, Adriaens E, Lenoir J, Van Peteghem C, De Saeger S, De Kimpe N. 2011. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. *Building and Environment* 46: 945–954.
- Rawat L, Singh Y, Shukla N, Kumar J. 2013. Salinity tolerant *Trichoderma harzianum* reinforces NaCl tolerance and reduces population dynamics of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* in chickpea (*Cicer arietinum* L.) under salt stress conditions. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46: 1442–1467.
- Raya-González J, Ortiz-Castro R, Ruiz-Herrera LF, 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.
- Reino JL, Guerriero RF, Hernandez-Gala R, Collado IG. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews* 7: 89–123.
- Reithner B, Brunner K, Schuhmacher R, Peissl I, Seidl V, Krška R, Zeilinger S. 2005. The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites. *Fungal Genetics and Biology* 42: 749–760.
- Roman G, Lubarsky B, Kieber JJ, Rothenberg M, Ecker JR. 1995. Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* 139: 1393–1409.
- Rubio MB, Hermosa R, Reino JL, Collado IG, Monte E. 2009. Thctf1 transcription factor of *Trichoderma harzianum* is involved in 6-pentyl-2H-pyran-2-one production and antifungal activity. *Fungal Genetics and Biology* 46: 17–27.
- Rubio MB, Quijada NM, Pérez E, Domínguez S, Monte E, Hermosa R. 2014. Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plants. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 1864–1873.
- Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorska R, Beeckman T, Friml J, Benkova E. 2007. Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* 19: 2197–2212.
- Samolski I, Rincón AM, Pinzón LM, Viterbo A, Monte E. 2012. The *gid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology* 158: 129–138.
- Scarselletti R, Faull JL. 1994. *In vitro* activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycological Research* 98: 1207–1209.
- Shores M, Harman GE. 2008. The molecular basis of shoot responses of maize 517 seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. *Plant Physiology* 147: 2147–2163.
- Siddiquee S, Cheong BE, Taslima K, Kausar H, Hasan MM. 2012. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of Chromatographic Science* 50: 358–367.
- Stepanova AN, Yun J, Likhacheva AV, Alonso JM. 2007. Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 19: 2169–2185.
- Stoppacher N, Kluger B, Zeilinger S, Krška R, Schuhmacher R. 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods* 81: 187–193.
- Strader LC, Chen GL, Bartel B. 2010. Ethylene directs auxin to control root cell expansion. *The Plant Journal* 64: 874–884.
- Studholme DJ, Harris B, LeCocq K, Winsbury R, Perer AV, Ryder L, Ward JL, Beale MH, Thornton CR, Grant M. 2013. Investigating the beneficial traits of *Trichoderma hamatum* GD12 for sustainable agriculture—insights from genomics. *Frontiers in Plant Science* 4: 1–13.
- Swarup K, Benkova E, Swarup R, Casimiro I, Peret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S *et al.* 2008. The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* 10: 946–954.
- Swarup R, Perry P, Hagenbeek D, Van Der Straeten D, Beeckman GT, Sandberg G, Bhalerao R, Ljung K, Bennett MJ. 2007. Ethylene upregulates auxin biosynthesis in *Arabidopsis* seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19: 2186–2196.
- Vargas WA, Crutcher FK, Kenerley CM. 2011. Functional characterization of a plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus *Trichoderma virens*. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells. *New Phytologist* 189: 777–789.
- Vargas WA, Mandawe JC, Kenerley CM. 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between *Trichoderma virens* and maize plants. *Plant Physiology* 151: 792–808.
- Velázquez-Robledo R, Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez LI, Hernández-Morales A, Aguirre J, Casas-Flores S, López-Bucio J, Herrera-Estrella A. 2011. Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism and induction of plant defense responses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24: 1459–1471.
- Vieten A, Vanneste S, Wiśniewska J, Benková E, Benjamins R, Beeckman T, Luschig C, Friml J. 2005. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132: 4521–4531.
- Vinale F, Manganiello G, Nigro M, Mazzei P, Piccolo A, Pascale A, Ruocco M, Marra R, Lombardi N, Lanzuise S *et al.* 2014. A novel fungal metabolite with beneficial properties for agricultural applications. *Molecules* 19: 9760–9772.
- Vinale F, Sivasithamparan K, Ghisalberti E, Marra R, Barbetti M, Li H, Woo S, Lorito M. 2008. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological Molecular Plant Pathology* 72: 80–86.
- Wilmoth JC, Wang S, Tiwari SB, Joshi AD, Hage G, Guilfoyle TJ, Alonso JM, Ecker JR, Reed JW. 2005. NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. *Plant Journal* 43: 118–130.
- Worasatit N, Sivasithamparan K, Ghisalberti EL, Rowland C. 1994. Variation in pyrone production, pectic enzymes and control of rhizoctonia root rot of wheat among single-spore isolates of *Trichoderma koningii*. *Mycological Research* 98: 1357–1363.
- Wu G, Lewis DR, Spalding EP. 2007. Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* 19: 1826–1837.
- Žádníková P, Petrásek J, Marhavý P, Raz V, Vandenbussche F, Ding Z, Schwarzerová K, Morita MT, Tasaka M, Hejátko J *et al.* 2010. Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 137: 607–617.
- Zazimalova E, Murphy AS, Yang HB, Hoyerova K, Hosek P. 2010. Auxin transporters—why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a0015.
- Zhao L, Wang F, Zhang Y, Zhang J. 2014. Identifying beneficial qualities of *Trichoderma parareesei* for plant. *Journal of Basic Microbiology* 54: S115–S124.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Fig. S1 6-PP modifies *Arabidopsis thaliana* root system architecture.

Fig. S2 Effect of 6-PP on *Arabidopsis thaliana* cell viability.

Fig. S3 6-PP reduces the cell division zone in primary roots.

Fig. S4 Effects of 6-PP on *Arabidopsis thaliana* root hair development and epidermal cell length.

Fig. S5 Effect of 6-PP on auxin responsive gene expression in primary root tips of *Arabidopsis thaliana* DR5:VENUS seedlings.

Fig. S6 Effects of NPA and IAA on primary root growth of wildtype (Col-0) and auxin-related mutants.

Fig. S7 Effect of AgNO₃ on primary root growth inhibition induced by ACC or 6-PP.

Please note: Wiley Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.



About New Phytologist

- *New Phytologist* is an electronic (online-only) journal owned by the New Phytologist Trust, a **not-for-profit organization** dedicated to the promotion of plant science, facilitating projects from symposia to free access for our Tansley reviews.
- Regular papers, Letters, Research reviews, Rapid reports and both Modelling/Theory and Methods papers are encouraged. We are committed to rapid processing, from online submission through to publication 'as ready' via *Early View* – our average time to decision is <27 days. There are **no page or colour charges** and a PDF version will be provided for each article.
- The journal is available online at Wiley Online Library. Visit www.newphytologist.com to search the articles and register for table of contents email alerts.
- If you have any questions, do get in touch with Central Office (np-centraloffice@lancaster.ac.uk) or, if it is more convenient, our USA Office (np-usaoffice@lancaster.ac.uk)
- For submission instructions, subscription and all the latest information visit www.newphytologist.com

New Phytologist Supporting Information Figs S1–S7

Article title: The volatile 6-pentyl-2*H*-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and *ETHYLENE INSENSITIVE 2* functioning

Authors: Amira Garnica-Vergara, Salvador Barrera-Ortiz, Edith Muñoz-Parra, Javier Raya-González, Alejandro Méndez-Bravo, Lourdes Macías-Rodríguez, León Francisco Ruiz-Herrera and José López-Bucio

Article acceptance date: 23 September 2015

The following Supporting Information is available for this article:

Fig. S1 6-PP modifies *Arabidopsis* root system architecture.

Fig. S2 Effect of 6-PP on *Arabidopsis* cell viability.

Fig. S3 6-PP reduces the cell division zone in primary roots.

Fig. S4 Effects of 6-PP on *Arabidopsis* root hair development and epidermal cell length.

Fig. S5 Effect of 6-PP on auxin responsive gene expression in primary root tips of *Arabidopsis DR5:VENUS* seedlings.

Fig. S6 Effects of NPA and IAA on primary root growth of wild-type (Col-0) and auxin-related mutants.

Fig. S7 Effect of AgNO₃ on primary root growth inhibition induced by ACC or 6-PP.



Fig. S1 6-PP modifies *Arabidopsis* root system architecture. *Arabidopsis* (Col-0) seedlings were germinated and grown for 10 d under increased 6-PP concentrations. (a–e) Photographs show representative individual seedlings. Bar, 1 cm.

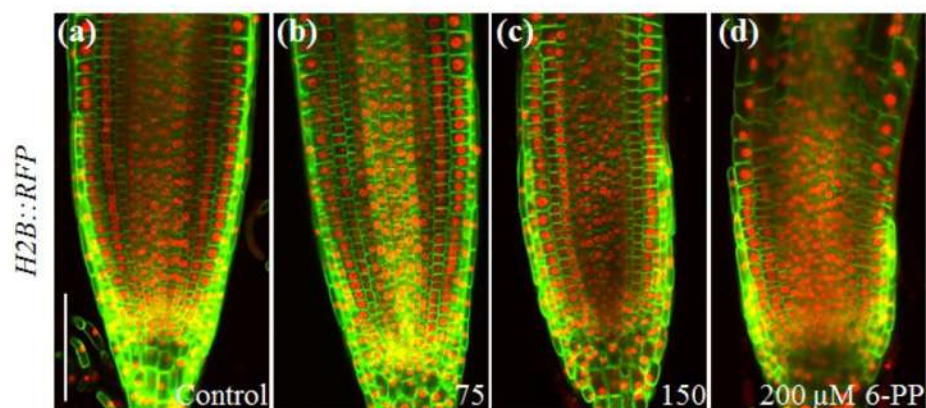


Fig. S2 Effect of 6-PP on *Arabidopsis* cell viability. *Arabidopsis* *H2B::RFP* expressing seedlings were grown for 10 d in media with the solvent only or supplied with increased concentrations of 6-PP. (a–d) Representative micrographs of primary root tips. Note that even under the highest concentration of 6-PP tested, root tip cell remain viable and show red intact nuclei. Bar, 100 μ m.

