

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



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

**“Estudio de la señalización de aminoácidos en la regulación del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*”**

**TESIS**

Que presenta

**M. C. Gustavo Ravelo Ortega**

Para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Director de tesis

**D. C. José López Bucio**

Codirector de tesis

**D. C. Ángel Arturo Guevara García**

**Marzo de 2021, Morelia, Mich.**

**Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D. C. José López Bucio y la codirección del D. C. Ángel Arturo Guevara-García (profesor-investigador del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México). Para su desarrollo se contó con apoyos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (becario 333051; recurso A1-S-34768) y del proyecto DGAPA PAPIIT UNAM (IN209420).**

**Esta tesis la dedico a mis padres Josefina y Daniel, pues sus consejos, su trabajo y su esfuerzo, han sido el cimiento principal de mi formación académica.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios**, por haberme dado la oportunidad de vivir esta experiencia profesional y por haber puesto en mi camino a personas de las que aprendí mucho.

**A mi esposa Berenice**, por la compañía, el apoyo y la paciencia que me has dedicado estos años, pues se convirtieron en una motivación que me ayudó a prevalecer.

**A mis padres Josefina y Daniel**, por el apoyo inmensurable que siempre me han brindado.

**A mis hermanos Daniel, Elizabeth y Liliana, y a mi familia en general**, que día a día han estado animándome a seguir adelante.

**A mi asesor**, por recibirme en su grupo de trabajo y por compartir de su conocimiento durante estos años.

**A mi co-asesor**, por haber guiado y apoyado el desarrollo de esta investigación.

**A mis sinodales**, por haber mejorado este trabajo con sus observaciones y sugerencias.

**A mis compañeros de laboratorio y amigos**, por su apoyo y por todos los momentos agradables que compartimos.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
1 INTRODUCCIÓN .....	10
2 ANTECEDENTES .....	11
2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	11
2.1.1 Sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	13
2.2 Fitohormonas .....	15
2.2.1 Auxinas: síntesis, transporte y señalización .....	16
2.2.2 Auxinas y transportadores PIN en el desarrollo radicular .....	19
2.2.3 Regulación de la división y el crecimiento celular a través de la señalización de auxinas .....	21
2.3 Aminoácidos .....	23
2.3.1 Síntesis de aminoácidos .....	26
2.3.2 Aminoácidos en la asimilación de nitrógeno .....	29
2.3.3 Transportadores de aminoácidos .....	30
2.3.4 Efecto de aminoácidos exógenos sobre el crecimiento radicular .....	31
2.4 Proteínas MAPKs .....	32
2.4.1 MAPKs en el desarrollo radicular .....	33
2.4.2 MAPKs en las respuestas de la raíz a L-Glu .....	35
3 JUSTIFICACIÓN .....	36
4 HIPÓTESIS .....	37
5 OBJETIVOS .....	37
5.1 Objetivo general .....	37
5.2 Objetivos específicos .....	37

6	RESULTADOS.....	38
6.1	The growth of <i>Arabidopsis</i> primary root is repressed by several and diverse amino acids through auxin-dependent and independent mechanisms and MPK6 kinase activity.....	38
7	DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	50
8	PERSPECTIVAS.....	53
9	REFERENCIAS.....	54
10	ANEXOS .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Arabidopsis</i> .....	13
Figura 2. Anatomía y morfología de la raíz de <i>A. thaliana</i> .....	15
Figura 3. Rutas propuestas para la biosíntesis de AIA.....	17
Figura 4. Modelo de la vía de la señalización de auxinas .....	19
Figura 5. Flujo de auxinas mediado por los transportadores PIN para el establecimiento y el desarrollo de la raíz .....	21
Figura 6. Influencia de las auxinas en los procesos de la división y el crecimiento celular.....	22
Figura 7. Estructura y clasificación de los 20 L-aminoácidos proteicos.....	26
Figura 8. Rutas de la biosíntesis de los aminoácidos proteicos. ....	28
Figura 9. Efecto del L-glutamato sobre el sistema radicular de <i>A. thaliana</i> .....	32
Figura 10. Vías de señalización de MAPKs.....	34
Figura 11. Identificación de proteínas MAPKs involucradas en la señalización del L-Glu. ....	36

## RESUMEN

Los aminoácidos en las plantas cumplen funciones estructurales, nutricionales y de señalización. Además, actúan como cofactores, osmolitos y precursores de fitohormonas. En este trabajo, realizamos un análisis detallado de las respuestas del crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* a los 20 L-aminoácidos e investigamos los posibles mecanismos moleculares que subyacen en la actividad de estas biomoléculas. 15 de los aminoácidos evaluados disminuyeron el crecimiento de la raíz primaria, de los cuales, L-glutamato (L-Glu), L-Leucina (L-Leu), L-Lisina (L-Lys) y L-triptófano (L-Trp) fueron los más bioactivos. A través de la aplicación localizada de los cuatro aminoácidos sobre el sistema radicular, se determinó que el ápice de la raíz es responsable de percibirlos. Estas biomoléculas disminuyeron la de división y el crecimiento celular, y alteraron de manera específica la expresión de genes de respuesta a auxinas y el nivel de transportadores PIN. Sorprendentemente, la mutante afectada en el gen de la MAP cinasa, MPK6, fue resistente al efecto de L-Glu, L-Leu, L-Lys y L-Trp. Con los resultados obtenidos, concluimos que independientemente de sus propiedades físico-químicas y de su influencia en la vía de las auxinas, los cuatro aminoácidos convergen en MPK6 para reducir el crecimiento de la raíz primaria.

**Palabras clave:** Planta, cinasa, auxina, desarrollo, biomolécula.

## **ABSTRACT**

Amino acids perform both structural and signaling roles for plants. Besides, these biomolecules act as osmolytes, cofactors, and phytohormone precursors. In this study, we performed detailed response analyses of the primary root growth of *Arabidopsis thaliana* to all 20-L amino acids and investigated the possible molecular mechanisms underlying the activity of these biomolecules. 15 amino acids were found to inhibit the primary root growth, being L-leucine (L-Leu), L-lysine (L-Lys), L-tryptophan (L-Trp), and L-glutamate (L-Glu) the most active. Applying the amino acids locally on the root system, we determined that the area that senses them is the root apex. These molecules decreased cell division and elongation, and specifically alter the auxin-responsive gene expression and the level of PIN transporters. Surprisingly, the affected mutant in the MAP kinase gene, MPK6, was resistant to the effect of L-Glu, L-Leu, L-Lys, and L-Trp. With the results obtained, we conclude that regardless of their physical-chemical properties and their influence on the auxin pathway, the four amino acids converge in MPK6 to reduce the primary root growth.

## 1 INTRODUCCIÓN

Las células vegetales poseen diversas proteínas receptoras con las que perciben diferentes estímulos ambientales. Es por esto que, durante la exploración del suelo, la raíz puede ajustar su crecimiento y desarrollo en respuesta a varios factores abióticos y bióticos (Jiménez-Vázquez *et al.*, 2020; Novak *et al.*, 2015). También, es capaz de interactuar y formar asociaciones con especies microbianas que mejoran el crecimiento y las defensas de la planta (Alori *et al.*, 2017; Köhl *et al.*, 2019). Su plasticidad y dinamismo depende de los procesos de división, elongación y diferenciación celular, los cuales son regulados fuertemente por moléculas señalizadoras llamadas fitohormonas.

Uno de los grupos de fitohormonas mayormente estudiado es el de las auxinas, las cuales participan en la regulación de casi todas las etapas del ciclo biológico. Principalmente se sintetizan en la raíz y en las hojas jóvenes, desde donde son movilizadas hacia los diferentes tejidos (Zhao, 2018). En la raíz, estas moléculas se encargan de mantener el crecimiento indeterminado y de promover programas de organogénesis como el desarrollo de raíces laterales (Lavenus *et al.*, 2013). A través de receptores nucleares, este tipo de fitohormonas activan una serie de proteínas que inducen la expresión de genes relacionados con la actividad mitótica y el crecimiento celular (Sablowski y Carnier, 2014; Schepetilnikov *et al.*, 2017).

La arquitectura del sistema radicular puede ser modificada por biomoléculas presentes en la rizosfera, que alteran la vía de señalización de auxinas. Tal es el caso de los aminoácidos que se incorporan al suelo como consecuencia de la degradación de materia orgánica, representando una fuente orgánica de nitrógeno (Miller *et al.*, 2008). Diversos estudios han demostrado que la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* puede percibir al L-glutamato como una molécula señal que modifica la arquitectura radicular, afectando el transporte de auxinas (Walch-Liu *et al.*, 2006). La señalización del L-Glu en la raíz involucra la función de las proteínas cinasas MEKK1 y MPK6, ambas pertenecientes a la familia de las denominadas "Mitogen-Activated Protein Kinases" (MAPKs; Forde *et al.*, 2013; López-Bucio *et al.*, 2018). Asimismo, se ha reportado que diferentes aminoácidos convergen en la

activación de los mismos componentes moleculares para regular el crecimiento celular y la despolarización de la membrana (Kim y Guan, 2011; Stephens *et al.*, 2008).

Este trabajo se enfocó en dilucidar las respuestas de la raíz primaria de *Arabidopsis* a los tratamientos con cada uno de los 20 L-aminoácidos proteicos en un intervalo amplio de concentraciones. Simultáneamente, se analizó si la señalización de algún (os) aminoácido (s) involucra a la vía auxínica con la actividad de la cinasa de MPK6 o si sus efectos son independientes.

## 2 ANTECEDENTES

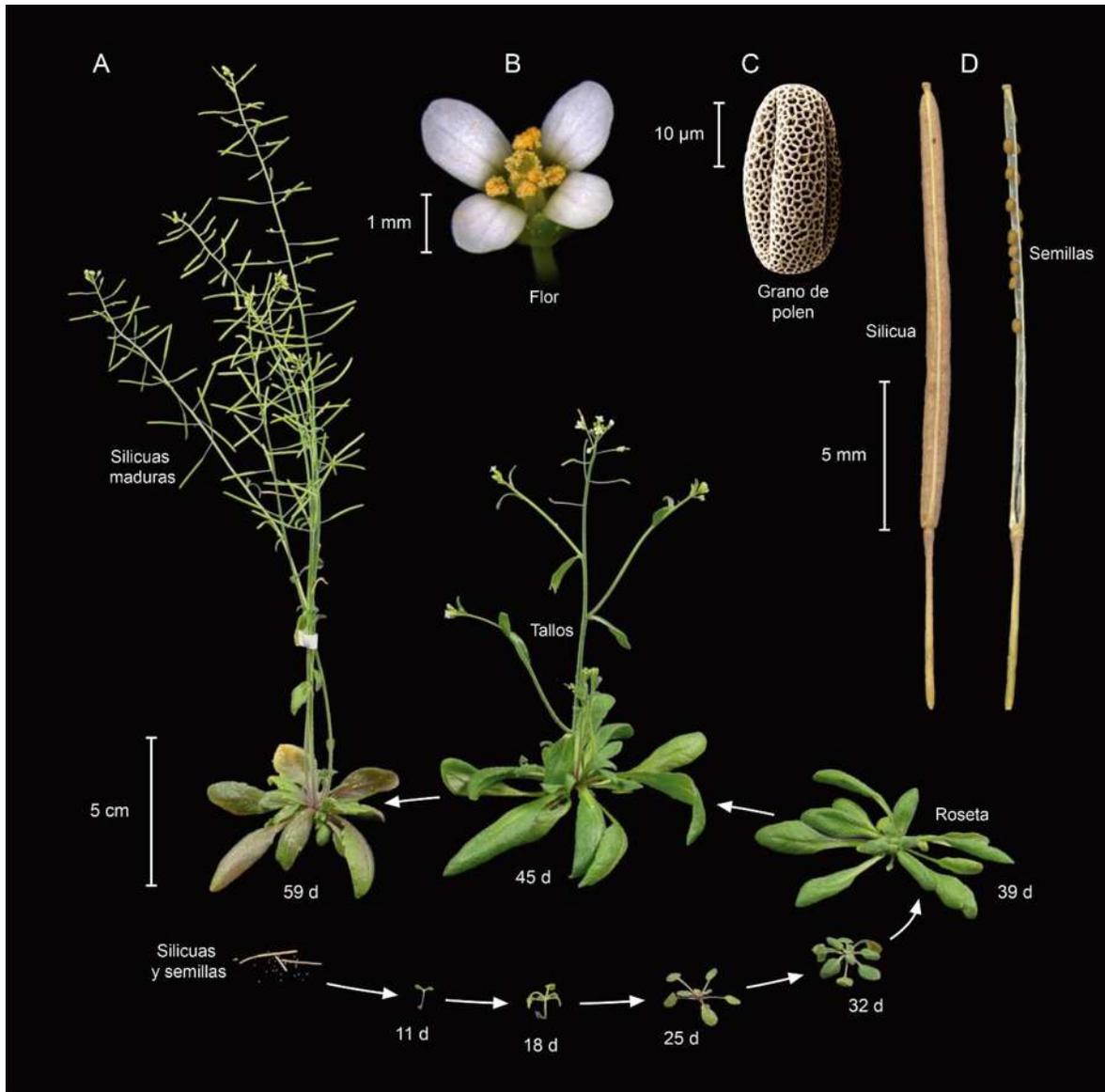
### 2.1 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* revolucionó las investigaciones en la biología molecular y el desarrollo de plantas. Hace más de 100 años que comenzaron a utilizarla en este campo del conocimiento y, hasta la fecha, suman más de 67,000 trabajos en los que se utilizó como planta modelo (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las publicaciones derivadas del estudio de *Arabidopsis*, se toman comúnmente como punto de referencia en las investigaciones con otros organismos vegetales (Provar *et al.*, 2016). Es una planta dicotiledónea de la familia *Brassicaceae*, descubierta en el siglo XVI por Johannes Thal en Alemania. Aunque es endémica de Europa, Asia Central y el Noroeste de África, hoy en día su distribución geográfica abarca regiones de Norte América y Australia (Toloti-Carneiro *et al.*, 2015). El ciclo de vida de *A. thaliana* desde la germinación hasta la senescencia tarda alrededor de 8 semanas (**Fig. 1**). Durante su etapa vegetativa, desarrolla una roseta basal de donde crecen tallos florales (escapos) que alcanzan una altura promedio de 30 cm. Las flores son hermafroditas y de éstas emergen frutos alargados, denominados silicuas, que contienen entre 30 a 50 semillas (Krämer, 2015).

Friedrich Laibach fue uno de los pioneros en emplear este organismo vegetal en estudios experimentales. En 1907, durante sus estudios de doctorado en

Alemania, analizó el número de cromosomas de varias plantas incluyendo a *Arabidopsis*. Posteriormente, en 1945, siendo director del Instituto de Botánica de la Universidad de Frankfurt, obtuvo la primera colección de mutantes mediante la aplicación de rayos X, resultados que fueron publicados en la tesis de doctorado de su estudiante Erna Reinholz. Estos avances fueron la base para proponer a esta pequeña planta como modelo de estudio, ya que con ella, Laibach demostró la facilidad con la que se pueden realizar análisis genéticos detallados (Meyerowitz, 2001). Algunas de las particularidades que fomentaron el uso de *Arabidopsis* como organismo modelo, son las siguientes: 1) facilidad para su cultivo en condiciones de laboratorio, 2) disponibilidad de protocolos de mutagénesis y métodos de selección de mutantes, 3) genoma pequeño, con 5 cromosomas entre los que se incluyen alrededor de 25, 000 genes, la mayoría de copia única, y 4) la posibilidad de transformarla genéticamente y generar plantas transgénicas estables (Woodward y Bartel, 2018).

Los avances en la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* y en las técnicas de mutación de genes específicos mediante inserción de fragmentos de ADN, permitieron la caracterización de genes por “genética reversa” (Toloti-Carneiro *et al.*, 2015). Actualmente, bancos de germoplasma como *Arabidopsis Biological Research Center* (<https://abrc.osu.edu/>), *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (<http://nasc.nott.ac.uk>) y *BioResource Research Center* (<https://epd.brc.riken.jp/en/>), se encargan de recolectar, mantener y propagar las variantes genéticas de esta planta de diferentes procedencias. Dichas colecciones se pueden consultar y solicitar a través de los sitios de internet mencionados o de la página de *The Arabidopsis Information Resource* (<https://www.arabidopsis.org/>), donde también cuenta con varias herramientas bioinformáticas y bases de datos enfocadas a *Arabidopsis*.

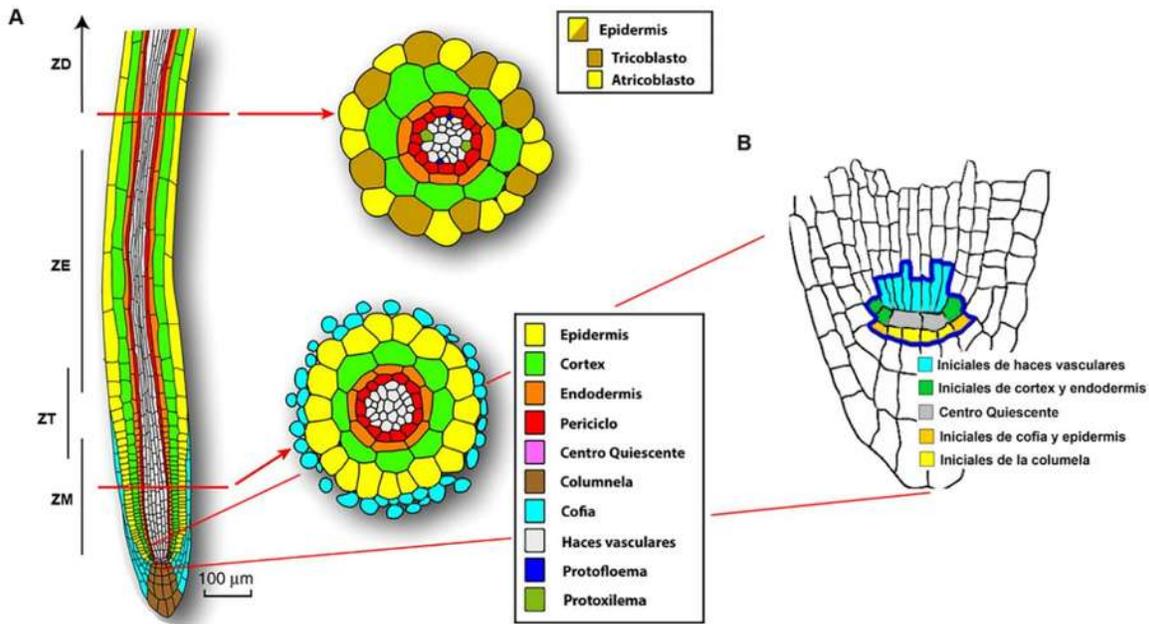


**Figura 1. Ciclo de vida de *Arabidopsis*.** (A) Diferentes etapas del ciclo de vida de *A. thaliana* (ecotipo Columbia-0). Fotografías amplificadas de (B) flor, (C) grano de polen (tomada con microscopio electrónico) y (D) silicuas maduras. Tomado de Krämer (2015).

### 2.1.1 Sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*

La productividad de una planta, cultivada o silvestre, depende de un desarrollo óptimo del sistema radicular, ya que este órgano es el responsable de absorber el agua y los nutrientes del suelo. A diferencia de otros modelos vegetales, la arquitectura y la estructura de la raíz de *Arabidopsis* es muy sencilla. Presenta una raíz primaria de origen embrionario, que mantiene un crecimiento indeterminado a

lo largo del ciclo de vida. De esta raíz, que es la de mayor longitud, se desarrollan raíces laterales, así como adventicias a partir del tallo, ambas de origen post-embrionario. El análisis microscópico de las células de la raíz es relativamente fácil debido a dos características: 1) carecen de pigmentos, y 2) cada tejido consta de una sola capa de células. De manera transversal, en la parte más interna de la raíz se localizan las células del periciclo y de los haces vasculares, ambas rodeadas por la endodermis, el córtex y la epidermis, que es la capa más externa. Además, una pequeña parte del ápice de la raíz está cubierta por la columela y la cofia, que la protegen de la fricción ocasionada por el contacto con el suelo. Longitudinalmente, las raíces poseen cuatro zonas celulares bien delimitadas, con funciones específicas y estrechamente relacionadas con el desarrollo radicular (**Fig. 2A**). La Zona Meristemática (ZM) es la más próxima a la columela y alberga células que poseen una tasa de división muy alta. Entre éstas, se encuentra un nicho de células pluripotenciales que incluye a las iniciales del córtex y la endodermis, las iniciales de la cofia y la epidermis, las iniciales de los haces vasculares e iniciales de la columela (**Fig. 2B**). El estado indiferenciado de las células iniciales se mantiene gracias a eventos de señalización provenientes de un grupo de células con escasa actividad mitótica, conocidas como Centro Quiescente (CQ) (Petricka *et al.*, 2012). Hacia la parte superior, las células que derivan de las meristemáticas, ingresan a la Zona de Transición (ZT), donde comienzan a crecer lentamente para luego aumentar su tamaño de manera rápida en la Zona de Elongación (ZE) adyacente. Este alargamiento implica la expansión del citoplasma, que es acompañada por la replicación del ADN, un proceso conocido como endoreduplicación (Hayashi *et al.*, 2013). Finalmente, las células dejan de crecer para madurar en la Zona de Diferenciación (ZD), un área que se define por la emergencia de los pelos radiculares y, un poco más adelante, de las raíces laterales (Verbelen *et al.*, 2006).



**Figura 2. Anatomía y morfología de la raíz de *A. thaliana*.** (A) Cortes longitudinales y transversales de la raíz donde muestran las diferentes zonas y tejidos. (B) Ubicación de las células iniciales. ZD, Zona de Diferenciación. ZE, Zona de Elongación. ZT, Zona de Transición. ZM, Zona Meristemática. Modificado de Overvoorde *et al.* (2010).

## 2.2 Fitohormonas

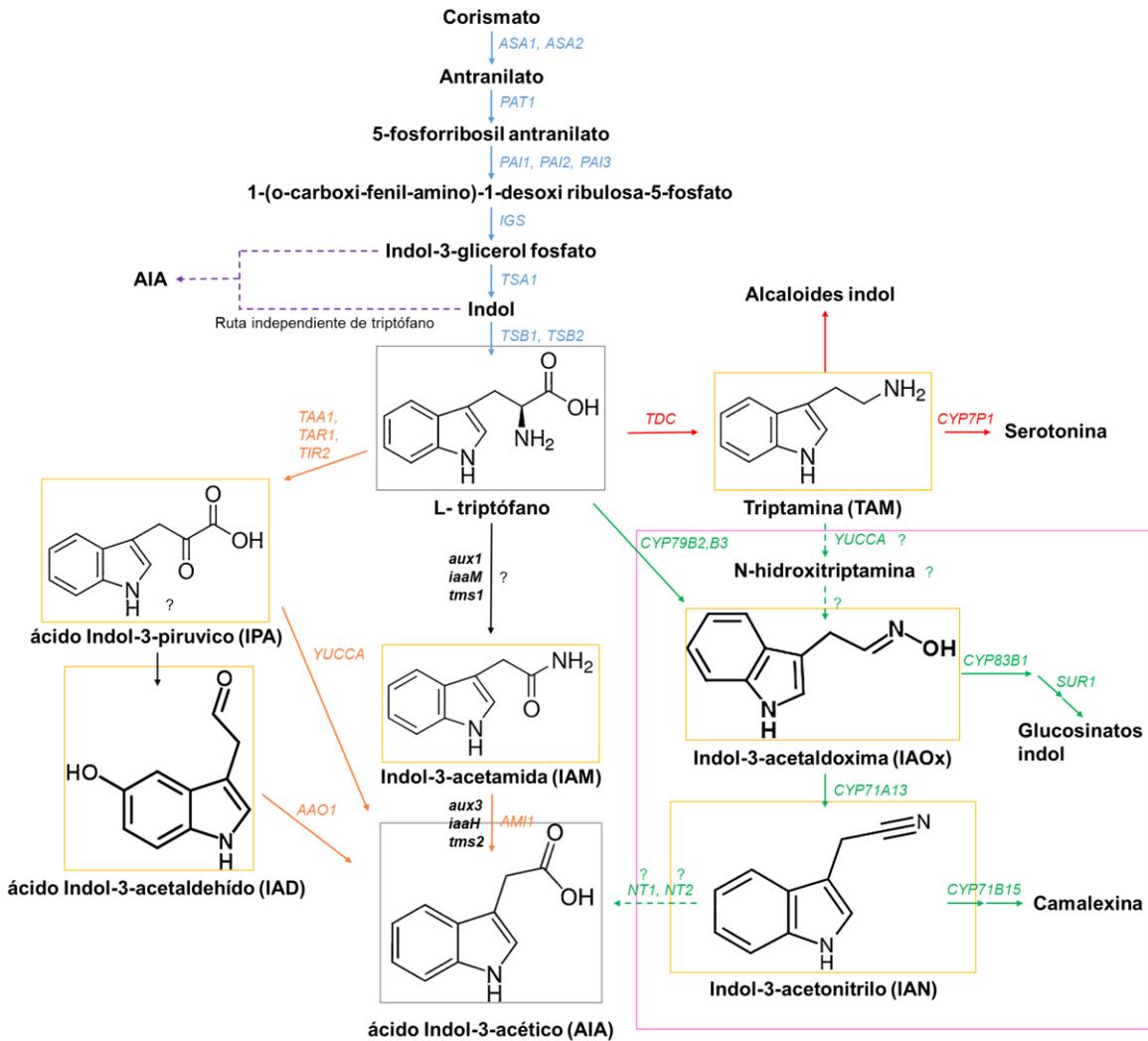
En las plantas se sintetizan varios grupos de moléculas conocidas como reguladores del crecimiento o fitohormonas. Éstas ejercen sus efectos por la unión a receptores, derivando en la activación de vías de señalización que promueven la expresión de genes implicados en los procesos de defensa y desarrollo vegetal. Su biosíntesis se lleva a cabo en células o tejidos específicos, de donde pueden ser movilizadas a diferentes partes de la planta. Las cinco fitohormonas clásicas, y las primeras en ser descubiertas, fueron las auxinas, las citocininas, las giberelinas, el etileno y el ácido abscísico. Luego se identificaron otros tipos de reguladores de crecimiento como el ácido jasmónico, el ácido salicílico, los brasinoesteroides, las estrigolactonas, el óxido nítrico, las poliaminas y algunos péptidos (Asami y Nakagawa, 2018). Hoy en día, se conoce que distintas vías de señalización de fitohormonas interactúan y se autorregulan conformando complejas redes de señalización (Yue *et al.*, 2016).

### 2.2.1 Auxinas: síntesis, transporte y señalización

Mientras investigaban el fototropismo, un fenómeno que consiste en el crecimiento de las plantas en dirección hacia la luz, Carlos Darwin y su hijo Francis (1880), dedujeron que una señal endógena y móvil era la encargada de mediar los cambios morfogénicos relacionados con la percepción de luz. Años más tarde, se demostró que esa señal de la que hablaban eran las auxinas, un grupo de fitohormonas que también intervienen en la reproducción, la embriogénesis, la elongación del hipocótilo, el crecimiento de la raíz, y la formación de raíces laterales y pelos radiculares (Gray *et al.*, 1998; Vanneste y Friml, 2009).

El ácido indol-3-acético (AIA) fue la primera auxina identificada y es una de las más bioactivas que se conocen. El AIA se produce en las hojas jóvenes y en el meristemo radicular, y se han propuesto dos vías para su síntesis: 1) la dependiente del L-triptófano (L-Trp) y 2) la independiente de este aminoácido, que involucra al indol-3-glicerol fosfato y al indol (**Fig. 3**). A partir de la ruta del L-Trp, se derivan cuatro precursores principales del AIA: indol-3-acetaldoxima (IAOx), indol-3-acetamida (IAM), ácido indol-3-piruvico (IPA) y la triptamina (TAM). Anteriormente se creía que la ruta de síntesis de AIA a partir de IAM era específica de bacterias, debido a que no existían evidencias que la relacionaran con plantas. Sin embargo, ya se ha detectado a este precursor en varias especies vegetales, así como el gen que codifica para la hidrolasa (AMI1) que lo convierte a AIA. Otra vía también presente en bacterias es la de IPA, un compuesto que da lugar al indol-3-acetaldehído (IAD) por la actividad de la indol-3-piruvato descarboxilasa, y después se forma AIA mediante la participación de la indol-3-acetaldehido oxidasa (Mano y Nemoto, 2012). Hasta la fecha, en plantas solo se ha encontrado IPA en *A. thaliana* y en *Pisum sativum*, pero se desconoce si en ellas puede conducir a la producción de IAD. Otros precursores de AIA es la TAM, que es intermediario en la producción de alcaloides indol y de serotonina. Además, a partir del IAOx se generan glucosinolatos indol. Ambos precursores, IAOx y TAM, se han encontrado en especies de la familia *Brassicaceae* (Mano y Nemoto, 2012). Las plantas pueden emplear varias opciones para mantener la homeostasis de esta fitohormona, ya sea degradando el AIA a 2-oxoindol-3-acético, inactivándolo al

conjugarlo con aminoácidos y azúcares e incluso disminuyendo su biosíntesis (Schaller *et al.*, 2015).



**Figura 3. Rutas propuestas para la biosíntesis de AIA.** En flechas azules se señala la síntesis del L-triptófano (L-Trp) en el cloroplasto. La flecha morada con línea de puntos indica la vía independiente del L-Trp. Las flechas naranjas muestran los pasos donde se conocen los genes y la función enzimática en la síntesis de AIA dependiente del L-Trp. En flechas rojas se esquematiza la ruta biosintética de la serotonina y de los alcaloides indol a partir del L-Trp. Las flechas verdes indican la ruta biosintética del AIA utilizada específicamente en las especies de la familia Brassicaceae. Las flechas negras muestran los pasos donde aún se desconocen los genes y funciones enzimáticas que participan. Las flechas verdes con línea de puntos señalan los pasos donde los genes y funciones enzimáticas son poco entendidas. Las letras minúsculas en cursiva son genes bacterianos. *ASA1/2*, antranilato sintasa. *PAT1*, antranilato fosforribosiltransferasa. *PAI1/2/3*, 5-fosforribosilantranilato isomerasa. *IGS*, indol-3-glicerol fosfato sintasa. *TSA1/TSB1/2*, triptófano sintasa. *aux1/iaaM/tms1*, triptófano-2-monooxigenasa. *aux3/iaaH/tms2/AMH*, indol-3-acetamida hidrolasa. *TAA1/TAR1/TIR2*, triptófano aminotransferasa. *CYP79B2/3*, triptófano N-hidroxilasa. *CYP71A13/CYP83B1/CYP71B15*, monooxigenasa. *SUR*, liasa de alquiltiohidroxamato. *YUCCA*, flavina monooxigenasa. *AAO1*, aldehído oxidasa. *TDC*, triptófano descarboxilasa. *NT1/2*, nitrilasa.

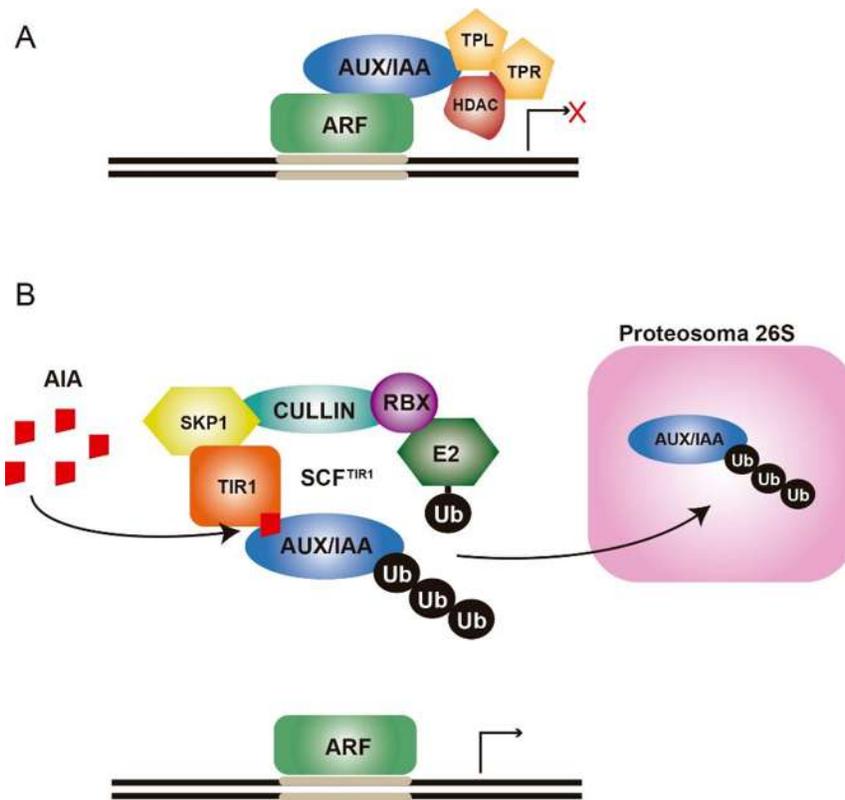
Para la distribución de auxinas hacia los diversos tejidos se han identificado dos sistemas de transporte: 1) la difusión simple a través del floema y 2) el transporte

polar, que favorece una movilización de auxinas de célula a célula y es mediado por proteínas transportadoras ancladas en la membrana celular. Este transporte polar está basado en la teoría quimiosmótica del AIA, la cual propone que el AIA es un ácido débil con un pKa de 4.75, que le permite adquirir dos formas químicas dependientes del pH: una protonada (AIAH) a pH ácido, y otra aniónica (AIA<sup>-</sup>) a pH neutro. El pH del apoplasto es de 5.5, por lo tanto, se estima que aproximadamente el 15% del AIA está en forma protonada y puede viajar a través de la membrana, mientras que, en el citosol, cuyo pH es de 7, se favorece la estructura aniónica. Debido a que esta última forma está cargada eléctricamente, no puede atravesar libremente la membrana, y para hacerlo requiere de la función de transportadores (Vanneste y Friml, 2009).

Las proteínas “Auxin transporter protein 1” (AUX1) median la entrada de AIA<sup>-</sup> al citoplasma, sin embargo, para su expulsión hacia el apoplasto intervienen los transportadores “ATP-Binding Cassette” (ABC) y “PIN-FORMED” (PIN). La función de las proteínas AUX1 se descubrió mediante la caracterización de la mutante *aux1*, que muestra resistencia a la movilización de auxinas al interior de la célula. Por su parte, los transportadores ABC fueron descubiertos al ser desactivados funcionalmente por el ácido naftilftalámico (NPA) y por flavonoides, los cuales impiden la interacción entre las proteínas ABC y su proteína reguladora “TWISTED DWARF 1” (TWD1). En cuanto a los genes *PIN*, en *A. thaliana* se han identificado ocho de ellos, cuyos fenotipos mutantes coinciden con su función como transportadores polares de auxinas en la regulación de los procesos del desarrollo de la raíz y en las respuestas al gravitropismo (Adamowski y Friml, 2015; Vanneste y Friml, 2009).

Las auxinas dentro de la célula estimulan la unión de los represores “AUXIN/INDOLE ACETIC ACID” (AUX/IAA) con los factores de transcripción “AUXIN RESPONSE FACTOR” (ARF), bloqueando la transcripción de genes de respuesta a auxinas (**Fig. 4A**). Durante este proceso los represores AUX/IAA reclutan a los co-represores “TOPLESS” (TPL) y “TOPLESS RELATED” (TPR), los cuales impiden la actividad transcripcional mediante el reclutamiento de histonas deacetilasas (HDAC). Al elevarse la concentración de auxinas, éstas son

reconocidas por las proteínas de la familia “TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEINS” (TIR1/AFB), promoviendo su interacción con el represor AUX/IAA (**Fig. 4B**). Posteriormente, TIR1/AFB recluta a SKP1–Cul1–F-box (SCF), una ligasa tipo E3, formándose el complejo SCF<sup>TIR1/AFB</sup> que desencadenará la ubiquitinación del represor AUX/IAA para que pueda ser degradado en el proteosoma 26S. Una vez que la proteína AUX/IAA es degradada, los ARF son liberados para promover la transcripción de los genes regulados por este sistema (Schlatter *et al.*, 2017; Wang y Estelle, 2014).

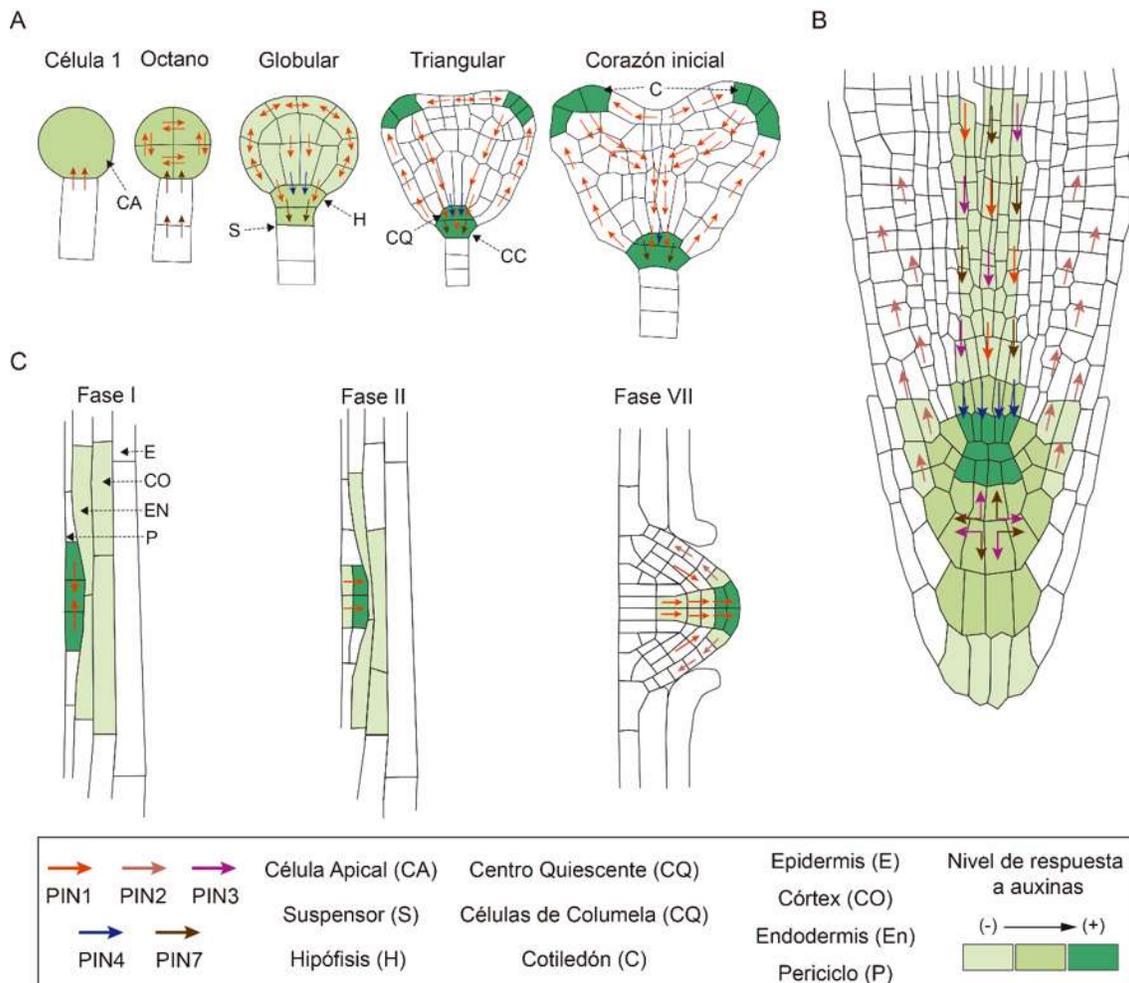


**Figura 4. Modelo de la vía de la señalización de auxinas.** (A) Cuando el nivel de auxinas es bajo, la proteína AUX/IAA con la ayuda de TPL, TPR y HDAC mantiene reprimida la función de los ARF para evitar la transcripción de los genes de respuesta a auxinas. (B) Al aumentar el nivel de auxinas se favorece la formación del complejo SCF<sup>TIR1</sup>, el cual realizará la ubiquitinación del represor AUX/IAA para que sea degradado vía proteosoma 26S y los genes originalmente reprimidos puedan ser transcritos.

### 2.2.2 Auxinas y transportadores PIN en el desarrollo radicular

Desde etapas tempranas de la embriogénesis, las auxinas definen el cuerpo apical y basal de la planta (**Fig. 5A**). La parte basal se divide para formar las células de la hipófisis y del suspensor. Enseguida, el suspensor da lugar al CQ y al

meristemo apical de la raíz. Estos eventos del desarrollo embrionario dependen de varios máximos de auxinas creados por los transportadores PIN1, PIN4 y PIN7 (Möller y Weijers, 2009). Posterior a la germinación, se establece un patrón de distribución de proteínas PIN en las capas celulares de la raíz primaria, el cual permite crear un flujo constante de esta fitohormona (**Fig. 5B**). Las auxinas presentes en el nicho de células iniciales y en el CQ, se distribuyen hacia las células de la columela y de la cofia mediante la actividad de PIN3 y PIN7. Después, PIN2 se encarga de movilizarlas a través de las células de la epidermis y del córtex, creando un efecto de fuente invertida. En las células vasculares, PIN1, PIN3, PIN4 y PIN7, dirigen a las auxinas provenientes del follaje hacia el nicho de iniciales. Este tipo de transporte crea un gradiente de auxinas a lo largo de la raíz, manteniendo la mayor concentración en el CQ e iniciales de la columela (Dhonukshe, 2012).



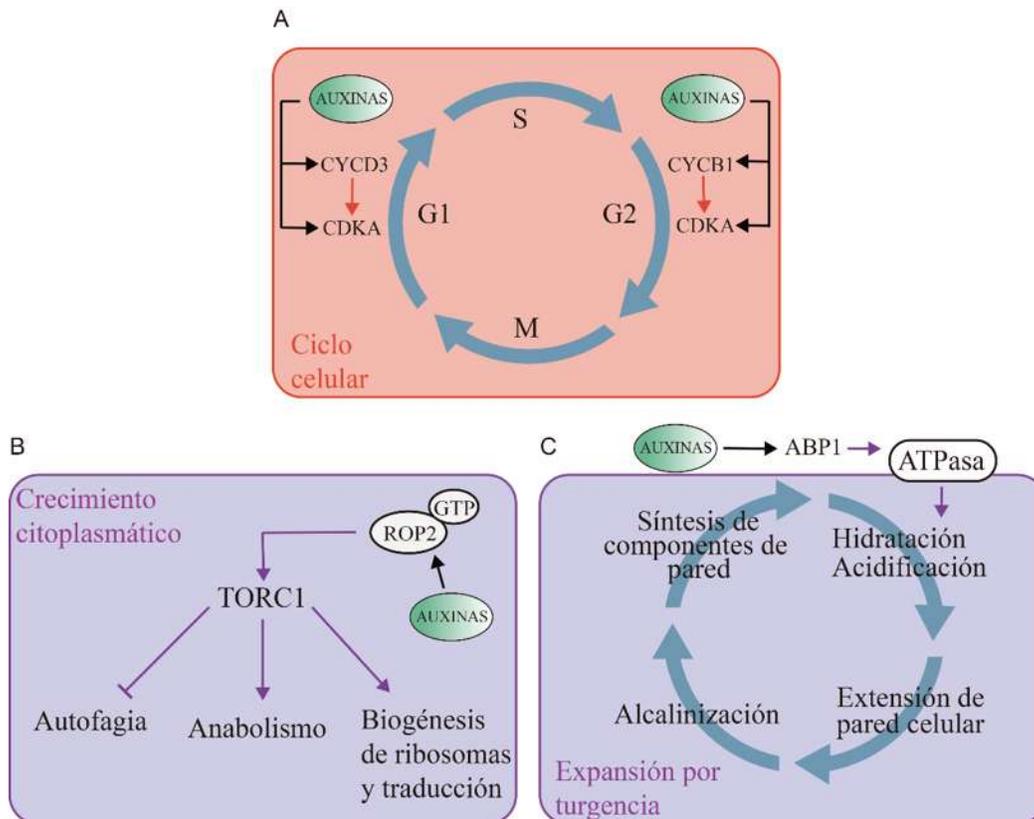
**Figura 5. Flujo de auxinas mediado por los transportadores PIN para el establecimiento y el desarrollo de la raíz.** (A) Eventos del desarrollo embrionario coordinados por la movilización de auxinas y la actividad de transportadores PIN. (B) Activación del desarrollo de raíces laterales por el transporte de auxinas y la participación de PIN1 y PIN2. (C) Esquema del gradiente de auxinas creado por los transportadores PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 y PIN7 en el meristemo radicular. Las flechas representan a los diferentes transportadores PIN e indican los sitios de actividad de estas proteínas, así como la dirección que generan en el flujo de auxinas.

El transporte de auxinas es un factor crucial durante la formación de raíces laterales. En la primera fase de desarrollo de un primordio, PIN1 conduce la acumulación de auxinas a las células adyacentes del periciclo para coordinar divisiones anticlinales (**Fig. 5C**). Después, en la segunda y tercera fase, ocurren una serie de divisiones periclinales que generan un total de tres capas celulares. Luego, PIN1 concentra a las auxinas en las dos capas más nuevas para producir una cuarta capa. Cuando llega la fase cinco, el máximo de auxinas permanece solamente en la punta del primordio para estimular más divisiones anticlinales, las cuales comienzan a ejercer presión sobre el córtex. En las etapas finales aparecen los diferentes tipos de células, se define el CQ, se organiza el meristemo y PIN2 moviliza a las auxinas a las capas más externas. Por último, el primordio se alarga y emerge como raíz lateral atravesando la epidermis (Petrásek y Friml, 2009).

### **2.2.3 Regulación de la división y el crecimiento celular a través de la señalización de auxinas**

Después de la germinación, la raíz primaria comienza a crecer y a desarrollar raíces laterales para ampliar la búsqueda de nutrientes en el suelo, todo esto es dirigido por las auxinas, que regulan la proliferación y la elongación celular. Previo a la división, la célula pasa por varias fases: en la primera (G1), incrementa la biogénesis de ribosomas y la síntesis de proteínas, logrando aumentar el tamaño del citoplasma. La segunda fase (S) implica la duplicación del ADN, lo que conlleva a que también el núcleo se extienda. Durante la tercera (G2), la célula sigue creciendo y se prepara para entrar en mitosis (M), que es la cuarta y última fase del ciclo celular. En la etapa M el ADN se condensa en forma de cromosomas, las cromátidas hermanas son separadas por el huso mitótico, y

finalmente, ocurre la división física de las células hijas, cada una con su carga de organelos y material genético. Las fases G1 y G2 también son consideradas puntos de revisión, pues si no existen condiciones ambientales adecuadas, la progresión del ciclo celular es suspendida (Sablowski y Carnier, 2014). Las proteínas que promueven la transición de G1-S o de G2-M, son cinasas de la familia “CYCLINE-DEPENDENT KINASE” (CDK), las cuales requieren de la unión de ciclinas para ser funcionales. Por lo tanto, algunas de las estrategias que la célula utiliza para controlar la progresión de su ciclo se basan en la síntesis y la degradación de ciclinas. Las auxinas influyen positivamente sobre la transcripción de “CYCLIN-DEPENDENT KINASE A;1” (CDKA;1) y “D3;1-type cyclin” (CycD3;1) en la fase G1 (**Fig. 6A**). Asimismo, para pasar de la fase G2 a la M, las auxinas inducen la expresión de *CycA2;1*, *CycA2;2*, *CycB1;1* y *CDKA;1* (Perrot-Rechenmann, 2010; Stals y Inze, 2001).



**Figura 6. Influencia de las auxinas en los procesos de la división y el crecimiento celular.** (A) Participación de las auxinas en la expresión de genes relacionados con la progresión del ciclo celular. (B) Las auxinas activan a (B) TORC1 y (C) ATPasas para inducir el crecimiento celular.

Por otra parte, las auxinas promueven el crecimiento citoplasmático que ocurre durante el ciclo celular, activando a la GTPasa “RHO OF PLANTS” (ROP), la cual fosforila a “TARGET OF RAPAMYCIN” (TOR), una cinasa encargada de potenciar la producción de macromoléculas y de componentes celulares (**Fig. 6B**) (Schepetilnikov *et al.*, 2017). La expansión por turgencia es otro proceso de crecimiento celular que comúnmente precede a la diferenciación, donde las auxinas al ser percibidas por el receptor “AUXIN-BINDING PROTEIN 1” (ABP1), activan ATPasas que acidifican el apoplasto (**Fig. 6C**) (Kim *et al.*, 2001). Este cambio de pH activa a las expansinas (EXP) y a la xiloglucano endotransglicosilasa/hidrolasa (XTH), enzimas encargadas de fragmentar componentes de la pared celular. La vacuola previamente hidratada ejerce una presión mecánica sobre la membrana y la pared, lo que provoca la extensión de ambas. Al mismo tiempo, las EXP y XTH son deshabilitadas, ya que el apoplasto es alcalinizado por la activación de canales que permiten la entrada de Ca<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> al citoplasma. Finalmente, la célula produce componentes nuevos de pared celular para reemplazar a los que fueron degradados por esas enzimas (Sablowski y Carnier, 2014).

### 2.3 Aminoácidos

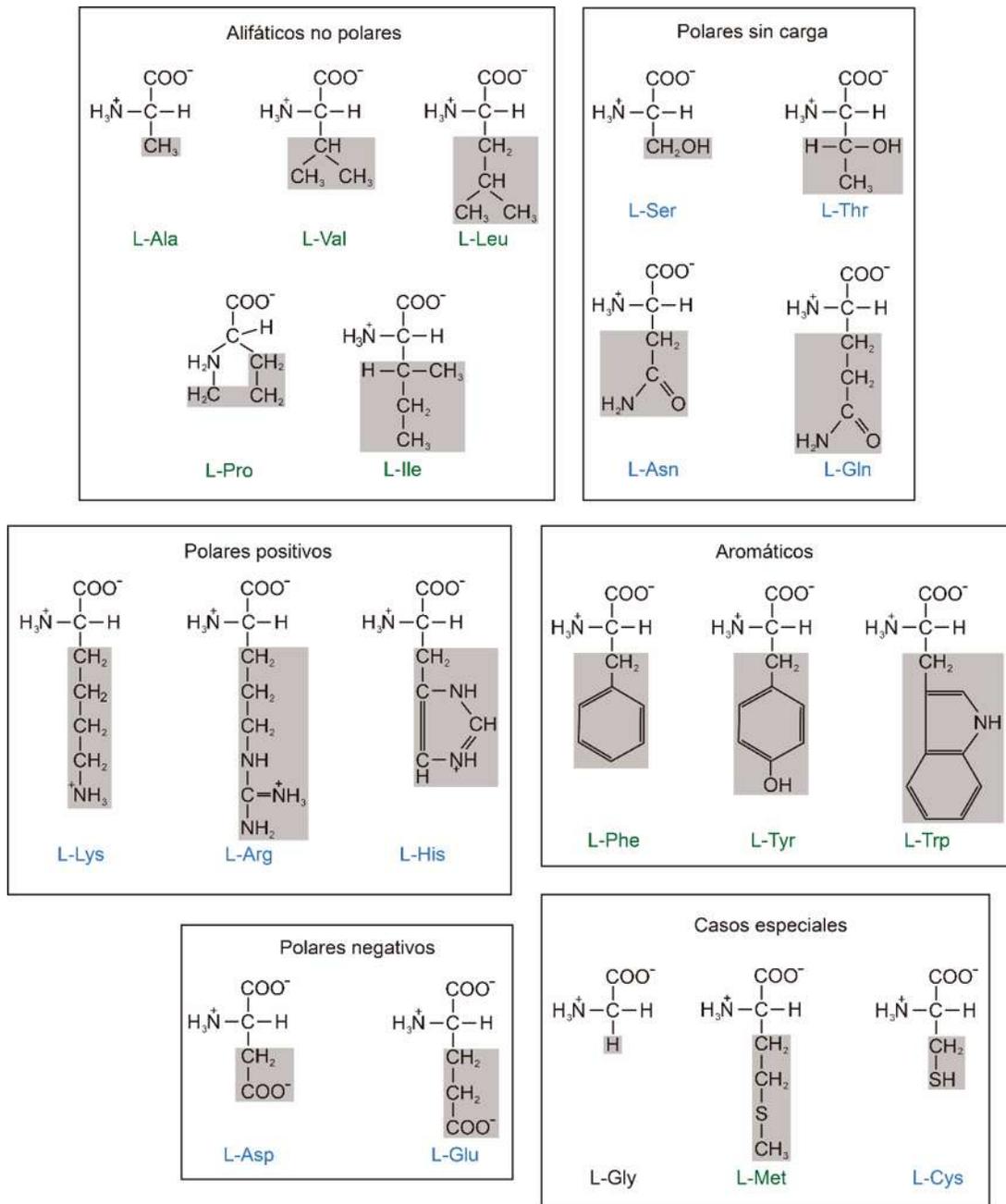
Diferentes organismos producen y secretan moléculas que se acumulan en el suelo. Muchas de ellas interaccionan con las raíces de las plantas e influyen sobre procesos metabólicos, de comunicación celular, y de defensa. Algunas otras, impactan el desarrollo vegetal al ser percibidas o absorbidas por la raíz. Por ejemplo, moléculas de *quorum-sensing* o volátiles microbianos modifican la arquitectura del sistema radicular de *Arabidopsis*, afectando la señalización de auxinas (Garnica-Vergara *et al.*, 2016; Ortíz-Castro *et al.*, 2011). Los aminoácidos son otras biomoléculas que se encuentran en el suelo, principalmente por la degradación de la materia orgánica o al ser secretados por plantas y microorganismos (Jones *et al.*, 2002). Están estructurados por un grupo amino y

un grupo carboxilo, ambos enlazados a un carbono  $\alpha$ , al cual también están unidos un hidrógeno y un grupo radical o cadena lateral. La mayoría de los aminoácidos son compuestos quirales que presentan formas especulares no superponibles (isómeros), por lo que los podemos encontrar en forma levógira (L-) o dextrógira (D-). Bajo una proyección lineal, se puede resaltar que el grupo amino de los L-aminoácidos está ubicado del lado izquierdo, mientras que en los D-aminoácidos está del lado derecho. Además, dependiendo del pH pueden comportarse como ácidos o como bases (Wu, 2009). Las variaciones en la composición del grupo radical definen la diversidad de los aminoácidos, de los cuales se han identificado a más de 900, pero sólo 20 L-aminoácidos son los que conforman a las proteínas (Yamane *et al.*, 2010).