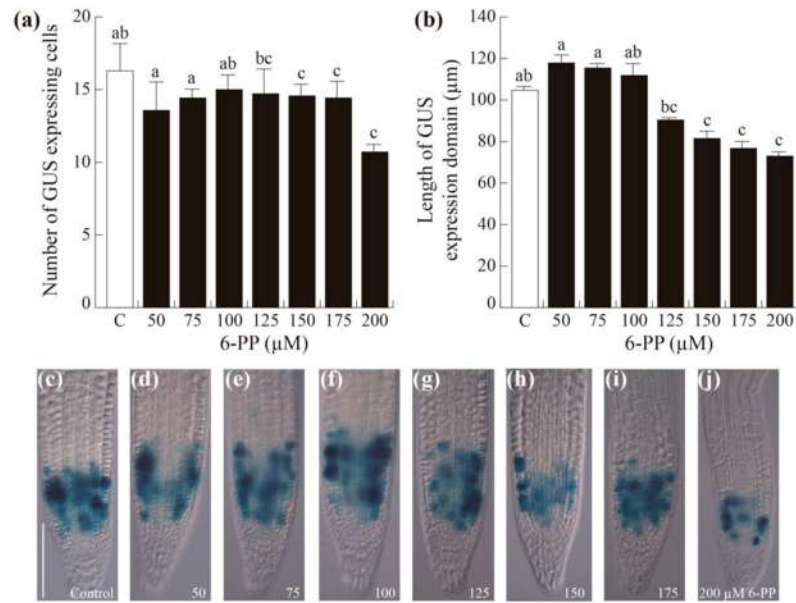


Fig. S3 6-PP reduces the cell division zone in primary roots. Transgenic *Arabidopsis* *CycB1:uidA* seedlings were germinated and grown for 5 d on $0.2 \times$ MS medium supplied with increasing 6-PP concentrations. (a) Number of GUS expressing cells and (b) length of GUS expression domain were quantified. (c–j) Photographs showing representative individuals from 20 GUS-stained seedlings obtained from three independent plates. Error bars represent SE from 20 GUS-stained seedlings analyzed. Different letters indicate means statistically different at $P < 0.05$. The experiment was repeated two times with similar results. Bar, 100 μm .

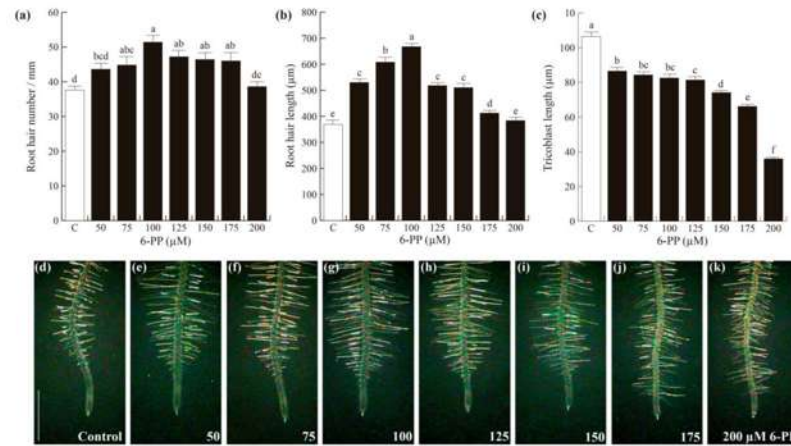


Fig. S4 Effects of 6-PP on *Arabidopsis* root hair development and epidermal cell length. (a) Root hair number, (b) root hair length, and (c) trichoblasts length. *Arabidopsis thaliana* seedlings were grown for 5 d on MS 0.2 × media with or without the indicated concentrations of 6-PP. Data points indicate mean ± SD ($n = 15$). (d–k) Representative photographs of root hairs formed at the primary root tip region of 5 d *Arabidopsis* seedlings supplied with the different 6-PP treatments. The results (a–c) show mean of 500 epidermal cells located at the root hair-forming zone of the primary root from 10 independent seedlings. This experiment was repeated twice with similar results. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. Bar, 1 mm.

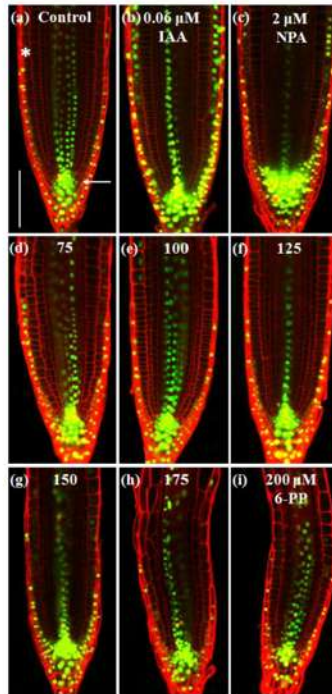


Fig. S5 Effect of 6-PP on auxin responsive gene expression in primary root tips of *Arabidopsis* *DR5:VENUS* seedlings. Seedlings were grown in MS 0.2 × media supplied with (a) solvent, (b) 0.06 μM IAA, (c) 2 μM NPA, (d) 75, (e) 100, (f) 125, (g) 150, (h) 175 and (i) 200 μM 6-PP. Five days after germination seedlings were stained with propidium iodide and analyzed by confocal microscopy. White asterisk and arrow in (a) indicate the epidermis and the area surrounding the quiescent center, respectively. This latter zone defines an auxin maximum response within the primary root tip. Note an induced expression by IAA or NPA treatments, whereas high concentrations of 6-PP decreased expression. Micrographs show representative individuals of at least 15 seedlings analyzed. Bar, 100 μm.

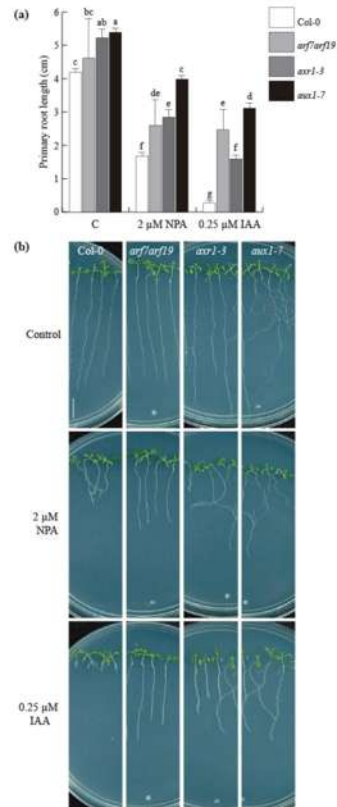


Fig. S6 Effects of NPA and IAA on primary root growth of wild-type (Col-0) and auxin-related mutants. *Arabidopsis thaliana* WT and *arf7arf19*, *aux1-3* and *aux1* mutant seedlings were grown for 10 d on MS 0.2 $\times$ medium supplemented with the indicated concentration of NPA and IAA. Values shown represent the mean primary root length of 15 seedlings $\pm$ SD. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. Representative photographs of *Arabidopsis* seedlings grown in the indicated treatment. The experiment was repeated twice times with similar results. Bar, 1 cm.

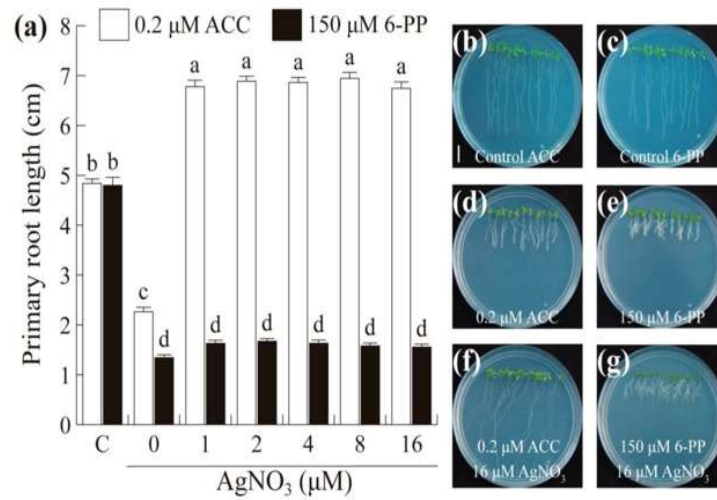


Fig. S7 Effect of AgNO_3 on primary root growth inhibition induced by ACC or 6-PP. *Arabidopsis thaliana* Col-0 seedlings were grown for 10 d on MS 0.2 $\times$ medium supplemented with the indicated concentration of ACC or 6-PP with or without AgNO_3 . Values shown represent the mean primary root length of 30 seedlings $\pm$ SD. Different letters indicate statistical differences at $P < 0.05$. Representative photographs of *Arabidopsis* seedlings grown in the indicated treatment. The experiment was repeated twice times with similar results. Bar, 1 cm.

9.2. ADDENDUM II

Mecanismos de tolerancia de las plantas a los metales pesados

León Francisco Ruiz Herrera, Alejandro Méndez Bravo y José López Bucio

Para definir a un metal pesado, el elemento debe presentar una densidad de 5 g cm^{-3} como límite inferior, lo que comprende 53 de los 92 elementos naturales de la tabla periódica. De estos 53 elementos algunos son micronutrientes esenciales para las plantas, incluyendo al hierro (Fe), el cobre (Cu) y el zinc (Zn). Debido a que gran cantidad de estos metales esenciales son altamente reactivos, pueden causar toxicidad si se acumulan por arriba de las concentraciones requeridas. Además, debido a que algunos metales pesados presentan radios iónicos similares a los micronutrientes esenciales, pueden entrar vía los transportadores que normalmente movilizan a dichos nutrientes. Ejemplo de este tipo de metales pesados son el cadmio (Cd), el plomo (Pb) y el mercurio (Hg), los cuales causan síntomas de toxicidad cuando se encuentran en el suelo. Otro metal bastante tóxico para las raíces en suelos ácidos ($\text{pH} < 5$) es el aluminio (Al), principalmente en la forma de ion Al^{3+} . Debido a que los suelos ácidos comprenden 50% de las tierras cultivables del mundo, los mecanismos de tolerancia de los cultivos al Al han sido ampliamente caracterizados. Por lo tanto, aunque el aluminio no es un metal pesado también se revisará su mecanismo de tolerancia.

Introducción

De los ciento diez y ocho elementos conocidos, noventa y cuatro se encuentran naturalmente en la Tierra y sesenta y nueve poseen propiedades de metales. Un metal es un elemento, compuesto o aleación que suele ser duro, opaco, brillante y que posee una buena conductividad eléctrica y térmica. Los metales son generalmente maleables y dúctiles (Müller, 2007). Algunos metales pesados esenciales como micronutrientes, incluyen al Fe, Cu, Zn y manganeso (Mn) que son muy reactivos, por lo que pueden causar toxicidad si se acumulan en concentraciones mayores a las que la planta necesita. Los metales pesados como el Cd, el Pb y el mercurio (Hg) debido a actividades antropogénicas (minería, industria metal-mecánica, teneorias, etc.), pueden causar síntomas de toxicidad cuando se encuentran en niveles elevados en el suelo. El Al es un metal altamente tóxico para las raíces en suelos ácidos ($\text{pH} \leq 5$), donde es solubilizado como el catión rizotóxico Al^{3+} a partir de las arcillas de aluminosilicatos en la solución del suelo. Debido a que aproximadamente el 50% de los suelos arables son ácidos y están ampliamente distribuidos en el mundo, la toxicidad por Al a nivel mundial es una de las principales limitaciones para la agricultura (Ceszkülly-Mutert, 1995). El propósito de este capítulo consiste en revisar los mecanismos que subyacen a la tolerancia al Al en los cultivos, debido a que tanto a nivel molecular como fisiológico son los procesos de tolerancia a metales mejor caracterizados en las plantas.

1. Clasificación y toxicidad de los metales

A pesar de que el concepto de metal pesado está ampliamente distribuido en la literatura no hay un consenso respecto a lo que debe considerarse como un metal pesado. Dullis (2002) utiliza los límites de densidad inferiores de diversos autores los cuales varían de 3.5 a 7 g cm^{-3} para definir a un metal "pesado". El autor afirma que dichos umbrales cambian dependiendo del investigador y que por lo tanto "es imposible llegar a un consenso" y concluye que se debe abandonar cualquier idea de definir los "metales pesados" en base a su densidad debido a que esto solo genera confusión. Sin embargo, aunque la mitad de los trabajos citados sugieren límites inferiores de 4.5 a 5 g cm^{-3} , las plantas en realidad no tienen la capacidad de detectar la densidad de los metales. Así que, el término "metal pesado" permanece oscuro en las ciencias de la vida. Sin embargo es un concepto útil porque, ¿en qué otras características de los metales deberíamos basar la clasificación de los metales pesados? Los metales pueden clasificarse de acuerdo al concepto HSAB (*hard and soft acids and bases*; ácidos y bases fuertes y débiles), donde para formar

compuestos estables los aceptores fuertes se unen a donadores fuertes, mientras que los débiles prefieren unirse a donadores débiles (Shaw *et al.*, 2004). Este es el concepto HSAB, el cual es muy común en la naturaleza y a esto se debe que algunos metales estén presentes en la corteza terrestre como minerales de óxido y carbonatos, mientras que otros lo hagan como sulfuros. Por ejemplo, los minerales que contienen Al, Ca o Mg junto con oxígeno o CO_3 son ácidos fuertes, mientras que los que están formados por Hg o Pb y S son ácidos débiles. La toxicidad relativa de los metales pesados, depende de su disponibilidad, la cual está determinada por las propiedades del suelo y la especie vegetal de interés. Una vez que es captado por una planta, los metales pesados interactúan con diferentes componentes celulares lo que resulta en alteraciones de los procesos metabólicos normales. Esto puede provocar daño a las células y en algunos casos la muerte del organismo (Shaw *et al.*, 2004). La toxicidad se debe a que las funciones biológicas de las enzimas están siendo bloqueadas o que los iones metálicos esenciales de las biomoléculas son reemplazados por iones no funcionales (Shaw *et al.*, 2004), lo que provoca que las propiedades catalíticas de las enzimas cambien o incluso se pierdan. De acuerdo con Nieboer y Richardson (1980), los metales pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a su afinidad por ciertos ligandos: clase A se unen a ligandos con oxígeno disponible; clase B se unen a compuestos que contienen azufre o nitrógeno; los de la clase C o de frontera poseen propiedades de unión intermedias entre la clase A y B (Tabla 1). La hipótesis de Nieboer y Richardson (1980) establece que la afinidad de un metal por un ligando específico conducirá a efectos idénticos en diferentes organismos. La actividad de algunas enzimas depende de la presencia de ciertos metales en su sitio activo; si estos iones metálicos son cambiados de posición o desplazados por otros metales con el mismo tamaño y carga, la actividad del catalizador se inhibe. Por ejemplo, el Zn metal crucial para la actividad de ciertas enzimas metálicas, puede ser desplazado por el Cd, el cual se localiza justo abajo de éste en la tabla periódica. A pesar de la

Tabla 1. Clasificación de algunos metales y metaloides de acuerdo al índice covalente de Nieboer y Richardson, 1980.

Elementos de frontera	Elementos de clase B	Elementos de clase A
Ga^{3+} , In^{3+} , Sn^{2+} , Pb^{2+} , As^{3+} , Sb^{3+} , Te^{4+} , V^{5+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+}	Ti^{4+} , ICl^{+} , Pb^{4+} , S^{2-} , I^{3-} , I^{2-} , Cu^{+} , Ag^{+} , Au^{+} , Hg^{2+}	Li^{+} , Na^{+} , K^{+} , Cs^{+} , Be^{2+} , V^{4+} , Co^{3+} , Sc^{3+} , Ba^{2+} , A^{3+} , Sr^{2+} , Mg^{2+}

similitud química entre el Cd y el Zn, las enzimas que contienen Zn son incapaces de realizar su actividad catalítica cuando el Cd se une a ellas (Shaw *et al.*, 2004). Los metales pesados con mayor toxicidad son los que se incluyen en la clase B del sistema de Nieboer y Richardson, los que exhiben un amplio espectro de mecanismos de toxicidad y no se han encontrado en forma natural en una enzima; estos metales se unen de manera más eficiente a los grupos sulfhidrilo (SH) de la cisteína y a los que contienen nitrógeno como los de la lisina en los centros activos de las enzimas (Shaw *et al.*, 2004). Por lo tanto, un metal pesado podría definirse dependiendo de que su concentración ocasione efectos tóxicos en los organismos, ya sea porque desplaza a los iones metálicos endógenos de sus sitios activos (serie A), o porque inhibe la actividad de las enzimas uniéndose a los grupos funcionales que contienen azufre o nitrógeno (serie B).

2. Estrategias de las plantas frente a los metales pesados

Las plantas utilizan dos estrategias generales para hacer frente a los metales pesados en el suelo: 1) la de exclusión, que consiste en la eliminación de l metal por las raíces o por algún otro órgano de la planta; y 2) la de acumulación, que es el mecanismo utilizado por las verdaderas plantas tolerantes a los metales pesados (Milner *et al.*, 2015). La primera estrategia involucra varios mecanismos, que incluyen: i) el transporte del metal en su forma iónica o como complejo ligando-metal (quelado a un compuesto orgánico) fuera de la raíz, después de haber sido captado por vía simplástica en la raíz; ii) exclusión del metal fuera la parte aérea de la planta vía el transporte del metal quelado a algún compuesto orgánico; iii) secreción de compuestos orgánicos que quiten por la raíz fuera la rizósfera, donde se une al metal o evitan su entrada a la raíz (Parakayastha y Chhonkar, 2010; Milner *et al.*, 2015). Así, las estrategias de exclusión están enfocadas ya sea a limitar los niveles de metal tóxico que entran y sequestran al metal en la vacuola y/o en la pared celular antes de que éste sea transportado a los tejidos aéreos, principalmente para proteger los procesos fotosintéticos, los cuales son altamente vulnerables a los metales pesados (Küper *et al.*, 2007). Los principales compuestos secretados para enfrentar a la toxicidad por metales pesados o por Al son regularmente los ácidos orgánicos cítrico y málico. También se han encontrado péptidos no proteicos tales como los fitosideróforos que se han relacionado con la captación de Fe por las gramíneas (Ma *et al.*, 2001; Dubbin y Ander, 2003); o la fitoquelatina que es un péptido rico en grupos SH (Cobbitt y Goldsbrough, 2002). Una estrategia general usada por especies no acumuladoras, que incluyen la mayoría de las especies