Miller y Urey (1959), al simular una atmósfera primitiva utilizando gases, elementos y descargas eléctricas, propusieron que las condiciones ambientales de hace 4,000 millones de años fueron ideales para la síntesis inorgánica de varias biomoléculas que son pilares del origen de la vida. Parte de sus resultados más interesantes, fue la síntesis de algunos nucleótidos y aminoácidos. Estas evidencias, junto con el conocimiento sobre el dogma central de la biología, respaldan la teoría de que este tipo de moléculas han acompañado a los organismos desde los inicios de la vida y durante su evolución. Las células han aprovechado de distintas maneras a los aminoácidos, pues además de ser los monómeros constituyentes de las proteínas, participan en la asimilación de nutrientes, en la síntesis de metabolitos secundarios y en eventos de señalización (Wu, 2009).

Con base en las características de sus grupos funcionales, los aminoácidos se clasifican en diferentes grupos (**Fig. 7**). Los que presentan una cadena lateral hidrocarbonada son alifáticos, una característica estructural que los vuelve hidrofóbicos. Otros aminoácidos con propiedades hidrofóbicas son los aromáticos, que contienen en su cadena lateral ya sea un benceno, un fenol o un indol. Está también el grupo de los polares sin carga, que son aminoácidos con grupos funcionales muy reactivos, donde sus átomos muestran diferencias

electronegativas que producen dipolaridad. Hay aminoácidos polares que a pH fisiológico muestran cargas completas en sus cadenas laterales, ya que algunos poseen grupos carboxilos que generan una carga negativa, y otros exhiben grupos amino, que les confiere una carga positiva. Tanto los polares sin carga, como los cargados, se consideran hidrofílicos. La L-metionina (L-Met) y la L-cisteína (L-Cys) se clasifican como casos especiales, ya que la composición de su cadena lateral incluye átomos de azufre, aunque la L-Met es hidrofóbico, y L-Cys hidrofílico. Otro caso especial, es el de la L-glicina (L-Gly), cuyo grupo radical es un átomo de hidrógeno y su pequeño tamaño favorece que pueda comportarse como hidrofóbico o hidrofílico (Voet *et al.*, 2016).

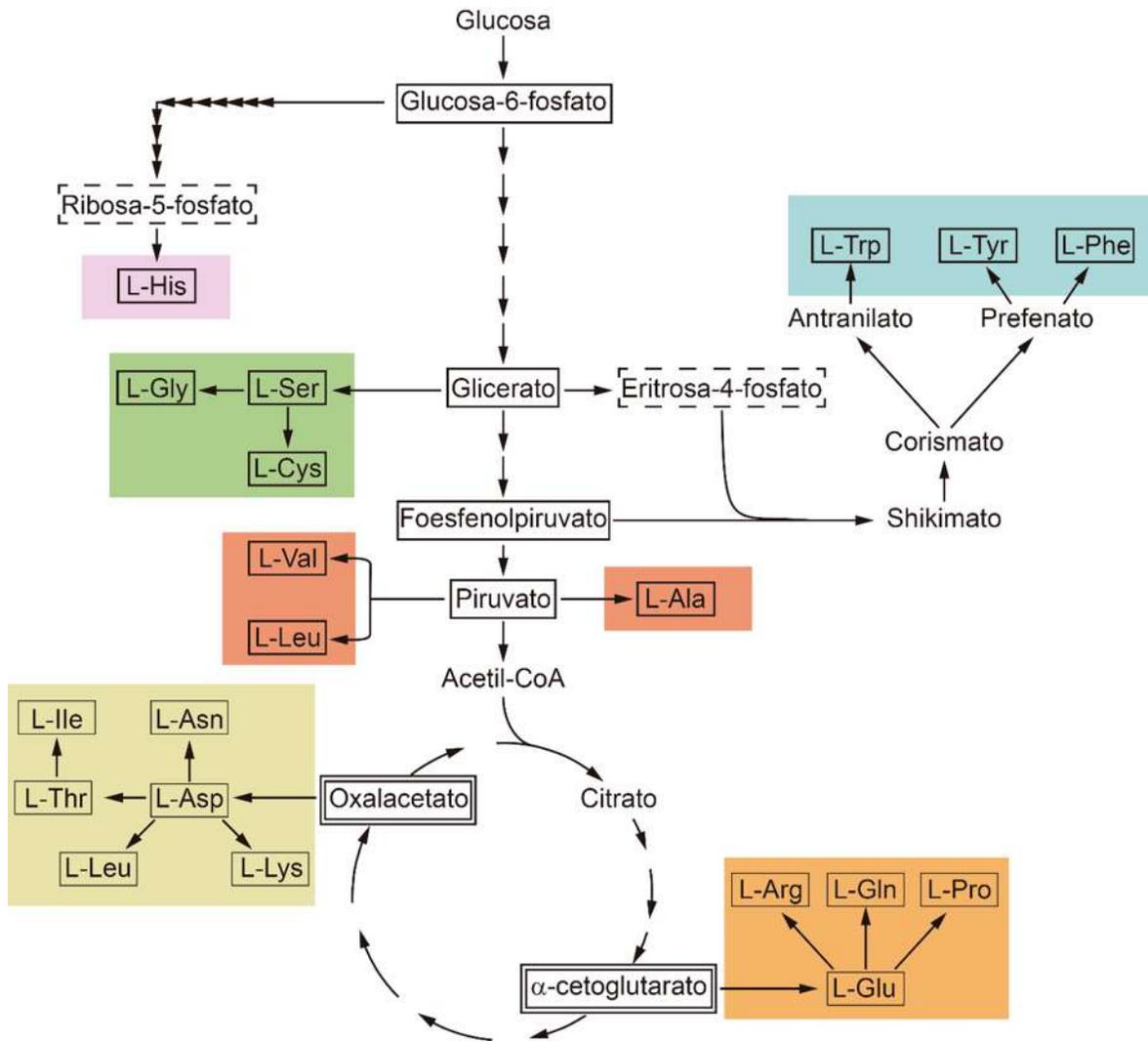


**Figura 7. Estructura y clasificación de los 20 L-aminoácidos proteicos.** Los grupos radicales están sombreados en color gris. Rótulos verdes = hidrofóbico, rótulos azules = hidrofílico, rótulos negros = hidrofóbico e hidrofílico.

### 2.3.1 Síntesis de aminoácidos

Los aminoácidos son indispensables para el funcionamiento celular, por lo que los organismos desarrollaron rutas metabólicas para sintetizarlos. En algún punto

evolutivo, el linaje animalia, que incluye a los humanos, perdió la capacidad de producir algunos de los aminoácidos que eran obtenidos con gran facilidad en la dieta. Cualquiera de los aminoácidos que no es sintetizado por algún organismo es considerado esencial, sin embargo, este término no es aplicable en las plantas, ya que éstas tienen la capacidad de producir los 20 L-aminoácidos. Para la biosíntesis de diez de estos aminoácidos, las células vegetales utilizan intermediarios de la glucólisis, del ciclo de Krebs y de la vía de las pentosas fosfato (**Fig. 8**). A partir de doce pasos enzimáticos, la L-histidina (L-His) se forma de la ribosa-5-fostato, una molécula que también sirve como suministro de la vía de las pentosas fosfato y que deriva de la glucosa-6-fosfato (Stepansky y Leustek, 2006). En el séptimo paso de la glucólisis se obtiene glicerato, el cual es convertido a hidroxipiruvato por medio de una deshidrogenasa. Después, la transaminación en el hidroxipiruvato genera L-serina (L-Ser), un aminoácido que también sirve como precursor para la síntesis de L-Cys y L-Gly (Bogdanova y Hell, 1997; Ros *et al.*, 2014; Voet *et al.*, 2016). Los aminoácidos aromáticos: L-fenilalanina (L-Phe), L-tirosina (L-Tyr) y L-triptófano (L-Trp), se originan a partir de la vía del shikimato, que es sustentada por el procesamiento de un metabolito de la glucólisis (fosfoenolpiruvato) y otro de la vía de las pentosas fosfato (eritrosa-4-fosfato) (Tzin *et al.*, 2012). Por otra parte, tres vías biosintéticas divergen desde el piruvato para sintetizar a L-alanina (L-Ala), L-leucina (L-Leu) y L-valina (L-Val) (Kochevenko y Fernie, 2011; Miyashita *et al.*, 2007).



**Figura 8. Rutas de la biosíntesis de los aminoácidos proteicos.** Cuatro intermediarios de la glucólisis (rodeados por línea continua), dos del ciclo de Krebs (rodeados por doble línea) y dos de la vía de las pentosas fosfato (rodeados por línea de puntos), actúan como precursores en la síntesis de aminoácidos.

Por su parte, la síntesis de los aminoácidos cargados negativamente depende de intermediarios del ciclo de Krebs. Por ejemplo, la transaminación en el  $\alpha$ -cetoglutarato genera L-glutamato (L-Glu), y la transaminación en el oxalacetato produce L-aspartato (L-Asp) (Voet *et al.*, 2016). Los esqueletos carbonados del L-Glu y L-Asp sirven para la producción de los ocho aminoácidos restantes. L-arginina (L-Arg), L-glutamina (L-Gln) y L-prolina (L-Pro), provienen del procesamiento del L-Glu (Okumoto *et al.*, 2016). En cambio, L-asparagina (L-Asn), L-isoleucina (L-Ile), L-lisina (L-Lys), L-Met y L-treonina (L-Thr), surgen del L-Asp

(Jander y Joshi, 2009). Estas biomoléculas pueden ser sometidas a reacciones reversibles o catabólicas que permiten la síntesis de otros aminoácidos, metabolitos o intermediarios de vías metabólicas como el ciclo de Krebs (Hildebrandt *et al.*, 2015).

### **2.3.2 Aminoácidos en la asimilación de nitrógeno**

La estabilidad nutricional de las plantas está sujeta a las concentraciones de los macro y microelementos que se encuentran en el suelo, que pueden ser absorbidos y percibidos por las raíces (López-Bucio *et al.*, 2003). El nitrógeno es considerado un elemento esencial para el desarrollo vegetal, pues desempeña funciones estructurales, metabólicas y de señalización. El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), son las dos formas inorgánicas de nitrógeno que las plantas toman del suelo por medio de transportadores, pero para ser asimiladas se requiere condensarlas en aminoácidos. El  $\text{NO}_3^-$  ingresa a las células de la raíz vía transportadores, ya en el citoplasma, es reducido a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) por la enzima nitrato reductasa. El nitrito es altamente reactivo, por lo que puede ser tóxico para la célula, así que es transportado rápidamente a los plástidos para convertirlo a  $\text{NH}_4^+$  por acción de la enzima nitrito reductasa (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). El  $\text{NH}_4^+$  también puede ser tomado del suelo por las células mediante la familia de transportadores AMT1 y AMT2. Una vez dentro del citoplasma o de los plástidos, el amonio es incorporado a esqueletos carbonados de cetoácidos y aminoácidos para evitar toxicidad. La glutamina sintetasa puede condensar el  $\text{NH}_4^+$  con el L-Glu para formar L-Gln. Asimismo, la incorporación de  $\text{NH}_4^+$  a  $\alpha$ -cetoglutarato genera L-Glu (Howitt y Udvardi, 2000). La integración del nitrógeno a aminoácidos facilita tanto su movilización hacia los diferentes tejidos de la planta, como su aprovechamiento en distintas rutas metabólicas (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010).

### 2.3.3 Transportadores de aminoácidos

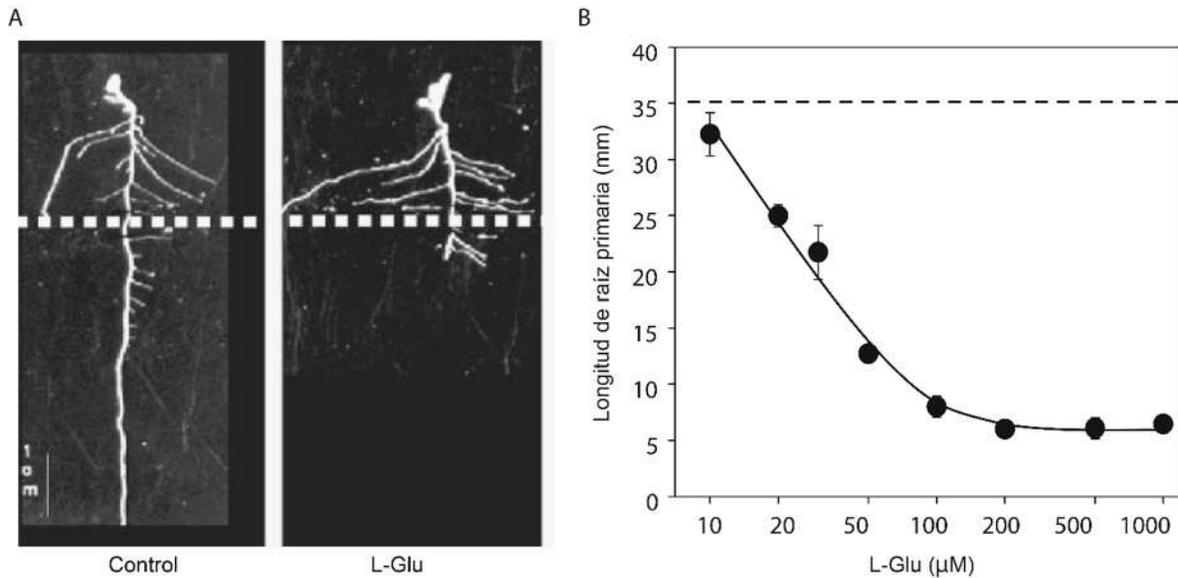
Después de ser sintetizados, los aminoácidos son enviados hacia los tejidos demandantes para contribuir con el desarrollo vegetativo y reproductivo de las plantas. La distribución de estas biomoléculas ocurre por proteínas transportadoras que están ancladas en las membranas de las células y de organelos. En total, se han identificado a seis familias de transportadores que regulan la entrada de aminoácidos: “amino acid permease” (AAP), “lysine/histidine-type transporter” (LHT), “proline/compatible solute transporter” (ProT), “aromatic-neutral amino acid transporter” (ANT), “ $\gamma$ -aminobutyric acid transporter” (GAT) y “cationic amino acid transporter” (CAT) (Tegeder, 2012). AAP2 se encarga de importar aminoácidos al floema, para que por este conducto sean movilizados hasta los diferentes órganos (Zhang *et al.*, 2010). Otras proteínas de este tipo son AAP6 y AAP8, cuyas mutantes presentan niveles bajos de aminoácidos en el tejido vascular (Hunt *et al.*, 2009; Schmidt *et al.*, 2007). Las proteínas exportadoras e importadoras de aminoácidos también se han identificado en las membranas de la mitocondria, vacuola, plástidos, retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Okumoto *et al.*, 2004; Palmieri *et al.*, 2006; Pohlmeier *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 2010).

Existen suelos con un contenido alto de materia orgánica que, al ser degradada, libera diversas biomoléculas, incluyendo a aminoácidos, que quedan expuestos para su aprovechamiento por los organismos. Por ejemplo, mediante las proteínas transportadoras de las células de la raíz, la planta absorbe los aminoácidos del suelo como fuente de nitrógeno. En este proceso participa AAP1, que se localiza en el ápice de la raíz y en los pelos radiculares, y se encarga de tomar los aminoácidos que en su grupo radical presentan carga neutra o negativa (Lee *et al.*, 2007). Está también ProT2, que se expresa en las células de la epidermis y del córtex, y se relaciona con la adquisición de L-Pro (Grallath *et al.*, 2005; Lehmann *et al.*, 2010). Por otro lado, aminoácidos neutros y negativos pueden ser absorbidos por LHT1, el cual está presente en las células de la epidermis, córtex y endodermis (Brady *et al.*, 2007; Hirner *et al.*, 2006). Adicionalmente, la toma de

aminoácidos positivos es llevada a cabo por AAP5, un transportador activo en las células del córtex (Tegeder, 2012).

#### **2.3.4 Efecto de aminoácidos exógenos sobre el crecimiento radicular**

Al parecer, los aminoácidos desempeñan funciones diversas que están vinculadas muy estrechamente con el desarrollo vegetal, como precursores de fitohormonas, ayudando en la asimilación y movilización de nitrógeno, y regulando la actividad de proteínas y la expresión de genes. En cambio, los aminoácidos de la rizosfera tienen una función nutricional para las plantas, pues representan una fuente orgánica de nitrógeno. Sin embargo, Walch-Liu *et al.*, (2006) determinaron que el L-Glu afecta el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis* actuando como una molécula señal y no como un nutriente (**Fig. 9**). El efecto de este aminoácido se relacionó con la disminución en el nivel de transportadores PIN, lo que disminuye la acumulación de auxinas en el meristemo radicular y por consecuencia, afecta la división y el crecimiento celular (López-Bucio *et al.*, 2018). En las últimas dos décadas, el estudio de la señalización del L-Glu en plantas se ha abordado de manera análoga a la función que desempeña como neurotransmisor en mamíferos, donde regula la plasticidad de las neuronas a través de canales iónicos (receptores ionotrópicos) y de cinasas (Thomas y Haganir, 2004). Actualmente, se conoce que el L-Glu, al igual que en los mamíferos, activa canales iónicos que despolarizan la membrana de las células vegetales. Estos canales están conformados por las proteínas “GLUTAMATE-LIKE RECEPTOR” (GLR), las cuales pueden ser activadas por más de un aminoácido (Stephens *et al.*, 2008). Hasta el momento, los GLR no han sido vinculados con la regulación del crecimiento de la raíz, pero su inespecificidad por ligandos propone un panorama en el que la señalización del L-Glu en la raíz, puede ser alterada por varias moléculas de este tipo. En mamíferos, diferentes aminoácidos comparten mecanismos de señalización para regular procesos de crecimiento y de comunicación celular, en donde las cinasas fungen como mediadoras principales (Kim y Guan, 2011; Thomas y Haganir, 2004).



**Figura 9. Efecto del L-glutamato sobre el sistema radicular de *A. thaliana*.** (A) Fotos representativas de plántulas de *A. thaliana* en ausencia (control) y presencia de L-glutamato (L-Glu). (B) Longitud de la raíz primaria de plántulas crecidas en diferentes concentraciones de L-Glu. Tomado de Walch-Liu *et al.* (2006).

## 2.4 Proteínas MAPKs

Una vez que los receptores membranales captan los estímulos ambientales, la señal es transmitida dentro del citoplasma mediante un gran número de proteínas, entre ellas, las cinasas. Éstas se encargan de regular las funciones de otras proteínas, adicionándoles grupos fosfato en las cadenas laterales de algunos de sus aminoácidos, una actividad enzimática conocida comúnmente como fosforilación (Stone y Walker, 1995). Las cascadas de fosforilación ocurren tanto en el citoplasma como en los organelos. Además, tienen una gran importancia en la expresión de genes, ya que controlan la actividad de múltiples factores de transcripción (Stone y Walker, 1995; Yoshida *et al.*, 2015).

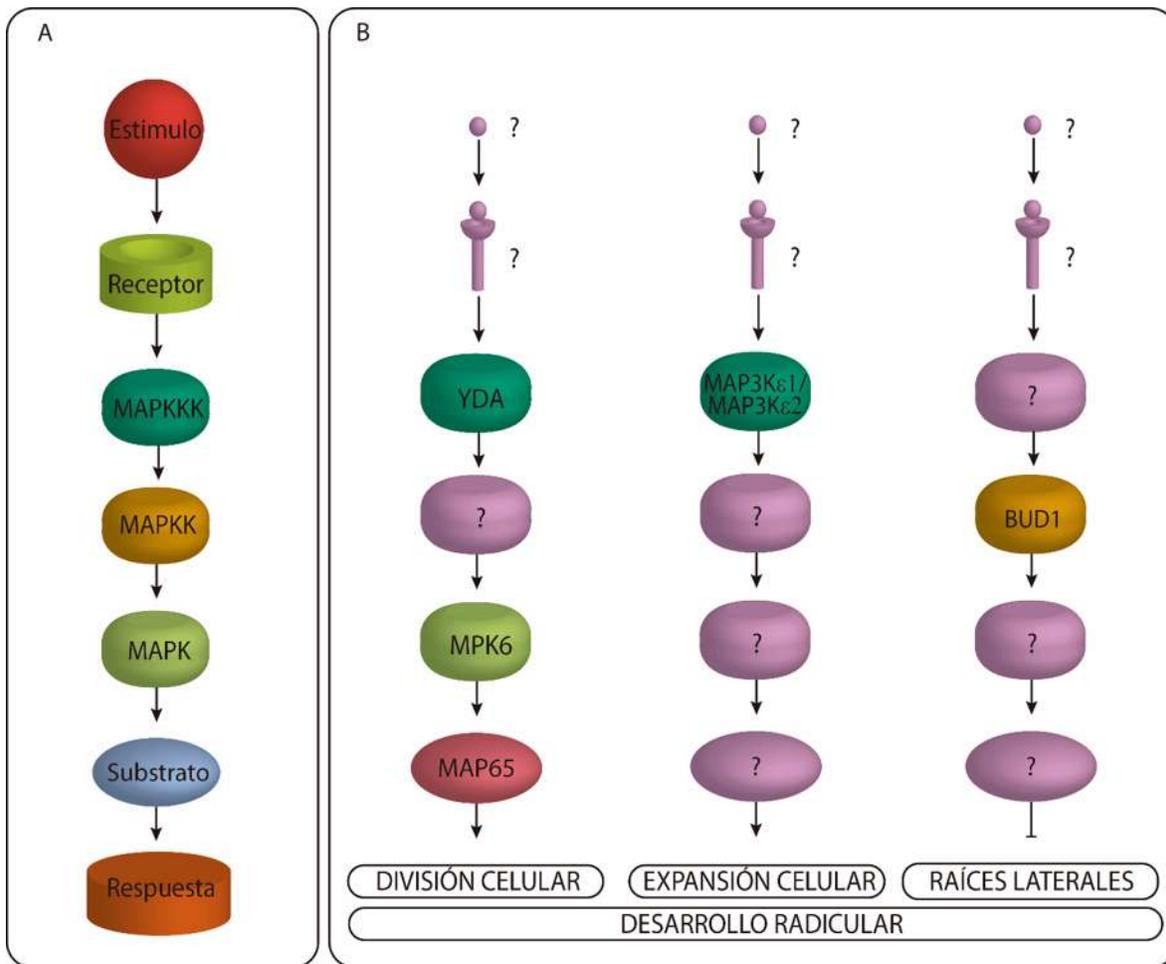
Las proteínas conocidas como “Mitogen-Activated Protein Kinases” (MAPKs) pertenecen a una familia de cinasas conservada entre eucariontes. Con base en los dominios de sus secuencias de aminoácidos y sitios de activación/fosforilación, las MAPKs de plantas, fueron clasificadas de la siguiente manera: un primer grupo, se compone de las MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK) que en el genoma de *Arabidopsis* está representado por 60 genes. También está el grupo

de las MAP cinasa cinasa (MAPKK) y el de las MAP cinasa (MAPK), que en *Arabidopsis* están representados por 10 y 20 proteínas, respectivamente (Ichimura *et al.*, 2002). Las vías de MAPKs inician cuando una molécula señal se une a un receptor membranal que directa o indirectamente dirige la fosforilación de una MAPKKK, la cual corriente abajo fosforila a una MAPKK, que finalmente activa a una MAPK (**Fig. 10A**). Ésta última, puede fosforilar a diferentes proteínas incluyendo factores de transcripción, pero también puede ser desactivada por fosfatasas denominadas en inglés como “MAP Kinase Phosphatases” (MKP; Xu y Zhang, 2015). Numerosos trabajos han demostrado que varias señalizaciones accionadas por estímulos ambientales en levaduras, mamíferos y plantas, son reguladas por cascadas de MAPKs. Las primeras investigaciones de MAPKs en plantas se relacionaron con respuestas a inductores provenientes de bacterias y hongos, y a algunos factores abióticos, como la temperatura, la humedad y la salinidad (Tena *et al.*, 2001). Además, se conoce que varias MAPKs regulan procesos del desarrollo embrionario, radicular, foliar y floral (Xu y Zhang, 2015).

#### **2.4.1 MAPKs en el desarrollo radicular**

Durante las etapas tempranas del desarrollo embrionario, el tejido basal comienza a establecerse a partir de divisiones celulares que muestran planos diferentes de segmentación. Mutantes afectadas en los genes que codifican para una MAPKKK (YODA/YDA), y para una MAPK (MPK6), presentan patrones ectópicos de división y un crecimiento menor en las células del suspensor (Bush y Krysan, 2007; Lukowitz *et al.*, 2004). Evidencias genéticas proponen a ambas cinasas como componentes de una cascada de señalización, activada por la unión de los péptidos pequeños “EMBRYO SURROUNDING FACTOR 1” (ESF1) al receptor “SHORT SUSPENSOR” (SSP), y encargada de controlar la división celular del cigoto y del suspensor (Bayer *et al.*, 2009). Por otra parte, las mutantes *yda* y *mpk6*, también tienen fenotipos con raíces cortas que manifiestan alteraciones de división celular en la ZM y CQ (López-Bucio *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2009; Smékalová *et al.*, 2014). Estas divisiones anormales que se observaron en estos

genotipos mutantes se han relacionado con la fosforilación, mediada por MPK6, de “MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN 65” (MAP65), el cual es un componente que permite estabilizar los microtúbulos antiparalelos del huso mitótico central durante la transición de la anafase a la citocinesis (Smertenko *et al.*, 2006). Asimismo, una mutante con ganancia de función en YDA, presenta mayores niveles de fosforilación en MAP65, lo que sugiere que podría estar actuando arriba de MPK6 para el control de la división celular en la raíz (**Fig. 10B**) (Smékalová *et al.*, 2014).

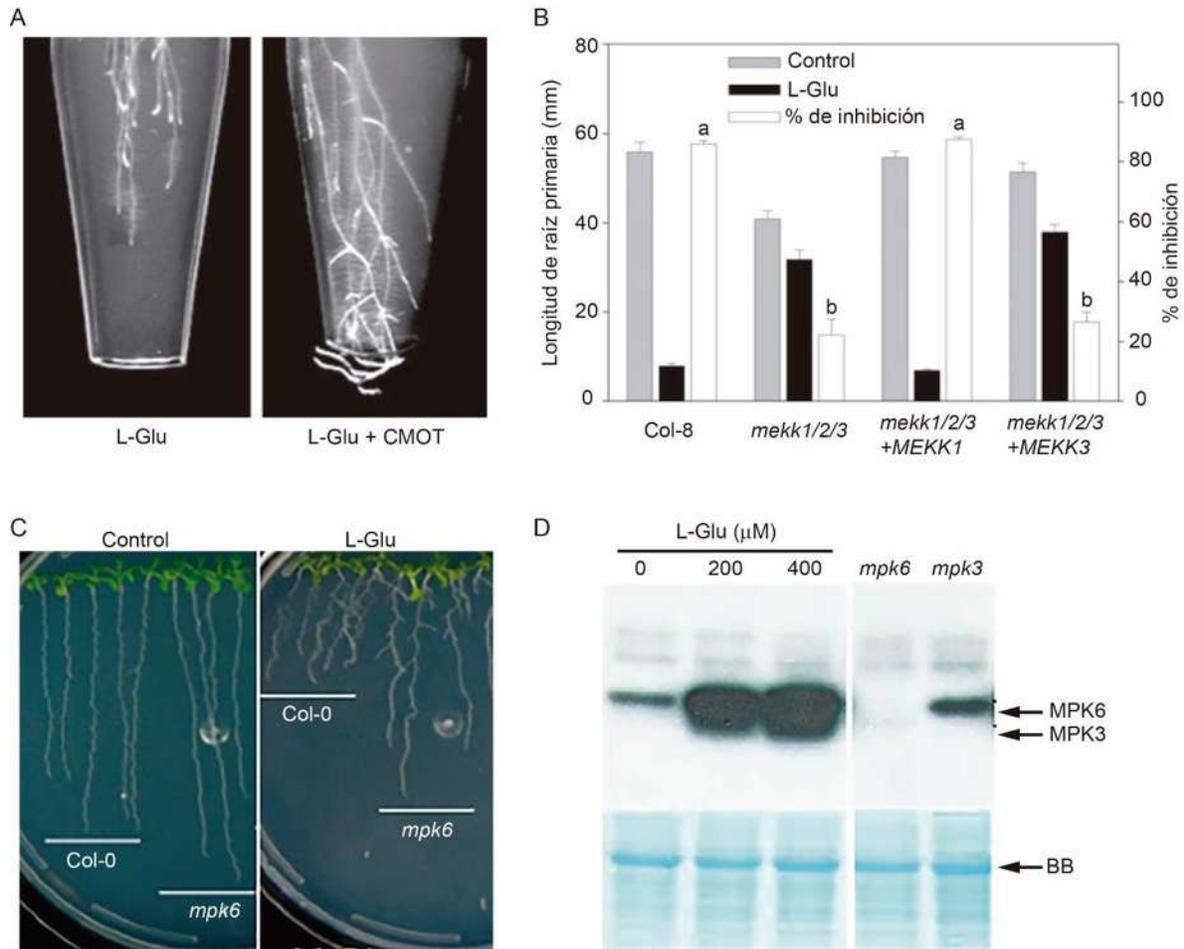


**Figura 10. Vías de señalización de MAPKs.** (A) Esquema general de la señalización de MAPKs. (B) MAPKs implicadas en el desarrollo radicular. Proteínas que aún se desconocen (?). Las flechas representan la regulación positiva de las proteínas o del proceso señalado. Las flechas con extremos romos indican regulación negativa.

Se ha propuesto que las MAPKKK, MAP3K $\epsilon$ 1 y MAP3K $\epsilon$ 2, regulan el crecimiento celular (**Fig. 10B**), ya que la doble mutante, *mapk3 $\epsilon$ 1/mapk3 $\epsilon$ 2*, muestra acortamiento en la raíz y disminución en la elongación de sus células (Chaiwongsar *et al.*, 2012). “BUSHY AND DWARF 1” (BUD1) es otra MAPKKK que controla la arquitectura del sistema radicular (**Fig. 10B**), pues al mutar o sobreexpresar el gen que la codifica, aumenta o disminuye el desarrollo de raíces laterales, respectivamente (Dai *et al.*, 2006). Hasta el momento se desconocen los estímulos y receptores que activan a estas MAPKKK, así como los posibles blancos moleculares.

#### 2.4.2 MAPKs en las respuestas de la raíz a L-Glu

Diversos estudios sugieren que la señalización del L-Glu en la raíz ocurre a través de una vía de proteínas MAPKs. A partir de un escrutinio de 1500 moléculas bioactivas en *Saccharomyces cerevisiae*, Forde *et al.*, (2013) identificaron dos compuestos, el 2-(4-cloro-3-metilfenil)-2-oxoetil tiocianato (CMOT) y 1-(2,6-dimetilfenil)-2,5-dihidro-1H-pirrol-5, diona (DDPD), que inhibieron el efecto del L-Glu en la raíz de *A. thaliana* (**Fig. 11A**). Uno de ellos, el CMOT, funciona como inhibidor de la actividad de una proteína MAPKKK de levaduras “Serine/threonine protein kinase 11” (STE11), la cual es homóloga a la proteína MEKK de *Arabidopsis*. Posteriormente, observaron que una triple mutante afectada en los genes de MEKK (*mekk1/mekk2/mekk3*) fue resistente a la inhibición del crecimiento de la raíz causada por el L-Glu, mientras que la complementación de la mutante con *MEKK1* restauró la sensibilidad al aminoácido (**Fig. 11B**). En nuestro grupo de trabajo, se determinó que la mutante afectada en el gen de la MPK6, también fue resistente al efecto del L-Glu (**Fig. 11C**). Además, el L-Glu promovió la actividad de cinasa de MPK6 (**Fig. 11D**; López-Bucio *et al.*, 2018). Dichas investigaciones, demostraron que en la raíz de *Arabidopsis*, MEKK1 y MPK6 participan en la ruta de señalización del L-Glu.



**Figura 11. Identificación de proteínas MAPKs involucradas en la señalización del L-Glu.** (A) Inhibición del efecto del L-Glu en la raíz mediante la aplicación del 2-(4-cloro-3-metilfenil)-2-oxoetil tiocianato (CMOT). (B) Longitud de la raíz primaria de una planta tipo silvestre (Col-8) y de una triple mutante de *A. thaliana* (*mekk1/2/3*) afectada en genes *MEKK*. (C) Fotografías representativas del crecimiento de la raíz primaria de una planta tipo silvestre (Col-0) y de la mutante *mpk6* bajo condiciones control y de tratamiento de 400  $\mu$ M de L-Glu. (D) Actividad de cinasa de MPK6 registrada mediante un ensayo de fosforilación. Los extractos de proteínas se obtuvieron de plantas de *A. thaliana* (Col-0) previamente crecidas en tratamientos control y en tratamientos con las concentraciones indicadas de L-Glu. Las flechas indican la señal de la actividad de cinasa de MPK6 y MPK3, deducida por comparación con la actividad detectada en las mutantes *mpk6* y *mpk3*. Como control de carga, se muestra un gel de réplica teñido con azul de Comassie (Brilliant Blue, BB). Tomado de Forde *et al.* (2013; A y B) y López-Bucio *et al.* (2018; C y D).

### 3 JUSTIFICACIÓN

El L-glutamato afecta el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana* alterando la distribución de auxinas. Recientemente, se ha demostrado que proteínas MAP cinasas median el efecto del L-glutamato en la raíz. Tanto en plantas como en otros organismos, varios aminoácidos convergen en una misma

vía de señalización para regular procesos celulares. Por lo tanto, es de nuestro interés estudiar si otros aminoácidos además del L-Glu influyen en el crecimiento de la raíz primaria, así como dilucidar la posible interacción entre la vía de auxinas y una cascada de MAP cinasas en este proceso.

## **4 HIPÓTESIS**

La vía de las auxinas y la proteína MPK6 median la respuesta de la raíz primaria de *Arabidopsis* a diferentes aminoácidos con actividad biológica.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

- Analizar la participación de la vía auxínica y de la cinasa MPK6 en las respuestas de la raíz primaria de *Arabidopsis* a diferentes aminoácidos.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar la bioactividad de diferentes aminoácidos sobre el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*.
- Evaluar la participación de la vía de las auxinas en mediar el efecto de los aminoácidos bioactivos sobre crecimiento de la raíz primaria.
- Determinar la participación de MPK6 en la regulación del crecimiento de la raíz primaria en respuesta a los aminoácidos bioactivos.

## **6 RESULTADOS**

**6.1 The growth of *Arabidopsis* primary root is repressed by several and diverse amino acids through auxin-dependent and independent mechanisms and MPK6 kinase activity.**



## The growth of *Arabidopsis* primary root is repressed by several and diverse amino acids through auxin-dependent and independent mechanisms and MPK6 kinase activity

Gustavo Ravelo-Ortega<sup>a</sup>, Jesús Salvador López-Bucio<sup>b</sup>, León Francisco Ruiz-Herrera<sup>a</sup>, Ramón Pelagio-Flores<sup>c</sup>, Juan Ángel Ayala-Rodríguez<sup>a</sup>, Homero Reyes de la Cruz<sup>a</sup>, Ángel Arturo Guevara-García<sup>d</sup>, José López-Bucio<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CP 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

<sup>b</sup> CONACYT-Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CP 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CP 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

<sup>d</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Amino acids  
Biostimulants  
Root development  
Auxin  
MPK6

### ABSTRACT

Amino acids serve as structural monomers for protein synthesis and are considered important biostimulants for plants. In this report, the effects of all 20-L amino acids in *Arabidopsis* primary root growth were evaluated. 15 amino acids inhibited growth, being L-leucine (L-Leu), L-lysine (L-Lys), L-tryptophan (L-Trp), and L-glutamate (L-Glu) the most active, which repressed both cell division and elongation in primary roots. Comparisons of *DR5::GFP* expression and growth of WT *Arabidopsis* seedlings and several auxin response mutants including *slr*, *axr1* and *axr2* single mutants, *arf7/arf19* double mutant and *tir1/afb2/afb3* triple mutant, treated with inhibitory concentrations of L-Glu, L-Leu, L-Lys and L-Trp revealed gene-dependent, specific changes in auxin response. In addition, L- isomers of Glu, Leu and Lys, but not L-Trp diminished the GFP fluorescence of *pPIN1::PIN1::GFP*, *pPIN2::PIN2::GFP*, *pPIN3::PIN3::GFP* and *pPIN7::PIN7::GFP* constructs in root tips. MPK6 activity in roots was enhanced by amino acid treatment, being greater in response to L-Trp while *mpk6* mutants supported cell division and elongation at high doses of L-Glu, L-Leu, L-Lys and L-Trp. We conclude that independently of their auxin modulating properties, amino acids signals converge in MPK6 to alter the *Arabidopsis* primary root growth.

### 1. Introduction

Plants sense changes in environmental conditions as informational cues for growth, development and adaptation [1–4]. Proteins are macromolecules made of combinations of 20-L amino acids that play structural and signaling roles in every tissue and biological process. In addition to serving as block units for proteins, amino acids act as signaling molecules, whose levels readjust both nutritional and metabolic cell responses. In addition, these biomolecules act as osmolytes, phytohormone precursors, cofactors and signaling compounds, and mediate ecological interactions and adaptation to environmental stress [5]. In this regard, particular interest has been paid towards deciphering the functions and mechanisms by which amino acids modify the

architecture of the root system, which ultimately controls water and nutrient uptake and determines biotic and abiotic adaptive responses.

Roots interact with soil microorganisms whose survival depends on root exudates and in turn fungi and bacteria emit bioactive metabolites influencing root behavior. A local and long-distance network links environmental root perception with photosynthesis in leaves, so changes in root architecture, through the modulation of growth, the formation of new branches and epidermal cell readjustments, drive acquisition of mineral nutrients [6]. The dynamism and plasticity of the root system during soil exploration depend on cell division, elongation, and differentiation, which are confined to specialized areas and developmental windows. In the root apex, the meristematic zone is made up of cells with high mitotic activity. After division, cells are displaced towards the

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [gustavo.ravelo@umich.mx](mailto:gustavo.ravelo@umich.mx) (G. Ravelo-Ortega), [jlopezb@conacyt.mx](mailto:jlopezb@conacyt.mx) (J.S. López-Bucio), [ainuropoda@hotmail.com](mailto:ainuropoda@hotmail.com) (L.F. Ruiz-Herrera), [ramon.pelagio@umich.mx](mailto:ramon.pelagio@umich.mx) (R. Pelagio-Flores), [angelayala.ro@hotmail.com](mailto:angelayala.ro@hotmail.com) (J.Á. Ayala-Rodríguez), [delacruz@umich.mx](mailto:delacruz@umich.mx) (H.R. de la Cruz), [aguevara@ibt.unam.mx](mailto:aguevara@ibt.unam.mx) (Á.A. Guevara-García), [jbucio@umich.mx](mailto:jbucio@umich.mx) (J. López-Bucio).

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110717>

Received 13 July 2020; Received in revised form 8 October 2020; Accepted 11 October 2020

Available online 15 October 2020

0168-9452/© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

transition zone, prior to reaching the elongation zone, where they increase in both size and length, and then diversify and specialize in the differentiation zone. The emergence of lateral roots and differentiation of the epidermal cells into root hairs takes place in the differentiation zone, and these traits are of prime importance for agriculture [7,8].

The amino acid L-tryptophan (L-Trp) acts as a precursor of auxin (indole-3-acetic acid, IAA), a phytohormone orchestrating cell division and elongation in roots [9,10]. IAA is unevenly distributed between and across root cell files by efflux and influx transporters [11]. Several nuclear proteins mediate IAA perception and expression of genes involved in numerous plant developmental processes. At low IAA levels, AUX/IAA repressors maintain deactivated the AUXIN-RESPONSE FACTORS (ARFs), but when the endogenous IAA level increases, auxin interacts with its receptors, the TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1), and related proteins to recruit a complex that leads to degradation of AUX/IAA repressors, enabling the transcription of genes [11,12]. During the G1 phase of the cell cycle, auxin induces the expression of *CYCLIN-DEPENDENT KINASE A;1* (CDKA;1) and *D3;1-type cyclin* (CycD3;1) to advance to the S phase [13,14]. It also promotes the expression of CycA2;1, CycA2;2, CycB1;1 and CDKA;1 in G2 phase for the progression to mitosis [14–16]. Cell elongation is also stimulated by auxin via TARGET OF RAPAMYCIN (TOR) activity and the GTPase ROP2 [17]. Moreover, the acidification given at the beginning of the turgor-driven cell expansion depends on the function of ATPases activated by the putative auxin receptor AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1), which is located in the apoplast [18,19]. Noteworthy, inorganic and organic molecules such as secondary metabolites, quorum-sensing signals, and volatiles commonly present in plant rhizospheres, modify the root system architecture affecting auxin signaling, either acting as agonists, antagonists or signal mimics [20,21].

Amino acids also act as signaling elements affecting protein activity, cell signaling, gene expression, and nutrient assimilation. Around the rhizosphere, amino acids may accumulate upon root or microbial exudation and/or degradation of organic matter, and may act as informational molecules [22]. For instance, the primary root of *Arabidopsis* seedlings senses L-glutamate (L-Glu), which antagonizes the response and distribution of auxins in the meristem and columella cells stopping root growth [23,24]. MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINASE KINASE 1 (MEKK1) and MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 (MPK6) have been proposed as mediators of the L-Glu signaling pathway in roots. Both proteins belong into a family of kinases conserved among eukaryotes known as MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASES (MAPKs) [23,25]. MAPKs are classified into three groups: the MAPKKK (MAP Kinase Kinase Kinase) that are activated by specific kinase receptors to consequently phosphorylate the MAPKK (MAP Kinase Kinase), which in turn activates a MAPK (MAP Kinase). The MAPKs can regulate the function of various proteins, including transcription factors, and in plants they mediate defense, environmental stress, developmental adaptation and developmental programs [26].

Given their proposed functions, amino acids can concur on common signaling pathways to control cellular processes. For example, L-arginine (L-Arg), L-leucine (L-Leu), L-lysine (L-Lys), and L-glutamine (L-Gln) promote activation of TOR kinase [27,28]. Besides, six amino acids interact with an ionic channel subunit named GLUTAMATE LIKE-RECEPTOR 3.3 (GLR3.3) to depolarize the *Arabidopsis* cell membrane [29]. It is uncertain which of all 20 L-amino acids could have an impact on the reconfiguration of root architecture and how they work. In this study, trying to understand amino acid function in roots and to gather basic information on their bioactivity, the effects of all 20 L-essential amino acids on growth of the *Arabidopsis* primary root were evaluated. A wide range of amino acid concentrations was applied to *Arabidopsis* seedlings grown axenically on Petri plates *in vitro* to analyze their effects on cell division and elongation, and on the distribution of auxin transporters and signaling responses at the root meristem. Finally, we investigated if the more bioactive amino acids converge in an MPK6-dependent pathway, previously found to be important in decoding the repressing effect of

L-Glu on root growth.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material and growth conditions

*Arabidopsis thaliana* Heyhn Columbia-0 (Col-0), the transgenic lines *CycB1:uidA* [30], *DR5:GFP* [31], *pPIN1::PIN1:GFP* [32], *pPIN2::PIN2:GFP* [33], *pPIN3::PIN3:GFP* [34], *pPIN7::PIN7:GFP* [35]; and the mutants *axr1-3* [36], *axr2-1* [37], *arf7-1/arf19-1* [38], *aux1-7* [39], *slr* [40], *tir1/afb2/afb3* [41] and *mpk6-2* (SALK\_073907; [42]), were used for the experiments. Generation of *mpk6/CycB1:uidA*, was done by outcrossing *mpk6-2* with pollen from the transgenic line to obtain the F1 progeny, and the corresponding plants were allowed to self-fertilize to recover the F2 generation. We identified homozygous seedlings through assessing the resistance of their primary roots to L-Glu in root growth assays. The presence of the markers was confirmed by X-Gluc staining for GUS activity. The seedlings were propagated for at least three generations.

Seeds were disinfected with 95% (v/v) ethanol for 5 min, 20% (v/v) bleach for 7 min, and washing five times with sterilized, distilled water. After a cold stratification (5 °C) of two days, seeds were germinated and grown on agar plates containing 0.2x MS media (Murashige and Skoog basal salts mixture, M524; Phytotechnology). Phytagar (micro-propagation grade, Phytotechnology) was applied to solidify the media, and seeds were sown at one side of the plate and allowed to grow vertically, at an angle of 65° from the surface of the medium to allow root growth following the gravity vector. The plates were kept in a growth cabinet (Percival AR-95 L) with a photoperiod of 16 h of light/ 8 h darkness, a light intensity of 300  $\mu\text{mol}/\text{m}^{-2}/\text{s}^{-1}$ , and a temperature of 22 °C. The seedlings were transferred into different media four days after germination, the control condition included agar-solidified 0.2x MS medium, and the treatments were supplemented with several concentrations of commercially available sources of amino acids (Sigma).

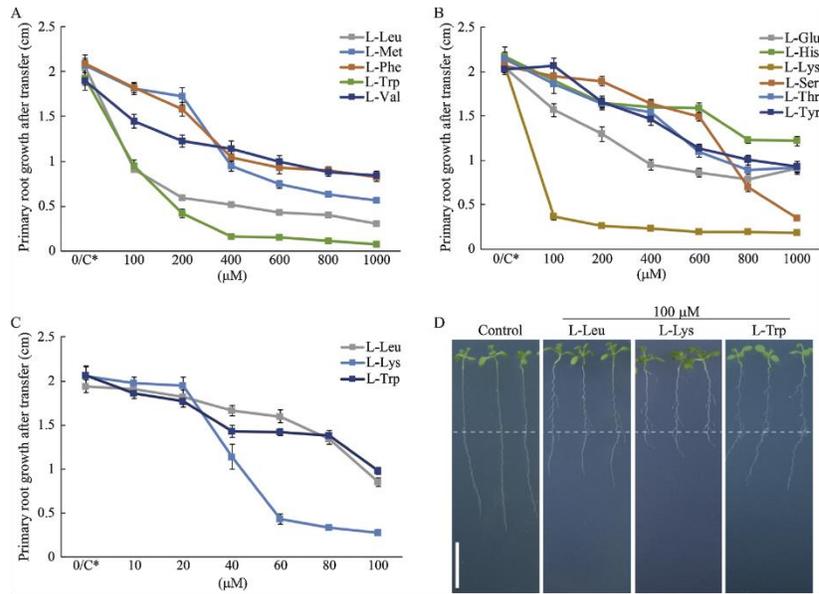
For the direct application of amino acids in specific parts of the root, *Arabidopsis* (Col-0) seedlings were transferred to a vertical two-layer split plate system. The primary root apex was exposed to medium without amino acids in the lower layer while the rest of the root was in contact with the respective treatment (0.2x MS medium supplemented with an amino acid) in the upper layer, and vice versa. The root growth was analyzed 5 days after transfer.

### 2.2. Measurement of cells and cell zones

For the study of the root cell zones, the roots were photographed with the Nomarski optics on a Leica DM500B microscope. Then the length of the meristematic zone and elongation zone were measured using ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Also, the cortical cells of the elongation zone were quantified and measured. For each treatment 15 seedling were analyzed and the experiments were replicated at least three times.

### 2.3. Histochemical analysis

For histochemical analysis of transgenic line *CycB1:uidA*, seedlings were stained and incubated overnight at 37 °C in a X-Gluc reaction buffer (0.5 mg mL<sup>-1</sup> 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronide in 100 mM sodium phosphate, pH 7). The stained plants were cleared and fixed with 0.24 N HCl in 20% methanol (v/v) and incubated for 60 min at 62 °C. The solution was substituted by 7% NaOH (w/v) in 60% ethanol (v/v) for 20 min at room temperature. Plants were dehydrated with ethanol treatments at 40, 20 and 10% (v/v) for 24 h each, and fixed in 50% glycerol (v/v). The processed roots were placed on glass slides and sealed with commercial nail varnish. At least 9 transgenic plants were analyzed for each treatment using the Nomarski optics on a Leica DM500B microscope.



**Fig. 1.** Different amino acids affect the primary root growth. *Arabidopsis* (Col-0) seedlings were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with indicated concentrations of L-amino acids. C\*, control treatment. (A, B) Primary root growth measured 5 days after transfer. (C) Primary root growth on adjusted concentrations of the more bioactive amino acids, and (D) representative photographs of control and 100  $\mu\text{M}$  treatments with indicated amino acids. The dashed line represents the starting point of root growth after transfer. Scale bar = 1 cm. Values shown represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 24$ ) following a Tukey test analysis ( $P \leq 0.05$ ). Means and statistical differences are shown in Tables S1 and S2.

#### 2.4. Confocal imaging

For analysis of transgenic lines expressing GFP, roots were stained with 10 mg/mL propidium iodide for 1 min, then rinsed in water and mounted in 50 % (v/v) glycerol on microscope slides. Fluorescence signal emitted from each transgenic root in vivo was analyzed on several levels in a confocal microscope (Olympus FV1000 equipped with an objective lens Olympus PlanFlour N40X and a digital camera) at wavelengths specific to propidium iodide (568 nm excitation line and emission SP detector of 585–610 nm) and GFP (488 nm excitation line and emission SP detector of 500–550 nm). The propidium iodide and GFP images were electronically overlaid to obtain the final image. The fluorescence issued by root cells was quantified using ImageJ software

(<https://imagej.nih.gov/ij/>).

#### 2.5. In-gel kinase assays

Total proteins were extracted from roots or shoots of *Arabidopsis* seedlings grown in different treatments. The plants were ground in liquid nitrogen and homogenized in extraction buffer: 250 mM sorbitol, 50 mM HEPES-BTP pH 7.8, 10 mM NaF, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM KCl, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF and 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), then centrifuged at  $12,000 \times g$  20 min at 4  $^\circ\text{C}$ . Protein concentration was estimated with the Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. The *in-gel* kinase assay was performed as

**Table 1**  
Effect of all 20 L-amino acids in growth of *Arabidopsis* primary roots.

Bioactivity level	L-amino acids	Concentration ( $\mu\text{M}$ )						
		0 / $^\circ\text{C}$	100	200	400	600	800	1000
None	Asp	2.06	2.01	2.08	2.1	2.07	2.03	2.07
	Cys	2.03	2.06	1.98	2.08	2.16	2.07	1.88
	Gln	1.94	1.98	2.03	1.92	1.96	1.99	1.99
	Gly	1.95	1.90	1.95	2.08	2	1.78	1.79
	Pro	2.07	1.98	2.14	2.07	2.01	1.94	2.01
	Ala	1.97	1.71	* 1.56	* 1.55	* 1.53	* 1.55	* 1.45
Low	Arg	2.12	2.05	2.06	1.87	* 1.8	* 1.81	* 1.81
	Asn	2.14	2.02	1.94	* 1.80	* 1.63	* 1.6	* 1.46
	Ile	2.09	* 1.77	* 1.61	* 1.50	* 1.54	* 1.51	* 1.50
	Glu	2.04	* 1.56	* 1.29	* 0.95	* 0.86	* 0.78	* 0.90
	His	2.17	* 1.89	* 1.65	* 1.6	* 1.58	* 1.22	* 1.21
	Met	2.06	1.81	* 1.72	* 0.94	* 0.74	* 0.63	* 0.56
Moderate	Phe	2.08	* 1.81	* 1.58	* 1.04	* 0.92	* 0.9	* 0.81
	Ser	2.06	1.95	1.89	* 1.63	* 1.49	* 0.69	* 0.34
	Thr	2.14	1.85	* 1.63	* 1.54	* 1.09	* 0.89	* 0.91
	Tyr	2.02	2.06	* 1.65	* 1.46	* 1.12	* 1.01	* 0.92
	Val	1.9	* 1.45	* 1.22	* 1.14	* 0.99	* 0.87	* 0.84
	Leu	2.05	* 0.90	* 0.59	* 0.51	* 0.43	* 0.4	* 0.30
High	Lys	2.06	* 0.36	* 0.26	* 0.23	* 0.18	* 0.18	* 0.18
	Trp	1.92	* 0.95	* 0.41	* 0.15	* 0.15	* 0.11	* 0.07

Values shown (cm) represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 24$ ) following a Tukey test analysis ( $P \leq 0.05$ ). Asterisk symbol indicates statistical differences between the concentrations tested with each amino acid and the control treatment ( $^\circ\text{C}$ ).

**Table 2**

Effect of the more bioactive amino acids on the primary root growth at low concentrations.

L-amino acids	Concentration ( $\mu\text{M}$ )						
	0 / °C	10	20	40	60	80	100
Leu	1.94	1.90	1.81	1.66	* 1.59	* 1.34	* 0.85
Lys	2.05	1.97	1.94	* 1.13	* 0.43	* 0.33	* 0.28
Trp	2.06	1.86	1.77	* 1.43	* 1.41	* 1.37	* 0.98

Values shown (cm) represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 24$ ) following a Tukey test analysis ( $P \leq 0.05$ ). Asterisk symbol indicates statistical differences between the concentrations tested with each of the amino acids and the control treatment (°C).

previously described [43]. 50  $\mu\text{g}$  of protein extracted from plant tissue were fractionated onto a 10 % SDS-PAGE gel containing 0.25 mg/mL of myelin basic protein (MBP; Sigma), as MPK6 substrate. After electrophoresis, the gel was washed three times with 25 mM Tris pH 7.5, 0.5 mM DTT, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 mM NaF, 0.5 mg/mL BSA, and 0.1 % (v/v) Triton X-100 for 30 min at room temperature. Proteins in the gel were re-natured by incubating the gel in 25 mM Tris pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , and 5 mM NaF at 4 °C overnight with three changes. The kinase reactions were carried out by incubating the gel in 30 mL of the reaction buffer (25 mM Tris pH 7.5, 2 mM EGTA, 12 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM DTT, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 200 nM ATP) and 50  $\mu\text{Ci}$  of  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (4000 Ci/mmol; 1 Ci = 37 GBq) for 60 min at room temperature. To remove free  $^{32}\text{P}$ , the gel was extensively washed at room temperature with several changes of 5 % (w/v) trichloroacetic acid and 1 % (w/v)  $\text{NaPO}_4$  until  $^{32}\text{P}$ -radioactivity in the wash solution was barely detectable. The gel was dried and exposed to a Kodak XAR-5 film. Pre-stained

size markers (Bio-Rad, Hercules CA) were used to calculate the molecular weight of kinases. As a loading control, 20  $\mu\text{g}$  of proteins from the same extracts used for kinase assays were fractionated in a 10 % SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue dye.