de cultivos comerciales, consiste en sequestrar el metal en la vacuola de las células de la raíz para evitar que sea transportado a la maquinaria fotosintética de las hojas (Audet y Charest, 2008). Sin embargo, en especies hiperacumuladoras de metales pesados altamente especializadas, una fracción significativa del metal tóxico es transportada al follaje vía el sistema y almacenada en la vacuola de las células epidérmicas de las hojas que generalmente no son fotosintéticas. Dos de los casos mejor estudiados de plantas hiperacumuladoras son *Nocca caulescens*, *Chelidonium majus* y *Arabidopsis halleri*, las cuales toleran más de 40,000 mg de Zn (Escarre *et al.*, 2006) y 10,000 mg de Cd (Jomri *et al.*, 2000) por kg de peso seco de follaje respectivamente, antes de que se observen síntomas de toxicidad al metal. Estos niveles son 100 veces mayores a los que se observan en plantas no acumuladoras, las cuales empiezan a exhibir síntomas de toxicidad cuando la concentración de Zn en las hojas excede 300 ppm en peso seco en los tejidos aéreos (Marschner, 2011). Además, existen otras plantas que hiperacumulan metales tóxicos como el cobre (Cu), plomo (Pb), níquel (Ni), cromo (Cr), selenio (Se) y arsénico (As) (Tabla 2) (Parakayastha y Chhonkar, 2010; Milner *et al.*, 2015). Debido a que la mayoría de las especies nativas de suelos ácidos presentan un amplio intervalo de mecanismos de resistencia, no exhiben síntomas de toxicidad. Éstas muestran los dos mecanismos generales antes mencionados, es decir, pueden presentar la estrategia de exclusión y/o la de acumulación. En el caso de las que excluyen el Al, solo una pequeña fracción de este metal es captado antes de ser regresado al suelo donde se acumula en su forma natural. Debido a que la mayoría exhiben una variedad de mecanismos para excluir altos niveles de Al del follaje, el contenido medio de Al en los tejidos vegetales es de alrededor de 200 mg·kg⁻¹ de peso seco (Hutchinson, 1945). Los niveles de Al en los tejidos aéreos se encuentra por debajo de los 300 mg·kg⁻¹ de peso seco. Contrario a las plantas cuyo estrategia es excluir el Al, un número limitado de especies vegetales pueden ser llamadas verdaderas acumuladoras de Al, o "plantas de Al", debido a que almacenan el metal en los tejidos aéreos en cantidades superiores al nivel promedio (Jansen *et al.*, 2010). Diversos autores coinciden en establecer como umbral de concentración de Al 1,000 mg·kg⁻¹ de peso seco para diferenciar entre las especies acumuladoras y no acumuladoras de Al (Jansen *et al.*, 2010). Masunaga *et al.* (1998) propusieron como criterio de concentración del Al, 3000 mg·kg⁻¹ de peso seco para plantas acumuladoras de este metal, en base a la relación entre la concentración de Al y la de los otros cinco elementos (Ca, Mg, P, S, Si). Los estudios de diferentes plantas acumuladoras de

Tabla 2. Plantas hiperacumuladoras de metales (Purakayastha y Chhonkar, 2010)

Metal	Hiperacumulador	Concentración reportada (mg·kg ⁻¹)
Zinc	<i>Nocca caerulescens</i>	52,000
	<i>S. polygaloides</i>	6,000
	<i>Potentilla griffithii</i>	6,250
Cobre	<i>Ipomoea alpina</i>	12,300
	<i>S. polygaloides</i>	120
	<i>Medicago sativa</i>	85
	<i>Brassica juncea</i>	22
Cadmio	<i>N. caerulescens</i>	1,000
	<i>Alfa alfa</i>	1,079
	<i>Nicotiana tabacum</i>	40
	<i>Sinapis alba</i>	123
Plomo	<i>Tulaspi rotundifolium</i>	8,200
	<i>Pisum sativum</i>	8,940
	<i>B. juncea</i>	15,000
	<i>N. caerulescens</i>	844
	<i>Verbena zizanioides</i>	1,480
	<i>Sonchus arvensis</i>	3,664
Cromo	<i>Leptospermum scoparium</i>	20,000
	<i>B. juncea</i>	1,400
	<i>Helianthus annuus</i>	1,400
Selenio	<i>Astragalus racemosus</i>	14,900
	<i>Astragalus pectinatus</i>	4,000
	<i>Stanleya pinnata</i>	330
	<i>Actinopteris radiata</i>	1,028
Arsénico	<i>Pteris vittata</i>	23,000
	<i>Pityrogramma californialis</i>	8,350

Al de varias localidades con suelos extremadamente ácidos, permiten distinguir entre acumuladoras de Al obligadas y facultativas. Las primeras, pueden definirse como especies en las cuales el contenido de Al en el follaje se encuentra constantemente arriba de 1000 mg·kg⁻¹ de peso seco, independientemente de la concentración de Al solubilizado en el suelo. Por otro lado, la concentración de Al en las plantas facultativas (también llamadas especies "indicadoras") refleja en forma aproximada el nivel del metal solubilizado en el suelo. Sin embargo, los niveles de Al en las partes aéreas de las acumuladoras facultativas pueden variar dependiendo de la estación (de Madeiros y Haridasan, 1983; Mazorra *et al.*, 1987). Las plantas acumuladoras obligadas no solo no muestran síntomas de toxicidad por Al en suelos ácidos, sino al contrario el metal estimula su crecimiento. Así, el Al tiene un efecto benéfico en las acumuladoras obligadas, por

ejemplo la planta de té (*Camellia sinensis*), *Melastoma malabathricum* y *Miconia albicans* (Watanabe y Osaki, 2001; Jansen *et al.*, 2010). Un efecto similar se ha reportado en *Eucalyptus gunnifera*, una especie que crece en suelos ácidos pero que no es acumuladora de Al (Molletre, 1975). Esta serie de observaciones plantean preguntas fisiológicas interesantes respecto a la posible función del Al en el metabolismo de las plantas acumuladoras y su tolerancia a la toxicidad por Al. Los resultados sugieren que en estas especies, el Al es un micronutriente esencial para las acumuladoras obligadas, ya que éstas solo pueden crecer sanas en suelos ácidos ricos en Al; mientras que en suelos no ácidos, pobres en Al presentan necrosis y clorosis en las hojas. No está claro si esto es así para todas las plantas hiperacumuladoras de Al y es aún menos conocida la posible función biológica del Al en estos organismos (Jansen *et al.*, 2010).

3. Evolución de las plantas en respuesta a la acumulación de metales pesados

La adaptación a suelos con alto contenido de metales y las variaciones ecotípicas con respecto a la resistencia y acumulación de metales como el, Ni, Zn, Pb, Cd, cobalto (Co), Cu, manganeso (Mn), Cr y Se, en un fenómeno común (Macnair, 1993). A menudo una sola especie de un género presenta acumulación de un metal pesado, lo que sugiere que las diferencias en el contenido de metales pesados pueden atribuirse a procesos evolutivos recientes (Reeves y Baker, 2000). Por ejemplo, las plantas acumuladoras de Ni en las Rubiaceae se limita a un escaso número de géneros y sus implicaciones taxonómicas parecen ser significativas a nivel de género o especie. En este sentido, la distribución de las especies acumuladoras de Ni dentro del enorme género *Psychotria* (incluye tanto especies acumuladoras como no acumuladoras de Ni) puede ser interesante para propósitos de clasificación entre las especies. La característica unificadora más importante entre las acumuladoras de metales es probablemente su distribución restringida y alto grado de endemismo (Baker y Brooks, 1989). En contraste, Broadley y col. (2001) reportaron variaciones significativas en la acumulación de metales pesados en el nivel taxonómico de orden (especialmente Malpighiales, Brassicales y Asterales) y por debajo de éste, lo que sugiere que características evolutivas primigenias pudieron influir en la acumulación de metales pesados. La hiperacumulación del Al en las hojas, muestra fuertes señales filogenéticas a un nivel taxonómico mayor que la acumulación de metales pesados en general; esta diferencia se puede explicar por la disponibilidad de los elementos y su función en los procesos metabólicos. Como ya se mencionó, los suelos ácidos con Al³⁺ solubilizado comprenden

el 50% de los suelos arables en el mundo (con Ueckert y Motert, 1995), en comparación de los suelos metalíferos que se distribuyen usualmente de forma aislada y local. Los suelos metalíferos muestran concentraciones anormalmente altas de algunos elementos que normalmente solo están presentes a nivel de trazas en otros suelos. A diferencia de la acumulación de Al, el efecto de los suelos metalíferos puede dar como resultado el desarrollo de una flora metalo-tolerante local característica (Reeves y Baker, 2000). Por lo tanto, una hipótesis ampliamente aceptada es que las adaptaciones a suelos metalíferos se han desarrollado a nivel de especie o variedades, mientras que las estrategias de acumulación o eliminación de Al parecen afectar a grandes grupos taxonómicos como familias u órdenes. También es probable que los mecanismos de acumulación de Al sean procesos fisiológicos diferentes a los de acumulación de metales pesados (Jensen *et al.*, 2010).