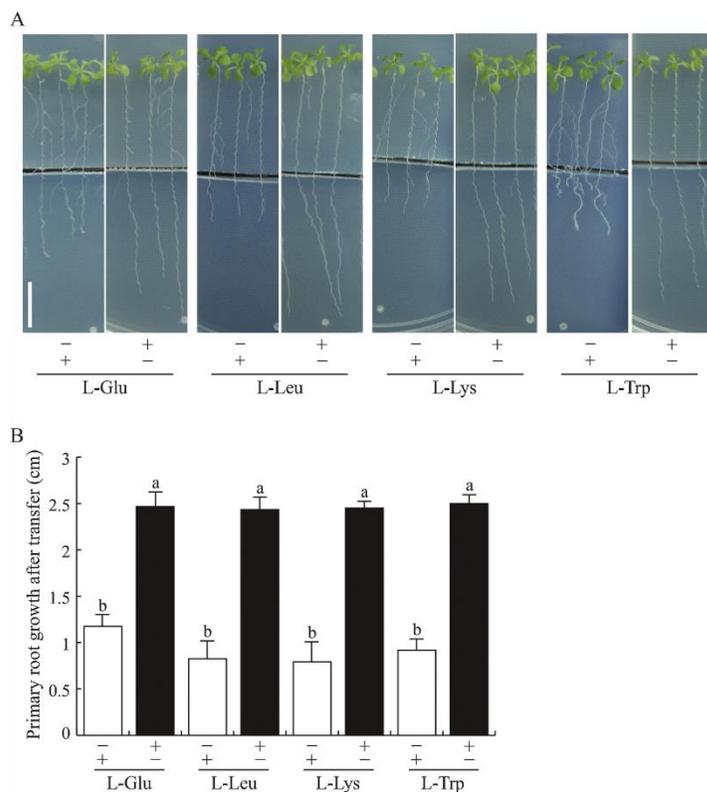
## 2.6. Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times to assess reproducibility of the effects of all amino acids and concentrations applied. All graphs show mean values for the correspondent variable  $\pm$  the standard deviation, and letters or asterisks indicate statistically significant differences. One-way variance analysis (Student's  $t$  test) and a Tukey significance test ( $P \leq 0.05$ ) were performed to all data with the STATISTICA software (StatSoft, 2010).

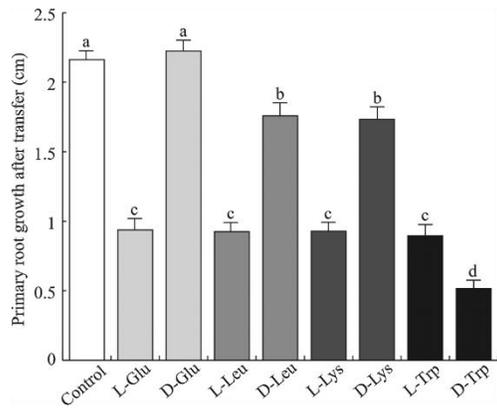
## 3. Results

### 3.1. Several L-amino acids repress Arabidopsis primary root growth

*Arabidopsis* WT (Col-0) seedlings were transferred onto agar-solidified MS 0.2x media supplemented with each of the 20 L-amino acids to analyze their effects on root growth. The initial concentration range assayed for each amino acid was between 100–1000  $\mu\text{M}$ . The results showed that eleven amino acids affected at least 40 % the growth of the primary root (Fig. 1A and B). Four amino acids slightly diminished root length, and five had no apparent, phenotypical effect (Table 1). L-Leu, L-Lys, and L-Trp are the more active amino acids in reducing root length as their effects were evident since 100  $\mu\text{M}$ . A lower range of concentrations was examined to these amino acids, from them L-Lys was the most active, showing 50 % growth inhibition at 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 1C and



**Fig. 2.** The root apex is the zone where amino acids are perceived. *Arabidopsis* (Col-0) seedlings were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media. Then, using a vertical two-layer split plate system, the root tip or the root upper part were simultaneously exposed to control treatment (-) or amino acid treatment (+). Amino acid concentrations applied were: L-Glu (400  $\mu\text{M}$ ), L-Leu (100  $\mu\text{M}$ ), L-Lys (40  $\mu\text{M}$ ), and L-Trp (100  $\mu\text{M}$ ). 5 days later, (A) representative photographs were taken, and (B) the primary root growth was recorded. Scale bar = 1 cm. Values shown represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 24$ ). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ( $P \leq 0.05$ ).



**Fig. 3.** Effect of L- and D-amino acids on the primary root growth. *Arabidopsis* (Col-0) seedlings were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with L- or D-amino acids. Amino acid concentrations applied were: L- and D-Glu (400  $\mu$ M), L- and D-Leu (100  $\mu$ M), L- and D-Lys (40  $\mu$ M), L- and D-Trp (100  $\mu$ M). After 5 days, the primary root growth was recorded. Values shown represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 24$ ). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ( $P \leq 0.05$ ).

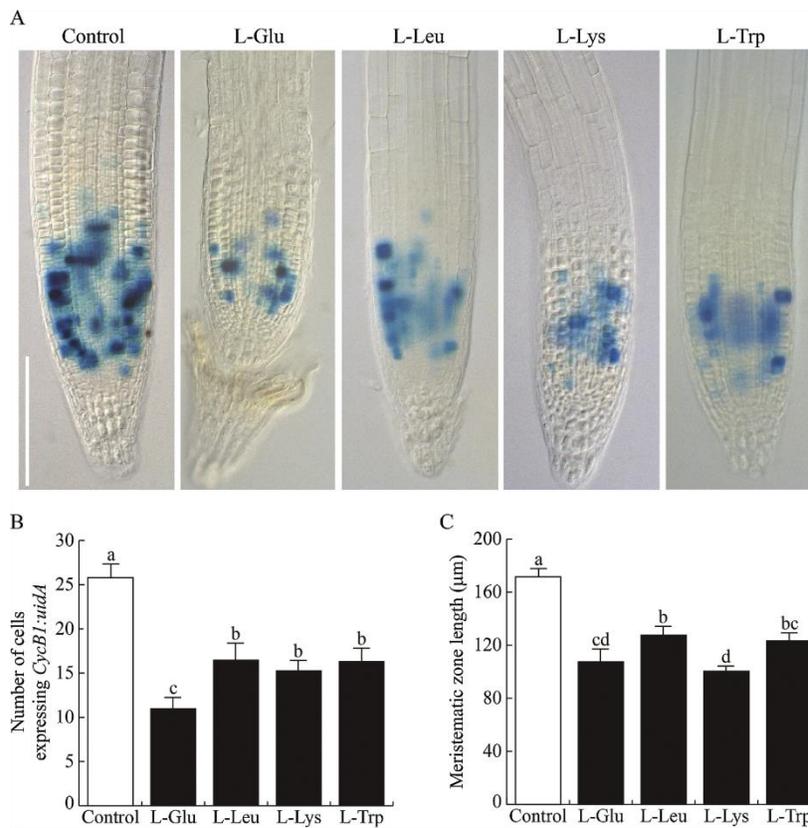
D). Given antecedents and their potent activities, as well as the concentrations at which they inhibit 50 % root growth, L-Glu, L-Leu, L-Lys, and L-Trp were chosen for subsequent experiments (Table 2).

### 3.2. Amino acids are perceived at the root tip

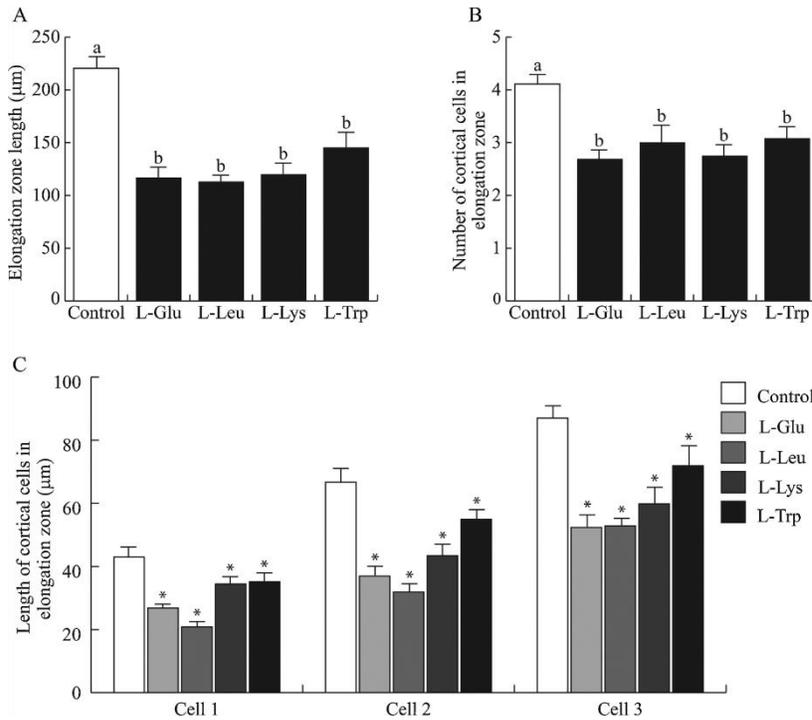
Trying to reveal the root site for amino acid sensing, each of those four selected amino acids was locally applied at the primary root apex or the upper root zone, and after 5 days of treatment, the root growth was assessed. The growth of primary roots was only affected when the apex was exposed to the biomolecules, indicating that the root tip is the zone of amino acid perception (Fig. 2A and B). Additionally, we compared the inhibitory effect on the primary root growth between L- and D-amino acids. D-Glu had no inhibitory effect, D-Leu and D-Lys were less bioactive than their L-counterparts, while D-Trp was more active than the L-configuration (Fig. 3). These results suggest that the spatial arrangement of the amino group determines the bioactivity level of the assayed amino acids, and that not only L-amino acids but also D amino acids may strongly repress root growth.

### 3.3. Amino acids affect cell division and elongation in the primary root

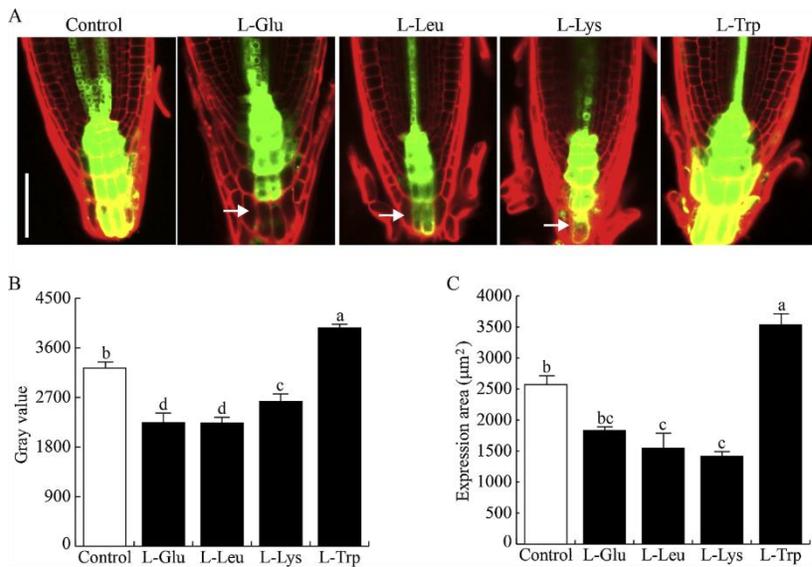
The root apical meristem is composed of cells that have a high mitotic activity, which subsequently migrates toward the elongation zone to grow and differentiate. This enables an indeterminate growth pattern of the primary root, which enables deep growth into the ground and overall soil exploration [8]. The expression of *CycB1:uidA* mitotic marker and cell length measurements were analyzed to determine if



**Fig. 4.** Cell division is impaired by several amino acids. *Arabidopsis* seedlings expressing *CycB1:uidA* were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with the specified amino acids. After 5 days, seedlings were analyzed. Amino acid concentrations applied were: L-Glu (400  $\mu$ M), L-Leu (100  $\mu$ M), L-Lys (40  $\mu$ M), and L-Trp (100  $\mu$ M). (A) Representative photographs of *CycB1:uidA* expression in primary roots. Scale bar 100  $\mu$ m. (B) Number of dividing cells and (C) meristematic zone length. Values shown represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 15$ ). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ( $P \leq 0.05$ ).



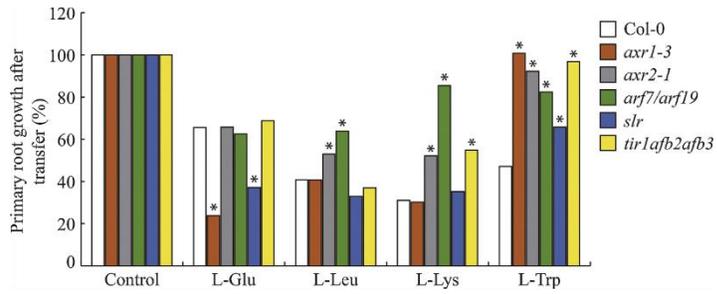
**Fig. 5.** Amino acids alter cell growth processes in the elongation zone of the primary root. *Arabidopsis* (Col-0) seedlings were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with the specified amino acids. After 5 days, seedlings were analyzed. Amino acid concentrations applied were: L-Glu (400 µM), L-Leu (100 µM), L-Lys (40 µM), and L-Trp (100 µM). (A) Elongation zone length. (B) Number and (C) length of cortical cells in elongation zone. Values shown represent the mean ± standard deviation (n = 15). Letters and asterisks indicate statistical differences following a Tukey test analysis (P ≤ 0.05).



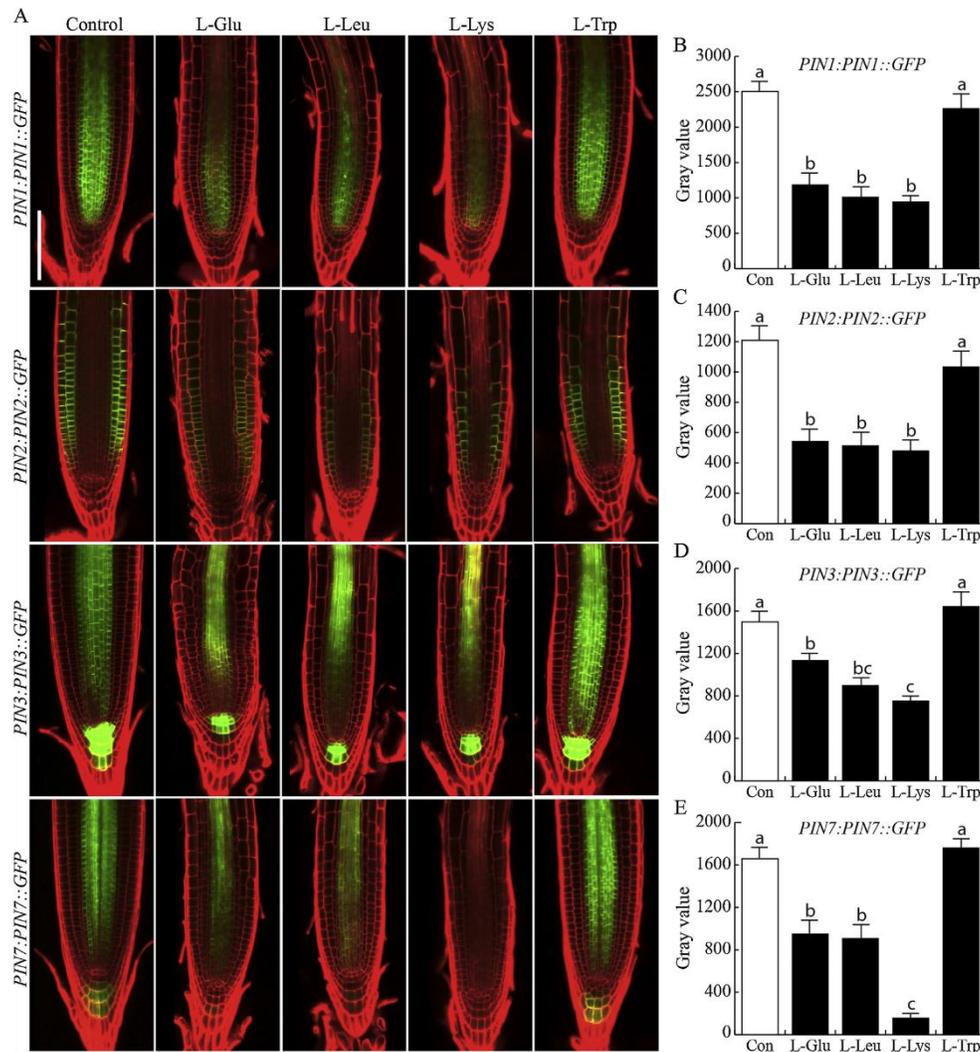
**Fig. 6.** Amino acids modify the auxin response around the root initial cells. *Arabidopsis* DR5:GFP seedlings were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with the specified amino acids. After 3 days, seedlings were stained with propidium iodide and analyzed by confocal microscopy. Amino acid concentrations applied were: L-Glu (400 µM), L-Leu (100 µM), L-Lys (40 µM), and L-Trp (100 µM). (A) Representative photographs of primary root tips expressing DR5:GFP. White arrows indicate decreased expression of DR5:GFP in columella cells. Scale bar 50 µm. (B) Intensity and (C) area of GFP fluorescence were determined. Values shown represent the mean ± standard deviation (n = 10). Letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis (P ≤ 0.05).

L-Glu, L-Leu, L-Lys, and L-Trp affect cell division and/or cell elongation. After exposure to each amino acid, *Arabidopsis* seedlings showed reduced number of dividing cells and meristematic zone length (Fig. 4A–C). Moreover, the elongation zone length as well as the number and length of cortical cells were smaller than the control (Fig. 5A–C). These observations indicate that L-isomers of Glu, Leu, Lys, and Trp led

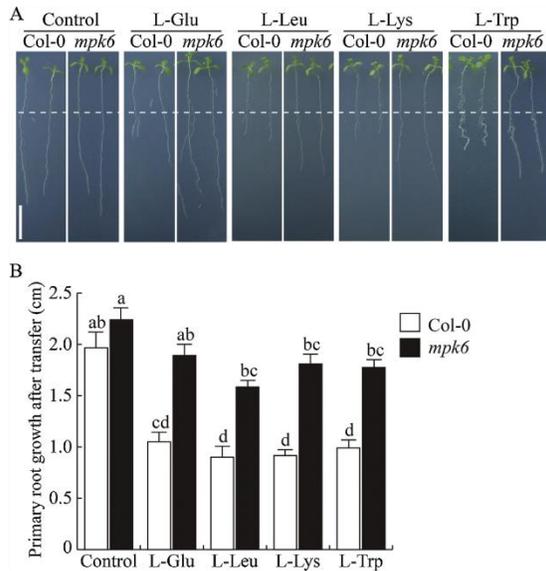
to the formation of short primary roots affecting cell division and elongation.



**Fig. 7.** Sensitivity of WT *Arabidopsis* seedlings and auxin-related mutants to highly active L-amino acids. *Arabidopsis* WT (Col-0) and mutants of genes related to the auxin signaling, were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with the indicated amino acids. After 5 days, the primary root growth was recorded. Amino acid concentrations applied were: L-Glu (400  $\mu$ M), L-Leu (100  $\mu$ M), L-Lys (40  $\mu$ M), and L-Trp (100  $\mu$ M). The values were normalized to 100 % owing to the differences at the root length of WT and mutant plants in MS 0.2x media without amino acids. Asterisks indicate statistical differences against Col-0 determined by a  $\chi^2$  test ( $n = 24$ ) followed by an analysis of proportions ( $P \leq 0.05$ ).



**Fig. 8.** Expression of GFP driven by PIN constructs are diminished by L-Glu, L-Leu and L-Lys but not by L-Trp. Seedlings of *Arabidopsis* lines expressing *pPIN1::PIN1::GFP*, *pPIN2::PIN2::GFP*, *pPIN3::PIN3::GFP*, and *pPIN7::PIN7::GFP*, were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with the specified amino acids. After 3 days, seedlings were stained with propidium iodide and analyzed by confocal microscopy. Amino acid concentrations applied are: L-Glu (400  $\mu$ M), L-Leu (100  $\mu$ M), L-Lys (40  $\mu$ M), and L-Trp (100  $\mu$ M). (A) Representative photographs of primary root tips. Scale bar 100  $\mu$ m. (B, C, D, E) The GFP fluorescence intensity was quantified. Values shown represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 10$ ). Letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ( $P \leq 0.05$ ).



**Fig. 9.** *mpk6* Arabidopsis mutant is less sensitive to the root growth repressing effect of several amino acids. Seedlings of *Arabidopsis* WT (Col-0) and mutant *mpk6* were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with the indicated amino acids. Amino acid concentrations applied are: L-Glu (400  $\mu$ M), L-Leu (100  $\mu$ M), L-Lys (40  $\mu$ M), and L-Trp (100  $\mu$ M). After 5 days, (A) representative photographs were taken, and (B) the primary root growth was recorded. The dashed line represents the starting point of root growth after transfer. Scale bar = 1 cm. Values shown represent the mean  $\pm$  standard deviation ( $n = 24$ ). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.4. Effect of amino acids on auxin responsive gene expression in primary root

An auxin gradient, specifically located at the root apex, enables the expression of genes involved in maintaining the undifferentiated status of cells and the mitotic activity of the root meristem [44]. The auxin-inducible *DR5::GFP* transgene was used to evaluate if amino acids that strongly inhibit primary root growth could alter the auxin response in the root meristem. *Arabidopsis* seedlings were transferred to amino acid treatments and their growth and GFP expression was monitored after 3 days. L-Glu, L-Leu, and L-Lys diminished the auxin response and the GFP expression area around the stem cell niche and columella (Fig. 6A–C). Conversely, L-Trp increased both registered variables. These data imply that the short root phenotype caused by L-isomers of Glu, Leu, Lys and Trp correlate with either a reduced or enhanced auxin response.

### 3.5. Genetic dissection of the primary root response to amino acids

To study the participation of auxin signaling components mediating the effect of amino acids, we compared the primary root growth between WT *Arabidopsis* seedlings and several auxin response mutants treated with L-Glu, L-Leu, L-Lys and L-Trp. The genotypes with a gain-of-function mutation in the repressor *AUX/IAA14* (*slr*), as well as mutants affected in the gene encoding the AXR protein (*axr-1*), were hypersensitive to L-Glu when compared to the WT (Fig. 7). Another genotype with a gain-of-function mutation in the auxin repressor *AXR2* (*axr2-1*) and the double mutant in *ARF* genes (*arf7/arf19*) were less sensitive than the WT to L-Leu, and L-Lys (Fig. 7). The triple mutant defective of auxin receptors

*tir1/afb2/afb3*, also was resistant to L-Lys. In contrast, all five tested mutants exhibited clear resistance to the inhibitory effects of L-Trp (Fig. 7). These results imply that although the effects of amino acids repressing root growth are comparable, their mechanisms of action involve auxin-dependent and -independent mechanisms.

### 3.6. L-Glu, L-Leu, and L-Lys but not L-Trp affect the level of PIN proteins in the Arabidopsis primary root tip

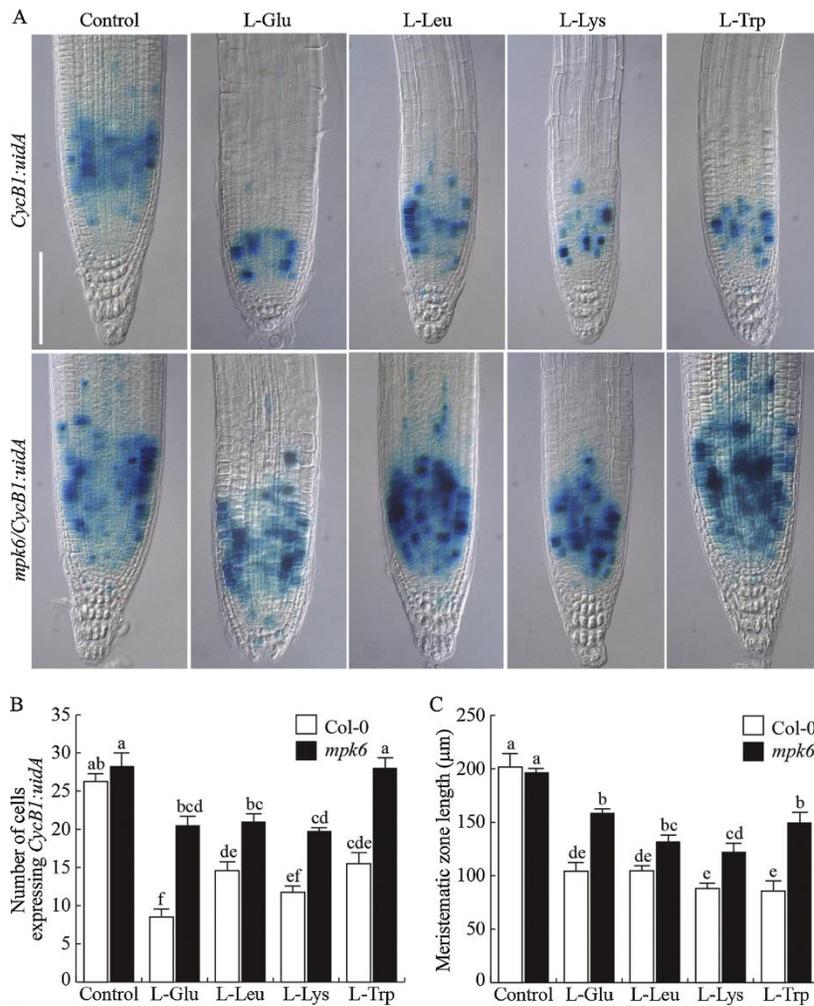
PIN-FORMED (PIN) transporters control the auxin efflux from cell to cell, helping to produce its constant mobilization and to preserve a precise level of this phytohormone in the root meristem [11]. To determine if L-Glu, L-Leu, L-Lys and L-Trp alter the amount of auxin transporters within primary root tips, we analyzed *pPIN1::PIN1::GFP*, *pPIN2::PIN2::GFP*, *pPIN3::PIN3::GFP*, and *pPIN7::PIN7::GFP* signals in response to these amino acids. L-isomers of Glu, Leu, and Lys diminished the GFP-driven fluorescence level of PIN1, PIN2, PIN3, and PIN7, in contrast, Trp did not affect the fluorescence signals (Fig. 8). We conclude that L-Glu, L-Leu, and L-Lys, antagonizes auxin flux due to the reduction of the PIN proteins. However, L-Trp appears to repress growth without changing PIN protein levels in roots.

### 3.7. MPK6 mediates the growth repressing effects of amino acids in Arabidopsis primary roots

Studies in mammals and plants have reported the activation of proteins involved in cell signaling by distinct amino acids. In *Arabidopsis*, the primary root responses to L-Glu require a signaling of MAPKs that includes MEKK1 and MPK6 [23,25]. Therefore, we investigated if L-Glu, L-Leu, L-Lys, and L-Trp root responses converge in MPK6. We exposed WT and homozygous *mpk6* mutants to treatments with amino acids, and after five days the primary root length was measured. The results showed that the *mpk6* root was less sensitive to the effect of the four amino acids tested (Fig. 9A and B). Concomitantly, the expression of *CycB1::uidA* and cell length measurements revealed that unlike WT seedlings, the *mpk6* mutant maintained a higher rate of cell division and elongation in response to amino acids (Fig. 10A–C). MPK6 activity in roots was also enhanced by amino acids treatment, being greater in response to L-Trp treatments, while the samples obtained from shoots showed a minimal signal of kinase activity (Fig. 11). These results suggest that MPK6 orchestrates the signaling of different amino acids in root cells to alter primary root growth.

## 4. Discussion

Root growth and development are influenced by inorganic and organic molecules present in the soil, some of which may act as nutrient resources or in cell signaling. The nitrogen level in most soils is deficient, therefore to optimize the growth of plants, fertilization is required [45]. Plants mainly take nitrogen from inorganic sources (nitrate or ammonium), but they can also obtain this nutrient from organic compounds (urea, peptides, and amino acids). For ammonium assimilation by plant cells, it is first incorporated into L-Glu, obtaining L-Gln [46]. Although the nutritional role of amino acids has been investigated in animal and plants, their functions as modulators or plant morphogenesis has just begun to be clarified. Here, we showed that several amino acids, indistinctly the group to which they belong according to their physical-chemical properties, diminished the primary root growth of *Arabidopsis* and this helps to reconfigure the whole architecture of the root, triggering the formation of novel branches. The more bioactive amino acids (L-Leu, L-Lys, and L-Trp) reduced approximately 50 % the primary root growth at concentrations between 40–100  $\mu$ M. In contrast, at least 1 mM of ammonium is needed to achieve the reduction percentage of the root length produced by these amino acids [47]. These data suggest that amino acids modify root growth through a mechanism independent of nitrogen assimilation. This assumption is supported by



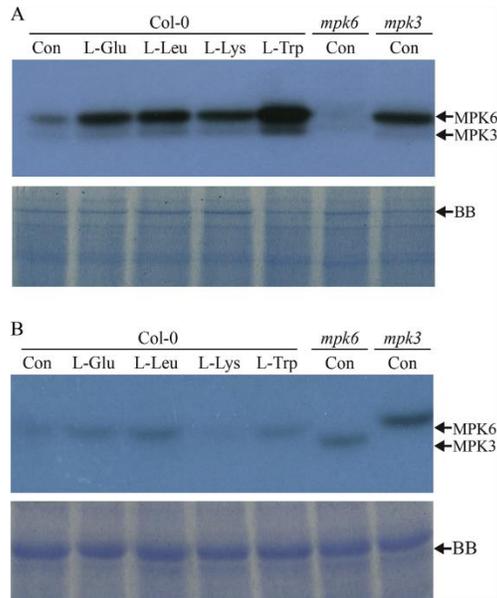
**Fig. 10.** The primary roots of *Arabidopsis mpk6* mutants maintain more cell division than WT in response to amino acids. *Arabidopsis* (Col-0) seedlings expressing *CycB1:uidA* and homozygous *mpk6/CycB1:uidA* were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with the specified amino acids. After 5 days, seedlings were analyzed. Amino acid concentrations applied are: L-Glu (400 μM), L-Leu (100 μM), L-Lys (40 μM), and L-Trp (100 μM). (A) Representative photos of *CycB1:uidA* and *mpk6/CycB1:uidA* on control condition and treatments with indicated amino acid are shown. Scale bar 100 μm. (B) Number of dividing cells and (C) meristematic zone length in WT (Col-0) and *mpk6* genotypes were recorded. Values shown represent the mean ± standard deviation ( $n = 15$ ). Different letters indicate statistical differences following a Tukey test analysis ( $P \leq 0.05$ ).

previous research showing that exogenous L-Glu treatments of *Arabidopsis* roots affect growth apparently antagonizing auxin signaling. Thus, L-Glu activity as well as that of three additional molecules, namely Leu, Lys, and Trp is unlikely to be explained by a nutritional effect, but rather they may act as signal molecules perceived at the root apex [23, 24].

The root cap and the transition zone, both located in the root apex, are responsible for sensing environmental stimuli or signals from microorganisms and other plants that modify root growth. For example, the root cap mediates responses to several tropisms, while the transition zone senses the availability of aluminum and phosphate [48,49]. L-isomers of Glu, Leu, Lys, and Trp reduced the primary root length only when they were applied at the root apex, but not to the lateral root area, a result that delimits the possible perception sites of these biomolecules. Different amino acids appear to use the same transporter proteins to move inside root cells and be mobilized to different cell layers. L-Glu, L-His, and neutral amino acids are substrates of AMINOACID PERMEASE 1 (AAP1), and L-Arg and L-Lys of AMINOACID PERMEASE 5 (AAP5). Furthermore, LYSINE HISTIDINE TRANSPORTER 1 (LHT1) takes up at least five amino acids, including L-Glu [50,51]. All mentioned transporters are localized in root apex areas [52].

It is still unknown the nature of the components that mediate the first steps in the signaling of amino acids that alter root growth. *Arabidopsis* GLUTAMATE-LIKE RECEPTORS (GLRs) and their homologous mammalian ionotropic Glu Receptors (iGluRs), control the flux of ions to depolarize the cell membrane in response to L-Glu [53]. However, GLR3.3 participates in sensing of several amino acids to promote membrane depolarization [29]. In the processes mentioned, amino acids could share a mechanism to modify the root development as L-Glu, L-Leu, L-Lys, and L-Trp had the same targets to inhibit the primary root growth, all of them altered the cell division and elongation programs.

Auxins are major phytohormones responsible for regulating root growth, promoting cell division and growth in the meristem and elongation zone, respectively. In one of the Trp-dependent pathways for IAA synthesis, cytochrome P450 enzymes (CYP79B2 and CYP79B3) catalyze the conversion of L-Trp to indole-3-acetaldoxime (IAOx). A reduction in the primary root growth of *Arabidopsis* results either from CYP79B2 overexpression, that maintains high levels of IAA, or the *cyp79B2/cyp79B3* double mutation, that exhibits low levels of IAA [54]. Noteworthy, mutants defective in auxin transporters, such as *pin1* and *pin2*, have a short root phenotype [35], suggesting that both a dysfunctional auxin biosynthesis or transport, impair the indeterminate root growth



**Fig. 11.** Several amino acids induce MPK6 activity in roots. In-gel kinase assays were executed with 50  $\mu$ g of total protein extracts from 7-day-old seedlings under the following conditions: (A) Roots or (B) shoots excised from WT (Col-0) seedlings that were germinated and grown on MS 0.2x media, then transferred to the same media or media supplemented with the indicated amino acids for 60 min. Amino acid concentrations applied were: L-Glu (400  $\mu$ M), L-Leu (100  $\mu$ M), L-Lys (40  $\mu$ M), and L-Trp (100  $\mu$ M). In each assay Coomassie Brilliant Blue stained gels (BB) are shown as the loading controls. Protein extract from the *mpk6* and *mpk3* mutant seedlings grown on MS 0.2x media was included in assays to identify the corresponding kinase, which is indicated by arrows (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

program in *Arabidopsis*. In this sense, some amino acids that halt root growth decreased the responses to auxins (i.e. L-Glu, L-Leu, and L-Lys), while L-Trp, considered the precursor for IAA biosynthesis in plants, might increase auxin biosynthesis. Furthermore, the GFP fluorescence driven by PIN transporters fused to their own promoters were only reduced by L-Glu, L-Leu, and L-Lys, but not by L-Trp, suggesting that the first three amino acids modified root growth by decreasing transport of auxin, while the effect of L-Trp appears to be independent of auxin transport. Each of the auxin-related signaling mutants whose growth was compared to the WT was resistant to the L-Trp treatment, but only some of them were resistant to L-Leu and L-Lys. In contrast, the L-Glu effect caused a hypersensitive response in *slr* and *axr1-3* mutants. Thus, these amino acids could impact at the same time on other signaling and metabolic processes, creating a specific interaction with the auxin signaling machinery. The selectivity of some auxin signaling components to alter the root growth is also observed in the bioactivity of various auxins or other compounds [55,56].

Plant MAPK signaling cascades, in addition to coordinating defense and stress responses, participate in the regulation of different developmental processes [26]. Previously, it was reported that MEKK1 and MPK6 coordinate the root growth in response to L-Glu [23,25]. In this work, we observed that L-Leu, L-Lys, and L-Trp also converge in MPK6 kinase to reduce primary root growth. Several studies have indicated that specific MAPKs can be activated by more than one molecule to control a particular plant development process. For example, the TOO MANY MOUTH (TMM) receptor senses the EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 (EPF1) and EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 (EPF2),

two small peptides implicated in regulating stomatal development [57, 58]. A MAPKs signaling cascade activated by TMM that includes MPK6 phosphorylates the transcription factor SPEECHLESS (SPCH) [59–61]. Also, EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE 4 (EPFL4) and EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE 6 (EPFL6) are other signal peptides that regulate the inflorescence architecture through ERECTA (ER) receptor and the YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MKP6 module [62,63]. Our results support MPK6 as a key component involved in primary root responses to growth repressing amino acids, independently of their function as agonist or antagonist of the auxin signaling pathway. *SLR* and *AXR-1* could negatively regulate the signaling of L-Glu mediated by MPK6. Furthermore, these data suggest that the effect of L-Leu and L-Lys share the same positive regulation through *AXR2-1* and *ARF7/ARF19*. In the other hand, L-Trp takes part of the auxin machinery to reduce the primary root growth and this may occur via transcriptional or post-transcriptional induction of MPK6.

## 5. Author contributions

GRO and JLB planned and designed the research. JSLB, LFRE, RPF, JAAR performed the experiments and analyzed data. JLB, HRC and AAGG provided reagents, materials and advice. GRO and JLB wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest

## Acknowledgments

This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, Grant No. A1-S-34768) (to J. L-B), and the Consejo de la Investigación Científica UMSNH (CIC 2.26) to J.L-B. GRO is indebted to CONACYT for a Ph. D. degree fellowship.

## References

- [1] J. Novak, M. Cerny, J. Pavlu, J. Zemankova, J. Skalak, L. Plackova, B. Brzobohaty, Roles of proteome dynamics and cytokinin signaling in root to hypocotyl ratio changes induced by shading roots of *Arabidopsis* seedlings, *Plant Cell Physiol.* 56 (2015) 1006–1018.
- [2] Y. Bao, P. Aggarwal, N.E. Robbins 2nd, C.J. Sturrock, M.C. Thompson, H.Q. Tan, C. Tham, L. Duan, P.L. Rodriguez, T. Vernoux, S.J. Mooney, M.J. Bennett, J. R. Dinneny, Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 9319–9324.
- [3] J.Z. Kiss, R. Hertel, F.D. Sack, Amyloplasts are necessary for full gravitropic sensitivity in roots of *Arabidopsis thaliana*, *Planta* 177 (1989) 198–206.
- [4] F. Yan, S. Schubert, K. Mengel, Effect of low root medium pH on net proton release, root respiration, and root growth of corn (*Zea mays* L.) and Broad Bean (*Vicia faba* L.), *Plant Physiol.* 99 (1992) 415–421.
- [5] G. Wu, Amino acids: metabolism, functions, and nutrition, *Amino Acids* 37 (2009) 1–17.
- [6] F.T. de Vries, M.D. Wallenstein, Below-ground connections underlying above-ground food production: a framework for optimizing ecological connections in the rhizosphere, *J. Ecol.* 105 (2017) 913–920.
- [7] J.P. Verbelen, T. De Cnodder, J. Le, K. Vissenberg, F. Baluska, The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone and growth terminating zone, *Plant Signal. Behav.* 1 (2006) 296–304.
- [8] H.M. Cederholm, A.S. Iyer-Pascuzzi, P.N. Benfey, Patterning the primary root in *Arabidopsis*, *WIREs. Dev. Biol.* 1 (2012) 675–691.
- [9] C. Perrot-Rechenmann, Cellular responses to auxin: division versus expansion, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2 (2010) a001446.
- [10] S. Simon, J. Petrasek, Why plants need more than one type of auxin, *Plant Sci.* 180 (2011) 454–460.
- [11] M. Adamowski, J. Friml, PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution, *Plant Cell* 27 (2015) 20–32.
- [12] S. Vanneste, J. Friml, Auxin: a trigger for change in plant development, *Cell* 136 (2009) 1005–1016.
- [13] A.S. Hemeryly, P. Ferreira, J. de Almeida Engler, M. Van Montagu, G. Engler, D. Inze, *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division, *Plant Cell* 5 (1993) 1711–1723.

- [14] K. Himanen, E. Boucheron, S. Vanneste, J. de Almeida Engler, D. Inze, T. Beeckman, Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation, *Plant Cell* 14 (2002) 2339–2351.
- [15] F. Roudier, E. Fedorova, M. Lebris, P. Lecomte, J. Gyorgyey, D. Vauvert, G. Horvath, P. Abad, A. Kondorosí, E. Kondorosí, The *Medicago* species A2-type cyclin is auxin regulated and involved in meristem formation but dispensable for endoreduplication-associated developmental programs, *Plant Physiol.* 131 (2003) 1091–1103.
- [16] P. Doerner, J.E. Jorgensen, R. You, J. Steppuhn, C. Lamb, Control of root growth and development by cyclin expression, *Nature* 380 (1996) 520–523.
- [17] M. Schepetilnikov, J. Makarian, O. Srour, A. Goldreich, Z. Yang, J. Chicher, P. Hammann, L.A. Ryabova, GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin, *The EMBO J.* 36 (2017) 886–903.
- [18] J.G. Chen, H. Ullah, J.C. Young, M.R. Sussman, A.M. Jones, ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis, *Genes Dev.* 15 (2001) 902–911.
- [19] Y.S. Kim, J.K. Min, D. Kim, J. Jung, A soluble auxin-binding protein, ABP57. Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 10730–10736.
- [20] R. Ortiz-Castro, C. Diaz-Perez, M. Martinez-Trujillo, R.E. del Rio, J. Campos-Garcia, J. Lopez-Bucio, Transkingdom signaling based on bacterial cyclolipopeptides with auxin activity in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 7253–7258.
- [21] A. Gamica-Vergara, S. Barrera-Ortiz, E. Munoz-Parra, J. Raya-Gonzalez, A. Mendez-Bravo, L. Macias-Rodriguez, L.F. Ruiz-Herrera, J. Lopez-Bucio, The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning, *New Phytol.* 209 (2016) 1496–1512.
- [22] A.J. Miller, X. Fan, Q. Shen, S.J. Smith, Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 111–119.
- [23] J.S. Lopez-Bucio, J. Raya-Gonzalez, G. Ravelo-Ortega, L.F. Ruiz-Herrera, M. Ramos-Vega, P. León, J. Lopez-Bucio, A.A. Guevara-Garcia, Mitogen activated protein kinase 6 and MAP kinase phosphatase 1 are involved in the response of *Arabidopsis* roots to L-glutamate, *Plant Mol. Biol.* 96 (2018) 339–351.
- [24] P. Walch-Liu, L.H. Liu, T. Remans, M. Tester, B.G. Forde, Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.* 47 (2006) 1045–1057.
- [25] B.G. Forde, S.R. Cutler, N. Zaman, P.J. Krysan, Glutamate signalling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces changes in *Arabidopsis* root architecture, *Plant J.* 75 (2013) 1–10.
- [26] J. Colombat, H. Hirt, *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes, *Biochem. J.* 413 (2008) 217–226.
- [27] G.R. Christie, E. Hajdudch, H.S. Hundal, C.G. Proud, P.M. Taylor, Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 9952–9957.
- [28] R.V. Duran, W. Opplinger, A.M. Robitaille, L. Heiserich, R. Skendaj, E. Gottlieb, M. N. Hall, Glutaminolysis activates Rag-mTORC1 signaling, *Mol. Cell* 47 (2012) 349–358.
- [29] N.R. Stephens, Z. Qi, E.P. Spalding, Glutamate receptor subtypes evidenced by differences in desensitization and dependence on the GLR3.3 and GLR3.4 genes, *Plant Physiol.* 146 (2008) 529–538.
- [30] A. Colon-Carmona, R. You, T. Haimovitch-Gal, P. Doerner, Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein, *Plant J.* 20 (1999) 503–508.
- [31] I. Ottenschlager, P. Wolff, C. Wolvertorn, R.P. Bhalerao, G. Sandberg, H. Ishikawa, M. Evans, K. Palme, Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 2987–2991.
- [32] E. Benková, M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Scifertova, G. Jurgens, J. Friml, Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation, *Cell* 115 (2003) 591–602.
- [33] J. Xu, B. Scheres, Dissection of *Arabidopsis* ADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 function in epidermal cell polarity, *Plant Cell* 17 (2005) 525–536.
- [34] P. Zadnikova, J. Petrasek, P. Marhavy, V. Raz, F. Vandenbussche, Z. Ding, K. Schwarzerova, M.T. Morita, M. Tasaka, J. Hejatkó, D. Van Der Straeten, J. Friml, E. Benkova, Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*, *Development* 137 (2010) 607–617.
- [35] I. Bilkou, J. Xu, M. Wildwater, V. Willemsen, I. Paponov, J. Friml, R. Heidstra, M. Aida, K. Palme, B. Scheres, The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots, *Nature* 433 (2005) 39–44.
- [36] C. Lincoln, J.H. Britton, M. Estelle, Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*, *Plant Cell* 2 (1990) 1071–1080.
- [37] C. Timpte, A.K. Wilson, M. Estelle, The *axr2-1* mutation of *Arabidopsis thaliana* is a gain-of-function mutation that disrupts an early step in auxin response, *Genetics* 138 (1994) 1239–1249.
- [38] J.C. Wilmoth, S. Wang, S.B. Tiwari, A.D. Joshi, G. Hagen, T.J. Guilfoyle, J. M. Alonso, J.R. Ecker, J.W. Reed, NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation, *Plant J.* 43 (2005) 118–130.
- [39] F.B. Pickett, A.K. Wilson, M. Estelle, The *aux1* mutation of *Arabidopsis* confers both auxin and ethylene resistance, *Plant Physiol.* 94 (1990) 1462–1466.
- [40] H. Fukaki, S. Tameda, H. Masuda, M. Tasaka, Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of *Arabidopsis*, *Plant J.* 29 (2002) 153–168.
- [41] G. Parry, L.I. Calderon-Villalobos, M. Prigge, B. Peret, S. Dharmasiri, H. Itoh, E. Lechner, W.M. Gray, M. Bennett, M. Estelle, Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 22540–22545.
- [42] J.M. Alonso, A.N. Stepanova, T.J. Leisse, C.J. Kim, H. Chen, P. Shinn, D. K. Stevenson, J. Zimmerman, P. Barajas, R. Cheuk, C. Gadrinab, C. Heller, A. Jeske, E. Koesema, C.C. Meyers, H. Parker, L. Prehn, Y. Ansari, N. Choy, H. Deen, M. Geralt, N. Hazari, E. Hom, M. Karnes, C. Mulholland, R. Ndubaku, I. Schmidt, P. Guzman, L. Aguilar-Henonin, M. Schmid, D. Weigel, D.E. Carter, T. Marchand, E. Risseuw, D. Brogden, A. Zeko, W.L. Crosby, C.C. Berry, J.R. Ecker, Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*, *Science* 301 (2003) 653–657.
- [43] S. Zhang, D.F. Klessig, Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco, *Plant Cell* 9 (1997) 809–824.
- [44] H. Stals, D. Inze, When plant cells decide to divide, *Trends Plant Sci.* 6 (2001) 359–364.
- [45] J. López-Bucio, A. Cruz-Ramirez, L. Herrera-Estrella, The role of nutrient availability in regulating root architecture, *Curr. Opin. Plant Biol.* 6 (2003) 280–287.
- [46] Y. Liu, N. von Wiren, Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants, *J. Exp. Bot.* 68 (2017) 2581–2592.
- [47] Y. Liu, N. Lai, K. Gao, F. Chen, L. Yuan, G. Mi, Ammonium inhibits primary root growth by reducing the length of meristem and elongation zone and decreasing elemental expansion rate in the root apex in *Arabidopsis thaliana*, *PLoS One* 8 (2013) e61031.
- [48] L. Wang, H. Chu, Z. Li, J. Wang, J. Li, Y. Qiao, Y. Fu, T. Mou, C. Chen, J. Xu, Origin and development of the root cap in rice, *Plant Physiol.* 166 (2014) 603–613.
- [49] X. Kong, G. Liu, J. Liu, Z. Ding, The root transition zone: a hot spot for signal crosstalk, *Trends Plant Sci.* 23 (2018) 403–409.
- [50] Y.H. Lee, J. Foster, J. Chen, L.M. Voll, A.P. Weber, M. Tegeder, AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*, *Plant J.* 50 (2007) 305–319.
- [51] H. Svennerstam, S. Jamtgard, I. Ahmad, K. Huss-Danell, T. Nasholm, U. Ganeteg, Transporters in *Arabidopsis* roots mediating uptake of amino acids at naturally occurring concentrations, *New Phytol.* 191 (2011) 459–467.
- [52] M. Tegeder, Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns, *Curr. Opin. Plant Biol.* 15 (2012) 315–321.
- [53] Z. Qi, N.R. Stephens, E.P. Spalding, Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile, *Plant Physiol.* 142 (2006) 963–971.
- [54] Y. Zhao, A.K. Hull, N.R. Gupta, K.A. Goss, J. Alonso, J.R. Ecker, J. Normanly, J. Chory, J.L. Celenza, Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3, *Genes Dev.* 16 (2002) 3100–3112.
- [55] T.A. Walsh, R. Neal, A.O. Merlo, M. Honma, G.R. Hicks, K. Wolff, W. Matsumura, J. P. Davies, Mutations in an auxin receptor homolog AFB5 and in SGT1b confer resistance to synthetic picolinic auxins and not to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 142 (2006) 542–552.
- [56] C. Schwechheimer, G. Serino, X.W. Deng, Multiple ubiquitin ligase-mediated processes require COP9 signalosome and AXR1 function, *Plant Cell* 14 (2002) 2553–2563.
- [57] K. Hara, R. Kajita, K.U. Torii, D.C. Bergmann, T. Kakimoto, The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule, *Genes Dev.* 21 (2007) 1720–1725.
- [58] L. Hunt, J.E. Gray, The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development, *Curr. Biol.* 19 (2009) 864–869.
- [59] D.C. Bergmann, W. Lukowitz, C.R. Somerville, Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase, *Science* 304 (2004) 1494–1497.
- [60] H. Wang, N. Ngwenyama, Y. Liu, J.C. Walker, S. Zhang, Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 19 (2007) 63–73.
- [61] G.R. Lampard, C.A. Macalister, D.C. Bergmann, *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the BHLH SPEECHLESS, *Science* 322 (2008) 1113–1116.
- [62] X. Meng, H. Wang, Y. He, Y. Liu, J.C. Walker, K.U. Torii, S. Zhang, A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation, *Plant Cell* 24 (2012) 4948–4960.
- [63] N. Uchida, J.S. Lee, R.J. Horst, H.H. Lai, R. Kajita, T. Kakimoto, M. Tasaka, K. U. Torii, Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 6337–6342.

## 7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diversas moléculas del suelo modifican la arquitectura del sistema radicular, actuando como nutrientes o señales que impactan los procesos del desarrollo. Las plantas adquieren principalmente el nitrógeno absorbiendo el nitrato y el amonio a través de la raíz, pero también pueden obtener este nutriente capturando urea, péptidos y aminoácidos que se encuentran en el suelo (Liu y Von Wiren, 2017). Además, el amonio es asimilado y movilizado por las plantas mediante su incorporación a aminoácidos (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2010). Se ha reportado que el L-Glu afecta el crecimiento de la raíz, siendo percibido como molécula señal y no como fuente de nitrógeno (Walch-Liu *et al.*, 2006). En este trabajo se evaluó la bioactividad de los 20 L-aminoácidos proteicos en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*, observando que la mayoría de ellos reduce el crecimiento de la raíz primaria, siendo los más bioactivos L-Leu, L-Lys y L-trp. Estas tres últimas moléculas afectaron el 50% del crecimiento en un rango de concentraciones de 40-100  $\mu$ M. En cambio, para que el amonio produzca un acortamiento similar de la raíz, se necesitan aplicar concentraciones mayores a 1 mM (Liu *et al.*, 2013). Estos datos demuestran que la disminución en el crecimiento de la raíz a causa de los aminoácidos no se debe a un desequilibrio en la homeostasis de amonio.

Se evaluó la especificidad del efecto de los L-aminoácidos más bioactivos comparándolos contra sus D-isómeros, encontrándose que la represión del crecimiento de la raíz se pierde para el D-Glu, y disminuye para D-Leu y D-Lys. De manera opuesta, el D-Trp tuvo un mayor efecto que el L-Trp. Por lo tanto, se concluyó que el cambio en la disposición espacial del grupo amino en los diferentes isómeros, sí influye sobre el nivel de actividad que tienen estos aminoácidos en la raíz. Particularmente, el efecto de L-Trp y D-Trp puede estar asociado a su función como precursores en la biosíntesis de auxinas, y no a su posible actividad como molécula señal. Se ha reportado que el D-Trp es aprovechado de manera más eficiente que el L-Trp por algunas especies de plantas para la producción de auxinas (Law, 1987; Mcqueen-Mason y Hamilton, 1989). Por otra parte, estos cuatro L-aminoácidos afectaron el crecimiento de la

raíz sólo al ser aplicados en el ápice de la raíz primaria, pero no tuvieron efecto cuando se aplicaron en las raíces laterales. Este resultado delimita la zona celular que se encarga de percibir a estas biomoléculas, abriendo la posibilidad de que todas ellas sean reguladas por un mecanismo similar. La cofia y la zona de transición, que se encuentran en el ápice de la raíz, se encargan de percibir varios estímulos ambientales que modifican el desarrollo radicular. (Kong *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014). Los aminoácidos del suelo pueden ser captados por las células de la raíz a través de transportadores tales como AAP1, AAP5 y LHT1, los cuales están localizados en el ápice y carecen de especificidad (Lee Y. H. *et al.*, 2007; Svennerstam *et al.*, 2011). Mediante su unión a receptores tipo GLR, algunos L-aminoácidos promueven el flujo de iones en las células del follaje. De este modo, modulan la apertura de estomas e inducen la expresión de genes de defensa (Kong *et al.*, 2016; Toyota *et al.*, 2018; Yoshida *et al.*, 2016). El L-Glu y otros cinco aminoácidos (L-Ala, L-Asn, L-Cys, L-Gly y L-Ser) despolarizan la membrana a través de la misma subunidad GLR3.3 (Stephens *et al.* 2008). Estos datos evidencian que los aminoácidos comparten mecanismos de percepción y movilización.

Las auxinas ayudan a mantener el crecimiento de la raíz primaria induciendo ciclos mitóticos en la zona meristemática y estimulando el crecimiento celular en las zonas de transición y de elongación (Perrot-Rechenmann, 2010; Stals y Inze, 2001). En la síntesis de AIA, la conversión de L-Trp a indol-3-acetaldoxima es catalizada por las enzimas citocromo P450 (CYP79B2 y CYP79B3), que es un paso limitante, ya que cuando la expresión de sus genes es inducida o suprimida, se aumentan o se disminuyen los niveles de auxinas, respectivamente, provocando en ambos casos la reducción de la longitud de la raíz (Walsh *et al.*, 2006). Alteraciones similares en el crecimiento de la raíz, también se presentan en las mutantes de los transportadores PIN1 y PIN2 (Blilou *et al.*, 2005), indicando que el transporte y la señalización de auxinas son esenciales para el crecimiento de la raíz.

Los aminoácidos L-Glu, L-Leu y L-Lys disminuyeron la respuesta a auxinas y el nivel de transportadores PIN en la raíz. Sin embargo, el L-Trp incrementó la señalización de auxinas, pero no modificó el nivel de los transportadores PIN. Estos datos sugieren que al menos los tres primeros aminoácidos afectaron el crecimiento de la raíz en detrimento del transporte de auxinas, pero para el caso del L-Trp, sus efectos podrían estar asociados con el incremento en la biosíntesis de AIA. Varias mutantes afectadas en genes que codifican para componentes de la señalización de auxinas fueron resistentes al efecto del L-Trp, un dato que respalda la relación entre la función de este aminoácido como precursor de AIA, y el acortamiento de la raíz. Por otra parte, solamente algunas de las mutantes de auxinas (*axr1-3* y *slr1*) son hipersensibles al L-Glu, mientras que otras (*axr2-1* y *arf7arf19*) comparten resistencia a L-Leu y L-Lys. Esto indica dos posibilidades: 1) que estos tres aminoácidos no dependen de manera directa de la vía de las auxinas para impactar el crecimiento de la raíz, o 2) que simultáneamente, regulan eventos de señalización y metabólicos que conllevan a crear una interacción específica con elementos de la maquinaria de la señalización de auxinas. Diversos compuestos auxínicos, también muestran selectividad por componentes de la vía de las auxinas para alterar el crecimiento y desarrollo de la planta (Walsh *et al.*, 2006).

Los módulos de MAPKs regulan el desarrollo vegetal y las respuestas contra estreses abióticos y bióticos (Bayer *et al.*, 2009; Bush y Krysan, 2007; Lukowitz *et al.*, 2004; Tena *et al.*, 2001). Estudios previos mostraron que MEKK1 y MPK6 coordinan la señalización del L-Glu en la raíz (Forde *et al.*, 2013; López-Bucio *et al.*, 2018). Asimismo, en el presente trabajo, se observó que L-Leu, L-Lys y L-Trp convergen en MPK6 para afectar el crecimiento de la raíz primaria. Las mismas vías de MAPKs pueden ser requeridas por diferentes moléculas durante el desarrollo. Por ejemplo, los péptidos “EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1” (EPF1) y “EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2” (EPF2), están involucrados en la formación de estomas. Ambos son percibidos por el receptor “TOO MANY MOUTHS” (TMM), el cual, activa una cascada de MAPKs que incluye a MPK6, para fosforilar al factor de transcripción “SPEECHLESS” (SPCH) (Hara *et al.*,

2007; Hunt L. y Gray, 2009; Lampard *et al.*, 2008; Wang H. *et al.*, 2007). Otros péptidos señal, como “EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE 4” (EPFL4) y “EPIDERMAL PATTERNING FACTOR-LIKE 6” (EPFL6), influyen en la arquitectura de la inflorescencia a través del receptor ERECTA (ER) y del módulo de MAPKs YDA-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 (Meng *et al.*, 2012; Uchida *et al.*, 2012). Los resultados presentados aquí, sugieren que diversos aminoácidos, independientemente de su actividad antagónica (L-Glu, L-Leu, L-Lys) o inductora (L-Trp) de la respuesta a auxinas, confluyen en MPK6 para afectar el crecimiento de la raíz primaria.

## 8 PERSPECTIVAS

- El efecto del L-Trp en la expresión de *DR5:GFP* y en el crecimiento de la raíz de las mutantes de auxinas y de *mpk6*, permite plantear la hipótesis de que la cinasa MPK6 es un regulador positivo de la síntesis o la señalización del AIA. Para responderla, se propone analizar el crecimiento de la mutante *mpk6* en tratamientos de AIA y de sus precursores. Bajo estas mismas condiciones, se evaluaría la expresión de *DR5:GFP* en el fondo genético de *mpk6*.
- El L-Glu y el L-Trp modifican de manera opuesta la respuesta a auxinas en el área de la columela, por lo que es interesante determinar si las células de la columela son el sitio de percepción de diferentes aminoácidos. Para esto, como primer paso, se piensa llevar a cabo la comparación del perfil de expresión de genes de células de la columela de plantas expuestas a condiciones control y a tratamientos con aminoácidos, con el fin de identificar genes que codifiquen para receptores potenciales de aminoácidos. Posteriormente, se evaluaría la posible participación de los genes identificados para mediar la señalización de aminoácidos, analizando el crecimiento de la raíz de sus mutantes en tratamientos con aminoácidos bioactivos.
- El análisis de la bioactividad de los aminoácidos en el crecimiento de la raíz, se realizó en medios de cultivo con suficiencia de amonio y nitrato. De tal manera, se desconoce el efecto que estas biomoléculas pueden tener al utilizar medios

deficientes de nitrógeno, y si la cinasa MPK6 podría estar involucrada en este proceso.

## 9 REFERENCIAS

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

Alori E. T., Glick B. R. Babalola O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Front Microbiol* 8: 971.

Asami T. Nakagawa Y. (2018). Preface to the special issue: brief review of plant hormones and their utilization in agriculture. *Journal of Pesticide Science* 43 (3): 154-158.

Bayer M., Nawy T., Giglione C., Galli M., Meinel T. Lukowitz W. (2009). Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 323 (5920): 1485-1488.

Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Paponov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K. Scheres B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis roots*. *Nature* 433 (7021): 39-44.

Bogdanova N. Hell R. (1997). Cysteine synthesis in plants: protein-protein interactions of serine acetyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. 11 (2): 251-262.

Brady S. M., Orlando D. A., Lee J.-Y., Wang J. Y., Koch J., Dinneny J. R., Mace D., Ohler U. Benfey P. N. (2007). A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. 318 (5851): 801-806.

Bush S. M. Krysan P. J. (2007). Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J Exp Bot* 58 (8): 2181-2191.

Chaiwongsar S., Strohm A. K., Su S. H. Krysan P. J. (2012). Genetic analysis of the *Arabidopsis* protein kinases MAP3K $\epsilon$ 1 and MAP3K $\epsilon$ 2 indicates roles in cell expansion and embryo development. *Front Plant Sci* 3 228.

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

Dhonukshe P. (2012). Mechanistic framework for establishment, maintenance, and alteration of cell polarity in plants. *Sci World J* 981658.

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

Garnica-Vergara A., Barrera-Ortíz S., Muñoz-Parra E., Raya-González J., Mendez-Bravo A., Macías-Rodríguez L., Ruiz-Herrera L. F. López-Bucio J. (2016). The volatile 6-pentyl-2H-pyran-2-one from *Trichoderma atroviride* regulates *Arabidopsis thaliana* root morphogenesis via auxin signaling and ETHYLENE INSENSITIVE 2 functioning. *New Phytologist* 209 (4): 1496-1512.

Grallath S., Weimar T., Meyer A., Gummy C., Suter-Grotemeyer M., Neuhaus J.-M. Rentsch D. (2005). The AtProT family. compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. *Plant Physiology* 137 (1): 117-126.

Gray W. M., Ostin A., Sandberg G., Romano C. P. Estelle M. (1998). High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (12): 7197-7202.

Hara K., Kajita R., Torii K. U., Bergmann D. C. Kakimoto T. (2007). The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev* 21 (14): 1720-1725.

Hayashi K., Hasegawa J. Matsunaga S. (2013). The boundary of the meristematic and elongation zones in roots: endoreduplication precedes rapid cell expansion. *Scientific Reports* 3 (1): 2723.

Hildebrandt Tatjana M., Nunes Nesi A., Araújo Wagner L. Braun H.-P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant* 8 (11): 1563-1579.

Hirner A., Ladwig F., Stransky H., Okumoto S., Keinath M., Harms A., Frommer W. B. Koch W. (2006). *Arabidopsis* LHT1 Is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *Plant Cell* 18 (8): 1931-1946.

Howitt S. M. Udvardi M. K. (2000). Structure, function and regulation of ammonium transporters in plants. *BBA - Biomembranes* 1465 (1): 152-170.

Hunt E., Gattolin S., Newbury H. J., Bale J. S., Tseng H.-M., Barrett D. A. Pritchard J. (2009). A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the *Arabidopsis* sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *J Exp Bot* 61 (1): 55-64.

Hunt L. Gray J. E. (2009). The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. *Current Biology* 19 (10): 864-869.

Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B. E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y. Walker J. C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7 (7): 301-308.

Jander G. Joshi V. (2009). Aspartate-derived amino acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis book* 7 e0121-e0121.

Jiménez-Vázquez K. R., García-Cárdenas E., Barrera-Ortíz S., Ortíz-Castro R., Ruiz-Herrera L. F., Ramos-Acosta B. P., Coria-Arellano J. L., Sáenz-Mata J. López-Bucio J. (2020). The plant beneficial rhizobacterium *Achromobacter* sp. 5B1

influences root development through auxin signaling and redistribution. *Plant Journal* 103 (5): 1639-1654.

Jones D. L., Owen A. G. Farrar J. F. (2002). Simple method to enable the high resolution determination of total free amino acids in soil solutions and soil extracts. *Soil Biol Biochem* 34 (12): 1893-1902.

Toloti-Carneiro J. M., Chacón-Madrid K., Miranda-Maciél B. C., Zezzi-Arruda M. A. (2015). *Arabidopsis thaliana* and omics approaches: a review. *Integrated Omics*. 5 (1): 1-16.

Kim J. Guan K. L. (2011). Amino acid signaling in TOR activation. *Annu Rev Biochem* 80 1001-1032.

Kim Y. S., Min J. K., Kim D. Jung J. (2001). A soluble auxin-binding protein, ABP57. Purification with anti-bovine serum albumin antibody and characterization of its mechanistic role in the auxin effect on plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 276 (14): 10730-10736.

Kochevenko A. Fernie A. R. (2011). The genetic architecture of branched-chain amino acid accumulation in tomato fruits. *J Exp Bot* 62 (11): 3895-3906.

Köhl J., Kolnaar R. Ravensberg W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy. *Front Plant Sci* 10: 845.

Kong D., Hu H. C., Okuma E., Lee Y., Lee H. S., Munemasa S., Cho D., Ju C., Pedoeim L., Rodríguez B., Wang J., Im W., Murata Y., Pei Z. M. Kwak J. M. (2016). L-Met activates *Arabidopsis* GLR Ca<sup>2+</sup> channels ppstream of ROS production and regulates stomatal movement. *Cell Rep* 17 (10): 2553-2561.

Kong X., Liu G., Liu J. Ding Z. (2018). The root transition zone: a hot spot for signal crosstalk. *Trends Plant Sci* 23 (5): 403-409.

Krämer U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *Elife* 4 e06100.

Lampard G. R., Macalister C. A. Bergmann D. C. (2008). *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* 322 (5904): 1113-1116.

Lavenus J., Goh T., Roberts I., Guyomarc'h S., Lucas M., De Smet I., Fukaki H., Beeckman T., Bennett M. Laplaze L. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci* 18 (8): 450-458.

Law D. M. (1987). Gibberellin-enhanced indole-3-acetic acid biosynthesis: D-Tryptophan as the precursor of indole-3-acetic acid. *Physiologia Plantarum* 70 (4): 626-632.

Lee Y. H., Foster J., Chen J., Voll L. M., Weber A. P. Tegeder M. (2007). AAP1 transports uncharged amino acids into roots of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 50 (2): 305-319.

Lehmann S., Gumy C., Blatter E., Boeffel S., Fricke W. Rentsch D. (2010). In planta function of compatible solute transporters of the AtProT family. *J Exp Bot* 62 (2): 787-796.

Liu Y., Lai N., Gao K., Chen F., Yuan L. Mi G. (2013). Ammonium inhibits primary root growth by reducing the length of meristem and elongation zone and decreasing elemental expansion rate in the root apex in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8 (4): e61031.

Liu Y. von Wiren N. (2017). Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *J Exp Bot* 68 (10): 2581-2592.

López-Bucio J., Cruz-Ramírez A. Herrera-Estrella L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6 (3): 280-287.

López-Bucio J. S., Dubrovsky J. G., Raya-González J., Ugartechea-Chirino Y., López-Bucio J., de Luna-Valdez L. A., Ramos-Vega M., León P. Guevara-García A. A. (2013). *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot* 65 (1): 169-183.

López-Bucio J. S., Raya-González J., Ravelo-Ortega G., Ruiz-Herrera L. F., Ramos-Vega M., Leon P., López-Bucio J. Guevara-García A. A. (2018). Mitogen activated protein kinase 6 and MAP kinase phosphatase 1 are involved in the response of *Arabidopsis* roots to L-glutamate. *Plant Mol Biol* 96 (4-5): 339-351.

Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D. Somerville C. (2004). A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116 (1): 109-119.

Mano Y. Nemoto K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *J Exp Bot* 63 (8): 2853-2872.

Masclaux-Daubresse C., Daniel-Vedele F., Dechorgnat J., Chardon F., Gaufichon L. Suzuki A. (2010). Nitrogen uptake, assimilation and remobilization in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Ann Bot* 105 (7): 1141-1157.

McQueen-Mason S. J. Hamilton R. H. (1989). The Biosynthesis of indole-3-acetic acid from D-tryptophan in Alaska pea plastids. *Plant Cell Physiol* 30 (7): 999-1005.

Meng X., Wang H., He Y., Liu Y., Walker J. C., Torii K. U. Zhang S. (2012). A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *Plant Cell* 24 (12): 4948-4960.

Meyerowitz E. M. (2001). Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant physiology* 125 (1): 15-19.

Miller A. J., Fan X., Shen Q. Smith S. J. (2008). Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *J Exp Bot* 59 (1): 111-119.

Miller S. L. Urey H. C. (1959). Organic compound synthesis on the primitive earth. *Science* 130 (3370): 245-251.

Miyashita Y., Dolferus R., Ismond K. P. Good A. G. (2007). Alanine aminotransferase catalyses the breakdown of alanine after hypoxia in *Arabidopsis thaliana*. 49 (6): 1108-1121.

Möller B. Weijers D. (2009). Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1 (5): a001545.

Müller J., Beck M., Mettbach B., Komis G., Hause G., Menzel D. y S. J. (2009). *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant Journal* 61 (2): 234-248.

Novak J., Cerny M., Pavlu J., Zemankova J., Skalak J., Plackova L. Brzobohaty B. (2015). Roles of proteome dynamics and cytokinin signaling in root to hypocotyl ratio changes induced by shading roots of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell Physiol* 56 (5): 1006-1018.

Okumoto S., Funck D., Trovato M. Forlani G. (2016). Amino acids of the glutamate family: functions beyond primary metabolism. *Front Plant Sci* 7: 318.

Okumoto S., Koch W., Tegeder M., Fischer W. N., Biehl A., Leister D., Stierhof Y. D. Frommer W. B. (2004). Root phloem-specific expression of the plasma membrane amino acid proton co-transporter AAP3. *J Exp Bot* 55 (406): 2155-2168.

Ortíz-Castro R., Díaz-Pérez C., Martínez-Trujillo M., del Río R. E., Campos-García J. López-Bucio J. (2011). Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (17): 7253-7258.

Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a001537.

Palmieri L., Todd C. D., Arrigoni R., Hoyos M. E., Santoro A., Polacco J. C. Palmieri F. (2006). *Arabidopsis* mitochondria have two basic amino acid transporters with partially overlapping specificities and differential expression in seedling development. *BBA - Bioenergetics* 1757 (9): 1277-1283.

Perrot-Rechenmann C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2 (5): a001446.

Petrásek J. Friml J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development* 136 (16): 2675-2688.

Petricka J. J., Winter C. M. Benfey P. N. (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annu Rev Plant Biol* 63 563-590.

Pohlmeyer K., Soll J., Steinkamp T., Hinnah S. Wagner R. (1997). Isolation and characterization of an amino acid-selective channel protein present in the chloroplastic outer envelope membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (17): 9504-9509.

Provart N. J., Alonso J., Assmann S. M., Bergmann D., Brady S. M., Brkljacic J., Browse J., Chapple C., Colot V., Cutler S., Dangl J., Ehrhardt D., Friesner J. D., Frommer W. B., Grotewold E., Meyerowitz E., Nemhauser J., Nordborg M., Pikaard C., Shanklin J., Somerville C., Stitt M., Torii K. U., Waese J., Wagner D. McCourt P. (2016). 50 years of *Arabidopsis* research: highlights and future directions. *New Phytologist* 209 (3): 921-944.

Ros R., Muñoz-Bertomeu J. Krueger S. (2014). Serine in plants: biosynthesis, metabolism, and functions. *Trends Plant Sci* 19 (9): 564-569.

Sablowski R. Carnier M. (2014). Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *J Exp Bot* 65 (10): 2703-2714.

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

Schepetilnikov M., Makarian J., Srour O., Geldreich A., Yang Z., Chicher J., Hammann P. Ryabova L. A. (2017). GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *EMBO J* 36 (7): 886-903.

Schlatter D., Kinkel L., Thomashow L., Weller D. Paulitz T. (2017). Disease suppressive soils: new insights from the soil microbiome. *Phytopatology* 107 (11): 1284-1297.

Schmidt R., Stransky H. Koch W. (2007). The amino acid permease AAP8 is important for early seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 226 (4): 805-813.

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

Smertenko A. P., Chang H.-Y., Sonobe S., Fenyk S. I., Weingartner M., Bögre L. Hussey P. J. (2006). Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *Cell Science* 119 (15): 3227-3237.

Stals H. Inze D. (2001). When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci* 6 (8): 359-364.

Stepansky A. Leustek T. (2006). Histidine biosynthesis in plants. *Amino Acids* 30 (2): 127-142.

Stephens N. R., Qi Z. Spalding E. P. (2008). Glutamate receptor subtypes evidenced by differences in desensitization and dependence on the GLR3.3 and GLR3.4 genes. *Plant Physiology* 146 (2): 529-538.

Stone J. M. Walker J. C. (1995). Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiology* 108 (2): 451-457.

Svennerstam H., Jamtgard S., Ahmad I., Huss-Danell K., Nasholm T. Ganeteg U. (2011). Transporters in *Arabidopsis* roots mediating uptake of amino acids at naturally occurring concentrations. *New Phytologist* 191 (2): 459-467.

Tegeder M. (2012). Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Curr Opin Plant Biol* 15 (3): 315-321.

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

Thomas G. M. Huganir R. L. (2004). MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Revs Neurosci* 5 (3): 173-183.

Toyota M., Spencer D., Sawai-Toyota S., Jiaqi W., Zhang T., Koo A. J., Howe G. A. Gilroy S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. *Science* 361 (6407): 1112-1115.

Tzin V., Galili G. Aharoni A. (2012). Shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol.* 63: 73-105

Uchida N., Lee J. S., Horst R. J., Lai H. H., Kajita R., Kakimoto T., Tasaka M. Torii K. U. (2012). Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (16): 6337-6342.

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

Verbelen J. P., De Cnodder T., Le J., Vissenberg K. Baluska F. (2006). The root apex of *Arabidopsis thaliana* consists of four distinct zones of growth activities: meristematic zone, transition zone, fast elongation zone and growth terminating zone. *Plant Signal Behav* 1 (6): 296-304.

Voet D. VJG, Pratt C. W. (2016). Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level. Wiley, Hoboken, NJ.

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

Walsh T. A., Neal R., Merlo A. O., Honma M., Hicks G. R., Wolff K., Matsumura W. Davies J. P. (2006). Mutations in an auxin receptor homolog AFB5 and in SGT1b confer resistance to synthetic picolinate auxins and not to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid or indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 142 (2): 542-552.

- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J. C. Zhang S. (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19 (1): 63-73.
- Wang L., Chu H., Li Z., Wang J., Li J., Qiao Y., Fu Y., Mou T., Chen C. Xu J. (2014). Origin and development of the root cap in rice. *Plant Physiol* 166 (2): 603-613.
- Wang R. Estelle M. (2014). Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Curr Opin Plant Biol* 21 51-58.
- Woodward A. W. Bartel B. (2018). Biology in bloom: a primer on the *Arabidopsis thaliana* model system. *Genetics* 208 (4): 1337-1349.
- Wu G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37 (1): 1-17.
- Xu J. Zhang S. (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci* 20 (1): 56-64.
- Yang H., Bogner M., Stierhof Y.-D. Ludewig U. (2010). H<sup>+</sup>-Independent glutamine transport in plant root tips. *PLoS One* 5 (1): e8917.
- Yoshida R., Mori I. C., Kamizono N., Shichiri Y., Shimatani T., Miyata F., Honda K. Iwai S. (2016). Glutamate functions in stomatal closure in *Arabidopsis* and fava bean. *Journal of Plant Research* 129 (1): 39-49.
- Yoshida T., Fujita Y., Maruyama K., Mogami J., Todaka D., Shinozaki K. Yamaguchi-Shinozaki K. (2015). Four *Arabidopsis* AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant Cell Environ* 38 (1): 35-49.
- Yue X., Li X. G., Gao X.-Q., Zhao X. Y., Dong Y. X. Zhou C. (2016). The *Arabidopsis* phytohormone crosstalk network involves a consecutive metabolic route and circular control units of transcription factors that regulate enzyme-encoding genes. *BMC Systems Biology* 10 (1): 87.

Zhang L., Tan Q., Lee R., Trethewy A., Lee Y.-H. Tegeder M. (2010). Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22 (11): 3603-3620.

Zhao Y. (2018). Essential roles of local auxin biosynthesis in plant development and in adaptation to environmental changes. *Annual Reviews* 69 69 (1): 417-435.

## **10 ANEXOS**



# Mitogen activated protein kinase 6 and MAP kinase phosphatase 1 are involved in the response of *Arabidopsis* roots to L-glutamate

Jesús Salvador López-Bucio<sup>3</sup> · Javier Raya-González<sup>2</sup> · Gustavo Ravelo-Ortega<sup>2</sup> · León Francisco Ruiz-Herrera<sup>2</sup> · Maricela Ramos-Vega<sup>1</sup> · Patricia León<sup>1</sup> · José López-Bucio<sup>2</sup> · Ángel Arturo Guevara-García<sup>1</sup>

Received: 20 June 2017 / Accepted: 8 January 2018  
© Springer Science+Business Media B.V., part of Springer Nature 2018

## Abstract

**Key message** The function and components of L-glutamate signaling pathways in plants have just begun to be elucidated. Here, using a combination of genetic and biochemical strategies, we demonstrated that a MAPK module is involved in the control of root developmental responses to this amino acid.

**Abstract** Root system architecture plays an essential role in plant adaptation to biotic and abiotic factors via adjusting signal transduction and gene expression. L-Glutamate (L-Glu), an amino acid with neurotransmitter functions in animals, inhibits root growth, but the underlying genetic mechanisms are poorly understood. Through a combination of genetic analysis, in-gel kinase assays, detailed cell elongation and division measurements and confocal analysis of expression of auxin, quiescent center and stem cell niche related genes, the critical roles of L-Glu in primary root growth acting through the mitogen-activated protein kinase 6 (MPK6) and the dual specificity serine–threonine–tyrosine phosphatase MKP1 could be revealed. In-gel phosphorylation assays revealed a rapid and dose-dependent induction of MPK6 and MPK3 activities in wild-type *Arabidopsis* seedlings in response to L-Glu. Mutations in MPK6 or MKP1 reduced or increased root cell division and elongation in response to L-Glu, possibly modulating auxin transport and/or response, but in a *PLETHORA1* and 2 independent manner. Our data highlight MPK6 and MKP1 as components of an L-Glu pathway linking the auxin response, and cell division for primary root growth.

**Keywords** *Arabidopsis* · L-Glutamate · MPK6 · MKP1 · Auxins · Root development

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s11103-018-0699-8>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ José López-Bucio  
jbucio@umich.mx

✉ Ángel Arturo Guevara-García  
aguevara@ibt.unam.mx

<sup>1</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 510-3, 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, C. P. 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

<sup>3</sup> CONACYT-Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B3, Ciudad Universitaria, C. P. 58030 Morelia, Michoacán, Mexico

## Introduction

Root system architecture is regulated by extrinsic and intrinsic factors such as hormones, nutrient availability and environmental conditions (López-Bucio et al. 2003; Malamy 2005; Fukaki and Tasaka 2009). Following germination, the primary root grows to anchor the plant, explores the soil and senses the biotic and abiotic stimuli for adaptation. In *Arabidopsis thaliana*, the primary root is comprised of concentric tissues, each made up with cell files that originate in its distal portion, which includes the root apical meristem (RAM), the quiescent center (QC) and four peripheral sets of initials or stem cells, each of whom divide for self-renewing and to generate new cells (Dolan et al. 1993). The daughter cells produced after mitosis progressively increase in size and then differentiate into the internal root tissues as well as the root cap, the most distal structure with protective and nutritional functions (Scheres et al. 2002; Cederholm et al. 2012; Kanno et al. 2016).

Several phytohormones and genetic elements play a role in the control of root growth through modulating QC and stem cell identity. Local auxin biosynthesis and distribution at the root tip determines stem cell fate and meristem proliferative capacity. Indole-3-acetic acid (IAA) transport mediated by the PIN-FORMED proteins (PIN1, 2, 3, 4 and 7) allow the formation of a concentration maximum in stem cells that is evidenced by the expression pattern of the synthetic auxin response marker *DR5:GFP* (Casimiro et al. 2001; Vieten et al. 2005; Křeček et al. 2009). IAA induces the expression of WUSCHEL RELATED HOMEBOX 5 (WOX5) and AP-2 domain transcription factors PLETHORA (PLT1-4) to establish stem cell fates (Aida et al. 2004). It further controls cell division at the G2-M phase transition of the cell cycle via activation of CYCLIN B1 (CYCB1), as well as other cyclin and cyclin-dependent kinases (Blilou et al. 2005; Chapman and Estelle 2009; Ding and Friml 2010).

During soil exploration, roots encounter and react to a wide variety of bioactive molecules released by plants or microorganisms. Amino acids, which serve as building blocks of proteins, can act as nutritional cues or as signaling molecules in the rhizosphere to modulate root system architecture (Moe 2013; Forde and Roberts 2014; Biancucci et al. 2015; Okumoto et al. 2016). Despite the nutritional effects that most amino acids may have for plant growth, L-glutamate (L-Glu), which is best known for its role as a neurotransmitter in the mammalian nervous system, acts as signaling molecule to modulate plant development through the participation of the MAPK MEKK1 (Walch-Liu et al. 2006; Forde et al. 2013; Forde 2014). Although plants possess proteins that share sequence similarity with animal ionotropic glutamate receptors (iGluRs) (Lam et al. 1998; Qi et al. 2006), there is no compelling evidence for any functional link between L-Glu and the iGluRs in plants. However, the related plant proteins, termed glutamate like receptors (GLRs) are involved in many physiological and adaptive responses such as touch and cold stress (Meyerhoff et al. 2005), pollen tube growth (Michard et al. 2011), leaf-to-leaf wound signaling (Mousavi et al. 2013), lateral root development (Vincill et al. 2013), and stomatal aperture (Kong et al. 2016).

L-Glu elicits a specific sequence of changes in root growth and branching patterns through inhibition of cell division in the primary root while activating lateral root initiation and growth (Walch-Liu et al. 2006; Forde 2014). L-Glu sensing activates genes encoding transcription factors, kinase/phosphatase enzymes and elicitor-responsive proteins (Kan et al. 2017). Interestingly, the evolutionarily conserved mitogen activated protein kinase MEKK1 from *Arabidopsis* plays a key role in the L-Glu signal transduction pathway influencing root architecture, but in an independent manner to its kinase activity (Forde et al. 2013). Therefore, the MAPKKK and

MAPKK proteins acting upstream of MPK6 to control the responses to L-Glu remain to be discovered.

Mitogen activated protein kinases (MAPKs) are enzymes that mediate responses to various extracellular stimuli and plant developmental programs (Asai et al. 2002; Bush and Krysan 2007; Colcombet and Hirt 2008; Fiil et al. 2009; Xu and Zhang 2015). These are the terminal components of the MAPK modules comprising three kinases (MAP3K/MAP2K/MAPK), which follow a sequential activation of downstream protein targets by phosphorylation. MAPKs have overlapping substrates and upstream activators resulting in functional redundancy (MAPK Group 2002; Andreasson and Ellis 2009; Suárez-Rodríguez et al. 2010). Particularly, MPK3 and MPK6, two of the twenty MAPKs encoded in the *Arabidopsis* genome, act redundantly in ethylene biosynthesis, pathogen response and stomatal development (Asai et al. 2002; Liu and Zhang 2004; Djamei et al. 2007; Lampard et al. 2008). However, in some cases the activity of MPK6 cannot be compensated by other MPKs, as demonstrated by the embryo and root phenotypes observed for the *Arabidopsis mpk6* mutants (Bush and Krysan 2007; López-Bucio et al. 2014).

Although MAP kinases interact to drive plant morphogenesis, it is the reversible protein phosphorylation, catalyzed by these kinases and their cognate phosphatases, which finally provides the regulatory network underlying most biological processes (Bartels et al. 2010). Several phosphatases modulate the MAPK cascades through dephosphorylation of different MAP kinases, thus inactivating the pathway (Keyse 2008; Bartels et al. 2009). Biochemical and genetic studies revealed that the dual specificity serine–threonine and tyrosine phosphatase MKP1, physically interacts with MPK3 and MPK6 influencing their activity in vivo (Ulm et al. 2001, 2002), then this phosphatase represents a good candidate in mediating root architectural adjustments to diverse stimuli via MPK6 (López-Bucio et al. 2014; Contreras-Cornejo et al. 2015).

In this report we investigate the response of *Arabidopsis* primary roots to L-Glu through in-gel phosphorylation assays, primary root growth and cell division and elongation analysis in wild-type (WT) plants and MAPK-related mutants *mpk3* and *mpk6* as well as in the *mkp1* phosphatase deficient mutant. Moreover, through expression analysis of PIN1, 2, and 7 auxin transporters, quiescent center and stem cell niche genes, the important roles of the MPK6 kinase and the MKP1 phosphatase in L-Glu signaling became evident. Our results provide compelling evidence that these enzymes are components of the L-Glu sensing mechanism controlling *Arabidopsis* primary root growth.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

*Arabidopsis thaliana* Heyhn Columbia-0 (Col-0) and Wassilewskija (Ws) WT ecotypes were used. The *mpk6-2* line (SALK\_073907) in Col-0 background (Liu and Zhang 2004) was obtained from the Salk T-DNA collection (Alonso et al. 2003). *mpk3* mutant T-DNA insertion line (SALK\_151594) in Col-0 background (Wang et al. 2007a, b), was kindly donated by Dr. Shuqun Zhang from Missouri University. *mpk1* mutant in Ws ecotype (Ulm et al. 2001) was kindly donated by Dr. Scot C. Peck from Missouri University. *mpk1* mutant introgressed into Col-0 ecotype (Bartels et al. 2009) was kindly donated by Dr. Marina A. González Basteiro from Dr. Roman Ulm Laboratory (University of Geneva, Switzerland). *CycB1::uidA* (Colón-Carmona et al. 1999), *DR5::GFP* (Ottenschläger et al. 2003), *PIN1::PIN1:GFP* (Benková et al. 2003), *PIN2::PIN2:GFP* (Bliluo et al. 2005), *PIN7::PIN7:GFP* (Bliluo et al. 2005), *WOX5:GFP* (Ding and Friml 2010), *PLT1::CFP* (Galinha et al. 2007) and *PLT2::CFP* (Galinha et al. 2007) markers, were mobilized into the *mpk6* and *mpk1* mutant backgrounds by directed crosses.

All seeds were surface sterilized and incubated at 4 °C for 3 days to break dormancy, then grown on agar (0.8% w/v 461 Bacto™ Agar BD DIFCO, Sparks, MD) solidified 0.2× MS medium (Caisson, Laboratories, Inc., Noth Logan, UT), which in that dilution provides 1.99 mM of nitrogen (0.54 mM from KNO<sub>3</sub> and 1.45 mM from NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), as carbon source 1% (w/v) sucrose was added. In all the analyses pH was adjusted to 6.7 to avoid any effect caused by changes in the pH. L-Glu was purchased from Sigma (Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, MO) and added to the medium at the indicated concentrations. Seedlings were grown on vertically oriented Petri dishes maintained in growth chambers at 21 °C under a 16:8 h light:darkness photoperiod with 105 μmol/m<sup>2</sup>/s light intensity. Photographs of the Petri dishes were taken in a stereomicroscope (Nikon SMZ1500) equipped with a digital camera (Nikon SIGHT DS-Fi1c, Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

### In-gel kinase assays

*Arabidopsis* seedlings were ground in liquid nitrogen and homogenized in extraction buffer 250 mM sorbitol, 50 mM HEPES-BTP pH 7.8, 10 mM NaF, 5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM KCl, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF and 40 μg/ml of protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), then centrifuged at 12,000×g

20 min at 4 °C. Protein concentration in the extracts was estimated with the Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA) using BSA as a standard. The in-gel kinase assay was performed as previously described (Zhang and Klessig 1997). Briefly, 50 μg of protein extracted from plant tissue were fractionated onto a 10% SDS-PAGE gel containing 0.25 mg/ml myelin basic protein (MBP, Sigma), as substrate for the kinases. After electrophoresis, the gel was washed three times with 25 mM Tris pH 7.5; 0.5 mM DTT; 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 5 mM NaF; 0.5 mg/ml BSA; 0.1% (v/v) Triton X-100 for 30 min at room temperature. Proteins in the gel were re-natured by incubating the gel in 25 mM Tris pH 7.5; 1 mM DTT; 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 5 mM NaF at 4 °C overnight. The kinase reactions were carried out by incubating the gel in 30 ml of kinase buffer 25 mM Tris pH 7.5; 2 mM EGTA; 12 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 200 nM ATP, and 50 μCi of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (4000 Ci/mmol; 1 Ci = 37 GBq), for 60 min at room temperature. To remove free <sup>32</sup>P, the gel was extensively washed at room temperature with several changes of 5% (w/v) trichloroacetic acid and 1% (w/v) NaPO<sub>4</sub> until <sup>32</sup>P-radioactivity in the wash solution was barely detectable. The gel was dried and exposed to a Kodak XAR-5 film. Pre-stained size markers (Bio-Rad, Hercules CA) were used to calculate the molecular weight of kinases. As loading control 20 μg of proteins from the same extracts used for kinase assays were fractionated in a 10% SDS-PAGE and stained with Coomassie Brilliant Blue dye.

### Generation of *MPK6::uidA* transgenic line

A 997 pb upstream intergenic region of MPK6 (At2g43790) gene was amplified by PCR from genomic DNA of *Arabidopsis* with the primers: forward-5'-CACCAGAGAATC GTGCCTAA-3' and reverse-5'-GACCCGGTAAAGATGA AAG-3'. A gateway system entry clone was generated cloning the amplified promoter into the pENTR/D-TOPO vector (Invitrogen™). The construct was transferred to the destiny binary vector pMDC163 by LR recombination reaction. A sequenced vector containing MPK6 promoter fused to *uidA* *E. coli* gene (*MPK6::uidA*) was used to transform *Agrobacterium tumefaciens*, then infiltrated into *Arabidopsis* WT plants (Col-0) via the floral-dip method (Clough and Bent 1998). The expression patterns of five independent transgenic lines were evaluated and data confirmed that all five lines had similar expression patterns in both root and aerial tissues.

### Statoloth staining

To analyze the root cap structure, the roots were fixed overnight with 4% (v/v) paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in 0.025 M phosphate buffer pH 7.2, then incubated with

a Lugol solution (1:2 w/w, iodine: potassium iodide, pH 4.0–4.5) for 10 s and rinsed with water. Finally, the roots were mounted in water on microscope slides and immediately analyzed using a transmission microscope (Nikon Eclipse E600) equipped with a digital camera (Nikon SIGHT DS-Fi1c, Nikon Corporation, Tokyo, Japan).

### Confocal imaging

For microscopy images, roots were stained with 10 mg/ml propidium iodide solution for 1 min, then rinsed in water and mounted in 50% (v/v) glycerol on microscope slides. Fluorescence signal emitted from each root was analyzed on several levels in a confocal microscope (Olympus FV1000 equipped with an objective lens Olympus PlanFlour N40X and a digital camera) at wavelengths specific to propidium iodide (568 nm excitation line and emission SP detector of 585–610 nm), GFP and CFP (488 and 458 nm excitation line, respectively, and emission SP detector of 500–550 nm for both). The propidium iodide and GFP or CFP images were electronically overlaid to obtain the final image. The fluorescence issued by root cells was determined using Image J software (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

### Statistical analysis

All graphs show mean values for the correspondent variable  $\pm$  the standard error, and letters or asterisks indicate statistically significant differences. One-way variance analysis (Student's *t* test) and a Tukey significance test ( $P < 0.05$ ) were performed to all data with the STATISTICA software (StatSoft, 2010).

## Results

### L-Glu inhibits primary root growth and promotes lateral root development

To determine the effects of L-Glu in modulating root system architecture and to establish an experimental system for the genetic dissection of the L-Glu response, *Arabidopsis* WT seedlings (Col-0) were grown on agar-solidified MS 0.2 $\times$  media supplemented with increasing concentrations of L-Glu. A dose dependent inhibition of primary root growth was observed in seedlings 7 days after germination (DAG) by increasing L-Glu concentrations, with effects ranging from around 15% (100  $\mu$ M) to 70% (800  $\mu$ M) of growth inhibition (Supporting Fig. S1). Concomitantly, lateral root formation and growth was stimulated by L-Glu, giving rise to a more branched and exploratory root system (Supporting Fig. S1). These data indicate that L-Glu can be perceived by *Arabidopsis* roots to orchestrate morphogenetic programs.

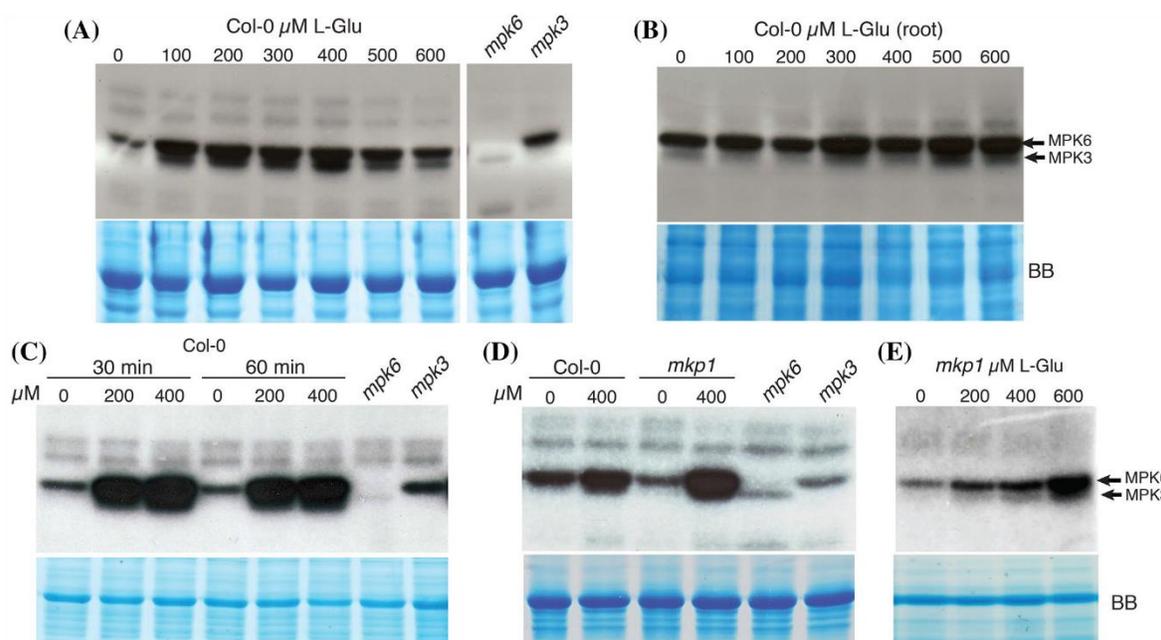
### L-Glu induces MPK3 and MPK6 activities

In mammals, the L-Glu signal transduction pathway involves protein phosphorylation cascades (Wang et al. 2007a, b). Recently, the MAPKs MPK3 and MPK6 were related to primary root growth and in the auxin response (López-Bucio et al. 2014; Contreras-Cornejo et al. 2015), opening the possibility that these kinases may also mediate L-Glu sensing. To address this question, the myelin basic protein phosphorylation activity was analyzed in WT seedlings and in sectioned roots from WT seedlings grown in media supplemented with increasing L-Glu concentrations. An increase in MPK3 and MPK6 activities was observed in extracts from whole plants treated with L-Glu (Fig. 1a, Supporting Fig. S2a). Interestingly in roots only MPK6 activity was increased in response to treatments with low (100, 200  $\mu$ M) L-Glu concentrations (Fig. 1b, Supporting Fig. S2b). Additionally, the temporality of the L-Glu effect over MPKs activities was evaluated 10 days after germination (DAG) in WT seedlings transferred to liquid media supplemented or not with 200 and 400  $\mu$ M L-Glu for 30 and 60 min. As shown in Fig. 1c and Supporting Fig. S2c, treatment of seedlings with 200 or 400  $\mu$ M of L-Glu by 30 and 60 min, clearly induced both MPK3 and MPK6 activities.

The phosphatase MKP1 is a regulator of MAPK activity (Ulm et al. 2002). Then, to evaluate if this enzyme could be involved in modulates the L-Glu inductive effect, the MPK6 and MPK3 activities were compared in WT and *mkp1* mutants. Interestingly, both kinases were induced by L-Glu in *mkp1* mutant background, even at higher levels than in the WT (Fig. 1d, Supporting Fig. S2d). An additional Kinase assay from seedlings exposed to 200, 400 and 600  $\mu$ M L-Glu shows that the activity of MPK6 in *mkp1* background is higher than MPK3 and occurred in a dose dependent manner (Fig. 1e, Supporting Fig. S2e). All together these last observations suggest that although MKP1 acts as a modulator of MPK6 (and MPK3) activity, other phosphatases could participate in the regulation of these kinases.

### Primary root growth responses to L-Glu in WT plants and MAPK related mutants

To genetically establish the relationship between the MAPK signaling module and root sensing of L-Glu, WT (Col-0), *mpk6* and *mkp1* mutant seedlings were germinated and grown 5 days in MS 0.2 $\times$  media, then transferred to the same media with or without increasing L-Glu concentrations (0, 100, 200 and 400  $\mu$ M), 5 days after transfer the primary roots were measured and the growth percentage obtained. L-Glu had a dose dependent inhibitory effect on root growth in WT seedlings. Indeed, *mpk6* mutants were less sensitive to L-Glu treatments and displayed longer primary roots (Fig. 2a, b). In contrast *mkp1* mutants displayed greater sensitivity to



**Fig. 1** L-Glu induces MPK3 and MPK6 activities. In-gel kinase assays were conducted with 50  $\mu\text{g}$  of total protein extracts from 7-day-old seedlings under the following conditions: Whole WT (Col-0) seedlings (a) or excised roots (b) from seedlings that were germinated and grown on MS 0.2 $\times$  media supplemented with the indicated L-Glu concentration. (c) WT (Col-0) seedlings grown on MS 0.2 $\times$  media, and transferred to the indicated L-Glu concentration for 30 and 60 min. (d) WT and *mkp1* seedlings grown on MS 0.2 $\times$  media and

transferred to the indicated L-Glu concentration for 30 min. (e) *mkp1* seedlings germinated and grown on MS 0.2 $\times$  media supplemented with the indicated L-Glu concentrations. In each assay Coomassie Brilliant Blue stained gels (BB) are shown as the loading controls. Extracts from the *mpk6* and *mpk3* mutant seedlings grown on MS 0.2 $\times$  media were included in assays to identify the corresponding kinase, which are indicated by arrows. The gel images are representative of at least three independent experiments

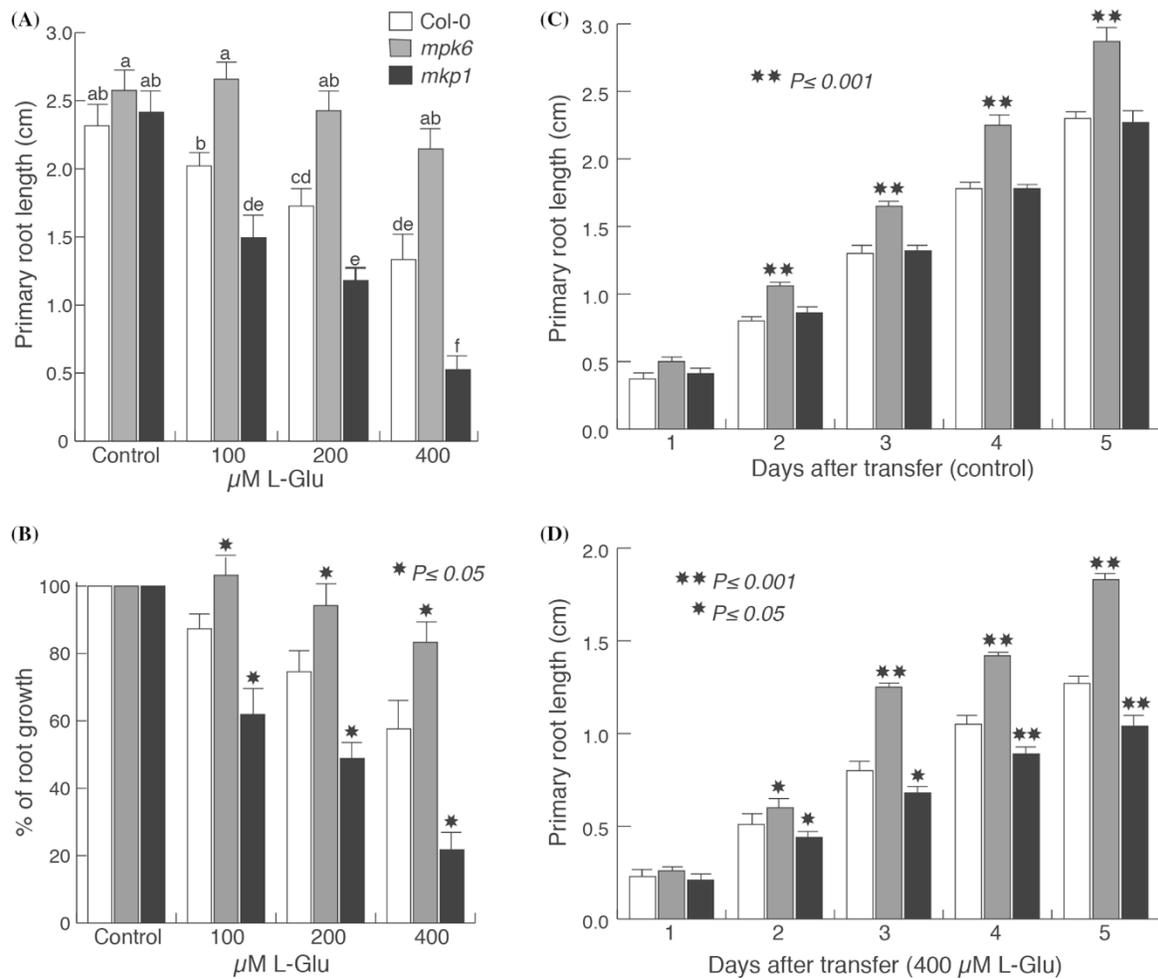
root growth inhibition caused by L-Glu (80%) than the WT (45%) (Fig. 2a, b). Daily measurements from 0 (Fig. 2c) or 400  $\mu\text{M}$  L-Glu (Fig. 2d) show an early root inhibition of WT seedlings and *mkp1* mutants when compared to *mpk6* mutants, which were less sensitive to the L-Glu treatments on root growth inhibition (Fig. 2c, d).

Since natural variation exists in different *Arabidopsis* ecotypes related to their L-Glu sensitivity (Walch-Liu et al. 2006), an additional experiment including the *mkp1* mutant allele in the *Ws* (*mkp1/Ws*) ecotype was performed. As shown in the Supporting Fig. S3, it was observed that the primary root of the *mkp1/Ws* mutant also was oversensitive to L-Glu regarding root growth inhibition. These results demonstrate that the oversensitivity to L-Glu on *mkp1* mutants occur in at least two independent ecotypes.

Functional redundancy between MPK6 and MPK3 in different plant developmental and stress responses has been reported, and since L-Glu induced the activity of both kinases (Fig. 1), the root responses of WT and *mpk3* seedlings to L-Glu were compared. The *mpk3* mutant

seedlings were slightly oversensitive to the L-Glu-induced root growth inhibition (Supporting Fig. S4). These results suggest that MPK6 and MPK3 are components of the L-Glu signaling pathway orchestrating root growth, whereas MPK6 likely function independently of MPK3 to modulate the growth response to L-Glu.

To determine if L-Glu could regulate *MPK6* expression at the transcriptional level, the *MPK6* promoter was fused to the *uidA* reporter gene (*MPK6::uidA*). Transgenic *Arabidopsis* seedlings expressing this construct were germinated and grown 5 days in MS 0.2 $\times$  media, then transferred to the same media with or without 400  $\mu\text{M}$  L-Glu and *MPK6* expression was evaluated after 5 days in L-Glu treatment. *MPK6* was expressed in differentiated vascular tissues of the primary root in control conditions, and L-Glu does not modify the *MPK6* expression intensity or distribution pattern in primary roots (Supporting Fig. S5), suggesting that L-Glu responses are orchestrated most likely via the posttranscriptional regulation of *MPK6*.



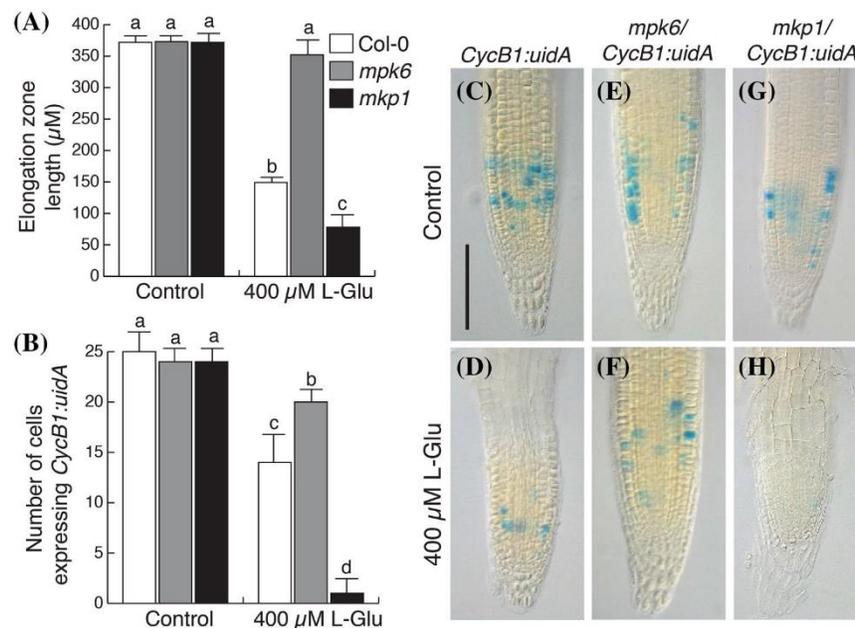
**Fig. 2** Primary root responses to L-Glu are altered in *mpk6* and *mkp1* mutants. Seeds from WT (Col-0), *mpk6* and *mkp1* mutants were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2 $\times$  media, then transferred to the same media supplemented with the indicated L-Glu concentrations. Primary root length (a) and root growth percentage (b) were measured and calculated 5 days after transfer. The percentages of root growth in the treatments were calculated regarding the primary root length of seedlings grown in MS 0.2 $\times$  media as 100% of growth (control in b). Seeds from WT (Col-0), *mpk6* and *mkp1*

mutants were germinated and grown for 5 days on agar solidified MS 0.2 $\times$  media, then transferred to the same media (c) or supplemented with 400  $\mu\text{M}$  L-Glu (d) and primary root length was measured daily after transfer. Different letters in (a) represent Tukey's post hoc test significant differences ( $P \leq 0.05$ ). Star marks in (b, c, d) indicate Student's *t* test significant differences comparing *mpk6* and *mkp1* mutants with the WT (Col-0). Values are the mean  $\pm$  standard error from 30 seedlings cultivated on three independent plates

### MPK6 and MPK1 are involved in root meristem response to L-Glu

L-Glu is likely perceived at the primary root tip, where it inhibits the mitotic activity of the root apical meristem (Walch-Liu et al. 2006). To determine if the primary root growth resistance or oversensitivity of *mpk6* and *mkp1* mutants to L-Glu, respectively, could be related to changes in cell elongation and/or cell division, both mutants were out-crossed with transgenic *Arabidopsis*

seedlings expressing *CycB1:uidA* (Colón-Carmona et al. 1999) and the growth of homozygous *mpk6/CycB1:uidA* and *mkp1/CycB1:uidA* seedlings were compared to that of WT plants after 5 days of exposure to 400  $\mu\text{M}$  L-Glu. The results show that L-Glu inhibits both cell elongation and mitotic cell activity in WT plants, while that the *mpk6* and *mkp1* mutants are resistant or oversensitive to these effects, respectively (Fig. 3a, b). Comparison of *CycB1:uidA* expression in meristems, clearly showed that L-Glu decreases the number of mitotic cells in WT



**Fig. 3** L-Glu impairs cell elongation and proliferation in roots via MPK6 and MKP1. *Arabidopsis* seedlings expressing *CycB1:uidA*, or homozygous *mpk6/CycB1:uidA* or *mkp1/CycB1:uidA* plants were germinated and grown for 5 days on MS 0.2× media, then transferred to same media or to media supplemented with 400 μM L-Glu. Elongation zone length (a) and number of cells expressing *CycB1:uidA*

(b) were analyzed 5 days after transfer. Representative photos of *CycB1:uidA* (c, d), *mpk6/CycB1:uidA* (e, f) and *mkp1/CycB1:uidA* (g, h) on control condition and L-Glu treatments are shown. Values are the mean ± standard error of 15 plants analyzed. Different letters represent significant differences in a Tukey's post-hoc test ( $P \leq 0.05$ ). Scale bar 100 μm

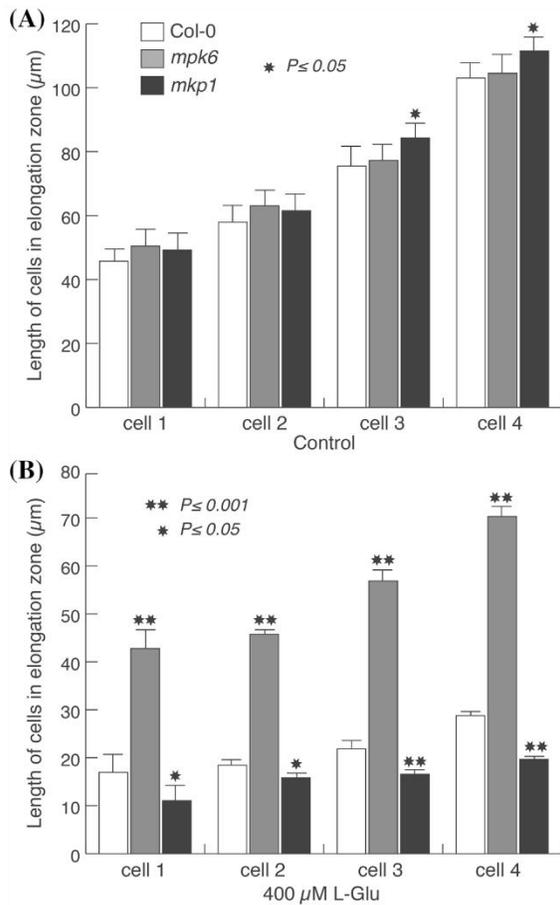
(Fig. 3c, d) and specially in *mkp1* (Fig. 3g, h), but only slightly in *mpk6* plants (Fig. 3e, f). Determination of the length of the first four cells located after the transition zone where rapid growth started showed that L-Glu drastically inhibits cell elongation, mainly in the WT and *mkp1* mutant seedlings that are more sensitive to the effects of L-Glu (Fig. 4a, b). These data indicate that L-Glu affects the establishment of the growth zone of the primary root inhibiting both cell division and elongation through the participation of MPK6 and MKP1.