4. Mecanismos moleculares generales de las plantas tolerantes a metales pesados

Recientemente, se han hecho progresos en la determinación de las bases moleculares en la tolerancia a los metales pesados. Parece ser que una característica común es la alteración en la expresión de genes involucrados en la homeostasis y el transporte del metal en cuestión. Para hacer frente a la hiperacumulación de un metal, las plantas incrementan la expresión de genes que codifican para los transportadores de éste. En otras ocasiones, se han encontrado un mayor número de copias del gen transportador, de tal forma que existe una mayor abundancia de la proteína transportadora del metal. Un ejemplo de esto, es la triplicación del gen *HMA1* que conduce a una mayor expresión del transportador AlHMA1-AL Paso de metales pesados y por lo tanto a un incremento en la movilización de Zn y Cd a los tejidos aéreos, lo que permite la hiperacumulación de Zn/Cd en el follaje (Hanikenne *et al.*, 2003). Algunos de los transportadores que participan en la tolerancia a metales y que han sido los más estudiados, incluyen a los que movilizan al nitrato y que son activados por el aluminio ALMT (AL ACTIVATED MALATE TRANSPORTERS), los de extensión de compuestos tóxicos y de multidroga MATE (MULTIDRUG AND TONIC COMPUND EXTENSION TRANSPORTERS), los de permeasas zinc-hierro ZIP (ZINC IRON PERMEASES), los asociados con metales pesados HMA (HEA VY METAL ASSOCIATED TRANSPORTERS), las proteínas transportadoras de tolerancia a metales MTP (METAL TOLERANCE PROTEIN TRANSPORTERS), las proteínas transportadoras de resistencia natural a macrofagos Nramp (NATURAL

RESISTANCE TO MACROPHAGE PROTEIN TRANSPORTERS y de la familia YSL (YELLOW STRIKE-LIKE FAMILY OF TRANSPORTERS).

Las plantas tolerantes, además de presentar genes de transportadores de metales, también contienen genes que codifican para enzimas involucradas en la producción de compuestos orgánicos que quelan a los metales, o para proteínas que participan en el movimiento célula-célula del metal confiriéndole una función de tolerancia al metal; por ejemplo, la fitoquelatina sintasa y la fitoquelatina metalotransferrina (Cobbett y Goldsbrough, 2003; Miao *et al.*, 2006). Por lo tanto la lista de genes que potencialmente podrían estar involucrados en la tolerancia a metales es muy extensa. También se ha encontrado que diferentes especies, han desarrollado diversos mecanismos de tolerancia para el mismo metal. Por ejemplo, la tolerancia al Al puede involucrar la exclusión del Al^{3+} rizotóxico del ápice de la raíz en división, una estrategia utilizada por un gran número de especies monocotiledóneas que incluyen el trigo, el sorgo y el maíz (Kordeczka *et al.*, 2004). También pueden acumular Al en la raíz o en el follaje (verdadera tolerancia al aluminio), como lo hacen las especies que hiperacumulan más del 1% de su peso seco de Al en el follaje, como la planta de té (*Camellia sinensis*) (Matsunono *et al.*, 1975), el alfalfón (*Eragrostis amabilis*) (Ma *et al.*, 1997b) y la hortensia (*Hydrangea macrophylla*) (Ma *et al.*, 1997a), o la tolerancia al acumular el metal en la raíz, como el arroz (Xia *et al.*, 2010). Debido a que los mecanismos fisiológicos y moleculares de tolerancia al Zn y al Cd se encuentran entre los mejores caracterizados, los siguientes apartados se centran en estos dos metales. Además, dichos mecanismos parecen ser representativos de los procesos de tolerancia a otros metales.

5. Tolerancia al zinc

5.1. Aspectos fisiológicos

La hiperacumulación del Zn involucra al menos cuatro estrategias diferentes de transporte: i, entrada de grandes cantidades de Zn a través de la membrana plasmática de las células de la raíz, ii, disminuir la cantidad de metal secretándolo en las vacuolas de las células de la raíz, iii, incrementar la cantidad de Zn en el xilema para que sea transportado hacia el follaje, y iv, estimular el flujo del metal a través de la membrana plasmática para su posterior secuestro en la vacuola de las células de las hojas (Lasat *et al.*, 1993). Un análisis de la cinética de captación de Zn en *Nocca caulescens* (*Thlaspi caulescens*) ($K_m = 6 \mu\text{M}$) comparado con una especie no acumuladora relacionada *N. minus* ($K_m = 8 \mu\text{M}$), muestra que el transporte de Zn hacia la raíz depende de la concentración del metal y es similar en las dos especies. Sin embargo, la

captación máxima de Zn ($V_{\max}$ en *N. caerulescens* es seis veces mayor (Lasat *et al.*, 1998), lo que sugiere que el transporte de Zn al interior de la raíz es más eficiente que el de una planta no acumuladora. De hecho, la densidad de transportadores de Zn en la membrana plasmática de células de la raíz es más alta en *N. caerulescens* que en *N. arvensis*. En *N. arvensis*, al igual que otras plantas no acumuladoras como *Arabidopsis thaliana*, la captación de Zn por la raíz se incrementa cuando las plantas son transferidas de un medio con suficiencia de Zn a uno deficiente. Sin embargo, se ha observado que *N. caerulescens* mantiene niveles elevados de influjo de Zn, tanto en condiciones de suficiencia como de deficiencia de Zn. Solo cuando *N. caerulescens* crece en altas concentraciones de Zn (500–1000 μM Zn), el valor de $V_{\max}$ para la captación de Zn disminuye, aunque conserva los valores de influjo de Zn elevados respecto a no acumuladoras (Tahukdar y Aarts, 2008). Se ha sugerido que este influjo de Zn hacia el interior de la raíz es mantenido por el transportador NrZNT1, específico y con alta afinidad para dicho metal (Pence *et al.*, 2000). La expresión de NrZNT1 correlaciona con la respuesta de influjo de Zn a la raíz cuando se cambia el estatus de Zn de la planta y se reduce cuando crecen en medios con elevadas concentraciones de Zn. Una vez que el Zn entra en la raíz, puede ser almacenado en la vacuola de las células de raíz o transportado vía simplística hacia el xilema para ser movilizado hacia el follaje. *N. arvensis* almacena aproximadamente 2.5 veces más Zn en la vacuola de la raíz que en *N. caerulescens* y este Zn vacuolar es liberado lentamente. Estudios en un período de 48 horas, mostraron que en las raíces de *N. arvensis* puede ser secuestrado hasta seis veces más Zn comparado con *N. caerulescens* (Lasat *et al.*, 1998). Estos descubrimientos indican que además de presentar una mayor entrada de Zn hacia la raíz, las especies hiperacumuladoras también mantienen el Zn de la raíz en una poza dinámica que puede movilizarlo rápidamente al xilema. El siguiente paso de la movilización del Zn del suelo al follaje se lleva a cabo a través del parénquima del xilema hacia los haces vasculares del xilema para posteriormente ser translocado hacia el follaje. La savia del xilema de *N. caerulescens* contiene aproximadamente cinco veces más Zn que la de *N. arvensis*, esta enorme cantidad del metal es una marca distintiva de las especies hiperacumuladoras. Se ha sugerido que el transporte antes mencionado es modulado por el transportador HMA1, una ATPasa tipo P (Lasat *et al.*, 1998). En el follaje el almacenaje del Zn parece requerir la coordinación entre diferentes tipos celulares. Las concentraciones más altas de Zn y Cd se encuentran en las células epidérmicas de las hojas, y son cuatro veces mayores que las del mesófilo (Küpper *et al.*,

1999), lo que probablemente se debe, a que de esta manera se evita el contacto entre los metales pesados y las células fotosintéticamente activas, debido a que la maquinaria fotosintética es muy sensible a dichos metales (Küpper *et al.*, 1999). Aunque la mayoría de los metales se acumulan en una mayor concentración en la epidermis, una fracción significativa del total presente en las hojas se almacena en el mesófilo. Se ha calculado que de 65 al 70% del Zn almacenado en las hojas se encuentra en el mesófilo (Ma *et al.*, 2005). Parece ser que la gran tolerancia de ciertas plantas al Zn o al Cd se debe en buena medida a una tolerancia celular a estos metales y no solo a los tejidos o células donde se almacenan. En cultivos celulares en suspensión de *N. caerulescens* comparados con los de *Arabidopsis thaliana*, se ha demostrado que los primeros son más tolerantes al Zn y al Cd (Klein *et al.*, 2008). Sin embargo, las líneas celulares de *N. caerulescens* acumularon menos Zn y Cd que las de *Arabidopsis*, probablemente debido a un mayor eflujo del metal.