Given the effects of L-Glu on mitotic activity and the contrasting root growth response of *mpk6* and *mkp1* mutants, the structures of the root cap and production of starch grains in treatments of 0, 200, 400 and 600 μM L-Glu were analyzed. In WT plants the number of starch grains in the root cap decreases by 400 μM L-Glu treatment, and in *mkp1* mutants that L-Glu concentration practically abates the accumulation of starch in the root cap. In contrast, in the *mpk6* mutant 400 and even 600 μM L-Glu treatment had only a minor effect on starch grain production, as well as on the overall structure of the root cap (Supporting Fig. S6). These data indicate that L-Glu impairs the activity of root cap initials and disrupts root cap formation and starch grain production.

### MPK6 and MKP1 influence the auxin response and the abundance of auxin transporters in roots treated with L-Glu

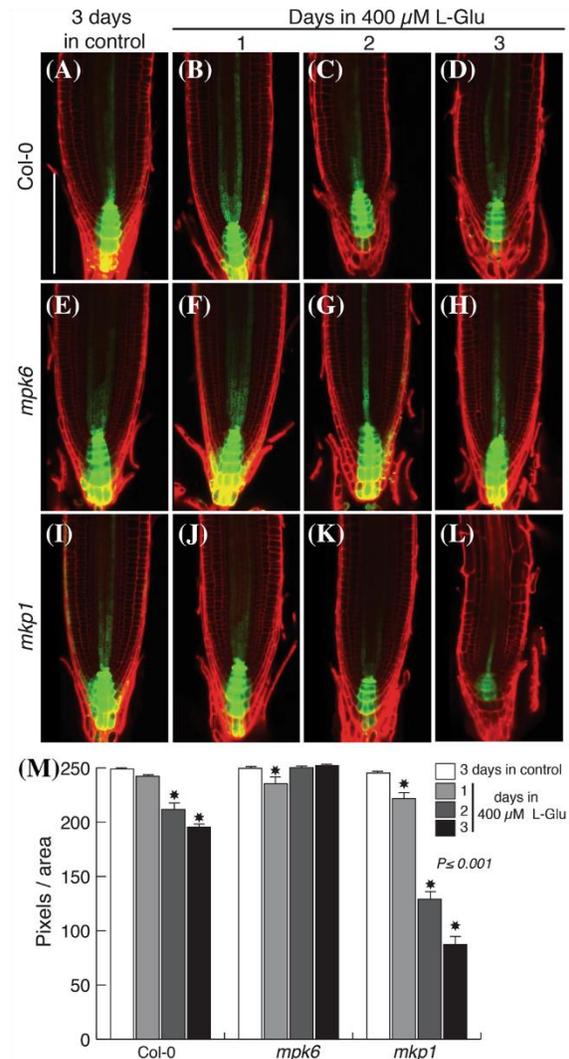
Auxin distribution within primary root tips controls cell division and elongation (Blilou et al. 2005). To analyze possible changes in auxin distribution triggered by L-Glu in roots, the auxin response at the primary root tip was monitored using the auxin-inducible *DR5::GFP* construct (Ottenschläger et al. 2003). The results showed that in WT *Arabidopsis* seedlings transferred to media supplemented with 400 μM L-Glu, the auxin response was slightly decreased after few days of exposure (Fig. 5a–d, m). In these assays, *mpk6/DR5::GFP* seedlings, which display an insensitive L-Glu phenotype in primary roots, the auxin response seems to be not affected (Fig. 5e–h, m), whereas in *mkp1/DR5::GFP* plants the L-Glu treatment affect auxin response disrupting the *DR5::GFP* auxin maximum after 3 days in L-Glu (Fig. 5i–m).

To determine if changes in the auxin response by L-Glu is dependent of the expression of the PIN family of auxin efflux transporters, the level of PIN1, PIN2 and PIN7 was determined in WT, *mpk6* and *mkp1* seedlings that express the reporter fusion proteins *PIN1::PIN1::GFP* (Benkova



**Fig. 4** L-Glu impairs cell elongation in roots via MPK6 and MKP1. Seeds from WT (Col-0), *mpk6* and *mkp1* mutants were germinated and grown for 5 days on MS 0.2× media, then transferred to same media (a) or to media supplemented with 400 μM L-Glu (b). The lengths of the most proximal cells in the elongation zone were measured. The elongation cell leaving the transition zone of the root was defined as cell 1, while the cell approaching the differentiation zone was defined as cell 4. Values are the mean ± standard error of 12 plants analyzed. Star marks indicate Student's *t* test significant differences comparing *mpk6* and *mkp1* mutants with the WT

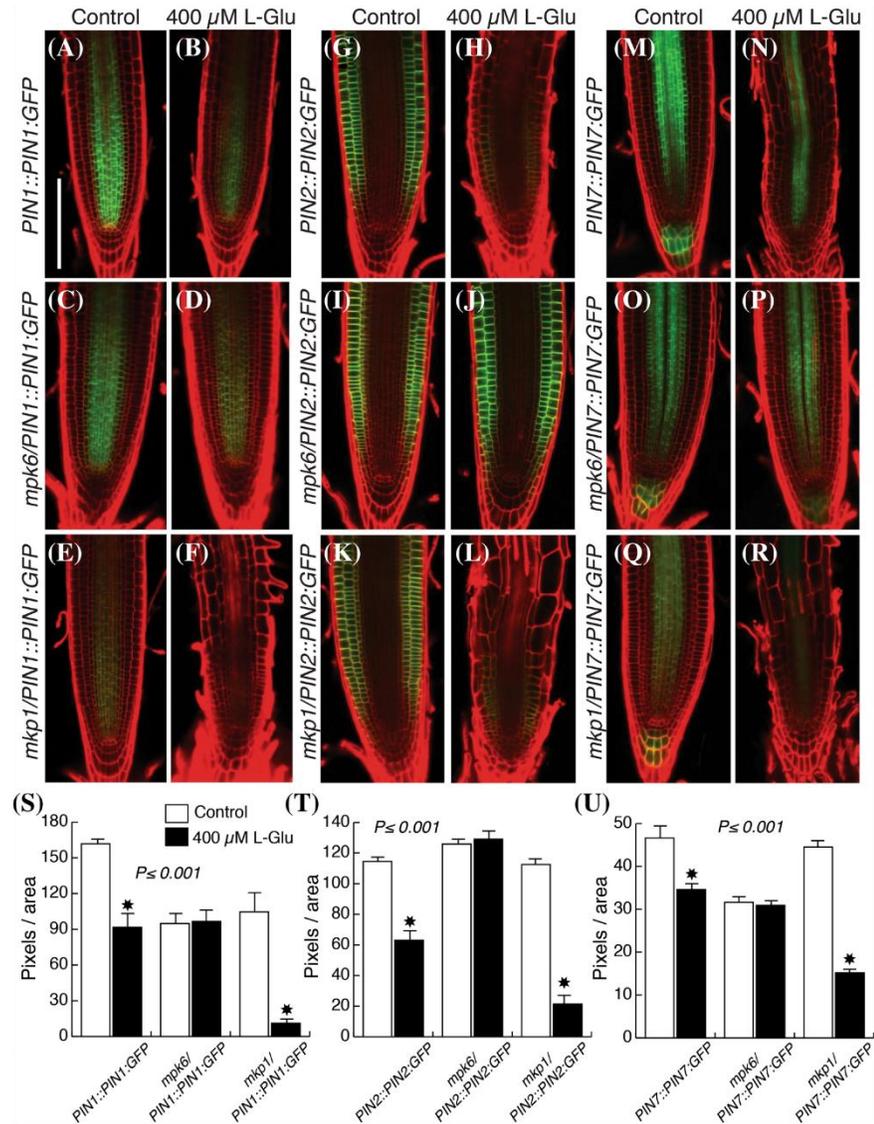
et al. 2003), *PIN2::PIN2:GFP* (Bliluo et al. 2005) and *PIN7::PIN7:GFP* (Bliluo et al. 2005). L-Glu decreased the expression of PIN1, PIN2 and PIN7 in WT seedlings (Fig. 6a, b, g, h, m, n, s–u). But interestingly, in *mpk6* mutant background the expression of PIN1, PIN2 and PIN7 were not affected (Fig. 6c, d, i, j, o, p, s–u). In contrast, in *mkp1* mutant background, the level of all three PIN proteins drastically diminished by L-Glu treatment, which correlated with changes in the structure of the root tip (Fig. 6e, f, k, l, q–u). Together, these data show that the



**Fig. 5** L-Glu affects auxin distribution in *Arabidopsis* primary roots. *Arabidopsis DR5::GFP*, *mpk6/DR5::GFP* and *mkp1/DR5::GFP* seedlings were germinated and grown for 5 days on MS 0.2× media, then transferred to same media or to media supplemented with 400 μM L-Glu. After 1, 2, or 3 days in treatment plantlets were stained with propidium iodide and analyzed by confocal microscopy. Representative photographs of primary root tips from: *DR5::GFP* (a–d), *mpk6/DR5::GFP* (e–h) and *mkp1/DR5::GFP* (i–l), are shown. Scale bar 100 μm. The GFP fluorescence (m) was determined using Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Star marks indicate Student's *t* test significant differences between treatments and their respective control. The experiment was repeated two times with similar results (n = 12)

repression of root growth by L-Glu may be closely related to an impaired auxin distribution and response, possibly linked to phosphorylation/dephosphorylation events mediated by MPK6 and MKP1 proteins.

**Fig. 6** L-Glu affects the levels of PIN auxin transporters in *Arabidopsis* roots. *Arabidopsis* seedlings harboring gene constructs with auxin transporter proteins fused to the GFP proteins *PIN1::PIN1:GFP*, *PIN2::PIN2:GFP* and *PIN7::PIN7:GFP* were transferred to *mpk6* and *mkp1* mutant backgrounds by outcrossing. Seeds from homozygous lines were germinated and grown for 5 days on MS 0.2× media, then transferred to the same media or to media supplemented with 400 μM L-Glu for 5 days. After treatment roots were stained with propidium iodide and analyzed by confocal microscopy. Representative photographs from: *PIN1::PIN1:GFP* (a, b), *mpk6/PIN1::PIN1:GFP* (c, d), *mkp1/PIN1::PIN1:GFP* (e, f); *PIN2::PIN2:GFP* (g, h), *mpk6/PIN2::PIN2:GFP* (i, j), *mkp1/PIN2::PIN2:GFP* (k, l); *PIN7::PIN7:GFP* (m, n), *mpk6/PIN7::PIN7:GFP* (o, p) and *mkp1/PIN7::PIN7:GFP* (q, r) are shown. Scale bar 100 μm. The GFP fluorescence (s–u) was determined using Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). The fluorescence intensity of the lines in 400 μM of L-Glu was compared to their respective control and star marks indicate Student's *t* test significant differences. The experiment included 15 seedlings, and was repeated three times with similar results



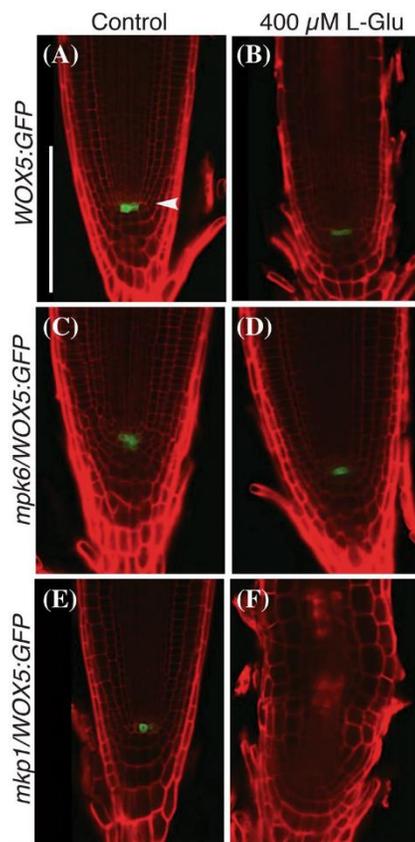
### L-Glu affects quiescent center gene expression through MPK6 and MKP1

To examine whether L-Glu driven changes in primary root growth involve changes on QC identity, we analyzed the expression of *WOX5:GFP* (Ding and Friml. 2010) in WT and in *mpk6* and *mkp1* mutants in response to 400 μM L-Glu. L-Glu seems to affect in a similar way the number of cells comprising the QC in WT (Fig. 7a, b) and *mpk6* (Fig. 7c, d) seedlings. But notably, L-Glu treatment causes the loss of QC identity in *mkp1* mutant (Fig. 7e, f), which correlates with *mkp1* mutant altered root tip structure. We conclude that MKP1 is a positive regulator for the

maintenance of QC identity, which apparently impact the root response to L-Glu.

### L-Glu inhibits expression of PLETHORA1 and 2 transcription factors in an MPK6/MKP1 independent manner

The space-temporal expression of AP2 transcription factors such as PLETHORA1 (PLT1) and PLT2 are involved in QC specification and stem cell activity, helping to establish and maintaining the root meristem (Aida et al. 2004). Then, we found interesting to examine the expression of these transcription factors in primary roots of WT and *mpk6* and *mkp1*



**Fig. 7** L-Glu affects QC identity. *Arabidopsis* plants expressing the WOX5 QC identity marker on wild-type (*WOX5:GFP*), and on *mpk6* (*mpk6/WOX5:GFP*) and *mkp1* (*mkp1/WOX5:GFP*) mutant backgrounds, were germinated and grown for 5 days on MS 0.2× media, then transferred to same media or to media supplemented with 400 μM L-Glu for 5 days. After treatment roots were recovered, stained with propidium iodide and analyzed by confocal microscopy. Representative photographs of root tips from: *WOX5:GFP* (a, b), *mpk6/ WOX5:GFP* (c, d) and *mkp1/WOX5:GFP* (e, f), are shown. The experiment included 15 seedlings and was repeated three times with similar results. Scale bar 100 μm

mutants treated or not with 400 μM L-Glu, using *PLT1:CFP* and *PLT2:CFP* gene constructs (Galinha et al. 2007). Surprisingly, *PLT1* and *PLT2* levels were strongly repressed by L-Glu in WT (Supplementary Fig. S7a, b, g, h, m, n), but also in *mpk6* (Supplementary Fig. S7c, d, i, j, m, n) and in *mkp1* (Supplementary Fig. S7e, f, k–n) mutant backgrounds, it irrespective of the contrasting effect that L-Glu has over root growth of the *mpk6* and *mkp1* mutants. Thus, L-Glu repression of *PLT1* and *PLT2* likely contributes to primary root growth inhibitory effects of this amino acid, whereas the growth resistance of *mpk6* to L-Glu cannot be explained only by the expression of *PLT1* and *PLT2* at the root stem cell niche.

## Discussion

Research aimed at identify the molecular signaling components involved in L-Glu-mediated root responses have yielded limited success, and the mechanisms of L-Glu sensing in plants remain mostly unknown. Previous research showed that the *mpk6* mutants had a longer primary root than that of the WT (López-Bucio et al. 2014), whereas the *mkp1* mutants display a short root phenotype, which contrasts with *mpk6* seedlings (Bartels et al. 2009), thus opening the possibility that a MAPK module could orchestrate root architectural responses to this bioactive amino acid.

Using in-gel kinase assays, it was observed that L-Glu supplementation rapidly induces MPK3 and MPK6 activities in *Arabidopsis* seedlings, suggesting that both kinases could mediate the changes in root architecture elicited by L-Glu. However, the fact that *mpk6* was less sensitive to L-Glu in primary root growth assays, whereas *mpk3* resulted slightly oversensitive, indicate that MPK6 and MPK3 play distinct functions in L-Glu sensing by primary roots. This result is not surprising, as both kinases seem to act independently in the embryo and root development programs of *Arabidopsis* (López-Bucio et al. 2014). The participation of MPK6 depends of its posttranscriptional activity, since its transcript levels or expression patterns does not change in time when L-Glu elicit changes in the primary root, then we propose that MPK6 act as a molecular switch inducing L-Glu responses by phosphorylation/dephosphorylation reactions.

Our data provides the first compelling evidence of the participation of a MAPK cascade in plant perception of L-Glu. A previous report demonstrated that the MEKK1 kinase (a MPKKK) plays a key role in L-Glu perception, since mutation of this gene renders plants insensitive to L-Glu effects on primary roots (Forde et al. 2013). However, it is still unclear whether the kinase activity or other unrelated function of this protein is determinant for the L-Glu insensitivity of roots. An obvious follow-up of this research should focus identifying the MPKKs acting upstream of MPK6. Very recently, MPK6 was related to the effects of high concentrations of hydrogen sulfide inhibiting primary root growth, via acting downstream of reactive oxygen species and upstream of nitric oxide accumulation. Similarly to L-Glu, hydrogen sulfide repressed the distribution of auxin and reduced the meristematic cell division potential in root tips (Zhang et al. 2017). It remains to be determined if L-Glu changes reactive oxygen distribution and/or nitric oxide levels.

In *A. thaliana*, MAPKs are regulated by MAP kinase phosphatases (MKPs). MKP1 has an important role in biotic, abiotic and genotoxic stresses and interacts with

and dephosphorylate MPK6 in vivo (Ulm et al. 2002; Bartels et al. 2009). To test if MKP1 participates in the root L-Glu perception likely regulating MPK6, we compared the root growth response of WT and *mkp1* mutants to L-Glu, and the mutants displayed the opposite root phenotypes, forming shorter primary roots than WT plants in response to this amino acid. The MKP1 loss of function phenotype is consistent with an increased MPK6 activity, which is also evident in our in-gel kinase assays. However, it was observed that the *mkp1* mutants preserved a basal MPK6 activity, which further increases following L-Glu supply, indicating that other phosphatase (s) may participate redundantly with MKP1. In this sense, additional factors possibly involved in this signaling pathway are the PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE1 (PTP1), which physically interacts with MPK6 and coordinates with MKP1 to repress plant defense responses (Bartels et al. 2009; Gupta and Luan 2003) and the Toll Interleukin 1 Receptor/Nucleotide Binding/Leucine Rich Repeat (TIR-NB-LRR) receptor-like resistance gene homolog of the SUPPRESSOR OF NPR1-1, CONSTITUTIVE1 (SNCI), which is a natural modifier of MKP1 (Li et al. 2007; Bartels et al. 2009), which may also influence the developmental responses modified by L-Glu via MAPK signaling.

The primary root growth inhibition of WT plants treated with L-Glu was initially attributed to inhibition of cell division (Walch-Liu et al. 2006), but the possible role of cell elongation has been unclear to date. Our results first confirm that L-Glu inhibits both cell division and elongation, and in particular, roots of *mkp1* mutant seedlings fail to express the mitotic marker, *CycB1:uidA* at lower L-Glu doses or times of exposure, consistent with its L-Glu hypersensitive phenotype. The role of L-Glu in repressing cell division and elongation could be related to an impaired auxin biosynthesis and transport based on analysis of (1) the effects of L-Glu on growth and root meristem structure, (2) the contrasting root phenotype of *mpk6* and *mkp1* mutants, and (3) expression of *DR5::GFP* and auxin transporters of the PIN family. Decreased auxin responses as revealed by the *DR5::GFP* auxin-inducible gene marker in *mkp1* seedlings in response to L-Glu treatments suggest that auxin biosynthesis at the root meristem is affected by L-Glu. This process depends on MPK6 because its corresponding mutants show normal accumulation of auxin at the root meristem under the same or higher L-Glu concentrations. These observations are in agreement with previous data by Walch-Liu et al. (2006), in which two loss-of function mutants at the AXR1 locus (*axr1-3* and *axr1-12*) were hypersensitive to L-Glu repression of growth and help to explain why the sensitivity of root growth to L-Glu declines markedly when the temperature is increased over the range 20–26 °C (Forde 2014), since high temperature promotes auxin biosynthesis (Gray et al.

1998; Franklin et al. 2011; Sun et al. 2012), thus relieving the negative effects of L-Glu on roots.

In *Arabidopsis* seedlings lacking MPK6 or MKP1 primary root growth was either resistant or oversensitive to L-Glu. This can be explained because asymmetric release of IAA from the QC and collumella initial cells to the epidermis and lateral root cap through the PIN2 transporter drives differential cell expansion in elongation zone tissues (Blilou et al. 2005). Consistently, *mkp1* and *mpk6* mutants showed contrasting expression of *PIN1::PIN1::GFP* and *PIN2::PIN2::GFP*, suggesting that L-Glu impairs auxin transport via directly or indirectly influencing the levels of PIN proteins. One possible explanation is that the loss of PIN1 and PIN2 abundance in *mkp1* (but not in *mpk6*) seedlings may represent an indirect consequence of the differentiation of the root meristem, as a result of their failure to keep cell division active following L-Glu perception, whereas sustained PIN1 and PIN2 expression in *mpk6* mutants may directly depend upon the loss of activity of MPK6 kinase. In this scenario, MPK6 appears to be a repressor of PIN1 and PIN2 protein accumulation in roots, a process tightly influenced by L-Glu.

The transcription factor WOX5 is expressed exclusively in the QC and represents an important element for the control of cell proliferating activity of the surrounding initial cells. L-Glu treatment appears to affect the number of cells comprising the QC in the WT and *mpk6* mutant in similar manner. But in *mkp1* mutant the QC is lost, suggesting that L-Glu affect QC activity depending upon MKP1. It is possible that the loss of WOX5 expression in *mkp1* mutants affects the proliferating activity of initial stem cells, which then differentiate or that there is a mechanism negatively regulated by MKP1 that induces the accumulation of differentiation promoting factors such as the ACR4 kinase or the transcription factor CDF in initial cells, repressing WOX5 and terminating the stem cell pool (Pi et al. 2015). The results that L-Glu alters root cap development (Supporting Fig. S6), further suggests that it inhibits proliferation of columella cell initials in the root distal region, which is accompanied by impaired cell differentiation, as amyloplast (starch containing plastids present specifically in columella cells) are no longer visible in *mkp1* mutants in response to 400  $\mu$ M L-Glu treatment, whereas in *mpk6* mutants the amyloplasts are present even at greater L-Glu concentrations.

The auxin-inducible transcription factors PLETHORA1-4 redundantly control the undifferentiated fate of the meristem and mitotic activity. In accordance to the auxinic regulation of PLT1 and PLT2 expression (Aida et al. 2004), *PLT1::CFP* and *PLT2::CFP* fusion proteins decreased in response to L-Glu in WT and *mpk6* or *mkp1* mutants. These data provide an important insight for a direct role of L-Glu in regulating meristem activity in WT plants, that is likely independent upon the activity

of MKP1 or MPK6, since expression of both transcription factors in the mutants appears similarly reduced even though their meristems manifest clearly contrasting responses to L-Glu. In conclusion, this work provides evidence of the participation of the MPK6 and MKP1 in the plant perception of a bioactive amino acid. The elucidation of the upstream components in the MAPK signaling pathway in this node is certainly an important avenue to follow, which needs to be considered for future studies.

**Acknowledgements** We thank Patricia Jarillo for technical support. We appreciate the kind donation of seeds by Drs. Ben Scheres, Alfredo Cruz-Ramírez, Shuqun Zhang, Scot C. Peck and Marina A. González Besteiro. This work was supported by Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)-Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA)-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) (Grants: IN207014 & IN210917 to AGG) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)-México (Grants: CB2015-251848 to AGG and CB-177775 to JLB).

**Author contributions** JSL-B, JR-G, GR-O, FR-H, MR-V: planning and execution of experiments and analysis of data/results. PL: funding, discussion of results and editing of the manuscript. JL-B: experiment planning, data/results analysis and writing/editing of the manuscript. AAG-G: funding, experiment planning, data/results analysis and writing/editing of the manuscript.

## References

- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh YS, Amasino R, Scheres B (2004) The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119:109–120
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R et al (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653–657
- Andreasson E, Ellis B (2009) Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus. *Trends Plant Sci* 15:106–113
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415:977–983
- Bartels S, Anderson JC, Gonzalez Besteiro MA, Carreri A, Hirt H, Buchala A, Metraux JP, Peck SC, Ulm R (2009) MAP kinase phosphatase1 and protein tyrosine phosphatase1 are repressors of salicylic acid synthesis and SNC1-mediated responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:2884–2897
- Bartels S, González Besteiro MA, Lang D, Ulm R (2010) Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends Plant Sci* 15:322–329
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertov D, Jürgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591–602
- Bianucci M, Mattioli R, Moubayidin L, Sabatini S, Constantino P, Trovato M (2015) Proline affects the size of the root meristematic zone in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol* 15:263
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 443:39–44
- Bush SM, Krysan PJ (2007) Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J Exp Bot* 58:2181–2191
- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao R, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero P, Bennett M (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* 13:843–852
- Cederholm HM, Iyer-Pascuzzi AS, Benfey P (2012) Patterning the primary root in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 1:675–691
- Chapman E, Estelle M (2009) Mechanisms of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* 43:265–285
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–743
- Colcombet J, Hirt H (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signaling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413:217–226
- Colón-Carmona A, You R, Haimovitch-Gal T, Doerner P (1999) Spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant J* 20:503–508
- Contreras-Cornejo HA, López-Bucio JS, 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 atroviride*. *Mol Plant Microbe Interact* 28:701–710
- Ding Z, Friml J (2010) Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:12046–12051
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H (2007) Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* 318:453–456
- 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
- Fiil BK, Petersen K, Petersen M, Mundy J (2009) Gene regulation by MAP kinase cascades. *Curr Opin Plant Biol* 12:615–621
- Forde BG (2014) Glutamate signalling in roots. *J Exp Bot* 65:779–787
- Forde BG, Roberts MR (2014) Glutamate receptor-like channels in plants: a role as amino acid sensors in plant defence? *F1000 Prime Rep* 6 (37):7
- Forde BG, Cutler SR, Zaman N, Krysan PJ (2013) Glutamate signalling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces changes in *Arabidopsis* root architecture. *Plant J* 75:1–10
- Franklin KA, Lee SH, Patel D, Kumar SV, Spartz AK, Gu C, Ye S, Yu P, Breen G, Cohen JD et al (2011) Phytochrome-interacting factor 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:20231–20235
- Fukaki H, Tasaka M (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol* 69:437–449
- Galinha C, Hofhuis H, Luijten M, Willemsen V, Blilou I, Heidstra R, Scheres B (2007) PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of *Arabidopsis* root development. *Nature* 449:1053–1057
- Gray WM, Ostin A, Sandberg G, Romano CP, Estelle M (1998) High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:7197–7202
- Gupta R, Luan S (2003) Redox control of protein tyrosine phosphatases and mitogen-activated protein kinases in plants. *Plant Physiol* 132:1149–1152
- Kan CC, Chung TY, Wu HY, Juo YA, Hsieh MH (2017) Exogenous glutamate rapidly induces the expression of genes involved in metabolism and defense responses in rice roots. *BMC Genom* 18:186. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3588-7>
- Kanno S, Arrighi JF, Chiarenza S, Bayle V, Berthomé R, Pêret B, Javot H, Delannoy E, Marin E, Nakanishi TM, Thibaud MC, Nussaume

- L (2016) A novel role for the root cap in phosphate uptake and homeostasis. *eLife* 5:e14577
- Keyse SM (2008) The regulation of stress-activated MAP kinase signalling by protein phosphatases. In: Posas F, R., NA (eds) Topics in current genetics: stress-activated protein kinases, vol 20. Springer, Berlin Heidelberg, pp 33–49
- Kong D, Hu HC, Okuma E, Lee Y, Lee H, Munemasa S, Cho D, Ju C, Pedoim L, Rodriguez B et al (2016) L-Met activates *Arabidopsis* GLR Ca<sup>2+</sup> channels upstream of ROS production and regulates stomatal movement. *Cell Rep* 17:2553–2561
- Křeček P, Skúpa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zažímalová E (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* 10:249–249.11
- Lam HM, Chiu J, Hsieh MH, Meisel L, Olivera IC, Shin M, Coruzzi G (1998) Glutamate-receptor genes in plants. *Nature* 396:125–126
- Lampard GR, Macalister CA, Bergmann DC (2008) *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* 322:1113–1116
- Li Y, Yang S, Yang H, Hua J (2007) The TIR-NB-LRR gene *SNCI* is regulated at the transcript level by multiple factors. *Mol Plant Microbe Interact* 20:1449–1456
- Liu Y, Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:3386–3399
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6:280–287
- López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya-González J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, de Luna-Valdés LA, Ramos-Vega M, León P, Guevara-García AA (2014) *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot* 65:169–183
- Malamy JE (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* 28:67–77
- MAPK Group (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7: 301–308
- Meyerhoff O, Müller K, Roelfsema MR, Latz A, Lacombe B, Hedrich R, Dietrich P, Becker D (2005) *AtGLR3.4*, a glutamate receptor channel like gene is sensitive to touch and cold. *Planta* 222:418–427
- Michard E, Lima PT, Borges F, Silva AC, Portes MT, Carvalho JE, Gilliam M, Liu LH, Obermeyer G, Feijo JA (2011) Glutamate receptor-like genes form Ca<sup>2+</sup> channels in pollen tubes and are regulated by pistil D-serine. *Science* 332:434–437
- Moe LA (2013) Amino acids in the rhizosphere: from plants to microbes. *Am J Bot* 100:1692–1705
- Mousavi SA, Chauvin A, Pascaud F, Kellenberger S, Farmer EE (2013) *GLUTAMATE RECEPTOR-LIKE* genes mediate leaf-to-leaf wound signalling. *Nature* 500:422–426
- Okumoto S, Funck D, Trovato M, Forlani G (2016) Amino acids of the glutamate family: functions beyond primary metabolism. *Front Plant Sci* 7:318
- Ottenschläger 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:2987–2991
- Pi L, Aichinger E, van der Graaff E, Llavata-Peris CI, Weijers D, Henning L, Groot E, Laux T (2015) Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression. *Dev Cell* 33:576–588
- Qi Z, Stephens NR, Spalding EP (2006) Calcium entry mediated by GLR3.3, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile. *Plant Physiol* 142:963–971
- Scheres B, Benfey P, Dolan L (2002) Root development. In: The American Society of Plant Biologists, eds. *The Arabidopsis Book*, vol 1, p e0101
- Suárez-Rodríguez MC, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 61:621–649
- Sun J, Qi L, Li Y, Chu J, Li C (2012) PIF4-mediated activation of *YUCCA8* expression integrates temperature into the auxin pathway in regulating *Arabidopsis* hypocotyl growth. *PLoS Genet* 8:e1002594
- Ulm R, Revenkova E, di Sansebastiano GP, Bechtold N, Paszkowski J (2001) Mitogen-activated protein kinase phosphatase is required for genotoxic stress relief in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 15:699–709
- Ulm R, Ichimura K, Mizoguchi T, Peck SC, Zhu T, Wang X, Shinozaki K, Paszkowski J (2002) Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO J* 21:6483–6493
- Vieten A, Vanneste S, Wiśniewska J, Benková E, Benjamins R, Beckman T, Luschnig C, Friml J (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132:4521–4531
- Vincill ED, Clarin AE, Molenda JN, Spalding EP (2013) Interacting glutamate receptor-like proteins in phloem regulate lateral root initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25:1304–1313
- Walch-Liu P, Liu LH, Remans T, Tester M, Forde BG (2006) Evidence that L-glutamate can act as an exogenous signal to modulate root growth and branching in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 47:1045–1057
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007a) Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:63–73
- Wang JQ, Fibuch EE, Mao L (2007b) Regulation of mitogen-activated protein kinases by glutamate receptors. *J Neurochem* 100:1–11
- Xu J, Zhang S (2015) Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci* 20:56–64
- Zhang S, Klessig DF (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9:809–824
- Zhang P, Luo Q, Wang R, Xu J (2017) Hydrogen sulfide toxicity inhibits primary root growth through the ROS-NO pathway. *Sci Rep* 7:868

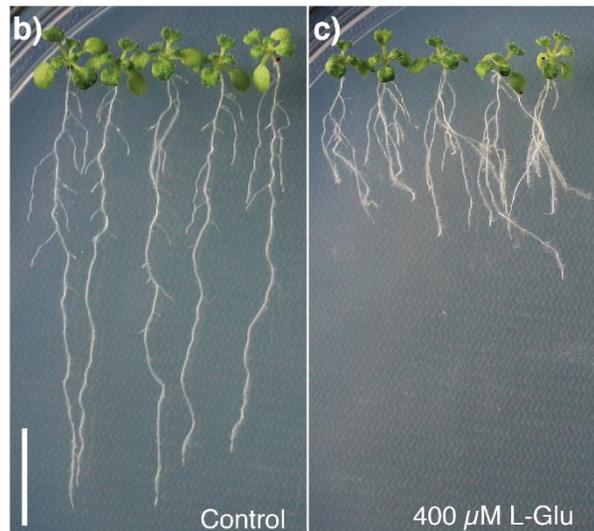
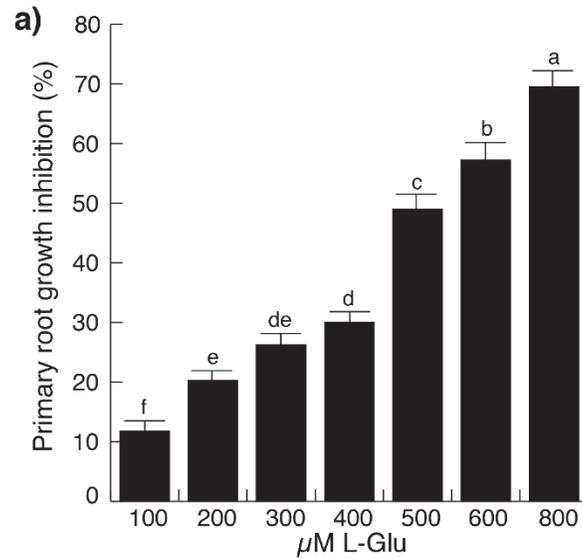
## Supporting Information

Article title: Mitogen activated protein kinase 6 and MAP kinase phosphatase 1 are involved in the response of *Arabidopsis* roots to L-glutamate.

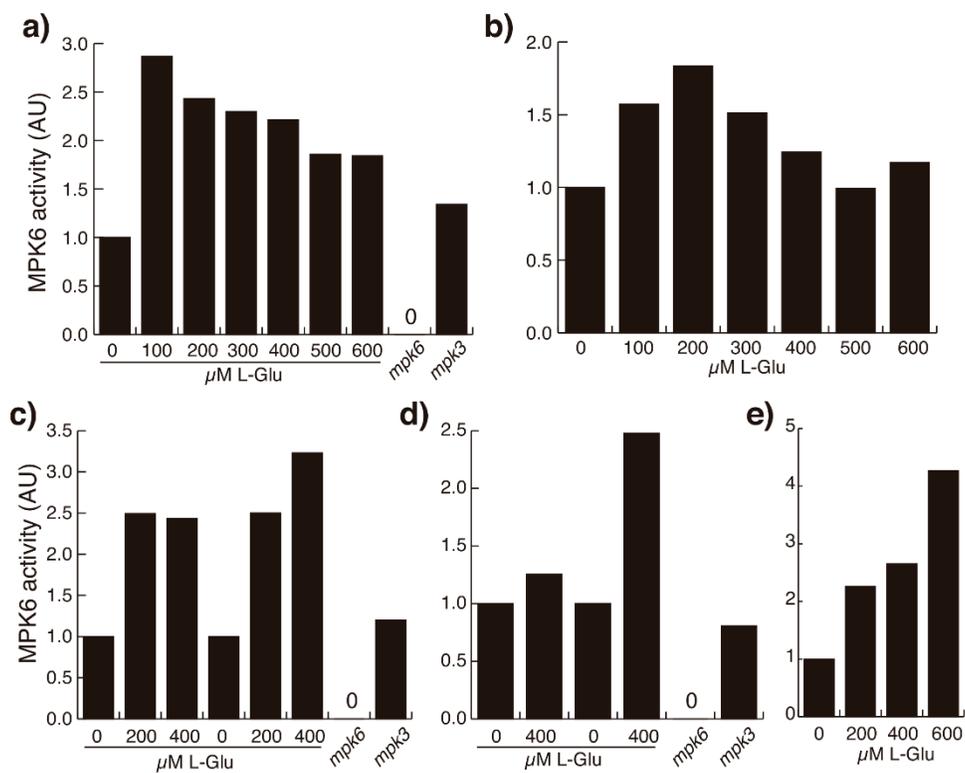
Authors: Jesús Salvador López-Bucio, Javier Raya-González, Gustavo Ravelo-Ortega, León Francisco Ruiz-Herrera, Maricela Ramos-Vega, Patricia León, José López-Bucio, and Ángel Arturo Guevara-García.

The following Supplementary material is available for this article:

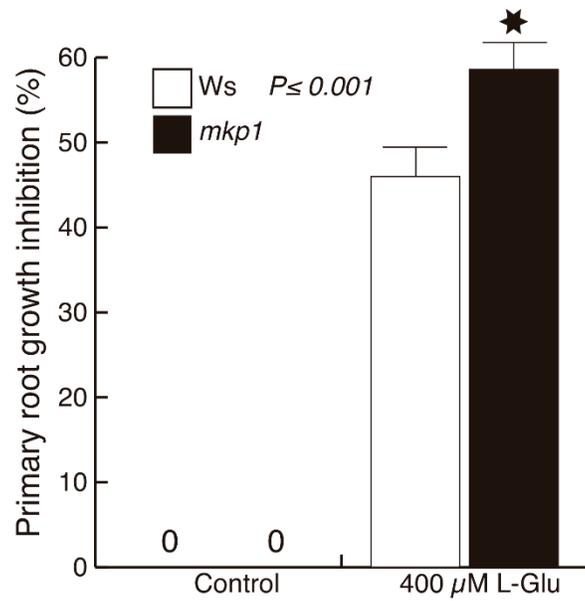
Supplementary Figures (S1-S7).



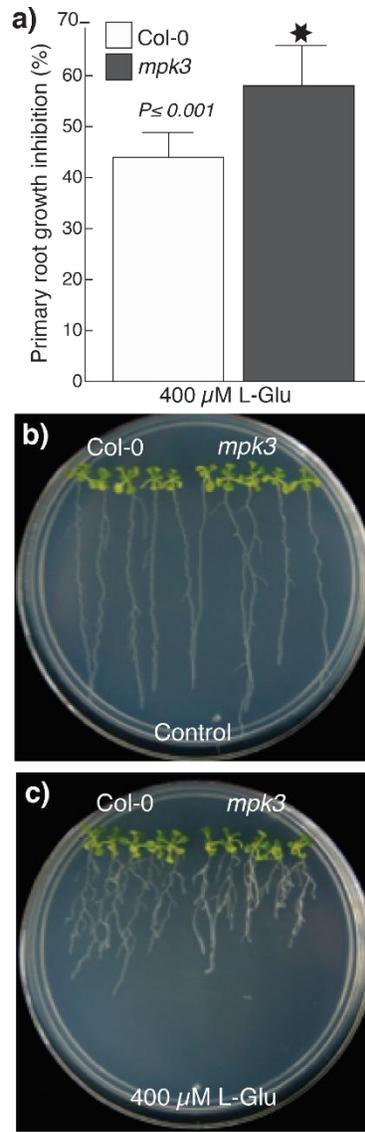
**Supplementary Fig. S1.** L-Glu affects *Arabidopsis* primary root development. **(a)** Primary root length inhibition caused by L-Glu. Data was obtained from seedlings grown on MS 0.2x media supplemented with the indicated L-Glu concentrations. The percentages of root growth inhibition were calculated taken into account the primary root length of seedlings grown on MS 0.2x media as 0% of inhibition. Values are the mean  $\pm$  standard error (n=15) from three independent experiments. Different letters represent statistically different means by a Tukey's post-hoc test ( $P \leq 0.05$ ). Representative seedlings growing in MS 0.2x media **(b)** or MS 0.2x media supplemented with 400  $\mu$ M L-Glu **(c)** are shown. Scale bar in **(b)** = 1 cm.



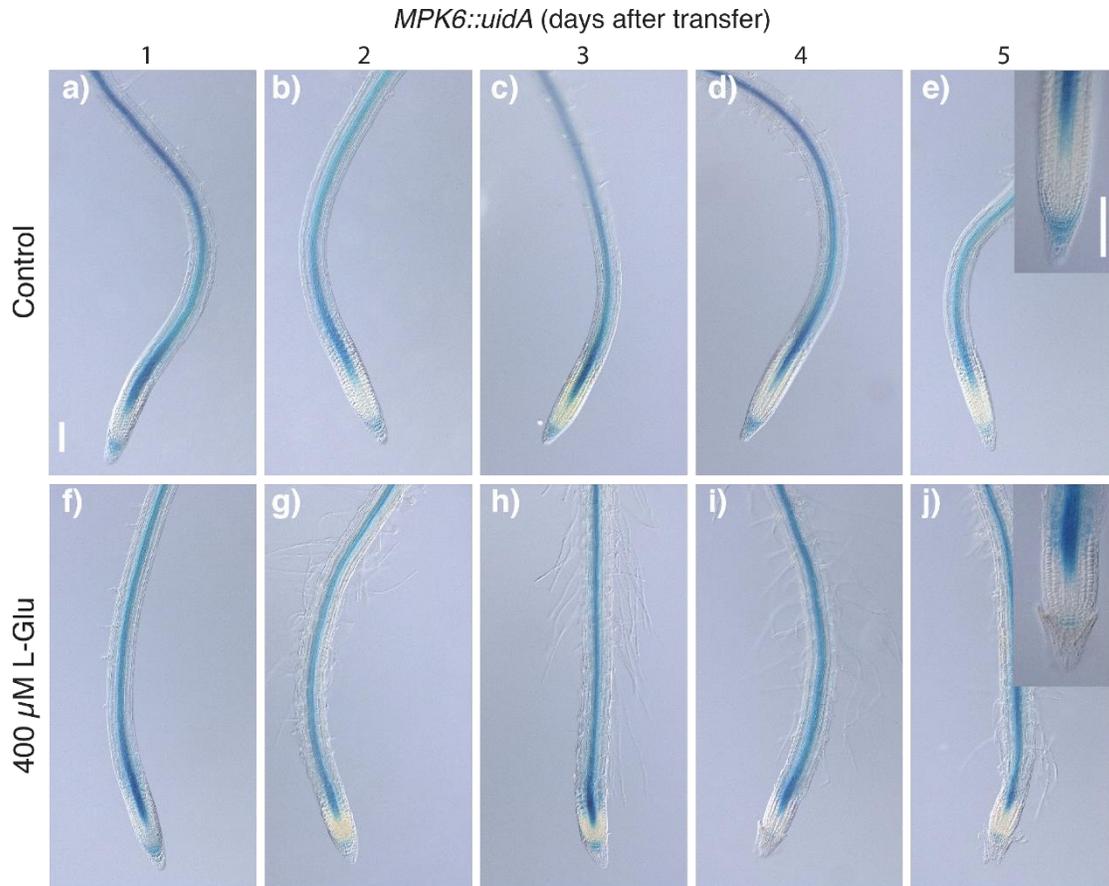
**Supplementary Fig. S2.** L-Glu induces MPK6 activity. Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) densitometric analysis of the MPK6 activity bands from the kinase assays showed in Figure 1. In all cases MPK6 activity in the control condition was taken as 1 on Arbitrary Units (AU)



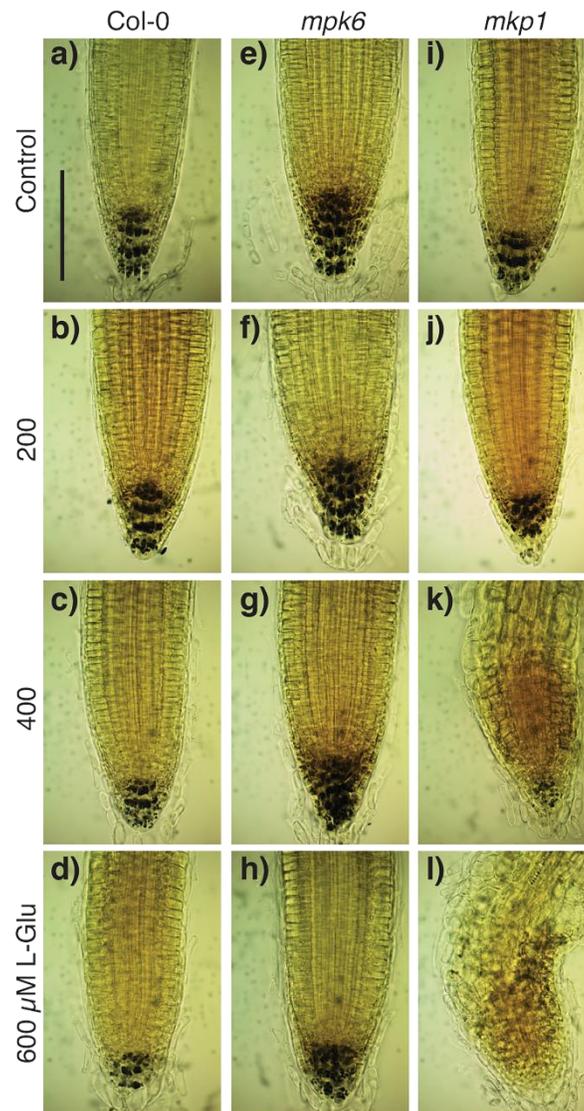
**Supplementary Fig. S3.** L-Glu effects in wild-type and *mkp1* mutants in Wassilewskija (Ws) genetic background. Plants were germinated and grown for 5 days on MS 0.2x media, then transferred to the same media supplemented with 400  $\mu$ M L-Glu. The primary root length was measured 5 days after transfer and the growth inhibition was calculated taken primary root length of seedlings grown in MS 0.2x media as 0% of inhibition. Values shown are mean  $\pm$  standard error (n = 15). Star marks indicate Student's t-test significant differences at  $P \leq 0.001$ .



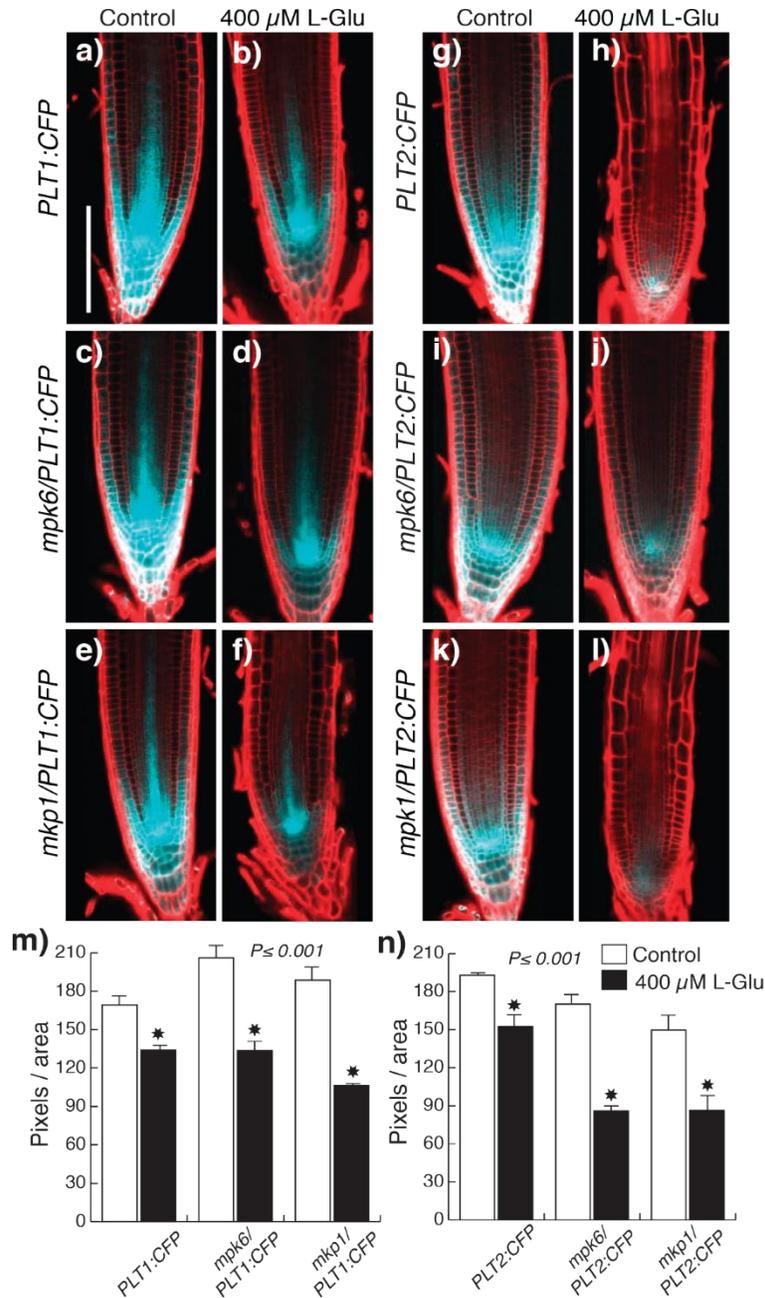
**Supplementary Fig. S4.** *mpk3* mutant performance in response to L-Glu treatment. (a) Comparison between root growth inhibitions caused by 400  $\mu$ M L-Glu on wild-type (Col-0) and *mpk3* null mutant. Data were recorded from seedlings grown on MS 0.2x media supplemented with 400  $\mu$ M L-Glu. The percentages of root growth inhibition were calculated taken primary root length of seedlings grown in MS 0.2x media as 0% of inhibition. Values are mean  $\pm$  standard error (n = 15). Star marks Student's t-test significant differences at  $P \leq 0.001$ . In (b) and (c) representative Petri dishes with 7-DAG wild-type (Col-0) and *mpk3* mutant seedlings grown side by side on MS 0.2x media and MS 0.2x media supplemented with 400  $\mu$ M L-Glu, respectively.



**Supplementary Fig. S5.** MPK6 pattern expression is not affected by L-Glu treatment. A promoter fusion with the *uidA* gene (*MPK6::uidA*) was generated and the expression of MPK6 was evaluated at root apical meristem. *MPK6::uidA* plants were germinated on MS 0.2x media, then transferred to same media or to media supplemented with 400  $\mu$ M L-Glu and expression patterns were analyzed at 1, 2, 3, 4 and 5 days after transfer. Representative pictures of roots from plants grown on MS 0.2x media (**a, b, c, d, e**) or 400  $\mu$ M L-Glu (**f, g, h, i, j**) are shown. Scale bars = 100  $\mu$ m.



**Supplementary Fig. S6.** L-Glu affects columella structure in *mpk1* but not in *mpk6* mutants. Wild-type (Col-0), *mpk6* and *mpk1* mutants were germinated and grown for 5 days on MS 0.2x media, then transferred to same media as control and media supplemented with 200, 400 or 600 μM L-Glu, as indicated. 5 days after transfer seedlings were collected and their roots were stained with Lugol's solution to analyze the starch content in columella cells. Representative photographs of root tips of different plant lines in each experimental condition are shown. The experiment was repeated three times with similar results (n=15). Scale bars = 100 μm.



**Supplementary Fig. S7.** L-Glu represses *PLT1* and *PLT2* expression in *Arabidopsis* roots in an MPK6-MKP1-independent manner. Marker lines *PLT1:CFP* (a-f) and *PLT2:CFP* (g-l) on WT (a, b, g, h) and on *mpk6* (c, d, i, j) and on *mkp1* (e, f, k, l) mutant backgrounds, were grown on MS 0.2x media supplemented with 400μM or without (Control) L-Glu. Confocal micrographs were taken 7 days after germination with a propidium iodide counterstain and representative images per genotype are shown. Scale bar represents 100 μm. The CFP fluorescence (m, n) was determined using Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). The fluorescence intensity of the lines in 400 μM of L-Glu was compared to their respective control and star marks indicate Student's t-test significant differences. The experiment included 15 seedlings and it was repeated three times with similar results.



## Mitogen-activated protein kinase 6 integrates phosphate and iron responses for indeterminate root growth in *Arabidopsis thaliana*

Jesús Salvador López-Bucio<sup>1</sup> · Guadalupe Jessica Salmerón-Barrera<sup>2</sup> · Gustavo Ravelo-Ortega<sup>2</sup> · Javier Raya-González<sup>2</sup> · Patricia León<sup>3</sup> · Homero Reyes de la Cruz<sup>2</sup> · Jesús Campos-García<sup>2</sup> · José López-Bucio<sup>2</sup> · Ángel Arturo Guevara-García<sup>3</sup>

Received: 5 March 2019 / Accepted: 6 June 2019  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

### Abstract

**Main conclusion** A MAPK module, of which MPK6 kinase is an important component, is involved in the coordination of the responses to Pi and Fe in the primary root meristem of *Arabidopsis thaliana*.

**Abstract** Phosphate (Pi) deficiency induces determinate primary root growth in *Arabidopsis* through cessation of cell division in the meristem, which is linked to an increased iron (Fe) accumulation. Here, we show that Mitogen-Activated Protein Kinase6 (MPK6) has a role in *Arabidopsis* primary root growth under low Pi stress. MPK6 activity is induced in roots in response to low Pi, and such induction is enhanced by Fe supplementation, suggesting an MPK6 role in coordinating Pi/Fe balance in mediating root growth. The differentiation of the root meristem induced by low Pi levels correlates with altered expression of auxin-inducible genes and auxin transporter levels via MPK6. Our results indicate a critical role of the MPK6 kinase in coordinating meristem cell activity to Pi and Fe availability for proper primary root growth.

**Keywords** Low Pi stress · MAPK6 · Phosphate/iron balance · Root development

### Abbreviations

DR5 Synthetic auxin-response element  
GFP Green fluorescent protein  
MAPK Mitogen-activated protein kinase  
MPK3, MPK6 Mitogen-activated protein kinase 3 and 6

PIN1, PIN2 PIN-formed efflux auxin transporters 1 and 2  
RAM Root apical meristem

### Introduction

Plant survival to adverse growth conditions, such as water stress and nutrient deficiency, depends on diverse adaptive responses, including remodeling of the root architecture. The availability of macro- and micronutrients influences root development via complex hormonal and morphological adjustments collectively termed as *root foraging* (López-Bucio et al. 2003; Giehl and von Wiren 2014; Ruiz Herrera et al. 2015). Phosphate (Pi) is a fundamental element required for photosynthesis and metabolism. Pi deficiency inhibits primary root growth and induces lateral root and root hair formation (López-Bucio et al. 2002; Sánchez-Calderón et al. 2005; Wang et al. 2019). This enables better soil exploration, which is accompanied by an increased expression of high-affinity phosphate transporters and exudation of phosphatase, which together allow plants to improve Pi capture from inorganic and organic resources

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00425-019-03212-4>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Jesús Salvador López-Bucio  
jlopezb@conacyt.mx

✉ Ángel Arturo Guevara-García  
aguevara@ibt.unam.mx

- <sup>1</sup> CONACYT-Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CP 58030 Morelia, Michoacán, Mexico
- <sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CP 58030 Morelia, Michoacán, Mexico
- <sup>3</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 62250 Cuernavaca, Morelos, Mexico

(Sánchez-Calderón et al. 2005). Besides, during Pi limitation, primary and lateral root meristems shift from indeterminate to determinate growth, ceasing cellular proliferation and initiating differentiation of stem and meristematic cells (Sánchez-Calderón et al. 2005; Wang et al. 2019).

Some proteins orchestrating the primary root growth responses to Pi starvation have been identified. The multicopper oxidase genes *LOW PHOSPHATE ROOT1* and *2* (*LPR1* and *LPR2*) play a role in sensing local Pi levels, since mutations of both genes confer primary root growth resistance to the determinate growth program induced by Pi starvation (Svistoonoff et al. 2007). The *P<sub>5</sub>-type ATPase* (*PDR2*) gene is required for root apical meristem (RAM) and stem cell maintenance during Pi deficiency by supporting the expression of the SCARECROW (*SCR*) transcription factor and acts upstream of *LPR1* (Ticconi et al. 2009). The *OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE3* (*OPR3*), which participates in jasmonic acid biosynthesis, is also required for root adaptation to Pi deficiency as part of a signaling network involving ethylene and gibberellins (Zheng et al. 2016). *ALUMINUM SENSITIVE3* (*ALS3*) originally identified as involved in plant tolerance to aluminum toxicity (Larsen et al. 2005) was more recently independently identified as a gene named *HYPERSENSITIVE TO Pi STARVATION10* (*HPS10*), and its mutation drives hypersensitivity to Pi deficiency (Belal et al. 2015). *ALS3/HPS10* together with its interactor SENSITIVE TO ALUMINUM RHIZOTOXICITY1 (*STAR1*) constitutes a putative ATP-binding tonoplast transporter (Dong et al. 2017). Two additional mutations causing insensitivity to Pi deficiency are *SENSITIVE TO PROTON RHIZOTOXICITY1* (*STOP1*) and *ALUMINUM-ACTIVATED MALATE TRANSPORTER1* (*ALMT1*) (Balzergue et al. 2017; Mora-Macías et al. 2017). *STOP1* protein is a zinc finger-type transcription factor that regulates the *ALMT1* gene expression encoding a malate transporter localized in the plasma membrane of root cells (Tokizawa et al. 2015).

Several reports evidenced the participation of iron (Fe) in the control of plant responses to Pi deficiency. Pi starvation increases Fe accumulation in roots and induces callose deposition (Ward et al. 2008; Ticconi et al. 2009; Müller et al. 2015). Genome-wide transcriptome and proteome analyses of plants exposed to Pi deprivation showed an over-expression of genes and proteins that regulate Fe homeostasis, cell wall remodeling, and reactive oxygen species (ROS) generation. The FERRIC REDUCTASE DEFECTIVE3 (*FRD3*) mediates an apoplastic Fe redistribution linked to Pi-dependent root growth (Hoehenwarter et al. 2016). *LPR1* has a ferroxidase activity that converts  $Fe^{2+}$  to  $Fe^{3+}$  in endoplasmic reticulum and cell wall. The mutation of the *PDR2* drives root inhibition hypersensitivity to Pi deficiency and higher accumulation of  $Fe^{3+}$  in the root apoplast (Ticconi et al. 2009; Müller et al. 2015). The mutants *als3/hps10* and *star1* both hypersensitive

to Pi starvation overaccumulates  $Fe^{3+}$  in roots (Belal et al. 2015; Dong et al. 2017). In contrast, the accumulation of Fe is reduced in root tips of both *stop1* and *almt1* mutants whose roots are insensitive to Pi deficiency (Balzergue et al. 2017; Mora-Macías et al. 2017). The *STOP1-ALMT1*-mediated accumulation of  $Fe^{3+}$  in the stem cell niche of roots under Pi deficiency raises the levels of ROS causing an increase in deposition of callose in cell walls and plasmodesmata that restricts the intracellular movement of the SHORT ROOT (*SHR*) transcription factor, which is responsible for the maintenance of the root stem cell niche (Müller et al. 2015; Mora-Macías et al. 2017). Altogether, these data show that a low-Pi/high-Fe ratio is important for the control of root growth, but the signaling cascade mediating this interaction is currently unknown.

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades include the enzymes MPKKK, MPKK and MPK that are activated sequentially by phosphorylation and play a role in responses to biotic and abiotic stresses, as well as in regulation of plant growth and development (Hamel et al. 2006; Mishra et al. 2006). In the *Arabidopsis* genome, 60 MPKKKs, 10 MPKKs, and 20 MPKs enzymes are encoded, but, due to their functional redundancy, only few of them have been characterized. From these, MPK3 and MPK6 play a complimentary role in inflorescence development, embryogenesis, and stomatal patterning (Bush and Krysan 2007; Wang et al. 2007; Meng et al. 2012), and both regulate growth responses during plant-microbe interactions, genotoxic stress, ROS accumulation, and hormone signaling (Asai et al. 2002; Ulm et al. 2002; Takahashi et al. 2007; Yoo et al. 2008; Wang et al. 2010; Xu et al. 2014; Contreras-Cornejo et al. 2015). Non-redundant functionality has also been demonstrated among them, since mutation of the *Arabidopsis* *MPK6* gene results in altered seed and embryo development, root architecture, and L-glutamate response phenotypes that are independent of MPK3 function (López-Bucio et al. 2014b, 2018).

In a recent report, MPK3 and MPK6 activities were enhanced during Pi deficiency influencing Pi acquisition through increasing the expression of Pi transporters (Lei et al. 2014). However, the specific relation of these MAPKs with the low Pi/Fe adaptive responses in roots and shoots, as well as their contribution to the root growth and architectural reconfiguration under Pi starvation remains to be investigated. In this report, we provide evidence of the specific participation of MPK6 in the modulation of primary root growth in response to contrasting Pi and Fe levels, likely affecting auxin homeostasis in the root meristem.

## Materials and methods

### Plant material and growth conditions

*Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0) WT seedlings were used in all experiments, and *mpk6-2* mutant line (SALK\_073907/*mpk6-2*) was previously reported by Liu and Zhang (2004) and was obtained from the Salk T-DNA collection (<http://arabidopsis.org>). The transgenic reporter genes *DR5::GFP* (Ottensschläger et al. 2003), *PIN1::PIN1:GFP* (Benková et al. 2003) and *PIN2::PIN2:GFP* (Blilou et al. 2005) transgenic lines were mobilized into the *mpk6-2* mutant background by outcrossing. Seeds were surface sterilized with bleach and rinsed three times with sterilized deionized water and incubated at 4 °C during 3 days to break dormancy. The seeds were germinated and grown in 1% agar solidified 0.2× MS medium containing 0.25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.125 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 3.758 mM KNO<sub>3</sub>, 0.6 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.3 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.0 μM KI, 20.04 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 19.99 μM MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 6.0 μM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 μM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.02 μM CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.021 μM CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 19.99 μM FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, and 20 μM Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O. For non-Pi and non-Fe treatments medium lacking KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and/or FeSO<sub>4</sub> was used. Seedlings analysis was performed at different days after germination being the final time 10 days after germination. Alternatively, the seeds were germinated in 0.2× MS medium and grown for 5 days, and then transferred to new plates containing fresh 0.2× MS complete medium or medium lacking KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and/or FeSO<sub>4</sub>. Plates were incubated vertically on a growth chamber (Percival AR95L, Percival Scientific) at 21 °C under 16:8 h of light/darkness photoperiod at 105 μmol/m<sup>2</sup> light intensity and analyzed at 2, 4, or 6 days after transfer.

### Root analysis

Primary root length was measured using a ruler and representative images were taken with a digital camera (Samsung digital camera SCC-131A). Photographs of meristems were captured with a digital camera (Nikon D50). Tukey's post hoc and Student's *t* tests were used for testing differences among treatments using SigmaPlot 11 (Systat Software). For confocal analysis, primary roots were stained with 10 μM propidium iodide (PI) and mounted in coverslips for analysis by confocal microscopy (Olympus FV1000). PI was excited at 568 nm and detected at 560–660 nm. Fluorescent proteins were excited at 488 nm and detected at 500–550 nm. Meristem measurements were done from at least ten representative images using the ImageJ program (National Institutes of Health, Bethesda,

MA, USA). The presence of Fe in the roots was revealed following the method of Roschztardt et al. 2009. Briefly, roots were incubated for 30 min in Perls stain solution (4% (v/v) HCl, 4% (w/v) K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]·3H<sub>2</sub>O). For diaminobenzidine (DAB) intensification, roots were quickly washed with double-distilled water (ddH<sub>2</sub>O) and incubated (1 h) in methanol containing 10 mM sodium azide and 0.3% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, washed with 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), and then incubated for up to 30 min in the same buffer containing 0.025% (w/v) DAB (Sigma-Aldrich) and 0.005% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The staining reaction was stopped washing with ddH<sub>2</sub>O and roots were mounted in coverslips for stereoscopic microscope analysis.

The presence of callose was assessed as described by Stadler et al. (1995). Briefly, the roots were treated with a solution of aniline blue (Sigma-Aldrich) 0.1% (w/v) in 100 mM Na-phosphate buffer (pH 7.2) for 1.5 h, and mounted in coverslips for analysis by confocal microscopy (Olympus FV1000). The fluorescence of callose was excited at 405 nm and detected between 480 and 515 nm.

### In-gel kinase assays

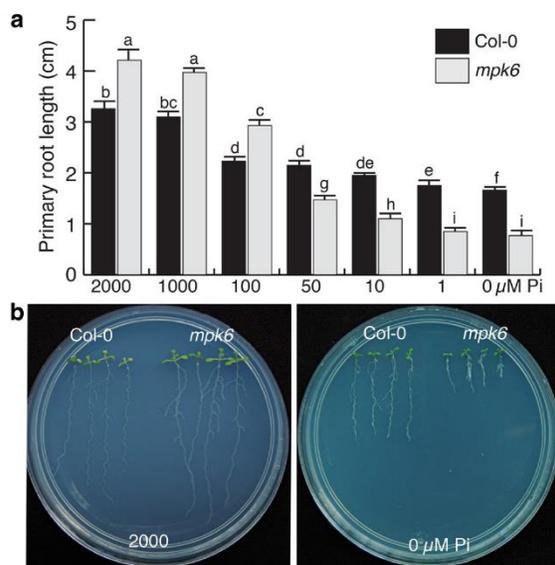
Total proteins were extracted from roots or shoots of plants grown in the different treatments. The seedlings were frozen and ground in liquid nitrogen and re-suspended in extraction buffer containing 100 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) [pH 7.5], 5 mM EDTA, 5 mM EGTA [ethylene glycol tetraacetic acid], 10 mM dithiothreitol [DTT], 10 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM of NaF, 50 mM β-glycerophosphate, 10% glycerol, and 7.5% polyvinylpyrrolidone, supplied with a protease inhibitor mixture, and centrifuged at 16,300 *g* for 15 min at 4 °C. The protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay kit using bovine serum albumin (BSA) as standard. The *in-gel* kinase assay was performed as described by Lu et al. (2002). For this, 50 μg of total protein extracted from plant tissue were fractionated on a 12% SDS polyacrylamide gel containing 0.25 mg/mL of myelin basic protein as substrate for the MPKs. After electrophoresis, the gel was washed three times for 30 min each with 25 mM Tris, pH 7.5, 0.5 mM DTT, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5 mM NaF, 0.5 mg/mL of BSA, and 0.1% (v/v) Triton X-100 solution, at room temperature. Proteins in the gel were re-natured by incubating the gel in a solution containing 25 mM Tris, pH 7.5, 1 mM DTT, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and 5 mM NaF at 4 °C overnight with three changes. The kinase reactions were carried out by incubating the gel in 30 mL of the reaction buffer (25 mM Tris, pH 7.5, 2 mM EGTA, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, and 200 nM ATP) and 1.85E +6 Bq of γ-32P ATP (> 1.48E + 14 Bq/mmol; Perkin Elmer Inc) for 60 min at room temperature. To remove free 32P, the gel was washed repeatedly at room temperature with several changes

with a solution of 5% (w/v) trichloroacetic acid and 1% (w/v) NaPPi until  $^{32}\text{P}$  radioactivity in the wash solution is undetectable. The gels were dried on Whatman 3MM paper and exposed to X ray films.

## Results

### MPK6 modulates the primary root growth response to Pi deficiency

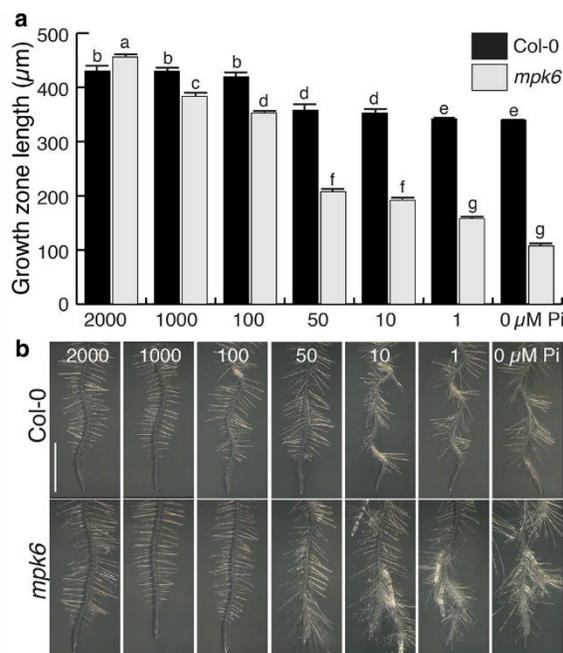
The first developmental response of *Arabidopsis* experiencing low Pi availability stress is the inhibition of primary root growth (López-Bucio et al. 2002; Sánchez-Calderón et al. 2005). To test a possible role of MPK6 on this response, we compared the growth of the primary roots of the wild-type (WT) and *mpk6* mutant seedlings in media supplemented with increasing Pi concentrations. In agreement with the previous reports, the primary root growth of the WT decreased as the concentration of Pi in the medium went down (Fig. 1). Interestingly, the primary roots of *mpk6* mutants showed an exacerbated sensitivity to Pi deficiency (Fig. 1). Root phenotypes associated with the low Pi availability are the greater density and length of root hairs (Bates and Lynch 1996; Müller and Schmidt 2004). These traits were altered in



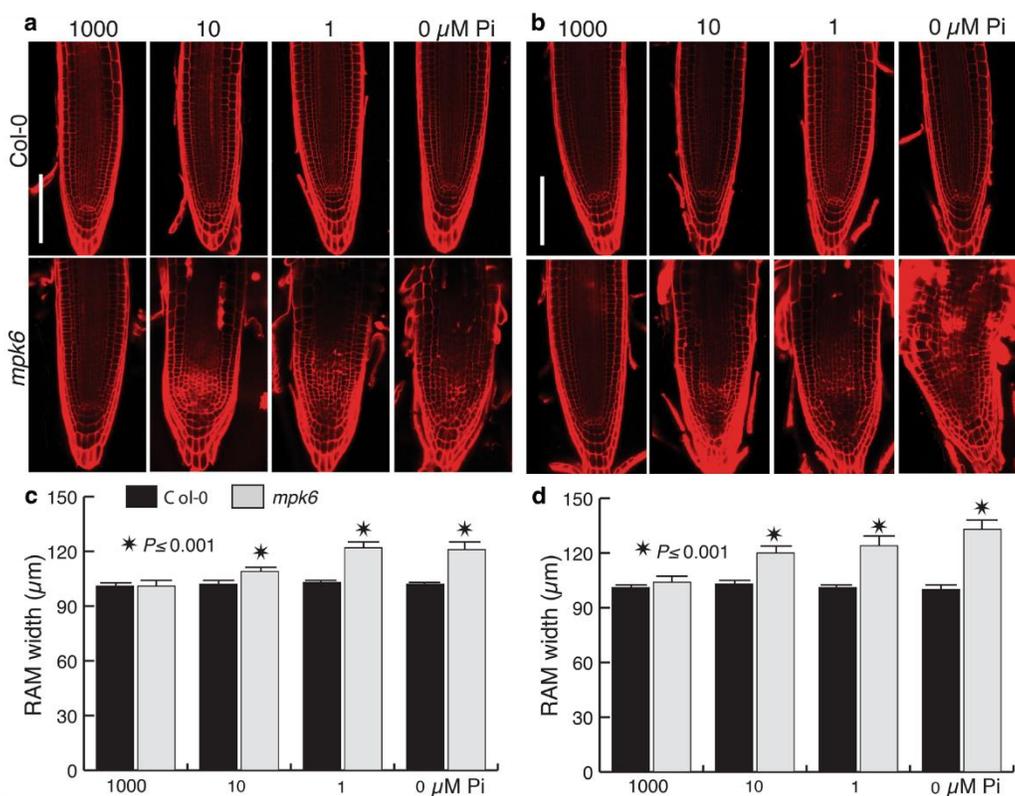
**Fig. 1** MPK6 loss of function exacerbates the growth repressing effects of Pi limitation in *Arabidopsis* primary roots. **a** Effects of different Pi supplementation on primary root growth of 10 days after germination WT (Col-0) and *mpk6* mutant seedlings. Different letters indicate statistical differences from a Tukey's post hoc analysis ( $n=60$ ). **b** Representative WT (Col-0) and *mpk6* mutant seedlings grown side by side in media supplied with 2000 or 0  $\mu\text{M}$  Pi

*mpk6* mutants, in which RAM differentiation occurred earlier and at lower Pi doses than the WT, and correlated with the production of root hairs closer to the root tip (Fig. 2).

To evaluate with more detail the responses of RAM faced with Pi deficiency, a confocal microscopic analysis of primary roots was conducted. After 6 days of germination in Pi deficiency, RAM widening was induced and deformation of the root tips was evident (Suppl. Fig. S1). In addition, the mitotic activity in the meristematic zone, the integrity of the statocytes and the functionality of the quiescent center (QC) of WT and *mpk6* mutant seedlings were compared in different Pi availability (Suppl. Fig. S2). These three parameters showed that the *mpk6* mutant is more susceptible to Pi deprivation as manifested by less mitotic activity, damage in the statocyte structure and loss of expression of the QC marker in mild Pi concentration where WT roots only show slight changes (Suppl. Fig. S2). Consistent with their oversensitivity to Pi deficiency, *mpk6* root meristem widening is faster and more severe than in the WT, occurring 2 dag (days after germination) at 10  $\mu\text{M}$  Pi and 4 dag at 0  $\mu\text{M}$  Pi, respectively (Fig. 3a–d).



**Fig. 2** **a** Effects of different Pi supplementation on growth zone length at 10 days after germination of WT (Col-0) and *mpk6* mutant seedlings. Different letters indicate statistical differences from Tukey's post hoc analysis ( $n=15$ ). **b** Phenotypes of root hairs of WT (Col-0) and *mpk6* mutant seedlings in response to Pi availability. Scale bar 1 cm. The experiment was repeated three times with similar results



**Fig. 3** MPK6 loss of function affects phosphate sensing and root meristem structure of *Arabidopsis*. **a, b** Confocal microscopy images from propidium iodide stained primary roots of WT (Col-0) and *mpk6* mutant seedlings grown for **a** 2 or **b** 4 days after germination on media with the indicated Pi concentration. Scale bars 100 μm. **c, d** RAM width (measured at 100 μm from the root tip) of WT (Col-

0) and *mpk6* mutant seedling obtained from **a** and **b** conditions, respectively. The graphs show the mean ± standard error (bars) from 12 plants analyzed. Statistically significant differences determined by Student's *t* test from treatments are represented with asterisks at *P* indicated. The experiment was repeated independently three times with similar results

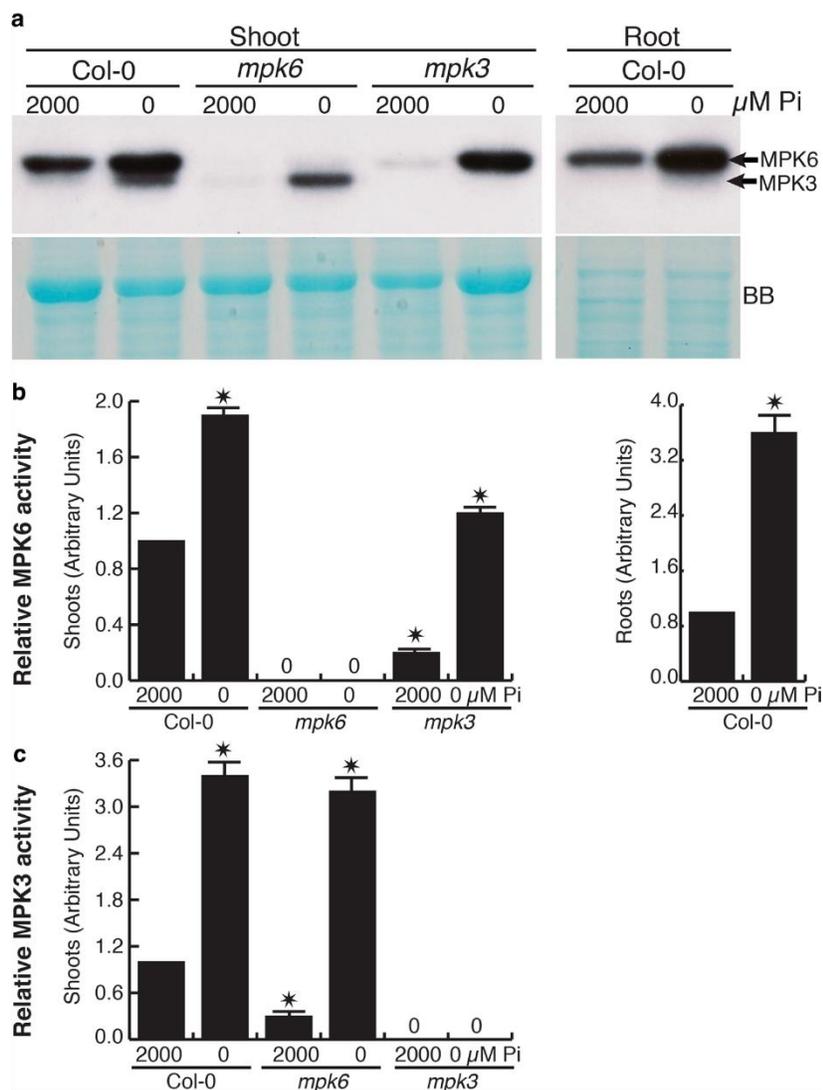
Subsequently, we evaluated the effects of Pi deficiency on another allele of *mpk6* (*mpk6-3*) previously characterized (Liu and Zhang 2004), which was as sensitive to Pi deficiency as the *mpk6-2* allele (Suppl. Fig. S3). Since it is well supported experimentally that the *mpk3* and the *mpk6* mutants do not have the same root phenotype (López-Bucio et al. 2014a, b, 2018), this study was focused on *mpk6* mutants. However, given that MPK6 and MPK3 have redundant functions in plant signaling (Bush and Krysan 2007; Wang et al. 2007; Meng et al. 2012), the effect of Pi starvation on the *mpk3* mutant was assessed. The roots of *mpk3* mutants were less sensitive than the WT to Pi deficiency (Suppl. Fig. S4), which suggests that MPK3 and MPK6 play opposite roles during the low Pi acclimation response in *Arabidopsis* primary roots.

### MPK6 and MPK3 are differentially regulated in roots and in shoots by Pi availability

Previously, Lei et al. (2014) showed that MPK3 and MPK6 activities increase in *A. thaliana* seedlings under low Pi stress. However, since the root is the organ where the availability of Pi is primarily sensed, we aimed to establish if these two kinases are differentially regulated in roots and in shoots. For this purpose, we performed in vitro kinase assays in both shoot and root tissues of *Arabidopsis* seedlings grown under different Pi availability. In shoots, the activities of both kinases were enhanced by Pi deficiency, but, in roots, only MPK6 activity was detected and specifically induced (Fig. 4). These data suggest that MPK3 and MPK6 may act to control shoot responses to Pi deficiency,

**Fig. 4** Pi starvation induces MPK3 and MPK6 activities.

**a** *In vitro* kinase assays were conducted on shoots from wild-type (Col-0) and *mpk6* and *mpk3* mutant seedlings, and on roots from WT seedlings. All seedlings were grown under 2000 or 0  $\mu$ M Pi supplementation as indicated. Arrows indicate phosphorylation activity of MPK6 and MPK3, respectively. BB = Coomassie blue-stained gel used as loading control. ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) densitometric analysis of the **b** MPK6 and **c** MPK3 activities bands showed in the respective kinase assay. In all cases, the band of activity in 2000  $\mu$ M Pi was taken as a reference (Relative activity = 1). The graphs show the mean  $\pm$  standard error (bars) from two independent experiments. Statistic significant differences determined by Student's *t* test from treatments are represented with asterisks at  $P=0.005$



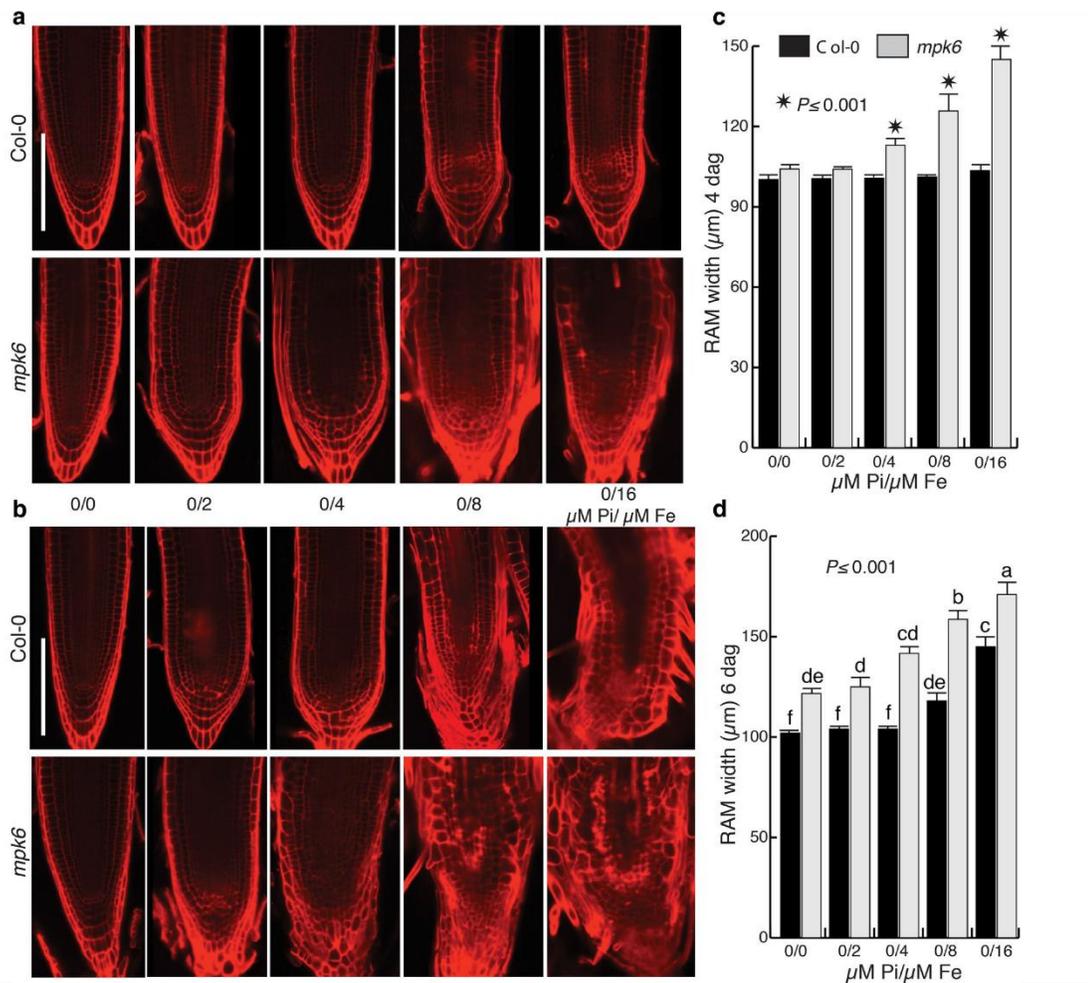
but only MPK6 acts as a non-redundant regulator of primary root growth associated with Pi deficiency.

### MPK6 mediates Fe-depending root responses during Pi deficiency

Iron homeostasis is an important factor determining primary root growth inhibition by low Pi (Ward et al. 2008; Müller et al. 2015; Hoehenwarter et al. 2016). Thus, we tested the effects of Fe supplementation on WT and *mpk6* mutant seedlings grown under Pi starvation. An analysis of root width and root tip structure at 4 and 6 dag showed that, in WT plants, the primary root widening begins at 4 dag in the presence of 8  $\mu$ M Fe or higher (Fig. 5a), and exacerbates at 6 dag at 8 and 16  $\mu$ M Fe (Fig. 5b, d). *mpk6*

mutants changed their root apical structure earlier and at lower Fe concentrations, since 4  $\mu$ M Fe treatment for 4 dag was sufficient to induced root thickness, and root hairs formed closer to the root tip at 4 dag in 8 and 16  $\mu$ M Fe implying a depletion of RAM activity (Fig. 5a, c), which is maintained and even boosted by day 6 in all tested Fe concentrations (Fig. 5b, d).

The inhibition of primary root growth under Pi limitation has been associated with accumulation of Fe and callose deposition in the meristem (Müller et al. 2015). The roots of the *mpk6* mutant accumulate much more Fe than the WT roots in conditions of optimal and low availability of Pi, supporting an interrelation between the accumulation of Fe and the exhaustion of the meristem (Suppl. Fig. S5). On the other hand, callose deposition was similarly observed (Suppl. Fig.



**Fig. 5** MPK6 loss of function alters the sensitivity of roots to phosphate deprivation and iron supply. Confocal microscopy images from propidium iodide stained primary roots of WT (Col-0) and *mpk6* mutant seedlings grown for **a** 4 or **b** 6 days after germination, on media depleted of Pi and supplemented with increasing Fe concentrations. Scale bars 100 μm. **c, d** RAM width (measured at 100 μm from the root tip) of WT (Col-0) and *mpk6* mutant seedling obtained from

**a** and **b**, respectively. Graphs show the mean ± standard error (bars) from 12 plants analyzed. Statistic significant differences determined by Student's t test (**b**) or Tukey's post hoc (**d**) from treatments in relation to RAM width of WT in 0/0 Pi/Fe condition are indicated with asterisks (**b**) or letters (**d**) at P indicated, respectively. The experiment was repeated independently three times with similar results

S5); nevertheless, the roots of the *mpk6* mutant in the condition of low Pi availability were fully differentiated.

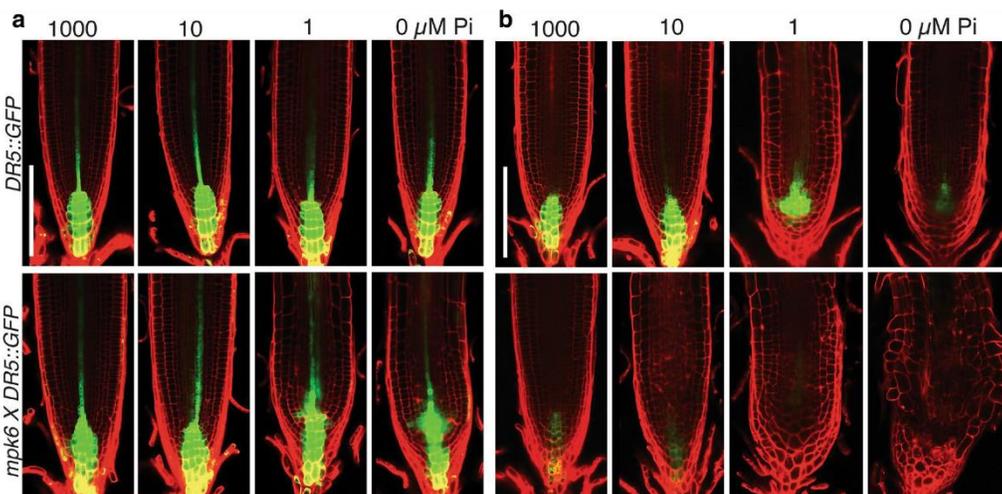
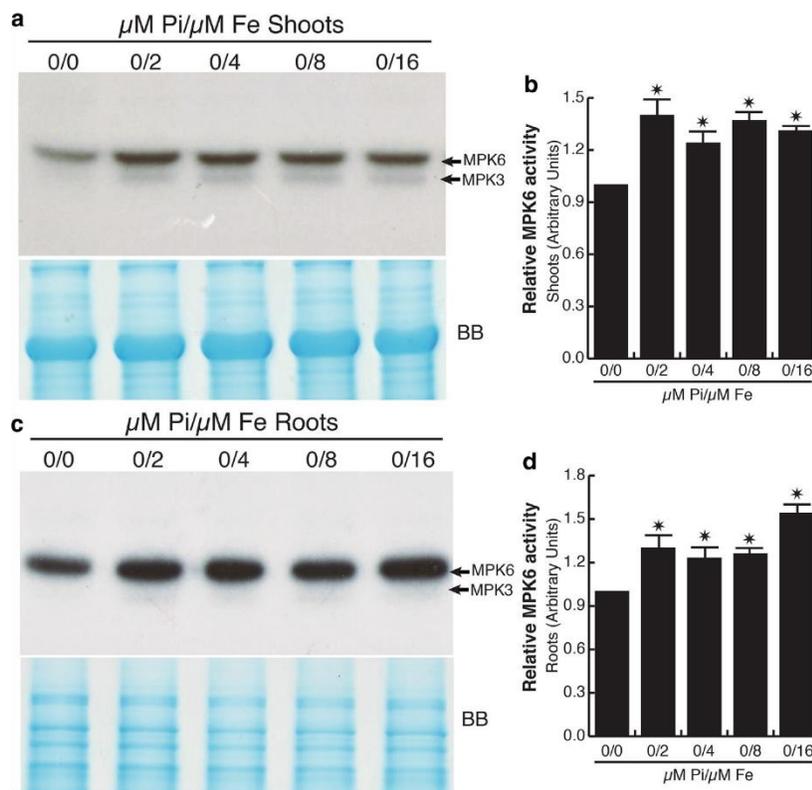
To determine whether the activation of MPK6 during the low Pi stress would be related to Fe availability, we performed in vitro kinase assays on shoots and roots of seedlings grown in low Pi with increasing Fe concentrations. When compared to the basal MPK6 activity in the -Pi/+Fe condition, the kinase activity of MPK6 was induced in a similar way in both organs from 2 μM Fe (Fig. 6a–d). In these experiments MPK3 activity was also induced in shoots (Fig. 6a), but it was not even detected in any Pi/Fe balance in

roots (Fig. 6c), supporting the fact that MPK6 has a specific role in regulating root responses to Pi deficiency.

**Pi deficiency affects auxin response and the expression of auxin transporters PIN1 and PIN2 via MPK6**

Auxin plays a major role in regulating root growth and development (Leyser 2010). To test the possible link of MPK6 with auxin signaling in Pi deficiency responses, we analyzed the expression of *DR5::GFP* auxin marker in

**Fig. 6** Fe induces MPK3 and MPK6 activities in shoots, but it only induces MPK6 activity in roots of *Arabidopsis* under Pi starvation. *In vitro* kinase assay was conducted on **a** shoots and **c** roots from WT (Col-0) seedlings grown in media depleted of Pi and supplemented with increasing concentrations of Fe as indicated. Arrows indicate the bands corresponding to the MPK6 and MPK3 phosphorylation activity, as shown in Fig. 3. **b** and **d** ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) densitometric analysis of the MPK6 activity bands showed in the corresponding kinase assay. In all cases, the band of activity in 0/0  $\mu\text{M Pi}/\mu\text{M Fe}$  was taken as a reference (relative activity = 1). The graphs show the mean  $\pm$  standard error (bars) from two independent experiments. Statistic significant differences determined by Student's *t* test from treatments are represented with asterisks at  $P=0.005$

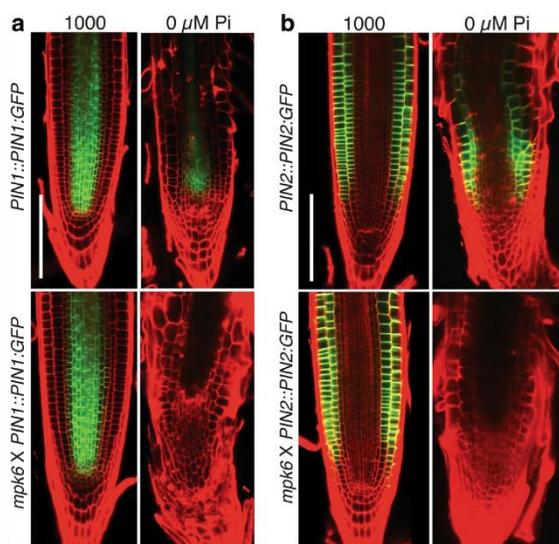


**Fig. 7** Pi starvation affects auxin patterning in the *Arabidopsis* primary root apical meristem via MPK6 function. *DR5::GFP* expression pattern in WT (Col-0) and *mpk6* roots from plants germinated and grown in MS 0.2X basal medium for 5 days, and then transferred to fresh medium containing different concentrations of Pi and ana-

lyzed at **a** 4 and **b** 6 days after transfer. Photographs are representative of at least ten seedlings analyzed by confocal microscopy. Scale bar 100  $\mu\text{m}$ . The experiment was repeated three times with similar results

primary root tips of *Arabidopsis* WT and *mpk6* mutants at two developmental stages in transfer experiments. At 4 days after transfer (dat) in WT and *mpk6* mutants, the effects of low Pi availability on auxin-responsive gene expression were imperceptible (Fig. 7a). However, at 6 dat in WT roots, low Pi availability affects the pattern of auxin distribution, as well as the development of the root (Fig. 7b, upper panels at 1 and 0  $\mu\text{M}$  Pi). In the *mpk6* mutant background, the effects of low Pi on roots were stronger. Even in optimal and sub-optimal Pi conditions (1000 and 10  $\mu\text{M}$  Pi, respectively), the *DR5::GFP* auxin marker expression was lower in protovascular tissues of *mpk6* mutant than in the WT (Fig. 7b, left panels), suggesting that the MPK6 loss of function by itself has an effect on the auxin signaling pathway. The participation of MPK6 in this signaling pathway was more evident in limiting Pi conditions, where, in the *mpk6* mutant background, auxin marker expression totally disappeared at the QC and root meristem (Fig. 7b, bottom right panels).

Auxin positively induces the expression and accumulation of PIN auxin transporters in a tissue-specific manner through an AUX/IAA-dependent signaling pathway (Vieten et al. 2005). Thus, to complement our study, the spatial localization pattern of two PIN auxin transporters (PIN 1 and PIN2) was determined at 6 dag on WT and *mpk6* mutant roots under Pi availability. In both backgrounds



**Fig. 8** Pi starvation affects auxin transport in the *Arabidopsis* primary root apical meristem via MPK6 function. PIN1 and PIN2 protein localization in 6 days after germination WT (Col-0) and *mpk6* root seedlings grown in media depleted of Pi or supplemented with 1000  $\mu\text{M}$  Pi. **a** *PIN1::PIN1:GFP* and *mpk6*  $\times$  *PIN1::PIN1:GFP*. **b** *PIN2::PIN2:GFP* and *mpk6*  $\times$  *PIN2::PIN2:GFP*. Photographs are representative of at least ten seedlings analyzed by confocal microscopy. Scale bars 100  $\mu\text{m}$ . The experiment was repeated three times with similar results

under control conditions, *PIN1::PIN1:GFP* was detected in the stele (Fig. 8a), whereas *PIN2::PIN2:GFP* was located in cortex and epidermal root cells (Fig. 8b). In WT roots, Pi deprivation results in a remarkable decreased expression of both auxin transporter markers as cell differentiation progressed, but in the *mpk6* mutant background the low Pi effect was remarkably, as no GFP expression was clearly observed in the root tips (Fig. 8a and b). Our findings suggest that the loss of function of MPK6 influences auxin homeostasis dependent of the Pi availability associated responses at the primary root tip. That results are not conclusive on the role of MPK6 in the transport of auxins, but considering that the Pi deficiency affects both the pattern of auxin distribution and the expression of the auxin transporters even in WT plants, the future analysis of mutants affected in the synthesis or transport of auxins would generate relevant results.

## Discussion

Pi availability and assimilation is important for proper plant growth and development. The previous work demonstrated that a low-Pi/high-Fe ratio at the root tip controls *Arabidopsis* primary root growth inducing determinate developmental patterning (Sánchez-Calderón et al. 2005). However, currently, the signaling pathway that links Pi and Fe homeostasis to root cellular programs remains unknown. Since MPK3 and MPK6 act redundantly to modulate diverse abiotic and developmental plant adaptive traits including the Pi uptake efficiency (Lei et al. 2014), in this work, we explored the possible function of these kinases in the growth of the primary root and the activity of the root meristem under contrasting Pi and Fe growing conditions.

The root meristem supports proper growth through a signaling mechanism controlled by the quiescent center and the surrounding initial or stem cells (Dolan et al. 1993). The link between quiescent center integrity and mitosis could be demonstrated during the transition from indeterminate to determinate growth induced by Pi deficiency and contrasting responses could be determined for the WT and *mpk6* mutants. MPK6 and MPK3 kinases are activated by phosphorylation to regulate phosphate acquisition in *Arabidopsis*, acting upstream of the transcription factor WRKY75 (Lei et al. 2014). The results presented here extend this knowledge showing that although both kinases are induced in shoots following Pi deprivation, in roots, only MPK6 is induced in that condition, suggesting that, in this organ, MPK6 acts independently of MPK3 to contend with low Pi stress. The fact that MPK3 and MPK6 activities increase in the shoot under low Pi suggests that both kinases participate in a still unknown developmental response modulated by Pi in the aerial tissues, probably including Pi uptake, transport and/or distribution. The differential sensitivity of

*mpk6* and *mpk3* in the primary root growth under low Pi treatments, as well as the underlying differentiation of root meristems during Pi deficiency and Fe supplementation, provides genetic evidence of the participation of a MAPK pathway whose members may act as mediators of the low Pi response. In support to this suggestion, some transcription factors mediating Pi starvation adaptive responses or Fe translocation, such as WRKY75 and WRKY46 are phosphorylated by MPKs (Devaiah et al. 2007; Popescu et al. 2009; Yan et al. 2016). The possible role of other transcription factors involved in Pi deficiency response, such as STOP1 (Balzergue et al. 2017), as targets of MAPKs remains to be explored.

A low-Pi/high-Fe ratio in the root changes growth from indeterminate to determinate. Regarding the experiments with Fe described here, it is important to note that the effects of its supplementation at 19.99  $\mu\text{M}$  (as supplemented in the 0.2 $\times$  MS basal medium), are comparable to those observed with 16  $\mu\text{M}$  (data not shown). Therefore, to follow the root response to Fe supplements under a logic increase of concentration, the experiments were carried out with a concentration of 16  $\mu\text{M}$  as maximum. It was suggested that, during Pi deficiency, the roots take up more iron and callose deposition occurs at the root tip, which interferes with cell-to-cell communication and results in meristem exhaustion (Müller et al. 2015). This suggestion was challenged in another report where callose deposition in the RAM could not be associated with Pi deficiency-induced meristem exhaustion (Gutiérrez-Alanís et al. 2017). Since the *mpk6* mutant whose root is hypersensitive to Pi deficiency accumulates as much callose in the RAM as the WT plants, we cannot exclude the possibility that callose deposition occurs later, as a consequence of meristem exhaustion, and may not be the causal agent that interferes with stem cell function and orchestrated cell division.

Several metals including aluminum, chromium, and gadolinium induce root changes that depend on the Pi availability; including inhibition of the primary root growth and induction of the expression of high-affinity Pi transporters. These developmental and biochemical responses are normalized following Pi supplementation (López-Bucio et al. 2014a; Ruíz Herrera et al. 2015). The exposure of *Medicago sativa* and *Arabidopsis* to cadmium and copper induced the activation of four distinct MAPKs including MPK3 and MPK6 (Jonak et al. 2004; Liu et al. 2010), while the adaptive significance of MAPK signaling in response to metal toxicity, or metal regulation of root growth remains unknown. Fe availability has been shown to regulate Pi inducible genes during Pi deficiency and the effects of Fe toxicity are alleviated by Pi (Rai et al. 2015), consistently with the fact that under Pi deficiency plants accumulate high levels of Fe in roots (Hirsch et al. 2006), although, apparently, the inhibition of primary root growth

induced by Pi deficiency does not appear to be associated with the Fe accumulated in the RAM (Wang et al. 2019). The precise mechanism that regulates Fe accumulation in RAM remains unknown; however, our results show that, indeed, the roots of the plants subjected to low Pi levels showed increased Fe accumulation, but also suggest that MAPKs are integral elements in the low Pi/Fe stress homeostasis, reinforcing the idea that MAPKs modules are key players in nutrient and metal stress responses during plant development.

Several phytohormones have been implicated in Pi signaling, but, even though the mechanisms of phytohormone-mediated root growth inhibition under low Pi remain elusive, it is accepted that a complex interaction between auxins and cytokinins at the root transition zone controls root growth (Kong et al. 2018). The specific role of auxin in the establishment of a determinate root growth developmental program following Pi starvation is unclear. Based on the primary root responses to auxin treatment and the low Pi inducible expression of the TIR1 auxin receptor, it was postulated that auxin oversensitivity was likely responsible of the cell division to cell differentiation transition in the meristem (Pérez-Torres et al. 2008). An analysis of expression of auxin-responsive genes and root development on *Arabidopsis* WT and Auxin Response Factor double mutants (*arf7arf19*) further demonstrated the role of Fe availability on local Pi root sensing, modulating auxin distribution and/or sensitivity (Rai et al. 2015). Our data are in agreement with these reports, since the determinate root growth program induced by low Pi stress alters auxin response in WT and *mpk6* primary roots. A possible explanation is that the roots undergoing Pi starvation exhibit Fe-inducible acclimation responses that disturbs auxin transport and leads to auxin maximum dissipation around the stem cell niche. According to the Pi hypersensitivity of the *mpk6* mutant, the expression of *DR5::GFP* auxin marker, *PIN1::PIN1:GFP*, and *PIN2::PIN2:GFP* auxin transporters was abolished in the mutant seedlings under Pi deficiency. Thus, our results show that low-Pi/high-Fe ratio induced determinate root growth implies a nutritional balance important for auxin control of root patterning. Since MPK6 activity is induced by indole-3-acetic acid and auxin-precursors (Contreras-Cornejo et al. 2015), and *mpk6* mutants show decreased auxin-responsive gene expression under low-Pi/high-Fe conditions, the results presented in this work pointed out to MPK6 acting in an auxin-signaling pathway to mediate root responses to deficiency and Fe homeostasis. Elucidation of the contribution of auxins and other phytohormones in the control of the modifications of the root architecture induced by Pi deficiency, as well as, the specific role that MPK6 plays in the low Pi signaling mediated by the LPR/STOP/ALMT1, requires further investigation.

**Author contribution statement** JSLB, JLB and AAGG, conceived and designed research. JLB, PL, HRdIC, JCG and AAGG, funded the research. JSLB, GRO and JRG designed and conducted experiments and analyzed data. GJSB conducted experiments and analyzed data. JSLB, JLB and AAGG, wrote the manuscript. PL, HRdIC and JCG reviewed the manuscript. All authors read and approved the manuscript. Neither the manuscript nor any part of its content has been published or submitted for publication elsewhere.

**Acknowledgements** We thank Dr. León Francisco Ruiz-Herrera by his technical support for confocal microscopic analysis. This work was supported by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, México, 177775 to JLB, 251848 to AAGG and cátedra CONACYT No. 416 to JSLB), the Consejo de la Investigación Científica (UMSNH, México, grant no. CIC 2.26), and the UNAM-DGAPA-PAPIIT (Grants IN207014 and IN210917 to AAGG and JSLB and IN204617 to PL).