5.2. Aspectos moleculares de la tolerancia al zinc

El primer paso de la hiperacumulación de Zn/Cd en la raíz involucra al gen NrZNT1, que codifica para un transportador de alta afinidad para el Zn, el cual es altamente expresado en las células de la epidermis y del córtex de la raíz de *Nocca caerulescens* (Fig. 1; Milner *et al.*, 2012). Debido a la enorme expresión de NrZNT en la estela de la raíz, se ha sugerido que este transportador podría estar involucrado en la translocación de Zn hacia el follaje. Anteriormente, se sugirió que NrZNT1 participaba en la captación de Cd con baja afinidad (Pence *et al.*, 2000). Sin embargo, Milner y col. (2012) demostraron que el influjo del Cd solo ocurría en ausencia de Zn. Así que, bajo condiciones normales, es probable que el transportador NrZNT1 module solamente la captación del Zn y no la del Cd por la raíz. El ortólogo más cercano de NrZNT1 en *Arabidopsis thaliana* es AtZTP1, cuando estas plantas fueron transformadas con el promotor de NrZNT1 fusionado al gen reportero GUS, se observó que la expresión de este último fue considerablemente mayor respecto a la construcción que contiene el promotor del gen endógeno AtZTP1. Estos resultados sugieren, que alguna secuencia específica en el promotor de NrZNT1 provoca una mayor expresión del gen no solo en *N. caerulescens* sino también en *A. thaliana*, planta no hiperacumuladora. Aunque se han mapeado 100 pb de la región promotora, no se ha podido identificar la secuencia responsable de esta expresión incrementada (Milner *et al.*, 2015). Otra proteína transportadora que se ha relacionado con la hiperacumulación de metales en *N. caerulescens* y *A. hallii* es HMA1, la cual

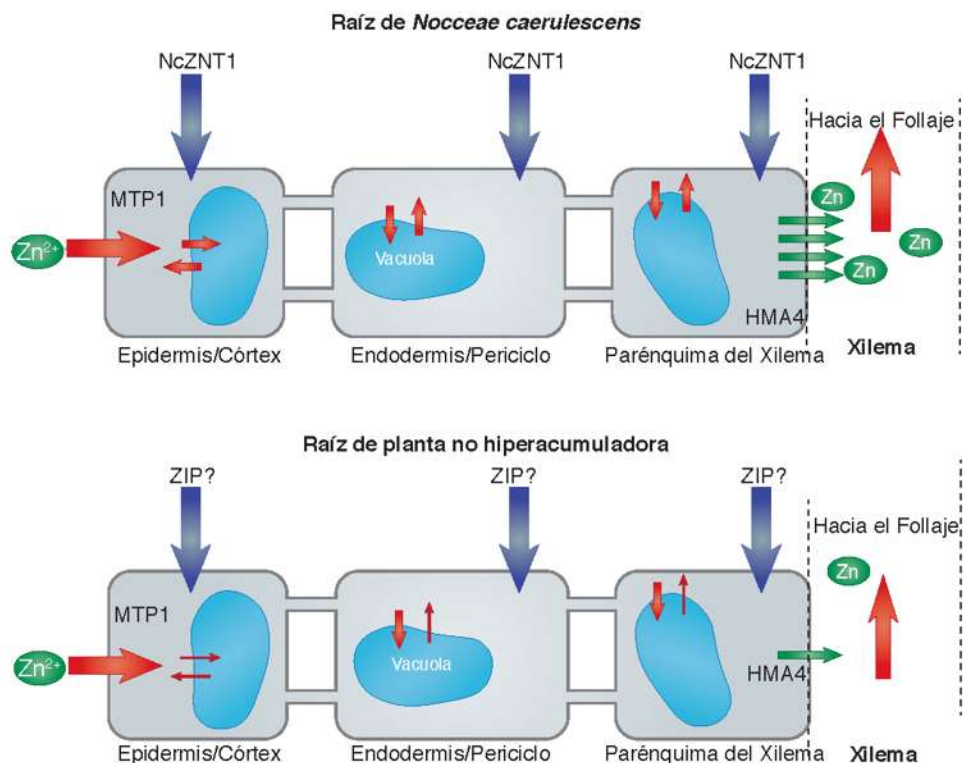


Figura 1. Modelo de transporte de Zn al interior y a través de la raíz de la planta *Noccea caerulescens* hiperacumuladora de Zn/Cd. El esquema muestra las diferencias entre *Noccea caerulescens* y una planta típica no acumuladora. Se ha sugerido que el transportador NcZNT1 facilita la captación de Zn del suelo, pero la localización del homólogo de este gen en *Arabidopsis* indica que también puede estar involucrado en el transporte de este metal a la estela. En el modelo también se indica que existe un menor secuestro de Zn en la raíz de *N. caerulescens*. Así, en la planta hiperacumuladora hay una mayor cantidad de Zn móvil en la raíz que puede ser rápidamente transportado a través de la endodermis y periciclo al parénquima del xilema. En el esquema también se indica cómo se moviliza una gran cantidad de Zn al xilema en *N. caerulescens*, vía la ATPasa de Zn/Cd HMA4 para su subsecuente transporte al follaje (modificado de Milner *et al.*, 2015)

fue originalmente identificada por su capacidad de incrementar la tolerancia al Cd cuando se expresó en levaduras (Bernard *et al.*, 2004; Papoyan y Kochian, 2004). NcHMA4 P₁₈ es un transportador de membrana involucrado en el movimiento de cationes divalentes, principalmente Zn y Cd hacia el xilema y se expresa principalmente en las raíces y en menor medida en el follaje. Este transportador es miembro de la superfamilia de ATPasas tipo P, específicamente de la subfamilia P₁₈. Además, se ha reportado que su expresión se induce tanto por deficiencia como por exceso de Zn, y también en respuesta a altas concentraciones de Cd (Milner *et al.*, 2015). En *N. caerulescens* y *A. halleri* se ha demostrado una correlación entre el nivel de acumulación de Cd y Zn en el follaje y el número de copias de *HMA4* en el genoma (Craciun *et al.*, 2012). En ambas especies,

se han encontrado múltiples copias de *HMA4* en tándem, lo que conduce a una mayor expresión de *HMA4* y a una acumulación de Zn y Cd. El transportador MTP1 (METAL TOLERANCE PROTEIN 1) caracterizado en *A. thaliana* participa en el transporte de Zn a la vacuola, tanto en raíces como en hojas (Debrosses-Fourey *et al.*, 2005). En el genoma de *A. thaliana* se han identificado ocho genes que codifican para transportadores CDF, AtMTP1 es un miembro de la familia CDF (CATION DIFFUSION FACILITATOR) que participa en el transporte de cationes divalentes fuera del citosol, ya sea movilizándolos a la vacuola o fuera de la célula. En *A. thaliana*, las mutantes *atmtp1* crecidas en altos niveles de Zn presentan un incremento en la sensibilidad a dicho metal (Kawachi *et al.*, 2009). Los análisis del transporte por AtMTP1 del Zn al interior de la vacuola,

han demostrado que es dependiente del pH. Así que, probablemente AtMTP1 sea un antiportador que moviliza H^+ al citosol y Zn^{2+} y otros cationes divalentes al interior de la vacuola (Kawachi *et al.*, 2009). Es importante resaltar que no todos los miembros de la familia CDF en las plantas superiores se encuentran en el tonoplasto, MTP1 de *Narcissus germanicus* se localiza en la membrana plasmática y está involucrado en el transporte de Ni fuera de la célula, lo que se asocia con una mayor tolerancia al Ni (Kim *et al.*, 2004). Otro descubrimiento importante relacionado al transportador AtMTP1, es que presenta una región rica en residuos de histidina, cuya pérdida resulta en un incremento del transporte de Zn al quedar los iones unidos a la proteína por un período de tiempo menor, lo que les permite pasar más rápidamente a través del "poro" del transportador (Kawachi *et al.*, 2008). En la planta hiperacumuladora de Zn/Cd, *A. hallii* se han identificado múltiples copias de *AhMTP1* y esto se ha asociado con un incremento a la tolerancia y acumulación de Zn (Shahzad *et al.*, 2010). Los autores también reportaron diferencias en la expresión de los parálogos de *MTP1* en *A. hallii*, lo que sugiere que otros factores podrían regular la expresión registrada en esta especie hiperacumuladora.

6. Tolerancia al cadmio

Los mecanismos de acumulación de Cd en *A. caudatus* y *A. hallii*, pueden ser los mismos que estas plantas utilizan para la acumulación del Zn. Un componente de la hiperacumulación Zn/Cd diferente podría ser el influjo de Cd a la raíz. Hasta el momento, no se han identificado transportadores específicos para Cd y se piensa que este metal es translocado al interior de la planta vía otros transportadores de micronutrientes esenciales. Debido a las similitudes iónicas entre el Zn^{2+} y el Cd^{2+} , se asume que el Cd se absorbe por las raíces de las plantas a través de los transportadores de Zn o de Fe. En varias especies de plantas, el transportador de alta afinidad de Fe, IRT1, puede movilizar niveles fisiológicamente relevantes de Cd a la raíz (Plaza *et al.*, 2007). Aunque, NrZNT1 el transportador de Zn ha sido involucrado en el influjo de Cd a la raíz, parece que solo puede hacerlo en condiciones de ausencia total de Zn, ya que incluso en presencia de cantidades micromolares de este metal, cesa por completo el influjo de Cd (Miller *et al.*, 2015). Estos resultados sugieren que los transportadores de Fe son la principal ruta de entrada del Cd a la planta. Algunos miembros de la familia de transportadores Nramp que movilizan Fe, también transportan niveles fisiológicamente importantes de Cd y podrían estar involucrados en muchos aspectos de la translocación de Cd hacia la planta. Caillière *et al.* (2010) demostraron que el transportador de Mn

de alta afinidad, AtNramp1 es un transportador con un amplio espectro de sustratos y también podría modular el transporte de Cd. Otras proteínas como las Nramp3 y Nramp4 transportan Cd que se localizan en la vacuola se han involucrado en la removilización de los metales pesados de la vacuola hacia el citosol (Lanquar *et al.*, 2005).

7. Tolerancia al aluminio

7.1. Aspectos fisiológicos

Gran cantidad de especies de vegetales utilizan una estrategia de tolerancia al Al basada en la eliminación (exclusión) de los iones Al^{3+} tóxicos del ápice de la raíz. Este mecanismo consiste en la quelación del Al^{3+} por ácidos orgánicos secretados por las células del ápice de la raíz (el sitio de la toxicidad por Al), a través de transportadores especializados de la membrana plasmática (Delhaize *et al.*, 2007). Este mecanismo de eliminación del Al funciona en varios cereales, por ejemplo cebada, trigo, maíz y sorgo, así como en una gran cantidad de especies dicotiledóneas como la soja, habichuelas, arroz y *Amblyopis thaliana* (Miller *et al.*, 2015). Debido a que Al es un metal muy reactivo y puede interactuar en varios sitios de la pared celular y el citoplasma del ápice de la raíz, los mecanismos potenciales de toxicidad por Al son numerosos e incluyen la inhibición de la elongación y división celular mediante su interacción con proteínas y carbohidratos de la pared celular; con el citoesqueleto; con la señalización por Ca, con las proteínas G y con los ácidos nucleicos (Kochian, 1995). La inhibición inducida por el Al sobre el crecimiento de la raíz es rápida y puede ser detectada minutos después de la exposición al metal, lo que indica que el síndrome inicial de toxicidad se debe primero a un efecto sobre la elongación celular. También se ha demostrado que la interacción del Al con el ápice de la raíz inhibe el crecimiento de la raíz, lo que deja claro que los mecanismos de tolerancia al Al residen en el crecimiento apical de la raíz (Ryan *et al.*, 2009). Las bases fisiológicas generales de los mecanismos de tolerancia al Al se basan en la exclusión del metal del ápice de la raíz e incluyen tres eventos: 1) estimulación de la exudación de ácidos orgánicos como el malato (trigo), citrato (maíz, sorgo, soja, habichuelas y arroz) y oxalato (alfalfa), mientras que *A. thaliana* exuda tanto citrato como malato, los cuales quelan al metal; 2) la exudación de ácidos orgánicos activada por Al se localiza en el ápice de la raíz solo cuando dicho tejido ha sido dañado por el metal, lo cual minimiza la exudación innecesaria de citrato o malato por la raíz; 3) el principal proceso que subyace a la tolerancia al Al, consiste en la activación del transporte de ácidos orgánicos más que en la síntesis de los ácidos (Delhaize *et al.*, 2007). Otro mecanismo de

tolerancia del Al, involucra procesos de destoxificación e inhibición de la absorción del metal por la planta. La hortensia (*Hydrangea sp.*), es una planta ornamental cuyos sépalos florales cambian de color de rosa a azul cuando el suelo está acidificado (Fig. 2) y este cambio es el resultado de la acumulación de Al y la formación de complejos entre este metal y los ácidos del ácido-3-glucósido y 3-cafeoilquinico que son de color azul. La hortensia es una planta hiperacumuladora de Al que puede exceder las 3,000 ppm de dicho metal (Ma *et al.*, 1997a). Mientras que el Al forma complejos con los ácidos fenólicos en los sépalos, en las hojas se acumula principalmente como un complejo Al-citrato en proporción 1:1; en un pH de 7.0 como el del citosol, dicho complejo es bastante estable y no es fitotóxico. La planta de alforfón cuando crece en suelos ácidos también hiperacumula Al en las hojas, encontrándose hasta 15,000 ppm (Ma e Hiradate, 2000). Gran cantidad del Al acumulado se encuentra formando complejos Al-oxalacetato en proporción 3:1 (Ma *et al.*, 1998). Estudios posteriores mostraron que este último complejo se acumula principalmente en la vacuola de las células de las hojas (Shen *et al.*, 2002).

7.2. Aspectos moleculares de la tolerancia al aluminio en arroz

El arroz es el cereal más tolerante al Al y este efecto no correlaciona ni con la exclusión del metal del ápice de la raíz ni con la liberación de ácidos orgánicos quelantes. A diferencia de otros cereales tolerantes al Al como la cebada, trigo, sorgo, maíz y centeno, el arroz utiliza otro mecanismo. La genética de la tolerancia del arroz, es más compleja que la

tolerancia al Al en otros cereales (Famoso *et al.*, 2011). *OxNr1* codifica un transportador de metales tipo Nrap único que específicamente modula la captación de Al a través de la membrana plasmática de la células del ápice de la raíz (Xia *et al.*, 2010). Este transportador parece funcionar como un complejo con la proteína OsALS1, el cual modula el transporte del Al absorbido del citosol a la vacuola, donde es almacenado y destoxificado (Huang *et al.*, 2009). Este mecanismo novedoso de tolerancia al Al, parece involucrar a la pared celular de la raíz, ya que se ha reportado que el complejo Nrap/OsALS1, remueve al Al de la pared celular y lo almacena en la vacuola de las células de la raíz. *OsSTAR1* fue el primer gen de tolerancia al Al exclusivo del arroz que se identificó y se determinó que codificaba para una proteína con dominio de unión a nucleótidos, característico de los transportadores tipo ABC. *OsSTAR1* interacciona con una segunda proteína de arroz codificada por *OsSTAR2*, y en conjunto estas dos proteínas forman un complejo transportador tipo ABC (Huang *et al.*, 2009). Al parecer, el complejo OSSTAR1/OSSTAR2 modula el transporte de la UDP-glucosa al interior de las vesículas endomembranas, las cuales al fusionarse con la membrana plasmática, liberan la UDP-glucosa al apoplasto, donde modifican la composición de carbohidratos de la pared celular, lo que a su vez, altera la unión del Al a la pared. Otro gen de tolerancia al Al, identificado en arroz fue *ART1*, que codifica para un factor transcripcional tipo dedos de Zn, el cual regula la expresión de genes inducibles por Al (Yamaji *et al.*, 2009). La mutante *Osart1*, presentó una disminución significativa en la



Figura 2. Efecto del pH sobre el color de las flores. Hortensias azules crecidas en suelos ácidos (pH 5.0) con iones Al^{3+} solubilizados y hortensias rosas crecidas en suelos a pH 6.0 con Al en forma de aluminosilicatos (Ma *et al.*, 1997a)

tolerancia al Al. Cabe mencionar que el gen *ART1* se expresa constitutivamente en el ápice de la raíz. En un análisis tipo transcriptoma, entre las plantas de arroz silvestres y las riantes *Osari* se identificaron 31 genes, cuya expresión fue regulada por ART1. Esta lista incluyó a *STAR1* y *STAR2* (homólogos de los genes de arroz *OsSTAR*), al gen del transportador Nr1 y a genes homólogos implicados en la tolerancia al Al en otros cereales.

Conclusiones

Las plantas han desarrollado una multitud de mecanismos adaptativos a través de la expresión de una gran cantidad de genes para hacer frente a los diferentes metales tóxicos que se encuentran en los suelos de todo el mundo. Estos genes, codifican para una gran variedad de diferentes transportadores de metales y ácidos orgánicos, así como para enzimas implicadas en la síntesis de ligandos que detoxifican a los metales. En general, las plantas han desarrollado dos estrategias principales para enfrentar el estrés por metales tóxicos: (1) la exclusión de metales de la planta por el follaje y (2) mecanismos de tolerancia que les permiten acumular o incluso hiperacumular los metales. Dentro de estas dos estrategias generales de tolerancia a metales, hay una gran variedad de mecanismos que las diferentes especies vegetales han desarrollado para adaptarse a diversos nichos ambientales. Como se discutió en el capítulo, la tolerancia al Zn, Cd y Al parecen depender de una función integrada de los transportadores de metales, así como de la síntesis y el transporte de ligandos orgánicos que detoxifican al metal. Todavía queda mucho por descubrir acerca de los mecanismos de tolerancia a los metales, en particular en lo que se refiere a cómo se regulan y coordinan estos procesos.

Referencias

- Audet P, Charest C (2003) Allocation plasticity and plant-metal partitioning: meta-analytical perspective in phytoremediation. *Environ Pollut* 156: 290-296.
- Baker AJM, Brooks RR (1989) Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biochemistry* 1: 31-126.
- Bernard G, Rossens N, Czernic P, Lebrun M, Verbruggen N (2001) A novel GTP-ATPase from cadmium hyperaccumulator *Thlaspi carnifolius*. *FEBS Lett* 569: 110-113.
- Broadley MR, Willey NJ, Wilkins JC, Baker AJM, Mead A, White PJ (2001) Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. *New Phytol* 152: 943.
- Cailliatte R, Schikora A, Briat JF, Mari S, Corie C (2010) High-affinity manganese uptake by the metal transporter NRAMP1 is essential for Arabidopsis growth in low manganese conditions. *Plant Cell* 22: 901-917.
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Ann Rev Plant Biol* 53: 159-182.
- Craciun AR, Meyer CL, Chen J, Roossens N, Groodt RD, Hilson P, Verbruggen N (2012) A major quantitative trait locus for cadmium tolerance in *Arabidopsis thaliana* colocalizes with HMA4, a gene encoding a heavy metal ATPase. *Plant Physiol* 111: 1052-1065.
- de Macedo RA, Haridasan M (1985) Seasonal variations in the foliar concentrations of nutrients in some aluminum accumulating and non accumulating species of the cerrado region of central Brazil. *Plant Sci* 36: 133-136.
- Debrosses-Fonrouge AG, Voight K, Schroder A, Arrivault S, Thomine S, Kramer U (2005) *Arabidopsis thaliana* MTP1 is a Zn transporter in the vacuolar membrane which mediates Zn detoxification and drives leaf Zn accumulation. *FEBS Lett* 579: 1163-1171.
- Delhaize E, Gruber BD, Ryan PR (2007) The roles of organic anion permeases in aluminum resistance and mineral nutrition. *FEBS Lett* 581: 2255-2262.
- Dubbin WE, Ander LE (2003) Influence of microbial hydroxamate siderophores on Pb(II) desorption from α -F-OOH. *Appl Geochem* 18: 1751-1756.
- Duffus JM (2002) "Heavy metal": a meaningless term? *Pure Appl Chem* 71: 393-397.
- Escarre J, Lefebvre C, Gruber W, LeBlanc M, Lepart J, Riviere Y (2000) Zinc and cadmium hyperaccumulation by *Thlaspi carnifolius* from metaliferous and nonmetaliferous sites in the Mediterranean area: implications from phytoremediation. *New Phytol* 115: 129-137.
- Famoso AN, Zhao K, Clark RT, Tung CW, Wright MH, Bustamante C, Kochian LV, McCouch SR (2011) Genetic architecture of aluminum tolerance in rice (*Oryza sativa*) determined through genome wide association analysis and QTL mapping. *PLoS Genet* 7:e1002231.
- Hanikenne M, Talke IN, Haydon MJ, Lanz C, Nolte A, Motte P, Kroymann J, Weigel D, Krämer U (2008) Evolution of metal hyperaccumulation required cis-regulatory changes and duplication of HMA1. *Nature* 453: 391-395.
- Holleman AF, Wiberg E, Wiberg N (2001) Holleman-Wiberg's Inorganic Chemistry. Academic Press, London, 1921.
- Huang CF, Yamaji N, Mitani N, Yano M, Nagamura Y, Ma JF (2009) A bacterial-type ABC transporter is involved in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21:655-667.
- Hutchinson GE (1913) Aluminum in soils, plants and animals. *Soil Sci* 6:29-40.
- Jansen S, Watanabe T, Dessein S, Robbrecht E, Sinets E (2004) The evolution of aluminum accumulation in angiosperms. Hemsley AR, Poole T, eds. The evolution of plant physiology. Ent. Linnean Society of London No. 21. Elsevier/Academic Press, India, 192: 167-179.
- Kavachi M, Kobae Y, Mimura T, Maeshima M (2008) Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ transporter of *Arabidopsis thaliana*, stimulates the transport activity. *J Biol Chem* 283:3371