## References

- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415(6875):977–983. <https://doi.org/10.1038/415977a415977a>
- Balzergue C, Dartevielle T, Godon C, Laugier E, Meisrimler C, Teulon JM, Creff A, Bissler M, Brouchoud C, Hagège A et al (2017) Low phosphate activates STOP1-ALMT1 to rapidly inhibit root cell elongation. *Nat Commun* 8:15300
- Bates TR, Lynch JP (1996) Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ* 19:529–538
- Belal R, Tang R, Li Y, Mabrouk Y, Badr E, Luan S (2015) An ABC transporter complex encoded by Aluminum Sensitive 3 and NAP3 is required for phosphate deficiency responses in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 463(2):18–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.05.009>
- Benková E, Michniewicz M, Sauer M, Teichmann T, Seifertova D, Jurgens G, Friml J (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115(5):591–602
- Bilhou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433(7021):39–44. <https://doi.org/10.1038/nature03184>
- Bush SM, Krysan PJ (2007) Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J Exp Bot* 58(8):2181–2191. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm092>
- Contreras-Cornejo HA, Lopez-Bucio JS, Mendez-Bravo A, Macias-Rodriguez L, Ramos-Vega M, Guevara-Garcia AA, Lopez-Bucio J (2015) Mitogen-activated protein kinase 6 and ethylene and auxin signaling pathways are involved in *Arabidopsis* root-system architecture alterations by *Trichoderma atroviride*. *Mol Plant Microbe Interact* 28(6):701–710. <https://doi.org/10.1094/mpmi-01-15-0005-r>
- Devaiah BN, Karthikeyan AS, Raghothama KG (2007) WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 143(4):1789–1801. <https://doi.org/10.1104/pp.106.093971>
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B (1993) Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119(1):71–84
- Dong J, Piñeros MA, Li X, Yang H, Liu Y, Murphy AS, Kochian LV, Liu D (2017) An *Arabidopsis* ABC transporter mediates phosphate deficiency-induced remodeling of root architecture by modulating iron homeostasis in roots. *Molecular Plant* 10(2):244–259. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.11.001>
- Giehl RF, von Wiren N (2014) Root nutrient foraging. *Plant Physiol* 166(2):509–517. <https://doi.org/10.1104/pp.114.245225>
- Gutiérrez-Alanís D, Yong-Villalobos L, Jiménez-Sandoval P, Alatorre-Cobos F, Oropeza-Aburto A, Mora-Macías J, Sánchez-Rodríguez F, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2017) Phosphate starvation dependent iron mobilization induces CLE14 expression to trigger root meristem differentiation through CLV2/PEPR2 signaling. *Dev Cell* 41:555–570.e3
- Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M, Ehling J, Beaudoin N, Barbazuk B, Klessig D, Lee J, Martin G, Mundy J, Ohashi Y, Scheel D, Sheen J, Xing T, Zhang S, Seguin A, Ellis BE (2006) Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci* 11(4):192–198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.02.007>
- Hirsch J, Marin E, Floriani M, Chiarenza S, Richaud P, Nussaume L, Thibaud MC (2006) Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in *Arabidopsis* plants. *Biochimie* 88(11):1767–1771. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.05.007>
- Hoehenwarter W, Monchgesang S, Neumann S, Majovsky P, Abel S, Muller J (2016) Comparative expression profiling reveals a role of the root apoplast in local phosphate response. *BMC Plant Biol* 16:106. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0790-8>
- Jonak C, Nakagami H, Hirt H (2004) Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol* 136(2):3276–3283. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045724>
- Kong X, Liu G, Liu J, Ding Z (2018) The root transition zone: a hot spot for signal crosstalk. *Trends Plant Sci* 23(5):403–409. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.02.004>
- Larsen PB, Geisler MJB, Jones CA, Williams KM, Cancel JD (2005) ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Plant J* 41(3):353–363. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2004.02306.x>
- Lei L, Li Y, Wang Q, Xu J, Chen Y, Yang H, Ren D (2014) Activation of MKK9-MPK3/MPK6 enhances phosphate acquisition in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 203(4):1146–1160. <https://doi.org/10.1111/nph.12872>
- Leyser O (2010) The power of auxin in plants. *Plant Physiol* 154(2):501–505. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161323>
- Liu Y, Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16(12):3386–3399. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026609>
- Liu XM, Kim KE, Kim KC, Nguyen XC, Han HJ, Jung MS, Kim HS, Kim SH, Park HC, Yun DJ, Chung WS (2010) Cadmium activates *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* 71(5–6):614–618. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.01.005>
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Cálderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol* 129(1):244–256. <https://doi.org/10.1104/pp.010934>
- López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Herrera-Estrella L (2003) The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Curr Opin Plant Biol* 6(3):280–287

- López-Bucio J, Hernández-Madriral F, Cervantes C, Ortiz-Castro R, Carreon-Abud Y, Martínez-Trujillo M (2014a) Phosphate relieves chromium toxicity in *Arabidopsis thaliana* plants by interfering with chromate uptake. *Biomaterials* 27(2):363–370. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9718-7>
- López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya-Gonzalez J, Ugartechea-Chirino Y, López-Bucio J, de Luna-Valdez LA, Ramos-Vega M, Leon P, Guevara-García AA (2014b) *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot* 65(1):169–183. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert368>
- López-Bucio JS, Raya-Gonzalez J, Ravelo-Ortega G, Ruíz-Herrera LF, Ramos-Vega M, León P, López-Bucio J, Guevara-García AA (2018) Mitogen activated protein kinase 6 and map kinase phosphatase 1 are involved in the response of *Arabidopsis* roots to L-glutamate. *Plant Mol Biol* 96:339–351. <https://doi.org/10.1007/s11103-018-0699-8>
- Lu C, Han MH, Guevara-García A, Fedoroff NV (2002) Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(24):15812–15817. <https://doi.org/10.1073/pnas.242607499242607499>
- Meng X, Wang H, He Y, Liu Y, Walker JC, Torii KU, Zhang S (2012) A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *Plant Cell* 24(12):4948–4960. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.104695>
- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys* 452(1):55–68. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2006.05.001>
- Mora-Macías J, Ojeda-Rivera JO, Gutiérrez-Alanís D, Yong-Villalobos L, Oropeza-Aburto A, Raya-González J, Jiménez-Domínguez G, Chávez-Calvillo G, Rellán-Álvarez R, Herrera-Estrella L (2017) Malate-dependent Fe accumulation is a critical checkpoint in the root developmental response to low phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* 114:E3563–E3572
- Müller M, Schmidt W (2004) Environmentally induced plasticity of root hair development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134:409–419
- Müller J, Toev T, Heisters M, Teller J, Moore KL, Hause G, Dinesh DC, Burstenbinder K, Abel S (2015) Iron-dependent callose deposition adjusts root meristem maintenance to phosphate availability. *Dev Cell* 33(2):216–230. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.02.007>
- Ottensschläger I, Wolff P, Wolverton C, Bhalerao RP, Sandberg G, Ishikawa H, Evans M, Palmé K (2003) Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(5):2987–2991. <https://doi.org/10.1073/pnas.0437936100>
- Pérez-Torres CA, López-Bucio J, Cruz-Ramírez A, Ibarra-Laclette E, Dharmasiri S, Estelle M, Herrera-Estrella L (2008) Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* 20(12):3258–3272. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058719>
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev* 23(1):80–92. <https://doi.org/10.1101/gad.1740009>
- Rai V, Sanagala R, Sinilal B, Yadav S, Sarkar AK, Dantu PK, Jain A (2015) Iron availability affects phosphate deficiency-mediated responses, and evidence of cross-talk with auxin and zinc in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 56(6):1107–1123. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv035>
- Roschttardt H, Conéjéro G, Curie C, Mari S (2009) Identification of the endodermal vacuole as the iron storage compartment in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Physiol* 151(3):1329–1338. <https://doi.org/10.1104/pp.109.144444>
- Ruiz Herrera LF, Shane MW, López-Bucio J (2015) Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 4(4):431–443. <https://doi.org/10.1002/wdev.183>
- Sánchez-Calderón L, López-Bucio J, Chacon-López A, Cruz-Ramírez A, Nieto-Jacobo F, Dubrovsky JG, Herrera-Estrella L (2005) Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 46(1):174–184. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci011>
- Stadler R, Brandner J, Schulz A, Gahrz M, Sauer N (1995) Phloem loading by the PmSUC2 sucrose carrier from *Plantago major* occurs into companion cells. *Plant Cell* 7(10):1545–1554. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.10.1545>
- Svistonoff S, Creff A, Reymond M, Sigoillot-Claude C, Ricaud L, Blanchet A, Nussaume L, Desnos T (2007) Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture. *Nat Genet* 39(6):792–796. <https://doi.org/10.1038/ng2041>
- Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007) The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19(3):805–818. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.046581>
- Ticconi CA, Lucero RD, Sakhonwasee S, Adamson AW, Creff A, Nussaume L, Desnos T, Abel S (2009) ER-resident proteins PDR2 and LPR1 mediate the developmental response of root meristems to phosphate availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(33):14174–14179. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901778106>
- Tokizawa M, Kobayashi Y, Saito T, Kobayashi M, Iuchi S, Nomoto M, Tada Y, Yamamoto YY, Koyama H (2015) Sensitive to Proton Rhizotoxicity1, Calmodulin Binding Transcription Activator2, and other transcription factors are involved in Aluminum-Activated Malate Transporter1 expression. *Plant Physiol* 167(3):991–1003. <https://doi.org/10.1104/pp.114.256552>
- Ulm R, Ichimura K, Mizoguchi T, Peck SC, Zhu T, Wang X, Shinozaki K, Paszkowski J (2002) Distinct regulation of salinity and genotoxic stress responses by *Arabidopsis* MAP kinase phosphatase 1. *EMBO J* 21(23):6483–6493
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benkova E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132(20):4521–4531. <https://doi.org/10.1242/dev.02027>
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007) Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19(1):63–73. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048298>
- Wang P, Du Y, Li Y, Ren D, Song CP (2010) Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22(9):2981–2998. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072959>
- Wang X, Wang Z, Zheng Z, Dong J, Song L, Sui L, Nussaume L, Desnos T, Liu D (2019) Genetic dissection of Fe-dependent signaling in root developmental responses to phosphate deficiency. *Plant Physiol* 179(1):300–316. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00907>
- Ward JT, Lahner B, Yakubova E, Salt DE, Raghothama KG (2008) The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency. *Plant Physiol* 147(3):1181–1191. <https://doi.org/10.1104/pp.108.118562>
- Xu J, Xie J, Yan C, Zou X, Ren D, Zhang S (2014) A chemical genetic approach demonstrates that MPK3/MPK6 activation and NADPH oxidase-mediated oxidative burst are two independent signaling events in plant immunity. *Plant J* 77(2):222–234. <https://doi.org/10.1111/tbj.12382>
- Yan JY, Li CX, Sun L, Ren JY, Li GX, Ding ZJ, Zheng SJ (2016) A WRKY transcription factor regulates Fe translocation under

- Fe deficiency. *Plant Physiol* 171(3):2017–2027. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00252>
- Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* 451(7180):789–795. <https://doi.org/10.1038/nature06543>
- Zheng H, Pan X, Deng Y, Wu H, Liu P, Li X (2016) *AtOPR3* specifically inhibits primary root growth in Arabidopsis under phosphate deficiency. *Sci Rep* 6:24778. <https://doi.org/10.1038/srep24778>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Mitogen-Activated Protein Kinase 6 integrates phosphate and iron responses for indeterminate root growth in *Arabidopsis thaliana*.**

Jesús Salvador López-Bucio<sup>1\*</sup>, Guadalupe Jessica Salmerón-Barrera<sup>2</sup>, Gustavo Ravelo-Ortega<sup>2</sup>, Javier Raya-González<sup>2</sup>, Patricia León<sup>1</sup>, Homero Reyes de la Cruz<sup>2</sup>, Jesús Campos-García<sup>2</sup>, José López-Bucio<sup>2</sup> and Ángel Arturo Guevara-García<sup>3\*</sup>

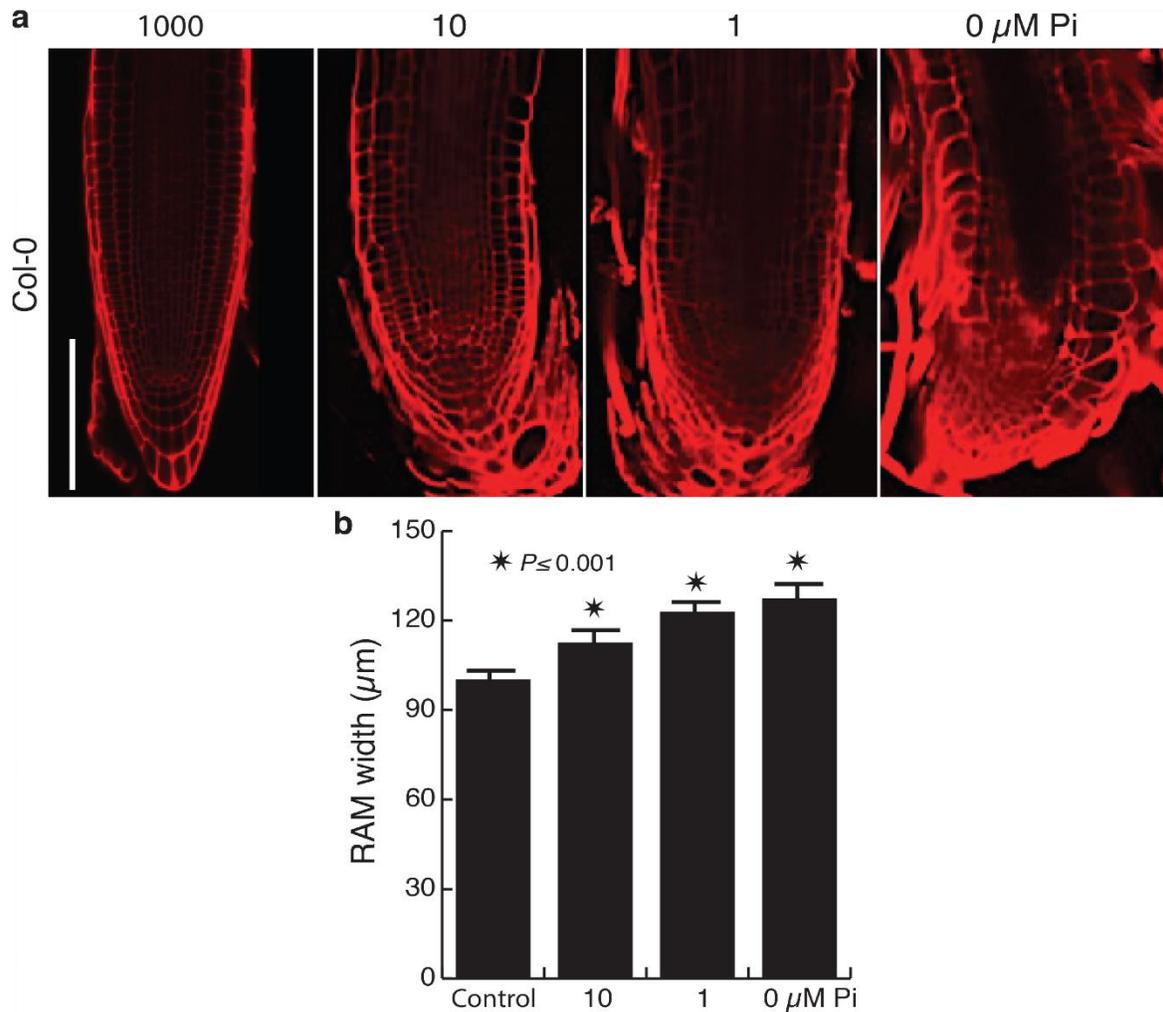
<sup>1</sup> CONACYT - Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CP 58030 Morelia, Michoacán, México

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, CP 58030 Morelia, Michoacán, México

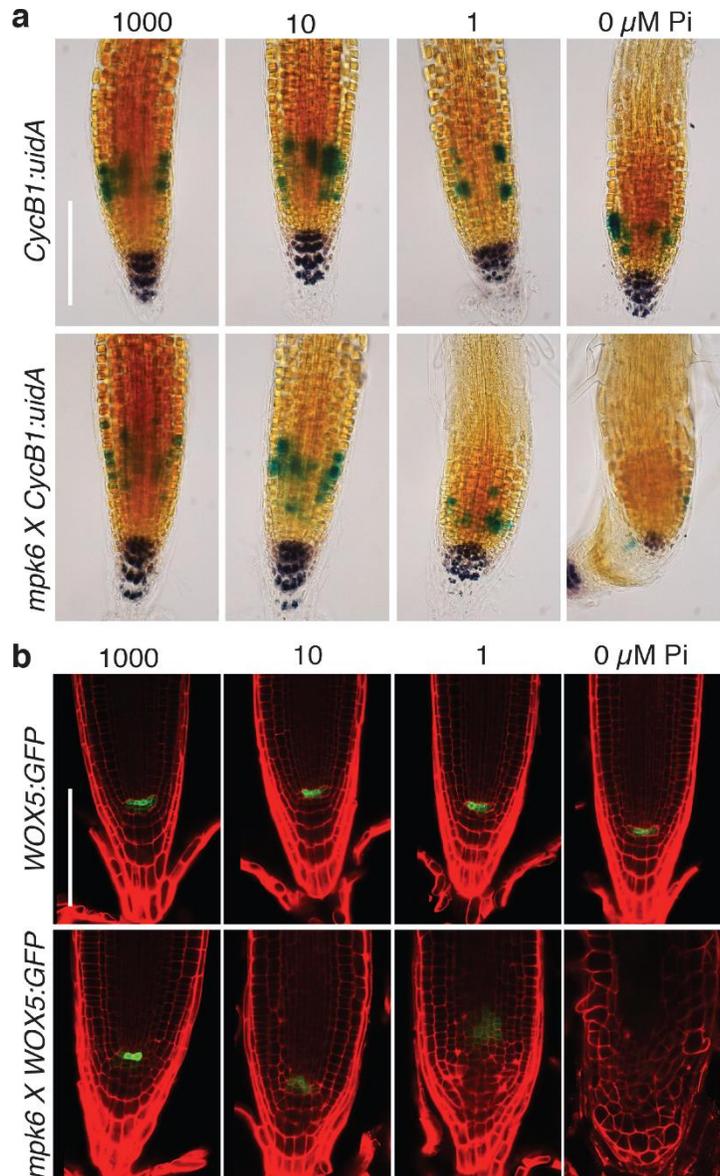
<sup>3</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, CP 62250 Cuernavaca, Morelos, México

\* **Co-corresponding authors**

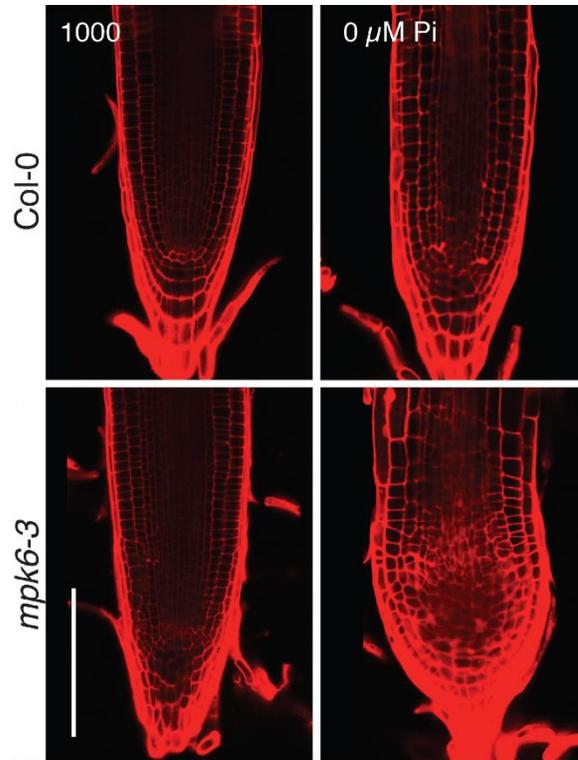
**Supplementary material**



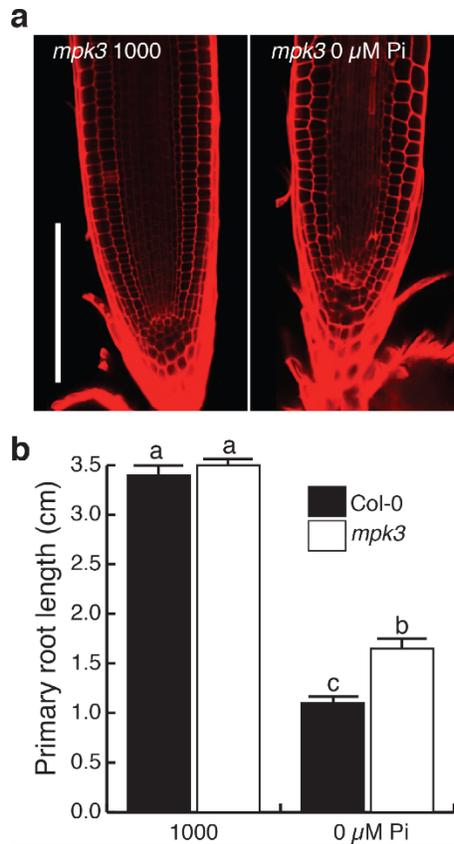
**Fig. S1** Pi availability effects on the structure of the root apical meristem of *Arabidopsis*. **a** Confocal microscopy images from 6 days after germination roots of seedlings grown on media supplied with the indicated Pi concentrations are shown. Images are representative Propidium Iodide stained roots from 18 plants analyzed. Scale bar represent 100  $\mu\text{m}$ . **b** Graph shows the root apical meristem (RAM) width (measured at 100  $\mu\text{m}$  from the root tip) mean  $\pm$  standard error (bars) from 18 plants analyzed. Significant differences determined by *t*-Student test from treatments are represented with asterisks at *P* indicated. The experiment was repeated independently three times with similar results



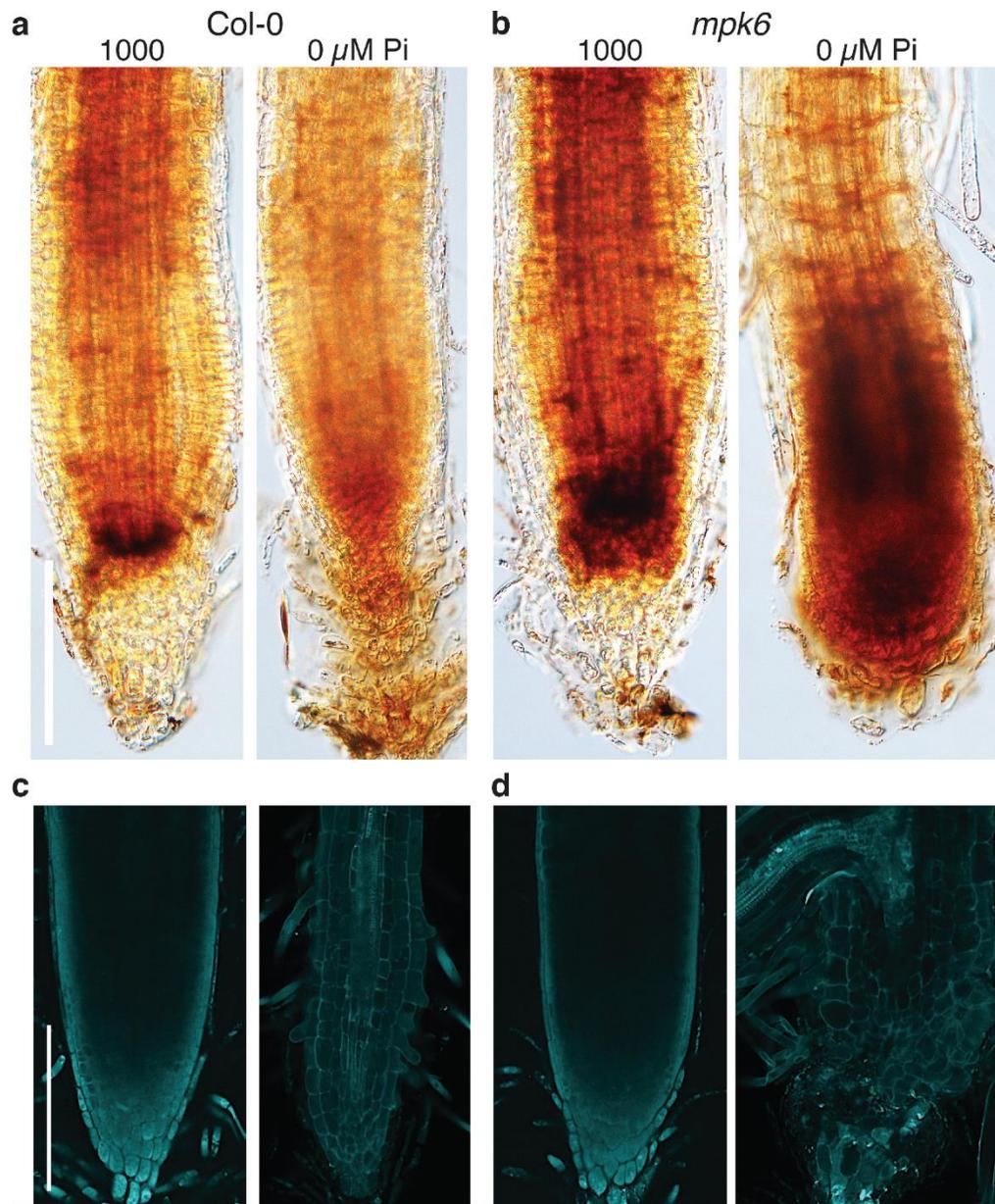
**Fig. S2** Pi availability effects on the mitotic activity, statocyte structure and quiescent center identity of the root apical meristem. Images from 6 days after germination roots of seedlings grown on media supplied with the indicated Pi concentrations are shown. **a** Images are representative Lugol's stained roots expressing *CyB1:GUS* mitosis marker and **b** Propidium Iodide stained roots expressing *WOX5:GFP* QC marker, from 18 plants analyzed to each genetic background indicated. In both (**a**, **b**), scale bar represent 100 μm. The experiment was repeated independently three times with similar results



**Fig. S3** Pi availability effects on the structure of the root apical meristem of *mpk6-3* mutant allele. Confocal microscopy images from 4 days after germination roots of wild-type (Col-0) and *mpk6-3* mutant seedlings grown on media supplied with the indicated Pi concentrations are shown. Images are representative Propidium Iodide stained roots from 10 plants analyzed. Scale bar represent 100  $\mu\text{m}$ . The experiment was repeated independently three times with similar results



**Fig. S4** Pi availability effects on the primary root length of *mpk3* mutant. **a** Confocal microscopy images from Propidium Iodide stained primary roots of *mpk3* mutant seedlings grown for 4 days after germination on media with the indicated Pi supplementation are shown. **b** The primary root length was measured on 8 days after germination seedlings grown on indicated media. Different letters indicate statistical differences from a Tukeys post-hoc analysis at  $P=0.001$  ( $n=20$ ). The experiment was repeated three times with similar results



**Fig. S5** Pi deficiency drives the accumulation of iron and callose in RAM. **a, c** Wild-type (Col-0; ) and **b, d** *mpk6* mutant seedlings were grown in media with 1000 or 0  $\mu\text{M}$  Pi, as indicated. In each condition the iron accumulation (**a, b**) and callose deposition (**c, d**) was determined by DAB or Aniline Blue stained, respectively. Images shown are representative from 15 analyzed roots in each condition. The experiment was repeated three times with similar results

# Funciones de las proteínas cinasas activadas por mitógenos en el desarrollo de las plantas

Gustavo Ravelo Ortega<sup>1</sup>, Jesús Salvador López Bucio<sup>2</sup>, Elda Beltrán Peña<sup>1</sup>, José López Bucio<sup>1</sup>✉

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio A-1', C. P. 58030 Morelia, Michoacán, México.

<sup>2</sup> CONACYT-Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio B-3, C. P. 58040 Morelia, Michoacán, México.

## Resumen

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) forman parte de módulos de señalización que integran respuestas extra e intra-celulares a través de la fosforilación de diferentes sustratos. Dichos módulos influyen la actividad de factores de transcripción para regular la expresión genética y el desarrollo de las plantas. Si bien las primeras investigaciones en este campo estuvieron encaminadas a esclarecer la participación de las MAPKs en respuestas de defensa y agobio ambiental, en la actualidad se les ha involucrado en la germinación, la configuración de la arquitectura de la raíz, la formación de estomas, la floración y la senescencia. Particularmente, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se han identificado y clasificado 90 MAPKs, lo que sugiere una fuerte redundancia funcional y plantea el reto de dilucidar el posible papel que desempeña cada miembro de esta familia en los diferentes procesos de organogénesis. En este artículo se analizan las investigaciones enfocadas a esclarecer la participación de las MAPKs durante el desarrollo vegetal.

**Palabras clave:** Plantas, desarrollo, señalización celular, hormonas, fosforilación.

## Abstract

Mitogen activated protein kinases (MAPKs) are part of signaling modules that integrate extra and intra-cellular responses through the phosphorylation of different substrates. Such modules influence the activity of transcription factors to regulate gene expression and plant development. Nowadays the earlier investigations in this field focused on clarifying the role of MPKs on defense and environmental stress, they have been also involved on germination, root system architecture, formation of stomata, flowering and senescence. Particularly, in the model plant *Arabidopsis thaliana* 90 MAPKs have been identified and classified, which suggest a strong functional redundancy and raises the challenge of identifying the role that each member of this family plays in the different organogenesis processes. In this article, investigations focusing to clarify the participation of MAPKs during plant development are analyzed.

**Keywords:** Plants, development, cell signaling, hormones, phosphorylation.

## Introducción

En las angiospermas, el ciclo de vida inicia con la germinación de la semilla y procede con la formación de los sistemas radicular, vegetativo y reproductivo. Durante la etapa embrionaria queda definida la estructura corporal de la planta con dos meristemos principales: el meristemo del brote y el meristemo de la raíz, que a través del proceso de mitosis producen las células para el aumento de talla que caracteriza a estos organismos (Xu y Zhang, 2015). En la fase reproductiva, se generan meristemos axilares que darán origen a las ramificaciones del tallo en cuyos extremos se forman las inflorescencias. En las flores maduras se lleva a cabo la fertilización de los óvulos, lo que posibilita la embriogénesis, el desarrollo del fruto, y la liberación de las semillas para su dispersión. En la raíz, ocurren eventos de diferenciación que permiten la conformación de un sistema radical que da soporte a la parte aérea, la exploración del suelo para la toma de agua y de nutrientes y diferentes tipos de interacciones con los microorganismos de la rizósfera, que son parte integral del funcionamiento del organismo (Ortiz-Castro *et al.*, 2011).

En las plantas, como en otros eucariotas, los cambios en las condiciones ambientales generan “señales”

o “estímulos” que son percibidos por receptores de naturaleza proteínica, que se localizan típicamente en la membrana plasmática. Estos receptores modulan la función de proteínas efectoras intracelulares mediante cambios estructurales y/o reacciones enzimáticas como parte de la respuesta de las células, acorde al estímulo inicial. A esta producción, reconocimiento y respuesta se le denota como sistema de transducción de señales ó simplemente como vías de señalización (Tuteja, 2009). La fosforilación es una reacción enzimática importante debido a que participa en un gran número de vías de señalización, en esta reacción ocurre la transferencia de un grupo fosfato a partir de un donador, usualmente el ATP, mediante la acción de una enzima con actividad fosfotransferasa, conocida comúnmente como cinasa, repercutiendo en la modificación de varios procesos celulares (Pawson y Scott, 2005).

## MAPKs en las vías de señalización de organismos eucariontes

Las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs, por sus siglas en inglés *Mitogen Activated Protein Kinase*) conforman “módulos” con una función preponderante en las vías de señalización en eucariotas y se activan cuando una MPKCK (MAP CINASA CINASA CINASA), después de la interacción con un receptor o ante la percepción de un estímulo, fosforila a una MPK (MAP CINASA CINASA), que finalmente fosforila y activa a la última cinasa del módulo, una MPK (MAP CINASA). Esta puede fosforilar diferentes sustratos proteínicos

✉ Dr. José López Bucio, jbcucio@umich.mx, joselopezbucio@yahoo.com.mx

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Edificio A-1', CP 58030 Morelia, Michoacán, México.

que desempeñan una gran variedad de funciones, desde orquestar cambios en la expresión genética para promover la división celular hasta coordinar programas de muerte o senescencia (Mishra *et al.*, 2006; Xu y Zhang, 2015). La primer MAPK se identificó en células de mamíferos y fue nombrada como MAP-2 Kinase (MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN-2 KINASE), posteriormente, el término "MAPK" se estableció para describir a cinasas estimuladas por mitógenos como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, la trombina y la insulina (Rossomando *et al.*, 1989).

Las MPKs de mamíferos se dividen en cuatro grupos: las ERK1 y 2 (EXTRACELULAR RESPONSE KINASE), las JNK1, 2 y 3 (JUN AMINO-TERMINAL KINASES), las proteínas p38 (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$  y p38 $\delta$ ) y la ERK5, que son activadas por las MPKKs, MPKK1/2, MPKK4/7, MPKK3/6 y MPKK5, respectivamente, pero que pueden ser activadas por más de una MPKKK para responder a diferentes estímulos (Chang y Karin, 2001; Pearson *et al.*, 2001; Turjanski *et al.*, 2007). Hasta la fecha y más de 30 años de investigación, han revelado que las MAPKs coordinan aspectos adaptativos que son ubicuos en mamíferos, levaduras y plantas.

En plantas, la primer MAPK se identificó en chícharo y desde entonces se les ha relacionado con respuestas a estrés biótico y abiótico, y se ha revelado su presencia en diferentes especies como arroz, tabaco, alfalfa y en *Arabidopsis thaliana* (Taj *et al.*, 2010). Las MAPKs de *Arabidopsis* conservan un alto nivel de homología con otras MAPKs de mamíferos o levaduras en la secuencia de aminoácidos que las componen (Ichimura *et al.*, 2002).

#### Clasificación de las MAPKs en *Arabidopsis*

En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 60 MPKKK, 10 MPKK y 20 MPK. Dentro de cada familia y de acuerdo con sus características estructurales, las MPKKKs del grupo A se distinguen por un dominio cinasa similar a la STE (SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE) y BCK1 (BYPASS OF C KINASE 1) de levaduras y a MEKK1 de mamíferos. En cambio, tanto el grupo B como el C se asemejan más a la proteína RAF (RAPIDLY ACCELERATED FIBROSARCOMA) de mamíferos. Las MPKKs tienen una secuencia consenso de fosforilación S/TxxxxS/T (la "x" equivale a cualquier aminoácido) y el alineamiento de este dominio con otras MPKK de eucariontes ha permitido su clasificación de cuatro grupos (A-D). El grupo B se caracteriza por tener un dominio similar al de NFT2 (NUCLEAR TRANSPORT FACTOR 2 PROTEIN) que posibilita su transporte al interior del núcleo. Los genes de los grupos C y D no presentan intrones y las proteínas codificadas por éstos, poseen posibles dominios de acoplamiento con otras proteínas. A las MPKs que conforman el grupo A se les ha relacionado con respuestas ambientales y hormonales, mientras que a las del grupo B se les

vincula con la tolerancia al agobio ambiental y las del C con la regulación del ritmo circadiano. Las cinasas del grupo D se diferencian por un dominio C-terminal más grande (Ichimura *et al.*, 2002).

#### Participación de las MAPKs durante el desarrollo de *Arabidopsis*

Las MAPKs coordinan las respuestas a diversos tipos de estrés tanto biótico como abiótico y con procesos de organogénesis durante el ciclo de vida que se discuten a continuación (Figura 1).

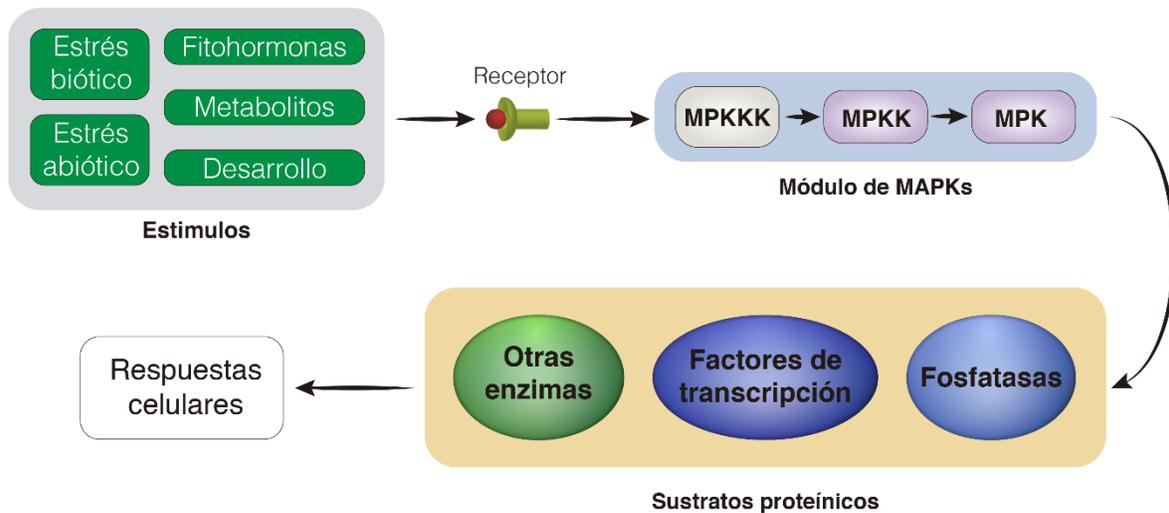
#### Desarrollo embrionario

La formación de la semilla depende del desarrollo apropiado del embrión. Las mutaciones en la MPKKK4 (*yda*) y en la MPK6 (*mpk6*) de *Arabidopsis* causan defectos embrionarios (Lukowitz *et al.*, 2004), en particular, en la mutante *mpk6* se producen divisiones ectópicas en el suspensor afectando la organogénesis del meristemo apical de la raíz (López-Bucio *et al.*, 2014; Bushy Kryan, 2007). El receptor con actividad de cinasa (RLK, RECEPTOR LIKE KINASE) denominado SSP1 (SHORT SUSPENSOR 1) activa a YDA cuando percibe al péptido pequeño ESF1 (EMBRYO SURROUNDING FACTOR 1) y esta vía culmina con la fosforilación de MPK6 (Costa *et al.*, 2014).

#### Arquitectura de la raíz

La raíz es uno de los órganos más importantes para el crecimiento y productividad de las plantas. Entre los factores principales que regulan su desarrollo destaca la señalización de hormonas como las auxinas y las citocininas, la disponibilidad de nutrientes, la abundancia de metales, así como la interacción con microorganismos (López-Bucio *et al.*, 2002; Ortíz castro *et al.*, 2011; Gruber *et al.*, 2013; López-Bucio *et al.*, 2014; Sozzani y Iyer-Pasquazzi, 2014). El gen *MPK6* se expresa en la raíz de *Arabidopsis*, principalmente en la zona de crecimiento. En concordancia con su posible función en este órgano, las mutantes *mpk6* tienen un mayor crecimiento de la raíz primaria. Adicionalmente, las MAPKs MPKK7-MPK6 regulan el desarrollo de las raíces laterales. Se ha demostrado que las auxinas inducen la actividad de MPK6, y que MPK6 fosforila al transportador de auxinas PIN1, estos datos sugieren la participación de las MAPKs en la regulación de la respuesta a auxinas para regular el desarrollo del sistema radical (Müller *et al.*, 2009; López-Bucio *et al.*, 2014; Contreras-Cornejo *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2016).

Las mutantes *yda* a diferencia de las mutantes *mpk6* muestran fenotipos de raíz primaria corta, sin embargo, tienen una mayor producción de raíces laterales. MPK6 fosforila a MAP65 (MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN 65), proteína que permite la estabilización de los microtúbulos del huso mitótico central durante la anafase y la citocinesis (Smertenko *et al.*, 2006). MAP65 participa corriente abajo del módulo YDA-MPK6,



**Figura 1. Señalización por MAPKs.** La vía inicia cuando una molécula señal es detectada por un receptor tipo cinasa, posteriormente éste puede activar de manera directa o indirecta a una MPKKK, la cual fosforilará a una MPKK para que sea activada y fosforile a una MPK. Finalmente, la MPK activa a proteínas sustrato que pueden ser enzimas o factores de transcripción.

regulando los procesos de división celular de la raíz y la actividad del nicho de células madre (Smékalová *et al.*, 2014). La mayor densidad de raíces laterales en *yda* se relaciona con la producción de altos niveles de la auxina ácido indol-3-acético (AIA), causados por la expresión de enzimas biosintéticas, como la triptófano sintetasa y las nitrilasas.

Por otra parte, la cinasa MEKK1 está involucrada en la formación de raíces laterales (Su *et al.*, 2007) y en la percepción del L-glutamato, un aminoácido que actúa como neurotransmisor en animales y cuya aplicación en plantas causa una disminución en el crecimiento de la raíz primaria y un aumento en la ramificación del sistema radical (Forde *et al.*, 2013). Esta información evidencia un panorama donde la interacción entre señales ambientales, MAPKs, y la biosíntesis de auxinas posibilitan la organogénesis vegetal.

#### Diferenciación de los estomas

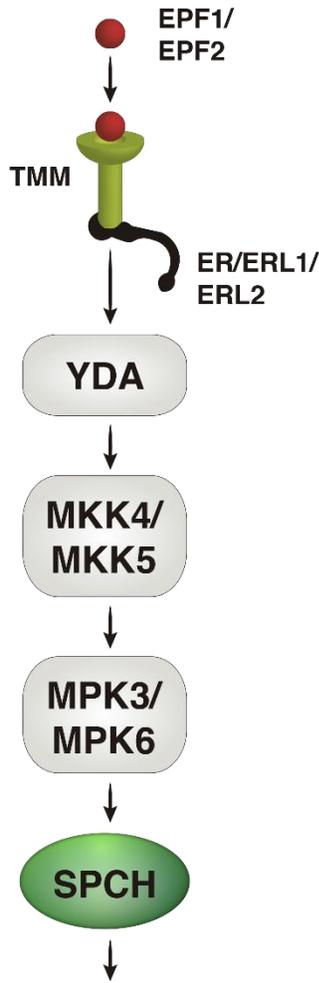
Los estomas son células epidérmicas de las hojas que participan en el intercambio de gases y la transpiración. Durante la diferenciación de las células epidérmicas en estomas, los receptores TMM (TOO MANY MOUTHS) y ER/ERL1/ERL2 (ERECTA Y ERECTA LIKE), reconocen a los péptidos pequeños EPF1 y 2 (EPIDERMAL PATTERNING FACTOR) para activar al módulo conformado por YDA, MPKK4/MPKK5 y MPK3/MPK6 (Figura 2). Las alteraciones en la expresión de *EPF1* y *EPF2* cambian la densidad de estomas, dado que la sobreexpresión de ambos genes reduce su número, mientras que la doble mutante mantiene una sobreproducción de estas estructuras (Hara *et al.*, 2007; Hunt *et al.*, 2009).

La pérdida de función de TMM causa una mayor

densidad de estomas. La señal podría ser transmitida por tres correceptores tipo cinasa de la familia ERECTA denominados ER, ERL1 y ERL2 (Nadeau y Sack, 2002; Shpak *et al.*, 2005). Las mutaciones sencillas y dobles de *er*, *erl1* y *erl2* alteran la formación de estomas y la triple mutante también presentó fenotipos similares a los antes descritos para la doble mutante *epf1 epf2* y la mutante *tmm* (Hunt *et al.*, 2009; Nadeau y Sack, 2002; Shpak *et al.*, 2005). Las mutaciones de pérdida o ganancia de función de las MAPKs antes mencionadas causan alteraciones fenotípicas contrastantes en la densidad de estomas (Bergmann *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007), en tanto que la eliminación del factor de transcripción SPCH (SPEECHLESS) impide la formación de estas estructuras. SPCH es fosforilado *in vitro* por las cinasas MPK3 y MPK6, por lo que se ha ubicado corriente abajo del módulo YDA-MKK4/MKK5-MPK6 (MacAlister *et al.*, 2007; Lampard *et al.*, 2008).

#### Floración

Las flores son los órganos de la reproducción, que antecede la embriogénesis y la formación de los frutos y semillas. La planta mutante *mpk6* tiene una fertilidad masculina disminuida, lo cual fue relacionado con defectos en el tamaño de las anteras, siendo éstas más pequeñas que en las plantas silvestres (Meng *et al.*, 2012). Las mutantes *mpk6* y *mpk3* tienen defectos en la orientación del tubo polínico, con un crecimiento irregular que dificulta su llegada al óvulo (Guan *et al.*, 2014). Estas MPKs tienen como sustrato a los factores de transcripción WRKY34 y WRKY2, ya que las mutaciones en estos genes reducen la viabilidad del polen y provocan alteraciones en el crecimiento del tubo polínico, mientras que con ensayos de fosforilación



**Figura 2. Cascada de señalización para el control de la formación de los estomas.** Los receptores TOO MANY MOUTHS y ER/ERL1/ERL2 reconocen a los péptidos pequeños EPF1 y EPF2 mediante el módulo de MAPKs (YDA-MPKK4/5 y MPK3/6), así se activa al factor de transcripción SPEECHLESS. Lo anterior permite la diferenciación de las células epidérmicas para formar los estomas, células de las hojas que se abren o cierran para permitir el intercambio de gases.

se demostró la activación de WRKY34 por MPK3/MPK6 (Guan *et al.*, 2014).

El receptor ERECTA (ER) y sus parálogos ERL1/ERL2 controlan el desarrollo normal del óvulo (Torii *et al.*, 1996). ERL2 mostró insuficiencia en la fertilidad femenina causada por un defecto en la división celular en el tegumento y por la interrupción del desarrollo del saco embrionario (Pillitteri *et al.*, 2007). Se ha sugerido que MPK3 y MPK6 actúan corriente abajo de ER/ERL1/ERL2, ya que alteraciones similares en la producción de óvulos se manifiestan en las mutantes dobles *mpk3 mpk6* (Wang *et al.*, 2008).

El módulo conformado por las MAPKs YDA-MKK4/MKK5-MPK6/MPK3 participa corriente abajo de la señalización de los péptidos pequeños EPFL4/EPFL6 para orquestar la floración (Uchida *et al.*, 2012; Meng *et al.*, 2012). Cuando se elimina la función de YDA el pedicelo se acorta y la inflorescencia se agrupa estrechamente, lo opuesto ocurre en mutantes de ganancia de función. Las líneas *MKK4/MKK5 RNAi* y la pérdida de función de MPK6/MPK3 presentaron los defectos similares en la inflorescencia (Meng *et al.*, 2012). Estas anomalías disminuyen la eficiencia del proceso de polinización. En la versión mutante de *MPK6* modificada en el dominio de activación, se observó un fenotipo de flores con sépalos y pétalos más pequeños, incluso los pétalos tienen dobleces muy pronunciados, lo que ocasiona que el carpelo sobresalga de la flor desde etapas muy tempranas.

#### Abscisión de las inflorescencias

La abscisión es el proceso mediante el cual diferentes órganos como las hojas, los pétalos, las flores y los frutos se desprenden de la planta, permitiendo su recambio y/o la dispersión de las semillas (Cho *et al.*, 2008).

El péptido IDA interacciona con el receptor HAESA (HAE), de la familia ER (Jinn *et al.*, 2000; Butenko *et al.*, 2003), y se ha reportado que las cinasas *MKK4/MKK5* participan corriente abajo de IDA/HAE ya que tienen fenotipos similares a los de las mutantes *ida*, sugiriendo que estas MPKK son reguladores positivos del proceso de la abscisión de las inflorescencias. Por su parte los genes *MPK6* y *MPK3* se expresan durante la abscisión de órganos florales y sus mutaciones sencillas ocasionan defectos en la abscisión, mientras que la doble mutante condicional *mpk6 mpk3* muestra fenotipos aún más drásticos que los observados en las mutaciones simples de *mpk6* y *mpk3*. Estos datos sugieren la participación del módulo *MKK4/MKK5-MPK6/MPK3* corriente abajo de IDA-HAE para regular positivamente la abscisión de los órganos florales (Cho *et al.*, 2008).

#### Senescencia

La senescencia es un proceso de deterioro de las hojas que conduce a la removilización de nutrientes hacia otras partes de la planta, principalmente los órganos reproductivos. Se ha descrito que la *MPK9*

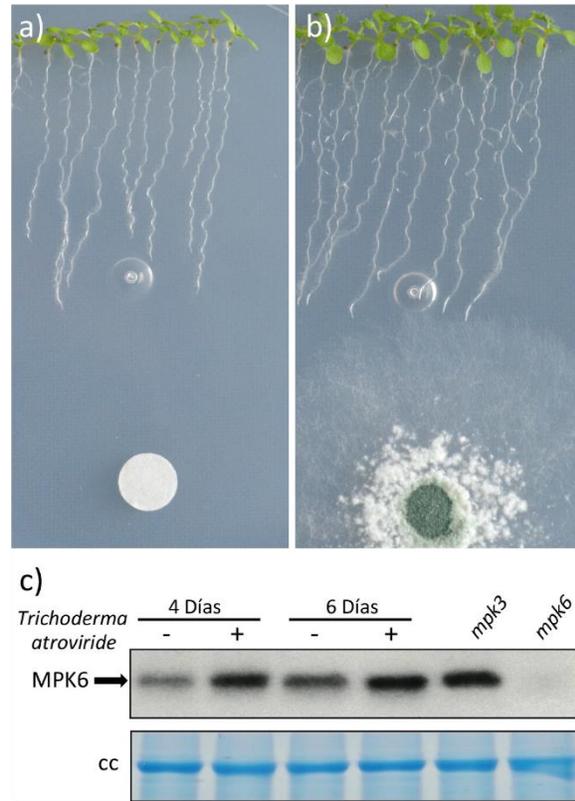
participa en este proceso, esto se evidenció debido a que las mutaciones en *MKK9* causan un retardo en la senescencia de hojas, mientras que la ganancia de función de *MKK9* resulta en una senescencia prematura. Ensayos de fosforilación permitieron comprobar que *MKK9* actúa cascada arriba de *MPK6*, y la mutante *mpk6* fenocopia a *mkk9* en el retraso de senescencia en tanto que la ganancia de función de *MKK9* es suprimida en el fondo genético de *mpk6* (Zhou *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha demostrado que la *MPKKK1* interactúa con el factor de transcripción *WRKY53* relacionado con la senescencia, para formar un complejo, fosforilarlo e incrementar su afinidad con el ADN (Miao *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2008).

### Conclusiones

Las cascadas de señalización de MAPKs, además de coordinar respuestas de defensa o tolerancia a estrés, también participan en la regulación de distintos procesos del desarrollo en las plantas. Las investigaciones que se han realizado con el fin de entender dichos procesos, muestran un panorama donde ocurren interacciones entre fitohormonas y estímulos ambientales de diversa magnitud. Aunque se desconocen muchos de los componentes moleculares que posibilitan las respuestas celulares a cinasas específicas, los factores de transcripción de la familia *WRKY* desempeñan una función crucial en la formación de estructuras florales y reproductivas, relacionadas a eventos de fosforilación. Diversas clases de receptores reconocen moléculas bioactivas, incluyendo péptidos, que activan la señalización por MAPKs, entre las más estudiadas destacan *MPK3* y *MPK6*. La *MPK6* es activada en *Arabidopsis* durante la interacción con el hongo simbiote *Trichoderma atroviride* y se ha establecido que durante esta interacción desempeña una función importante en la configuración del sistema radical en respuesta a los metabolitos bioactivos del hongo (Contreras-Cornejo *et al.*, 2015; **Figura 3**). Con los avances alcanzados en técnicas para estudios de interacción proteína-proteína será posible identificar en los próximos años, los blancos moleculares de las cinasas y dilucidar su papel en el crecimiento y desarrollo de las plantas.

### Referencias

- Bergmann DC, Lukowitz W, Somerville CR** (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* 304: 1494-1497.
- Bush SM, Krysan PJ** (2007) Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase *MPK6* is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J. Exp. Bot.* 58: 2181-2191.
- Butenko MA, Patterson SE, Grini PE, Stenvik GE, Amundsen SS, Mandal A, Aalen RB** (2003) Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands



**Figura 3. La cinasa MPK6 participa en la interacción de las plantas con el hongo simbiote *Trichoderma atroviride*.** a-b) La interacción de plantas de *Arabidopsis* con *T. atroviride* mejora el crecimiento y promueve la ramificación de la raíz. c) El hongo incrementa la actividad de la cinasa MPK6. Nótese el incremento de las bandas de fosforilación a los cuatro y seis días en las plantas inoculadas con *T. atroviride*.

in plants. *Plant Cell* 15: 2296-2307.

**Chang L, Karin M** (2001) Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410: 37-40.

**Cho SK, Larue CT, Chevalier D, Wang H, Jinn T-L, Zhang S, Walker JC** (2008) Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 15629-15634.

**Contreras-Cornejo HA, López-Bucio JS, Méndez-Bravo A, Macías-Rodríguez L, Ramos-Vega M, Guevara García AA, 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 atroviride*. *Molecular Plant Microbe Interact.* 28: 701-710.

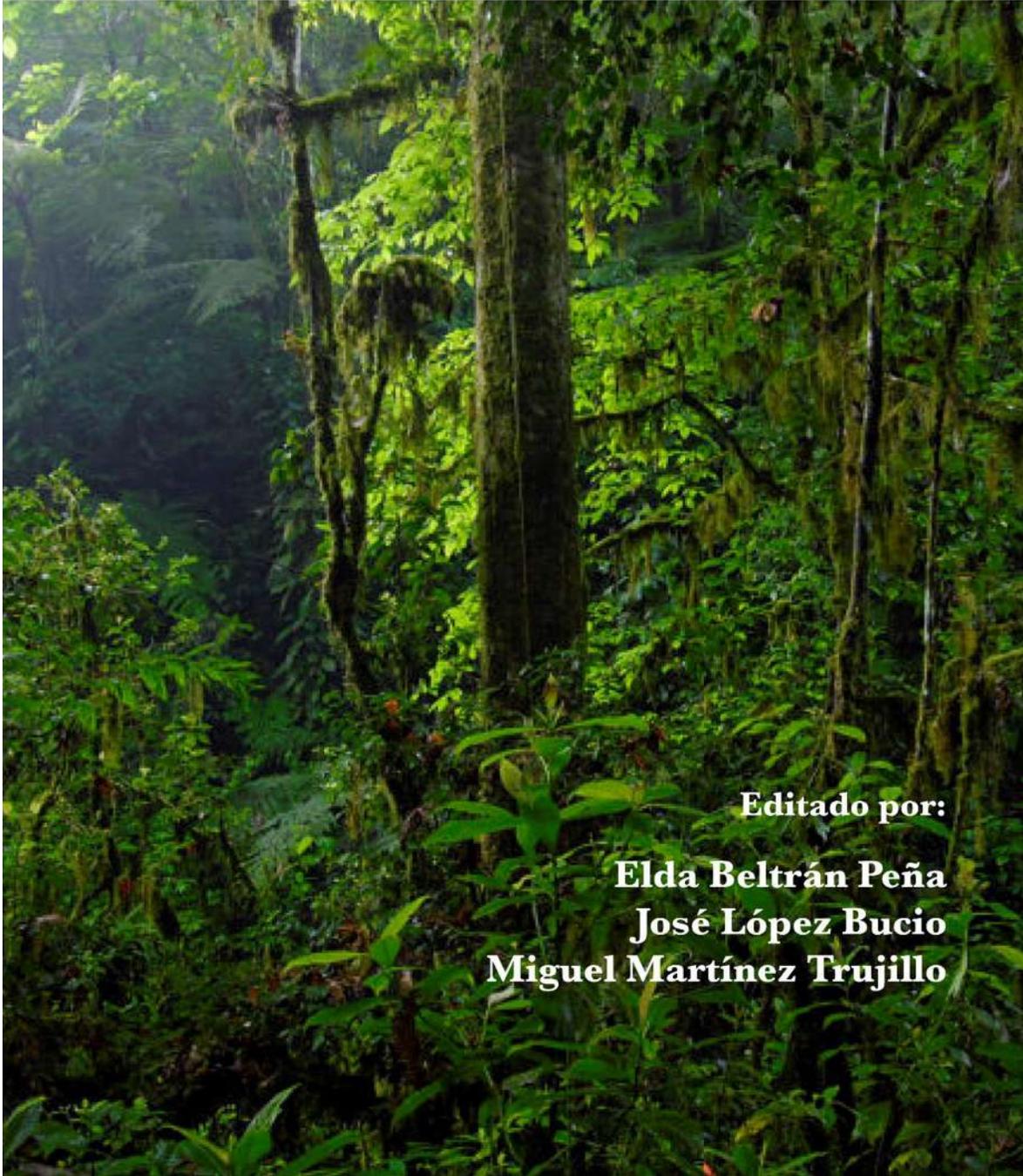
**Costa LM, Marshall E, Tesfaye M, Silverstein KA, Mori M, Umetsu Y, Otterbach SL, Papareddy R, Dickinson SG, Boutiller K, VandenBosch KA, Ohki S, Gutierrez JF** (2014) Central cell-derived peptides regulate early embryo patterning in flowering plants. *Science* 344: 168-172.

**Forde BG, Cutler SR, Zaman N, Krysan PJ** (2013) Glutamate signalling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces

- changes in *Arabidopsis* root architecture. *Plant J.* 75: 1-10.
- Gruber BD, Giehl RFH, Friedel S, von Wirén N** (2013) Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 163: 161-179.
- Guan Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S** (2014) Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 10: 1-12.
- Guan Y, Lu J, Xu J, McClure B, Zhang S** (2014) Two mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, are required for funicular guidance of pollen tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 165: 528-533.
- Hara K, Kajita R, Torii KU, Bergmann DC, Kakimoto T** (2007) The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev.* 21: 1720-1725.
- Hunt L, Gray JE** (2009) The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. *Curr. Biol.* 19: 864-869.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis B. E, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* 7: 301-308.
- Jia W, Li B, Li S, Liang Y, Wu X, Ma M, Wang J, Gao J, Cai Y, Zhang Y, Wang Y, Li J, Wang Y** (2016) Mitogen-activated protein kinase cascade MKK7-MPK6 plays important roles in plant development and regulates shoot branching by phosphorylating PIN1 in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 14(9): e1002550.
- Jinn TL, Stone JM, Walker JC** (2000) HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev.* 14: 108-117.
- Lampard GR, Macalister CA, Bergmann DC** (2008) *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* 322: 1113-1116.
- López-Bucio J, Hernández-Abreu E, Sánchez-Calderón L, Nieto-Jacobo MF, Simpson J, Herrera-Estrella L** (2002) Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiol.* 129: 244-256.
- López-Bucio JS, Dubrovsky JG, Raya J, Ugartechea C, López J, Luna LA, Ramos M, León P, Guevara AA** (2014) *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J. Exp. Bot.* 65: 169-183.
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C** (2004) A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116: 109-119.
- MacAlister CA, Ohashi-Ito K, Bergmann DC** (2007) Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* 445: 537-540.
- Meng X, Wang H, He Y, Liu Y, Walker JC, Torii KU, Zhang S** (2012) A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *Plant Cell* 24: 4948-4960.
- Miao Y, Laun TM, Smykowski A** (2007) *Arabidopsis* MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. *Plant Mol. Biol.* 65: 63-76.
- Miao Y, Smykowski A, Zentgraf U** (2008) A novel upstream regulator of WRKY53 transcription during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 10: 110-120.
- Mishra NS, Tuteja R, Tuteja N** (2006) Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 452: 55-68.
- Müller J, Beck M, Mettlich U, Komis G, Hause G, Menzel D, Samaj J** (2009) *Arabidopsis* MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *Plant J.* 1-15.
- Nadeau JA, Sack FD** (2002) Control of stomatal distribution on the *Arabidopsis* leaf surface. *Science* 296: 1697-1700.
- Ortiz-Castro R, Díaz-Pérez C, Martínez-Trujillo M, del Río RE, Campos-García J, López-Bucio J** (2011) Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 7253-7258.
- Pawson T, Scott JD** (2005) Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* 30: 286-290.
- Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH** (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Rev.* 30: 153-183.
- Pillitteri LJ, Bemis SM, Shpak ED, Torii KU** (2007) Haploinsufficiency after successive loss of signaling reveals a role for ERECTA-family genes in *Arabidopsis* ovule development. *Development* 134: 3099-3109.
- Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW** (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6940-6943.
- Shpak ED, McAbee JM, Pillitteri LJ, Torii KU** (2005) Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science* 309: 290-293.
- Smékalová V, Luptovciak I, Komis G, Samajová O, Ovečka M, Daskocilova A, Takác T, Vadovic P, Novák O, Pechan T, Ziemann A, Kosútová P, Samaj J** (2014) Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytol.* 203: 1175-1193.
- Smertenko AP, Chang HY, Sonobe S, Fenyk SI, Weingartner M, Bogre L, Hussey PJ** (2006) Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J. Cell Sci.* 119: 3227-3237.
- Sozzani R, Iyer-Pascuzzi A** (2014) Postembryonic control of root meristem growth and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 17: 7-12.
- Su SH, Suarez MC, Krysan P** (2007) Genetic interaction and phenotypic analysis of the *Arabidopsis* MAP kinase pathway mutations *mekk1* and *mpk4* suggests signaling pathway complexity. *FEBS Lett.* 581: 3171-3177.