- Kim D, Gustin JL, Lahner B, Persans MW, Baek D, Yun DJ, Salt DE (2001) The plant CDF family member TgMPT1 from the Ni/Zn hyperaccumulator *Thlaspi gossypense* acts to enhance efflux of Zn at the plasma membrane when expressed in *Saccharomyes cerevisiae*. *Plant J* 39: 233–241.
- Klein MA, Sekimoto H, Milner MJ, Kochian LV (2008) Investigation on heavy metal hyperaccumulation at the cellular level: development and characterization of *Thlaspi caerulescens* suspension cell line. *Plant Physiol* 147: 2006–2016.
- Kochian LV (1999) Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 46: 237–260.
- Kochian LV, Hoekenga OA, Piñeiros MA (2001) How do crop plants tolerate acid soils? Mechanisms of aluminum tolerance and phosphorus efficiency. *Annu Rev Plant Biol* 52: 139–193.
- Küpper H, Parameswaran A, Leitenmaier B, Trtleik M, Setlik I (2007) Cadmium induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 173: 657–674.
- Küpper H, Zhao FJ, McGrath SP (1999) Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol* 119: 305–312.
- Lanquar V, Lelièvre E, Bolte S, Hamès C, Alcon C, Neumann D, Vansuyt G, Curie C, Schödel A, Krämer U, Barbier-Brygno H, Thomine S (2005) Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP1 is essential for seed germination in low iron. *EMBO J* 24: 1011–1021.
- Lasat MM, Baker A, Kochian LV (1998) Altered Zn compartmentation in the root symplast and stimulated Zn absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi*. *Plant Physiol* 113: 1715–1722.
- Lombi E, Zhao FJ, Dunham SJ, McGrath SP (2000) Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi gossypense*. *New Phytol* 143: 11–20.
- Ma JF, Hiradate S (2000) Form of aluminum for uptake and translocation in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Planta* 211: 356–360.
- Ma JF, Hiradate S, Matsumoto H (1994) High aluminum resistance in buckwheat: II. Oxalic acid detoxifies hydrangea: identification of Al form in the leaves. *Plant Physiol* 113: 1033–1039.
- Ma JF, Hiradate S, Nomoto K, Iwashita T, Matsumoto H (1997) Internal detoxification mechanism of Al in hydrangea: identification of Al form in the leaves. *Plant Physiol* 113: 1033–1039.
- Ma JF, Ryan PR, Delhaize E (1991) Aluminum tolerance in plants and the complexing role of organic acids. *Trends Plant Sci* 6: 273–278.
- Ma JF, Ueno D, Zhao FJ, McGrath SP (2003) Subcellular localization of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 220: 731–736.
- Ma JF, Zheng SJ, Matsumoto H, Hiradate S (1997) Detoxifying aluminum with buckwheat. *Nature* 390: 569–570.
- Macnair MR (1993) The genetics of metal tolerance in vascular plants. *New Phytol* 124: 511–559.
- Mari S, Gendre D, Pianelli K, Ouerdane L, Lobinski R, Briat JF, Lebrun M, Czernic P (2006) Root-to-shoot long-distance circulation of nicotianamine and nicotianamine-nickel chelates in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* 57: 1111–1122.
- Masunaga T, Kubota D, Hotta M, Wakatsuki T (1998) Mineral composition of leaves and bark in aluminum accumulators in a tropical rain forest in Indonesia. *Soil Sci Plant Nutr* 44: 347–358.
- Marschner H (2001) Marschner's mineral nutrition of higher plants. Academic press, Third Ed, USA, 672.
- Matsumoto H, Hirasawa E, Morimura S, Takahashi E (1976) Localization of aluminum in tea leaves. *Plant Cell Physiol* 17: 627–631.
- Mazorra MA, San Jose JJ, Montes R, Miragaya JG, Haridasan M (1987) Aluminium concentration in the biomass of native species of the Morichas swamp palm community at the Orinoco Llanos, Venezuela. *Plant Sci* 102: 275–277.
- Milner MJ, Craft E, Yamaji N, Koyama E, Ma JF, Kochian LV (2012) Characterization of the high affinity Zn transporter from *Nocca caerulescens*, NrZNT1, and dissection of its promoter for its role in Zn uptake and hyperaccumulation. *New Phytol* 195: 113–123.
- Milner MJ, Piñeiros M, Kochian LV (2015) Molecular and physiological mechanisms of plant tolerance to toxic metals. Jenkins MA, Hasegawa PM (eds). Plant abiotic stress. Wiley Blackwell, Second Ed, Malasia, 318–379–201.
- Müller U (2007) Inorganic structural chemistry. John Wiley & Sons, Second Ed, Chichester, 264.
- Mullette KJ (1975) Stimulation of growth in *Eucalyptus* due to aluminum. *Plant Soil* 32: 193–199.
- Nieboer E, Richardson DHS (1980) The replacement of the nondescript term “heavy metal” by a biological and chemically significant classification of metal ions. *Environ Pollut B Chem Phys* 1: 3–26.
- Papayan A, Kochian LV (2001) Identification of *Thlaspi caerulescens* genes that may be involved in heavy metal hyperaccumulation and tolerance. Characterization of a novel heavy metal transporting ATPase. *Plant Physiol* 136: 3301–3313.
- Pence NS, Larsen PB, Ebbs SD, Letham DL, Lasat MM, Garvin DF, Eide D, Kochian LV (2000) The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proc Natl Acad Sci* 97: 1956–1960.
- Plaza S, Teavall KL, Zhao FJ, Buchner P, McGrath SP, Hawkesford MJ (2007) Expression and functional analysis of metal transporter genes in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *J Exp Bot* 58: 1717–1728.
- Purakayastha TJ, Chhonkar PK (2010) Phytoremediation of heavy metal contaminated soils. Sherma HJ, Varma A (eds). Soil Heavy Metals. Env Soil biology, vol. 196 ed. Varma A. Springer Verlag Berlin Heidelberg, India, 192–309–129.
- Reeves RD, Baker AJM (2000) Metal accumulating

- plants. Kassim I, Easley BD (eds): *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, New York, 301: 193-229.
- Ryan PR, DiTomaso JM, Gupta S, Horst WJ, Delhaize E** (2009) A second mechanism for aluminum resistance in wheat relies on the constitutive efflux of citrate from roots. *Plant Physiol* 149: 330-339.
- Shahzad Z, Gosti F, Frérot H, Lacombe E, Roosens N, Saumitou-Laprade P, Berthomieu P** (2010) The five AlMTP1 zinc transporters undergo different evolutionary fates towards adaptive evolution to zinc tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 6:e1000911.
- Shaw BP, Sahu SK, Mishra RK** (2004) Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. Prasad MNV (ed): *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Second Ed. India, 162: 81-126.
- Shen R, Ma JF, Kyo M, Iwashita T** (2002) Compartmentation of aluminum in leaves of an Al accumulator, *Fagopyrum esculentum* Moench. *Planta* 215: 391-394.
- Talukdar S, Aarts M** (2003) *Arabidopsis thaliana* and *Thlaspi caerulescens* respond comparably to low zinc supply. *Plant Soil* 256: 89-94.
- Uexküll HR, Mutert E** (1996) Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant Soil* 171: 1-15.
- Watanabe T, Osaki M** (2001) Influence of aluminum and phosphorus on growth and xylem sap composition in *Melastoma malabathricum* L. *Plant Soil* 232: 63-70.
- Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma JF** (2010) Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Acad Sci* 107:10383-10385.
- Yamaji N, Huang CF, Nagao S, Yano M, Sato Y, Nagamura Y, Ma JF** (2009) A zinc finger transcription factor ART1 regulates multiple genes implicated in aluminum tolerance in rice. *Plant Cell* 21: 3339-3349.