- Taj G, Agarwal P, Grant M, Kumar A** (2010) MAPK machinery in plants recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signal. Behav.* 5: 1370-1378.
- Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF, Komeda Y** (1996) The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 8: 735-746.
- Turjanski AG, Vaque JP, Gutkind JS** (2007) MAP kinases and the control of nuclear events. *Oncogene* 26: 3240-3253.
- Tuteja N** (2009) Signaling through G protein coupled receptors. *Plant Signal. Behav.* 4: 942-947.
- Uchida N, Lee JS, Horst RJ, Lai HH, Kajita R, Kakimoto T, Tasaka M, Torii KU** (2012) Regulation of inflorescence architecture by inter-tissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 6337-6342.
- Wang H, Liu Y, Bruffett K, Lee J, Hause G, Walker JC, Zhang S** (2008) Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsis* ovule development. *Plant Cell* 20: 602-613.
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S** (2007) Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 63-73.
- Xu J, Zhang S** (2015) Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci.* 20: 56-64.
- Zhou C, Cai Z, Guo Y, Gan S** (2009) An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiol.* 150: 167-177.

**FRONTERAS EN LA BIOLOGÍA:  
SEÑALIZACIÓN Y COMUNICACIÓN DE LAS PLANTAS**



**Editado por:**

**Elda Beltrán Peña**

**José López Bucio**

**Miguel Martínez Trujillo**

... Los tres primeros capítulos de este libro presentan una revisión actualizada de las vías de señalización de las principales fitohormonas, haciendo un énfasis especial en las auxinas, ya que éstas participan prácticamente en la regulación de todos los procesos del desarrollo vegetal, desde la embriogénesis hasta la senescencia. Es tal su importancia, que en el capítulo tres se analiza su antagonismo con las citocininas para regular el mantenimiento de los meristemas de la raíz y de los brotes apicales, y permitir el crecimiento y desarrollo continuo de las plantas.



# **FRONTERAS EN LA BIOLOGÍA:** **SEÑALIZACIÓN Y COMUNICACIÓN DE LAS PLANTAS**

**Editado por:**

**Elda Beltrán Peña**

Laboratorio de Transducción de Señales

**José López Bucio**

Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal

**Miguel Martínez Trujillo**

Laboratorio de Genética y Microbiología

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO. AÑO 2018  
FRONTERAS EN LA BIOLOGÍA: SEÑALIZACIÓN Y  
COMUNICACIÓN DE LAS PLANTAS  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

**Editado por**

**Elda Beltrán Peña**

Laboratorio de Transducción de Señales

**José López Bucio**

Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal

**Miguel Martínez Trujillo**

Laboratorio de Genética y Microbiología

**Diseño y Maquetación**

Fidel Anguiano Rodríguez

**Cuidado del Contenido Editorial**

Ma. Elena Mellado Rojas

© D. R. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas.

© D. R. Facultad de Biología

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

# Prefacio

La respuesta de las plantas a los estímulos ambientales, debida en gran medida a la activación de las cascadas de señalización y al cruce de señales entre ellas para regular el adecuado desarrollo vegetal, es la temática del libro **“Fronteras en la biología: señalización y comunicación de las plantas”**, correspondiente al tercer volumen de la serie **Fronteras en la biología del desarrollo de las plantas**. La biología vegetal ha tenido varias etapas importantes, iniciando con la nutrición y el transporte, la fotosíntesis y otros procesos del metabolismo, con avances generales de los efectos de algunos compuestos conocidos como hormonas vegetales. No obstante, hubo que esperar al desarrollo de la biología molecular para integrar estos conocimientos con la información genética y su expresión, entre ellos el mecanismo molecular de acción de las hormonas: la percepción de señales endógenas o exógenas, la transmisión de estas señales y su transformación en otras, formando rutas o vías de señalización o transducción que culminan en la modificación de un proceso, siendo común la modulación de la expresión de genes específicos. Estos mecanismos hormonales, entre otros, permiten que haya una comunicación molecular entre las diferentes estructuras de una planta y su ambiente abiótico y biótico, lo que la mantiene en constante alerta para responder y adaptarse a las condiciones existentes, ya que por su naturaleza sésil la planta “está obligada” a vivir en el sitio donde germinó y se estableció. Los tres primeros capítulos de este libro presentan una revisión actualizada de las vías de señalización de las principales fitohormonas, haciendo un énfasis especial en las auxinas, ya que éstas participan prácticamente en la regulación de todos los procesos del desarrollo vegetal, desde la embriogénesis hasta la senescencia. Es tal su importancia, que en el capítulo tres se analiza su antagonismo con las citocininas para regular el mantenimiento de los meristemos de la raíz y de los brotes apicales, y permitir el crecimiento y desarrollo continuo de las plantas. No podría dejar de analizarse la vía de señalización del regulador maestro TOR, originalmente encontrada en levaduras y animales donde integra las señales de energía, disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento que permiten el desarrollo; en las plantas cada vez se reporta más su participación en dicha integración. En los últimos capítulos se revisan los mecanismos moleculares que participan en el transporte de azúcares, en la deficiencia del hierro, y los involucrados en la tolerancia a los metales pesados. La edición de este libro, al igual que los dos anteriores de la serie **“Fronteras en la biología del desarrollo de las plantas”** es uno de los objetivos del curso de “Biología del desarrollo vegetal” que se imparte a los estudiantes de posgrado del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH. Finalmente, agradecemos a todos los autores su esfuerzo por presentar de manera actualizada la información existente en las diferentes áreas analizadas y que cumple con el propósito de divulgar los avances científicos e introducir a los estudiantes en este ámbito.

Elda Beltrán Peña  
José López Bucio  
Miguel Martínez Trujillo

Morelia, septiembre de 2018

# Contenido

<b>Prefacio</b>	III
<b>Contenido</b>	IV
<b>Índice de autores</b>	IX
<b>Portadas</b>	X
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Vías de señalización de las hormonas vegetales</b>	<b>2</b>
<i>Aarón G. Munguía Rodríguez, José López Bucio, Miguel Martínez Trujillo y Elda Beltrán Peña</i>	
Introducción	3
1. La actividad de las auxinas, del JA, el GA, las SL, el ABA y el SA comprende la señalización a través de receptores citoplasmáticos y/o nucleares	3
1.1. Funciones del complejo SCF	3
1.2. Vía de señalización de las auxinas y del ácido jasmónico (JA)	3
1.3. Señalización del ácido giberélico (GA) y las estrigolactonas (SL)	5
1.4. Señalización del ácido abscísico (ABA)	7
1.5. Señalización del ácido salicílico (SA)	8
2. Citocininas (CK), brasinoesteroides (BR) y etileno (ET): señalización a través de receptores transmembranales	9
2.1. Señalización de las citocininas (CK)	9
2.2. Señalización de brasinoesteroides (BR)	10
2.3. Señalización de etileno (ET)	11
Conclusiones	13
Referencias	13
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Las auxinas: hormonas que coordinan el crecimiento y desarrollo de las plantas y su interacción con el ambiente</b>	<b>18</b>
<i>Elizabeth García Cárdenas, Edith Muñoz Parra, José López Bucio y Elda Beltrán Peña</i>	
Introducción	19
1. Homeostasis de las auxinas: biosíntesis, conjugación y degradación	19
2. Distribución de las auxinas	20
3. Señalización de las auxinas	20
4. Eventos del crecimiento y desarrollo vegetal regulados por auxinas	21
4.1. Embriogénesis	21
4.2. Tropismos	22
4.3. Funcionamiento de los meristemos	23
4.4. Interacción de la vía auxínica con el complejo MEDIADOR	23
Conclusiones	24
Referencias	24

### **CAPÍTULO 3**

#### **Mecanismos moleculares que controlan el desarrollo de los meristemos en plantas** **28**

*Ernesto Vázquez Chimalhua, José López Bucio, Eduardo Valencia Cantero y Elda Beltrán Peña*

Introducción	29
1. Características de los meristemos	29
1.1. Actividad y composición del meristemo apical de la raíz	31
1.2. Estructura y función del meristemo del brote apical	31
2. Identidad y mantenimiento del centro quiescente del meristemo apical de la raíz	31
2.1. La expresión de los genes <i>PLETHORA (PLT)</i> ubica y mantiene la organización del centro quiescente	31
2.2. La actividad del complejo SHR/SCR regula la identidad del centro quiescente	33
2.3. La expresión de <i>WOX5</i> mantiene las características del centro quiescente	34
3. Operatividad del centro organizador del meristemo del brote apical	34
3.1. La expresión de <i>WUSCHEL</i> en el centro organizador mantiene el nicho meristemático	35
3.2. Las citocininas promueven el mantenimiento del centro organizador	36
3.3. La expresión del <i>STM</i> mantiene al meristemo del brote apical	36
Conclusión	37
Referencias	37

### **CAPÍTULO 4**

#### **Regulación del crecimiento vegetal a través de la vía TOR** **42**

*Iván Corona Sánchez, Homero Reyes de la Cruz y Elda Beltrán Peña*

Introducción	43
1. La modulación de la actividad de TOR	43
1.1. Estructura general de la proteína cinasa TOR	43
1.2. TOR forma parte de los complejos TORC1 y TORC2	43
2. Vía de señalización PI3K/TOR en mamíferos	45
2.1. Cascada de señalización activada por la insulina y factores de crecimiento tipo insulina (IGF)	45
2.2. Activación de la vía de señalización de TOR en mamíferos como respuesta a los nutrientes, niveles energéticos y estrés	45
3. Regulación del crecimiento vegetal a través de TOR	47
3.1. Aspectos moleculares de la funcionalidad de TOR en las plantas	48
3.2. Sensibilidad de las plantas a la rapamicina	48
3.3. Procesos regulados por la cinasa TOR en plantas	48
Conclusión	49
Referencias	49

### **CAPÍTULO 5**

#### **La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal** **54**

*Gustavo Ravelo Ortega, José López Bucio y Elda Beltrán Peña*

Introducción	55
1. Clasificación de las proteínas involucradas en las vías MAPKs en plantas	56
2. Vías de señalización de las MAPK que regulan el crecimiento y desarrollo vegetal	58
2.1. Desarrollo embrionario	58
2.2. Regulación de la arquitectura radicular	59
2.3. Desarrollo foliar	59
2.3.1. Formación de estomas	59
2.3.2. Senescencia foliar	62
2.4. Desarrollo floral	62

2.4.1. Abscisión de órganos florales	62
2.4.2. Arquitectura de la inflorescencia y desarrollo de órganos florales	63
2.4.3. Desarrollo del polen, crecimiento y orientación del tubo polínico	63
2.4.4. Desarrollo del óvulo	64
Conclusión	64
Referencias	64

## **CAPÍTULO 6**

### **Mecanismo molecular del transporte de azúcares en las plantas durante su interacción con hongos** **68**

*Saraí Esparza Reynoso, José López Bucio y Elda Beltrán Peña*

Introducción	69
1. Transportadores de sacarosa tipo SUT y de monosacáridos MST presentes en plantas	71
2. Función de los transportadores tipo SWEET	72
3. Mecanismos de los transportadores de azúcares durante la interacción mutualista planta-microorganismos y planta-patógenos	73
3.1. Mecanismo del transporte de azúcares hacia los microorganismos simbioses	73
3.2. Mecanismo del transporte de azúcares empleado por los patógenos	75
3.3. ¿Cómo los patógenos biotróficos adquieren nutrientes de las células hospedadoras de la planta?	75
Conclusiones	78
Referencias	78

## **CAPÍTULO 7**

### **Absorción, localización y homeostasis del hierro en las plantas superiores** **84**

*Vicente Montejano Ramírez, Eduardo Valencia Cantero y Elda Beltrán Peña*

Introducción	85
1. Características del hierro	85
2. Homeostasis del hierro	85
3. Las plantas estrategia I utilizan un mecanismo basado en la reducción de hierro	86
3.1. Regulación de la expresión génica en las plantas estrategia I	87
4. Mecanismo de las plantas estrategia II basado en la quelación de hierro	88
4.1. La regulación química en las plantas estrategia II	88
5. Los genes <i>FRO</i> codifican para las enzimas férrico quelato reductasas	89
5.1. Evolución de los genes <i>FRO</i> en las plantas estrategia I	89
5.2. Función de <i>FRO</i> en las plantas estrategia II	90
5.3. Localización intracelular de las proteínas <i>FRO</i>	90
6. Vía de señalización activada en respuesta a la deficiencia del hierro	91
Conclusión	91
Referencias	92

**CAPÍTULO 8**  
**Efecto de la deficiencia del hierro sobre el sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*** **96**

*Guadalupe J. Salmerón Barrera, José López Bucio y Elda Beltrán Peña*

Introducción	97
1. Respuestas morfológicas y fisiológicas a la deficiencia de hierro	97
2. Estrategias de captación del hierro	98
2.1. Plantas Estrategia I	98
2.2. Plantas Estrategia II	98
3. Genes involucrados en las respuestas transcripcionales a la deficiencia de hierro	99
3.1. Participación de la familia de los factores de transcripción bHLH	99
3.2. Percepción y asimilación del hierro	100
4. Participación de las fitohormonas en la deficiencia de Fe	101
5. Deficiencia de hierro y su efecto sobre la fotosíntesis	101
Conclusión	101
Referencias	102

**CAPÍTULO 9**  
**Las actinobacterias endófitas activan la respuesta inmune de las plantas** **106**

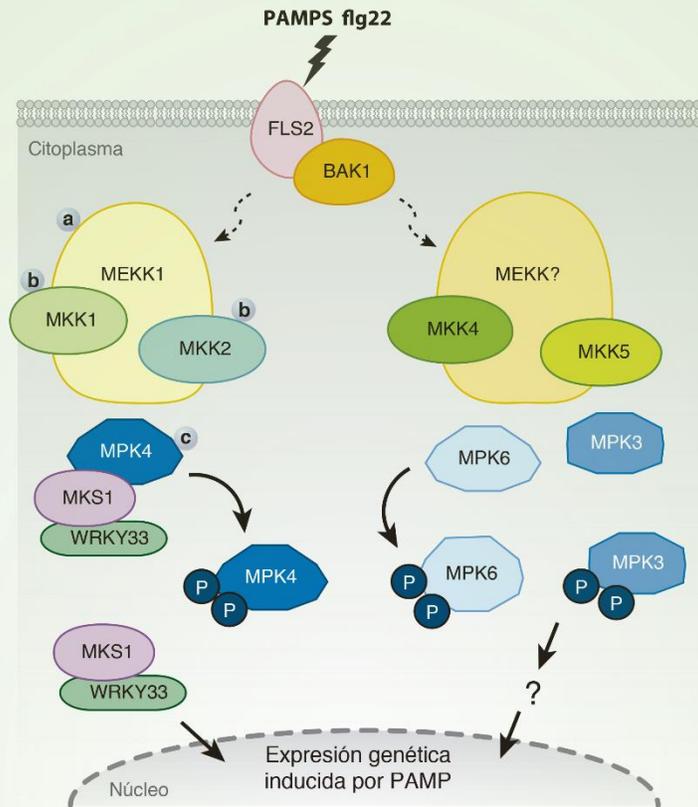
*Christian Hernández Soberano, Eduardo Valencia Cantero y Elda Beltrán Peña*

Introducción	107
1. Respuesta de las plantas al ataque de los organismos patógenos	107
2. Respuesta sistémica adquirida (SAR)	108
2.1. Genes de respuesta a patógenos ( <i>PR</i> )	108
3. Respuesta sistémica inducida (ISR)	108
4. El efecto de las actinobacterias endófitas sobre la respuesta inmune de las plantas	109
5. Efecto de <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2 sobre el crecimiento vegetal	110
5.1. Activación de la ISR por la actinobacteria <i>Arthrobacter agilis</i> UMCV2	111
Conclusión	111
Referencias	111

**CAPÍTULO 10**  
**Mecanismos de tolerancia de las plantas a los metales pesados** **114**

*León Francisco Ruíz Herrera, Alejandro Méndez Bravo y José López Bucio*

Introducción	115
1. Clasificación y toxicidad de los metales	115
2. Estrategias de las plantas frente a los metales pesados	116
3. Evolución de las plantas en respuesta a la acumulación de metales pesados	117
4. Mecanismos moleculares generales de las plantas tolerantes a metales pesados	118
5. Tolerancia al zinc	118
5.1. Aspectos fisiológicos	118
5.2. Aspectos moleculares de la tolerancia al zinc	119
6. Tolerancia al cadmio	121
7. Tolerancia al aluminio	121
7.1. Aspectos fisiológicos	121
7.2. Aspectos moleculares de la tolerancia al aluminio en arroz	122
Conclusiones	123
Referencias	123



## CAPÍTULO 5

La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal

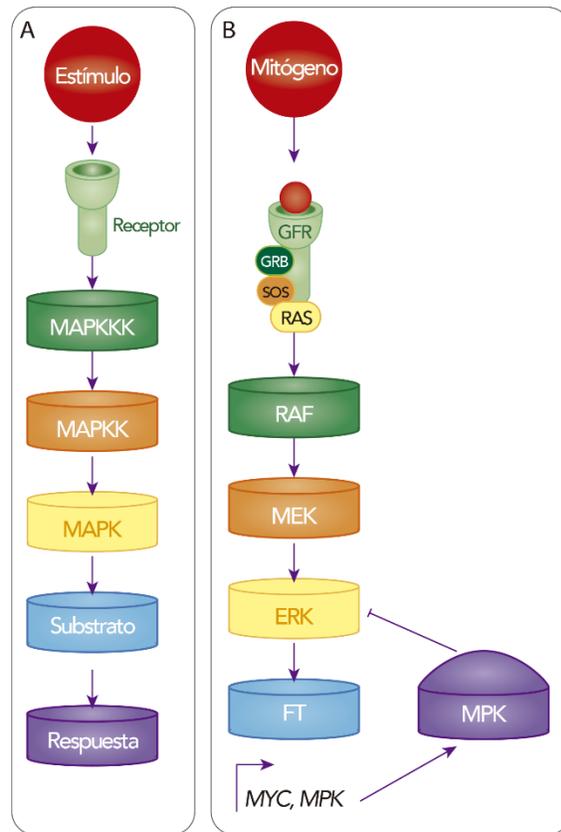
# La vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal

Gustavo Ravelo Ortega, José López Bucio y Elda Beltrán Peña

La vía de señalización de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) se encuentra conservada entre diferentes organismos eucariontes. En esta vía participan varias proteínas cinasas que desencadenan una cascada de fosforilaciones que finaliza en la regulación de la actividad de otras cinasas, enzimas y factores de transcripción. En las plantas se han identificado y clasificado 90 proteínas cinasas MAPKs, pero la mayoría de ellas se desconoce cómo participan en los diferentes procesos celulares. Las primeras investigaciones que determinaron su función en las plantas las asociaron con respuestas de defensa y estreses ambientales. Posteriormente, se determinó que dichas vías también participan en el desarrollo y crecimiento de las plantas; aunque varios de los componentes de la vía de señalización de las MAPK que participan en estos procesos de organogénesis no se han podido establecer. En esta revisión se describe de manera general la clasificación de las proteínas MAPKs en plantas y se analizan las investigaciones que se han enfocado en dilucidar la vía de las MAPK involucrada en la regulación del crecimiento y desarrollo vegetal.

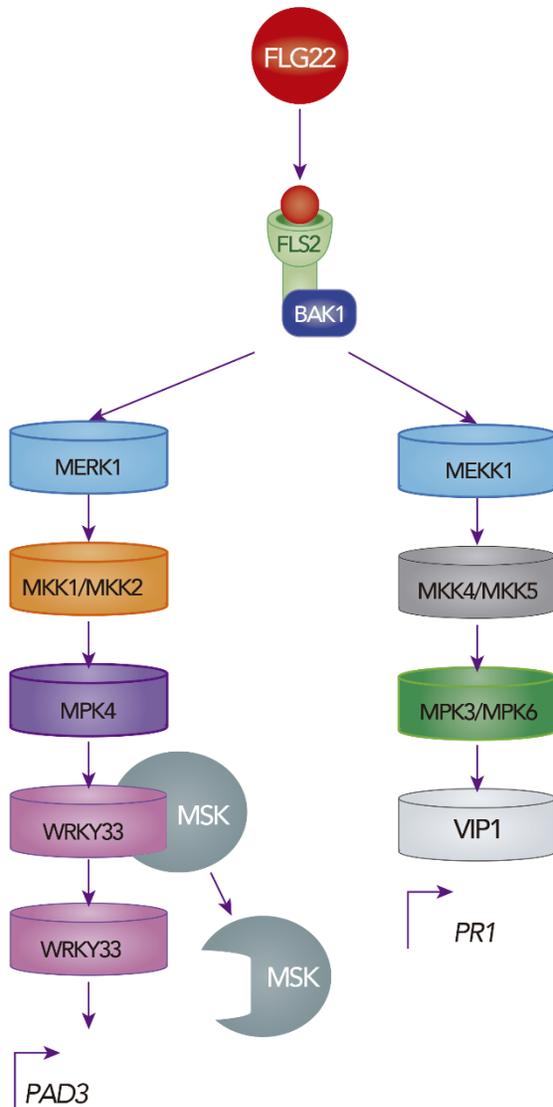
**Introducción**

Las células poseen mecanismos que les permiten percibir estímulos bióticos o abióticos. En eucariontes este tipo de señales son percibidas por receptores que se localizan en la membrana plasmática y modulan la función de varias proteínas a través de una secuencia de reacciones enzimáticas denominadas cascadas de señalización (McCarty y Chory, 2000). La fosforilación es una reacción enzimática importante debido a que participa en la mayoría de las cascadas de señalización, repercutiendo en varios procesos celulares (Pawson y Scott, 2005). Una de las vías de señalización que se basa en la fosforilación y se encuentra conservada entre los eucariontes es la de las MAPK. Esta cascada de señalización inicia cuando el receptor membranal es estimulado y activa directa o indirectamente a la triple cinasa MAPKKK, la cual fosforila a la cinasa doble MAPKK que a su vez fosforila a la cinasa sencilla MAPK (Fig. 1 A). Esta última MAPK fosforila a varias proteínas blanco entre las cuales destacan otras cinasas, enzimas o factores de transcripción (Xu y Zhang, 2015). El término MAPK fue utilizado por primera vez en mamíferos para describir a una proteína cinasa a la que se denominó ERK o pp44, la cual es estimulada por varios mitógenos como el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el forbol-12-miristato-13-acetato, la trombina y la insulina (Rossomando *et al.*, 1989). Actualmente la vía de señalización MAPKs estimulada por estos mitógenos donde participa la ERK se encuentra completamente elucidada (Fig. 1B). El mecanismo de esta vía inicia con la unión del mitógeno al receptor cinasa, el cual se autofosforila y recluta al complejo GRB2-SOS formado por el GROWTH FACTOR RECEPTOR-BOUND PROTEIN 2 (GRB2) y el SON OF SEVENLESS (SOS), el cual intercambia el guanósín difosfato (GDP) unido a la proteína RAS por el guanósín trifosfato (GTP). RAS-GTP activa a la MAPKKK, RAPIDLY ACCELERATED FIBROSARCOMA (RAF), lo que conducirá a los eventos de fosforilaciones secuenciales de la MEK (MAPKK) y la ERK (MAPK). Finalmente la ERK fosforila a los factores de transcripción que permiten la expresión de varios genes como los *MYC* que codifican para proteínas que activan a las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), estimulando la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la S. También dichos mitógenos promueven la síntesis de la fosfatasa MPK, la cual regula negativamente a la cinasa ERK (Pearson *et al.*, 2001; Long *et al.*, 2015). En la actualidad otras vías de señalización de las MAPKs en respuesta a diversos estímulos ambientales han sido establecidas en levaduras, mamíferos y plantas. Las primeras investigaciones de la vía MAPK en plantas la relacionaron con las respuestas



**Figura 1. Vía de señalización de las MAPKs en eucariontes.** (A) La vía inicia cuando una molécula señal es detectada por un receptor tipo cinasa, posteriormente éste activa de manera directa o indirecta a una cinasa MAPKKK, la cual fosforilará a una MAPKK para que sea activada y fosforile a su vez a una cinasa MAPK. Finalmente, está última activa a proteínas sustrato que pueden ser factores de transcripción. (B) Vía de señalización de las MAPK estimulada por mitógenos en mamíferos. Cuando el mitógeno es percibido por el receptor GFR recluta al complejo GRB2-SOS, el cual activa a la proteína G, RAS al cambiarle GDP por GTP. RAS-GTP activa a RAF una MAPKKK, para que inicie una serie de fosforilaciones de manera secuencial entre las proteínas MEK-ERK-Factor de transcripción (FT). Esta vía termina con la expresión de los genes *MYC* y *MPK*. MPK es una fosfatasa que actúa como regulador negativo de ERK.

a inductores provenientes de las bacterias, los hongos, los estreses salino y oxidativo y también a algunos factores abióticos como la temperatura, la humedad, la hiperosmolaridad, el contacto y las heridas (Tena *et al.*, 2001). Todas las vías MAPK antes mencionadas no han sido completamente elucidadas, excepto dos que son estimuladas por el péptido FLG22 (Fig. 2). Dicho péptido es un componente de la flagelina, proteína del flagelo bacteriano, el cual es percibido por plantas mediante el receptor cinasa FLS2 y el correceptor



**Figura 2. Vías de las MAPK involucradas en las respuestas de defensa contra patógenos.** El péptido FLG22 constituyente del flagelo bacteriano activa dos distintas vías de defensa. Ambas comparten componentes como el receptor (FLS2), el correceptor (BAK1) y la MAPKKK (MEKK1). La señalización corriente abajo de MEKK modula distintas proteínas MAPK en cada vía de defensa. Una de ellas permite la expresión del gen *PAD3* que codifica para una enzima que interviene en la síntesis de la camalexina. En la segunda vía se expresan genes *PR1* que codifican para glucaneras o quitinasas.

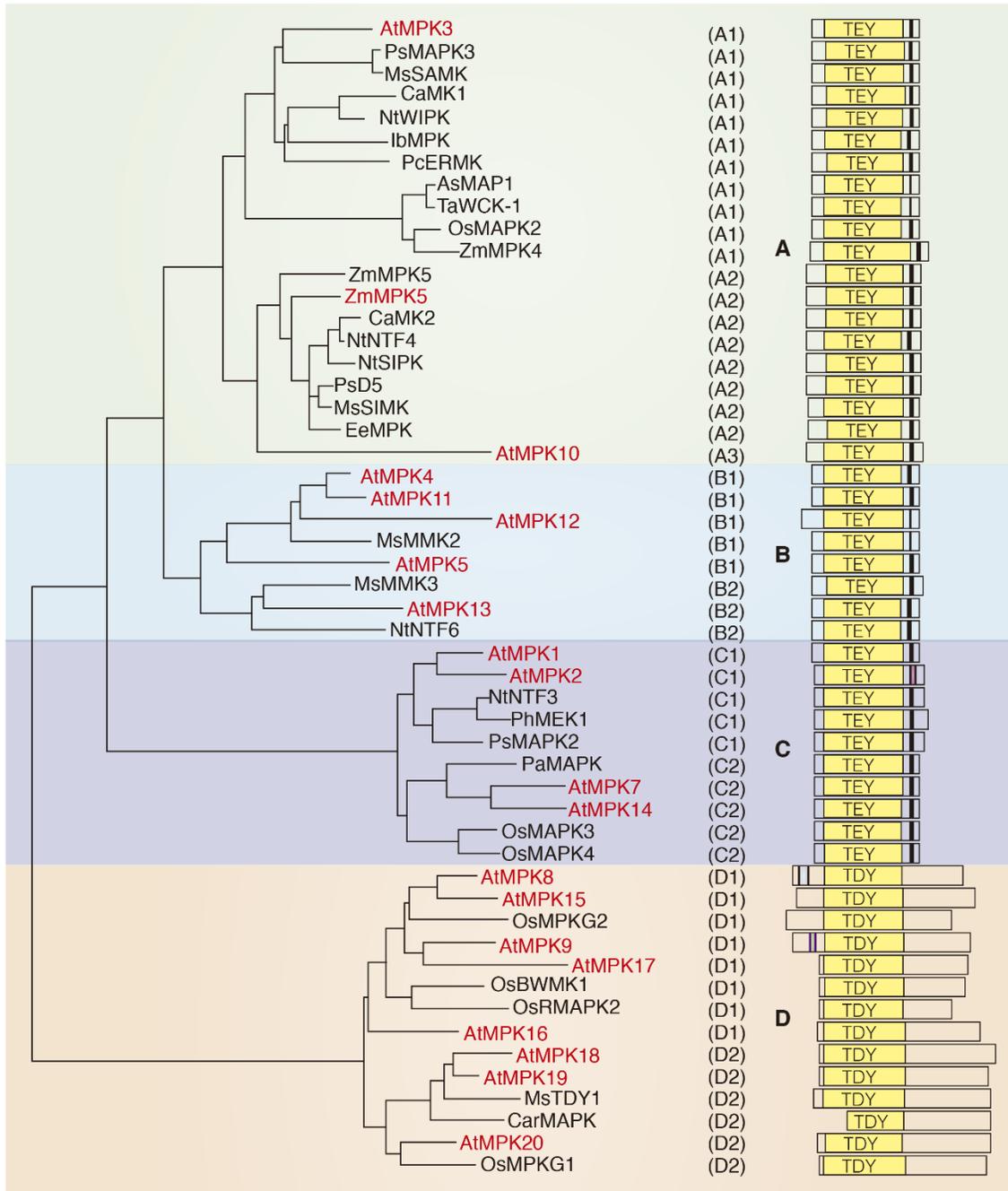
BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-associated receptor kinase 1 (BAK1). Este complejo fosforila y activa corriente abajo a la MEKK1 (MAPKKK) que fosforila a la MKK1/MKK2 (MAPKK), la cual a su vez, fosforila a la MPK4 (MAPK). Esta última cinasa al fosforilar a la proteína MECKEL SYNDROME

TYPE 1 (MKS1) libera al factor de transcripción WRKY33, el cual promueve la expresión de *PHYTOALEXIN DEFICIENT3 (PAD3)*, una enzima requerida para la síntesis de camalexina, un compuesto antimicrobiano. La segunda vía estimulada por el péptido FLGS22 también recae sobre MEKK1 que fosforila a la MKK4/MKK5, la cual al fosforilar a las cinasas MPK3/MPK6 activan al factor de transcripción VirE1-INTERACTING PROTEIN 1 (VIP1). Este factor a su vez incrementa la expresión de los genes relacionados a la defensa *PATHOGENESIS-RELATED 1 (PR1)* (Tena *et al.*, 2001; Colcombet y Hirt, 2008; Pitzschke *et al.*, 2009). Las proteínas MAPK de las plantas han sido clasificadas de acuerdo a los siguientes criterios: i) la homología que presentan con otras MAPK previamente identificadas en mamíferos o levaduras; ii) al tipo de estímulo al que responden y iii) a las características estructurales de la secuencia de aminoácidos que las conforman (Ichimura *et al.*, 2002). Las vías de las MAPK se han visto implicadas en la regulación de diferentes procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, aunque pocas proteínas MAPK que participan en dichas vías han sido identificadas (Xu y Zhang, 2015). En esta revisión se describen cuáles son los elementos propuestos para la clasificación de las proteínas MAPKs de plantas y también se proporciona un panorama de los procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas que son regulados por la vía de las MAPK.

### 1. Clasificación de las proteínas involucradas en las vías MAPKs en plantas

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado 60 MAPKKK, 10 MAPKK y 20 MAPK. La familia que comprende tres grupos (A-C) y presenta mayor diversidad en los dominios estructurales es la MAPKKK (Tabla 1). Las proteínas del grupo A presentan un dominio cinasa similar al de la SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE (STE11) y al BYPASS OF C KINASE (BCK1) de levaduras y al de la proteína MEKK1 de mamíferos. En cambio, tanto las cinasas del grupo B como del C se asemejan más al de la proteína RAF de mamíferos. Todas las MAPKKK del grupo B presentan un dominio N-terminal grande (Ichimura *et al.*, 2002). Por otra parte, en las proteínas MAPKK la secuencia consenso de fosforilación es S/TxxxxS/T (x equivale a cualquier aminoácido) y el alineamiento de este dominio con otras MAPKK de eucariontes ha permitido su clasificación en cuatro grupos (A-D) (Tabla 1). El grupo B se caracteriza por tener un dominio de NUCLEAR TRANSPORT FACTOR 2 PROTEIN (NFT2) en el C-terminal, el cual en otras proteínas estimula la eficiencia del importe nuclear de proteínas cargo. Los genes de los grupos C y D no presentan intrones y poseen posibles dominios

**Tabla 1. Clasificación y características de las proteínas MAPKs.** Se resalta en color rojo las MAPKs de *A. thaliana*.



■ Domain CD      ■ Región rica en ácido glutámico  
■ Dominio cinasa      ■ Región rica en serina

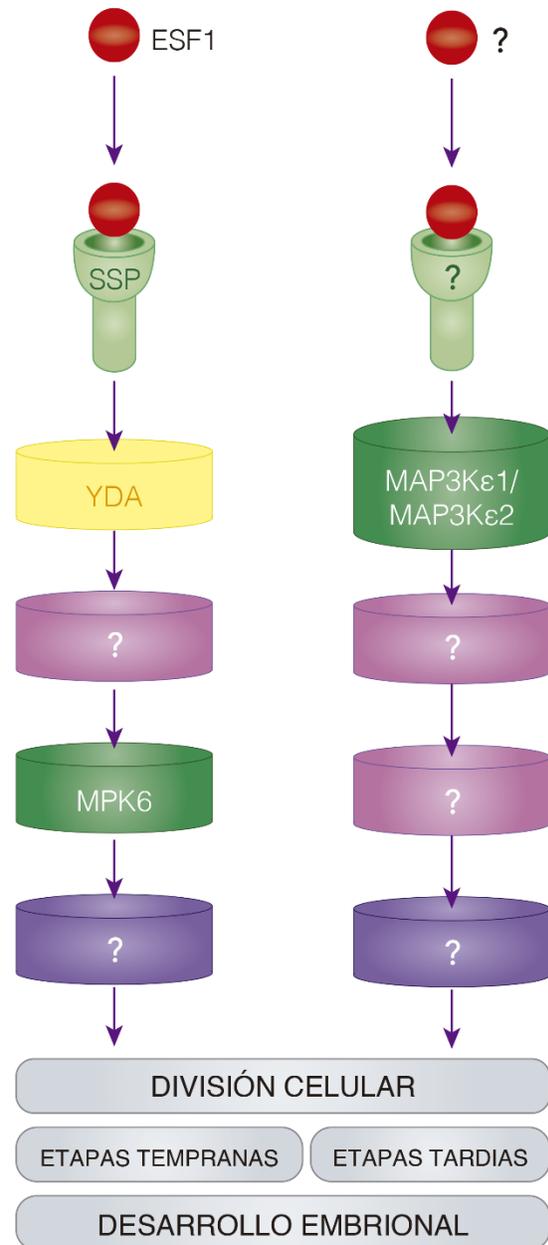
de acoplamiento con otras proteínas (Ichimura *et al.*, 2002). Finalmente, las cinasas MAPK se clasifican en cuatro grupos donde A, B y C presentan el motivo de los aminoácidos TEY como sitio de fosforilación y las del grupo D el TDY (Tabla 1). A las proteínas que conforman el grupo A se les ha involucrado con respuestas ambientales y hormonales, a las del B a estreses ambientales y sobre el grupo C solo existe un reporte que lo involucra con la regulación del ritmo circadiano. Mientras que las del grupo D a diferencia de los demás contiene un C-terminal más grande (Ichimura *et al.*, 2002).

## 2. Vías de señalización de las MAPK que regulan el crecimiento y desarrollo vegetal

### 2.1. Desarrollo embrionario

Durante el desarrollo temprano del endospermo en *A. thaliana* fueron identificados tres genes *At1g10747*, *At1g10745* y *At1g10717* que se expresaron exclusivamente en los sacos de óvulos del embrión. Estos genes codifican a los péptidos pequeños EMBRYO SURROUNDING FACTOR 1 (ESF1). La regulación negativa de los transcritos de los genes *ESF1* mediante líneas de ARN de interferencia (*esf1*\_ARNi) mostró fenotipos con semillas más pequeñas y morfológicamente anormales. También los embriones de las plantas *esf1*\_ARNi presentaron defectos en el patrón de división celular y una disminución del número de células del suspensor (Costa *et al.* 2014). También al interrumpir la función del gen que codifica para el receptor cinasa SHORT SUSPENSOR (SSP) se presentaron fallas en la elongación del cigoto y una disminución en el tamaño de las células basales, causando la supresión del crecimiento normal del suspensor (Bayer *et al.* 2009). Los defectos antes mencionados en las líneas *esf1*\_ARNi, se han reportado también en las plantas con pérdida de función de los genes *YODA* (*YDA*) y *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6* (*MPK6*), los cuales codifican para una MAPKKK y una MAPK respectivamente. En las plantas *yda* y *mpk6* también se presenta una alta incidencia de embriones expuestos fuera de la cubierta de la semilla (Lukowitz *et al.*, 2004; Bush y Krysan, 2007). Esta evidencia genética sugiere una vía de señalización que inicia cuando el péptido ESF1 es percibido por el receptor cinasa SSP que activa a YDA. Después YDA fosforila a una MAPKK no identificada y ésta a su vez fosforila a la cinasa MPK6 (Fig. 3). Actualmente se desconocen los blancos de MPK6 en esta vía de señalización, aunque existe la posibilidad de que sean factores de transcripción que regulen la expresión de genes relacionados con el control de la división celular del cigoto y del suspensor durante las etapas

tempranas del desarrollo embrionario. Por otra parte, durante el desarrollo embrionario de *Arabidopsis* se identificó la expresión de los genes *MAP3Kε1*/*MAP3Kε2* que codifican para una MAPKKK que



**Figura 3.** Vías de las MAPK que regulan distintas etapas del desarrollo embrionario de *Arabidopsis thaliana*. El péptido ESF1 y su receptor cinasa SSP modulan corriente abajo a YDA y a MPK6, las cuales regulan el desarrollo embrionario en etapas tempranas y en las tardías solo se ha señalado la participación de MAP3Kε1/MAP3Kε2. Los componentes que aún se desconocen en las vías de señalización son mostrados por el símbolo de interrogación (?).

se encuentra estrechamente relacionada con las MAPKKK: CELL DIVISION CYCLE 7P y 15P (CDC7P y CDC15P) de levaduras. La mayoría de las semillas de la doble mutante *map3ke1 map3ke2* mostraron una detención en el desarrollo del embrión en la etapa globular o de corazón, lo cual indica la importancia de estas MAPKKK en la regulación de las etapas tardías del desarrollo embrionario (Fig. 3) (Chaiwongsar *et al.*, 2012).

## 2.2. Regulación de la arquitectura radicular

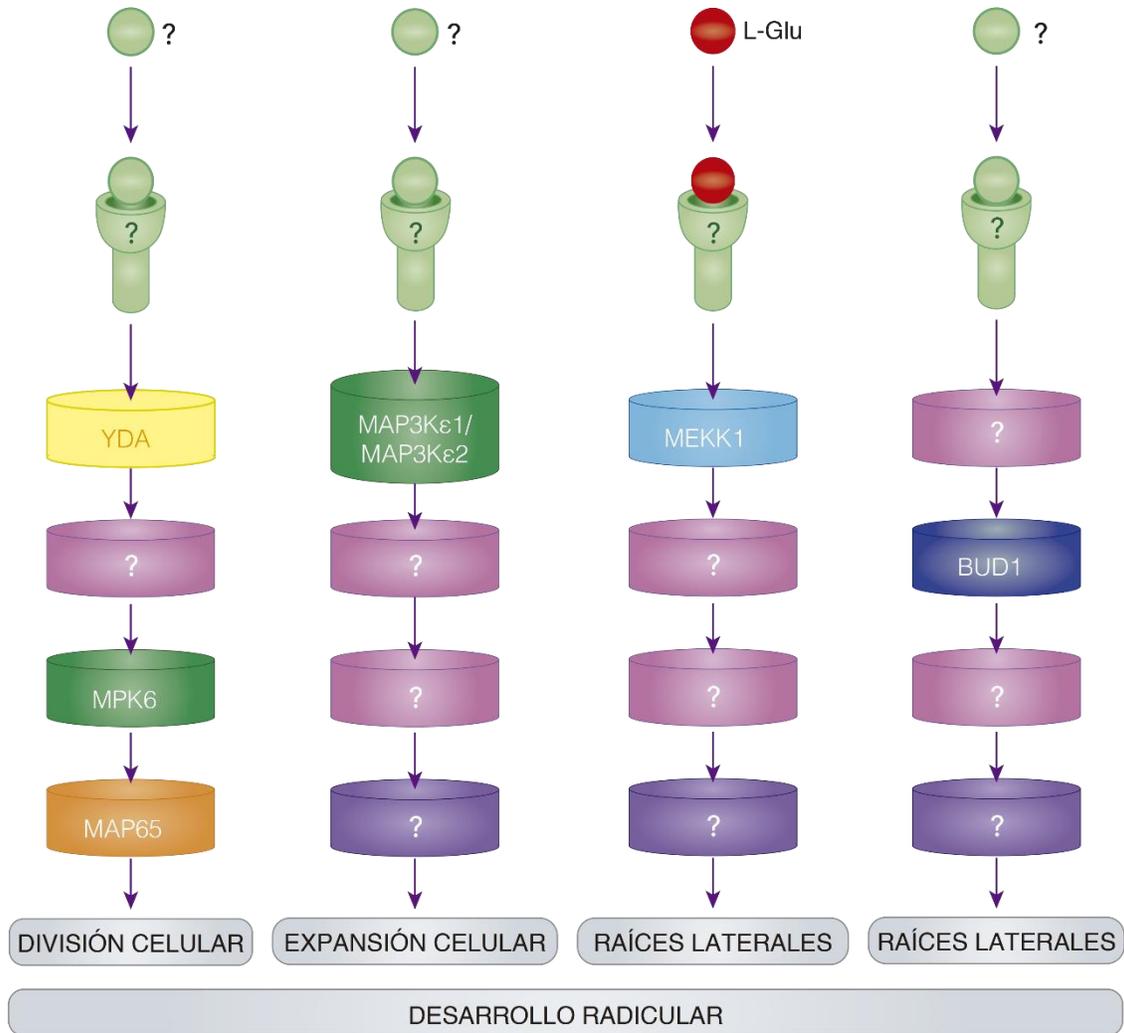
La expresión de *MPK6* en la raíz primaria de *Arabidopsis* se observa principalmente en la zona meristemática y de transición. La raíz de las plantas *mpk6* presentó divisiones celulares ectópicas y planos de división desordenados, específicamente en la parte apical del meristemo y en el centro quiescente. También en las plantas *mpk6* se evidenciaron tres diferentes fenotipos de raíz: larga, corta y sin desarrollo, donde el primer fenotipo mostró un mayor número de raíces laterales que la planta silvestre. Estos resultados muestran la importancia de la función de MPK6 en el desarrollo de la raíz y en la regulación negativa del desarrollo de raíces laterales (Müller *et al.*, 2010; López Bucio *et al.*, 2014). Las alteraciones de la mutante *mpk6* en los patrones de división de la zona meristemática de la raíz fueron similares a las del fenotipo de *yda*, lo que sugiere que MPK6 participa corriente abajo de YDA en la modulación de los planos de división celular de la raíz (Smékalová *et al.*, 2014). Se ha reportado a partir de ensayos de fosforilación que la MPK6 fosforila a la proteína MICROTUBULE ASSOCIATED PROTEIN 65 (MAP65), la cual es una proteína que permite la estabilización de los microtúbulos antiparalelos del huso mitótico central durante el transcurso de la anafase a la citocinesis (Smertenko *et al.*, 2006). Además, en las plantas de *Arabidopsis* WT, y las mutantes de pérdida y ganancia de función *yda* y  $\Delta Nyda1$  respectivamente, se mostró por ensayos de inmunofluorescencia que la proteína MAP65 se localiza sobre los microtúbulos del huso mitótico, en mayor cantidad en las plantas *yda* y en menor en las  $\Delta Nyda1$  respecto al control. En extractos de la raíz de las mutantes *yda* y de la silvestre se identificó mediante ensayos de inmunodetección con fosfoetiquetado a MAP65 fosforilada. En las mutantes *yda* y en la planta silvestre, los niveles de fosforilación de la proteína MAP65 fueron moderados, en tanto que en la mutante  $\Delta Nyda1$  fueron significativamente altos. Estos últimos experimentos permitieron sugerir que la MAP65 participa corriente abajo del módulo YDA-MPK6, regulando los procesos de división celular de la raíz (Fig. 4) (Smékalová *et al.*, 2014). En estudios recientes se ha demostrado que las cinasas MPK3/MPK6 actúan en *Oryza sativa* independientemente o de manera

coordinada con las auxinas y citocininas durante el desarrollo de la raíz. También se ha sugerido que estas MAPK regulan la actividad de algunos transportadores de auxinas de la familia PIN (Fig. 7). Cabe mencionar que las mutantes *yda1* y  $\Delta Nyda1$  presentaron mayor densidad de raíces laterales y defectos en división celular. En estas mutantes se encontraron altos niveles endógenos de la auxina Acido Indol Acético (AIA). Un análisis proteómico reveló que el incremento del AIA se debía al aumento de las enzimas biosintéticas de esta auxina, como la triptófano sintetasa (involucrada en la síntesis del triptófano, precursor de AIA) y las nitrilasas (encargadas de convertir el indol-3-acetonitrilo a AIA). *yda1* también presentó patrones alterados de división en la epidermis, en tejidos internos y en el nicho de células fuente de la raíz. Con estos resultados, los investigadores propusieron que YDA regula el desarrollo de la raíz a través de un mecanismo dependiente de auxina (Fig. 7) (Smékalová *et al.*, 2014). Los resultados antes mencionados evidencian un panorama complejo donde la vinculación de señales ambientales, la vía de las MAPK, las fitohormonas y los transportadores de auxinas regulan el sistema arquitectónico de la raíz (Singh *et al.*, 2015). La expresión de las cinasas MAP3Kε1 y MAP3Kε2 en la raíz y su función se ha relacionado con el crecimiento de la raíz, debido a que la doble mutante *map3ke1 map3ke2* presenta un fenotipo con una raíz mucho más corta que la planta silvestre y una reducción en la expansión celular de la raíz (Fig. 4) (Chaiwongsar *et al.*, 2012). La cinasa MEKK1 es una MAPKKK que se piensa que está involucrada en la formación de raíces laterales, debido a que el fenotipo de la mutante *mekk1* carece de raíces laterales (Su *et al.*, 2007). Recientemente a MEKK1 también se le ha asociado con la señalización del L-glutamato exógeno y su efecto sobre la arquitectura de la raíz de *A. thaliana*, al observar una disminución en el crecimiento de la raíz primaria y un aumento en el desarrollo de raíces laterales (Fig. 4) (Forde *et al.*, 2013). Por otra parte en *Arabidopsis* se aislaron las mutantes *bushy* y *dwarf 1 (bud1)*, ambas identificadas como una MAPKK. La expresión disminuida de *BUD1* en *A. thaliana*, aumentó el transporte de auxinas y el número de raíces laterales (Fig. 4) y un resultado contrario se observó en las plantas que sobreexpresan *BUD1*, demostrando que esta cinasa es un regulador negativo de los transportadores de auxinas y por lo tanto de la arquitectura de la raíz (Fig. 7) (Dai *et al.*, 2006).

## 2.3. Desarrollo foliar

### 2.3.1. Formación de estomas

En *Arabidopsis* la sobreexpresión de *EPF1* y *EPF2* provocó una disminución en la densidad de estomas y el efecto opuesto se observó cuando se realizaron



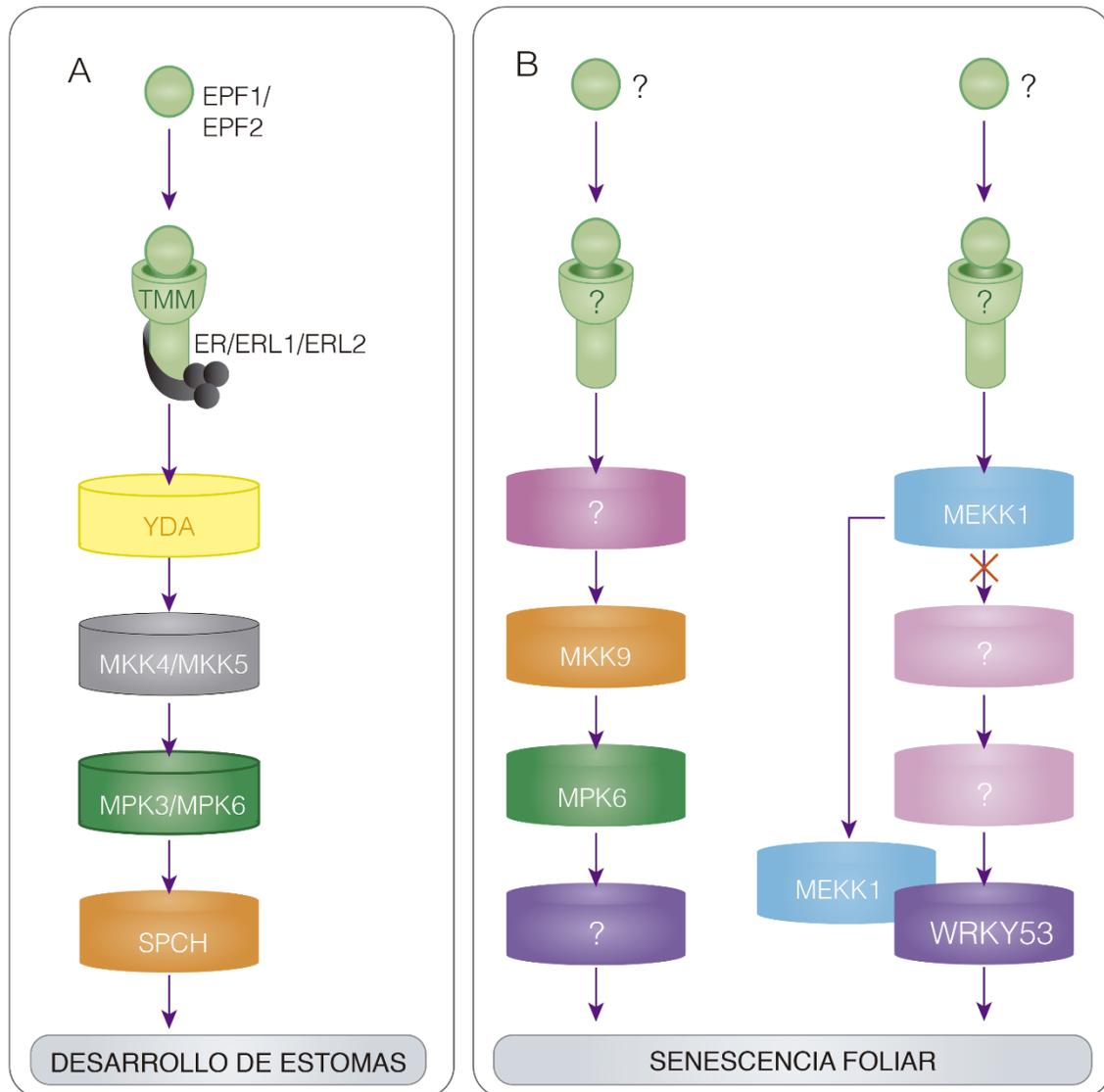
**Figura 4. Identificación de las vías MAPKs que regulan el desarrollo radicular.** Las proteínas YDA y MPK6 controlan el patrón de división celular, mientras que las cinasas MAP3Kε1/MAP3Kε2 intervienen en procesos de expansión celular. MEEK1 modula la señalización del L-Glu para promover el desarrollo de raíces laterales y BUD1 disminuye el número de raíces laterales. Los componentes que aún se desconocen en las vías de señalización son indicados con el símbolo de interrogación (?).

inserciones en la región codificante de estos genes, las cuales interrumpen la función de estas proteínas. La doble mutante de estos genes provocó un agrupamiento de estomas. Los genes *EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 1 (EPF1)* y *EPIDERMAL PATTERNING FACTOR 2 (EPF2)* codifican para péptidos pequeños. Estos resultados permitieron proponer que los péptidos EPF1 y EPF2 regulan el patrón de formación de estomas. Durante el desarrollo de la hoja la expresión de ambos genes se concentró en los meristemoides, en las células madre guardia y únicamente *EPF1* se expresó en los estomas. Por lo tanto, se ha sugerido que EPF2 es el que determina la cantidad de células que entrarán

o permanecerán dentro del linaje de estomas, debido a que este péptido sólo se expresa antes del desarrollo de estomas (Hara *et al.*, 2007; Hunt y Gray, 2009). Se ha señalado que la proteína TOO MANY MOUTH (TMM) es la encargada de percibir a los péptidos EPF1 y EPF2, debido a que las mutantes *tmm* presentan fenotipos con mayor densidad y agrupación de estomas. Aunque el receptor TMM carece de un sitio de reconocimiento intracelular para transmitir la señal externa al interior de la célula, los resultados de otras investigaciones han permitido sugerir que la señal podría ser transmitida por tres correceptores tipo cinasa de la familia ERECTA denominados ER, ERL1 y ERL2 (Nadeau y Sack, 2002; Shpak *et al.*,

2005). Las mutaciones simples y dobles de *er*, *erl1* y *erl2* alteraron el patrón de la formación de estomas y la triple mutante *er erl1 erl2* también presentó un fenotipo similar a los antes descritos para *epf1 epf2* y para la mutante *tmm* (Nadeau y Sack, 2002; Shpak *et al.*, 2005; Hunt y Gray, 2009). Se ha sugerido que corriente abajo del receptor TMM y los correceptores ER/ERL1/ERL2 la señal es modulada por YDA, MKK4/MKK5 (MAPKK) y MPK3/MPK6 (Fig. 5A.), debido a que mutaciones de pérdida y ganancia de función de estas MAPKs muestran las mismas

alteraciones fenotípicas en la densidad y en el agrupamiento de los estomas (Bergmann *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). El gen *SPEECHLESS* (*SPCH*) codifica para un factor de transcripción que al perder su función impide la formación de estomas, sugiriendo que SPCH es necesario para la formación del linaje de estomas. La proteína SPCH es fosforilada *in vitro* por las cinasas MPK3/MPK6, además el genotipo de plantas *yda* bajo el fondo genético de la mutante *spch* presentó un fenotipo deprovido de estomas. Estos resultados indican que SPCH se encuentra corriente



**Figura 5.** Vías de las MAPKs involucradas en el desarrollo de estomas y la senescencia foliar. **(A)** La evidencia genética sugiere que la vía de señalización modulada por MAPKs controla el patrón de formación y el desarrollo de estomas. **(B)** las cinasas MKK9 y MPK6 han sido señaladas como promotoras de la senescencia foliar. Por otra parte, la MEKK1 puede fosforilar directamente al factor WRKY53 o formar un complejo, el cual aumenta la estabilidad de su unión con el ADN y de esta manera no permitir la expresión de genes que regulan la senescencia foliar. Los componentes que aún se desconocen en las vías de señalización son mostrados por el símbolo de interrogación (?).

abajo del módulo YDA-MKK4/MKK5-MPK6 (Fig. 5A) (MacAlister *et al.*, 2007; Lampard *et al.*, 2008).

### 2.3.2. Senescencia foliar

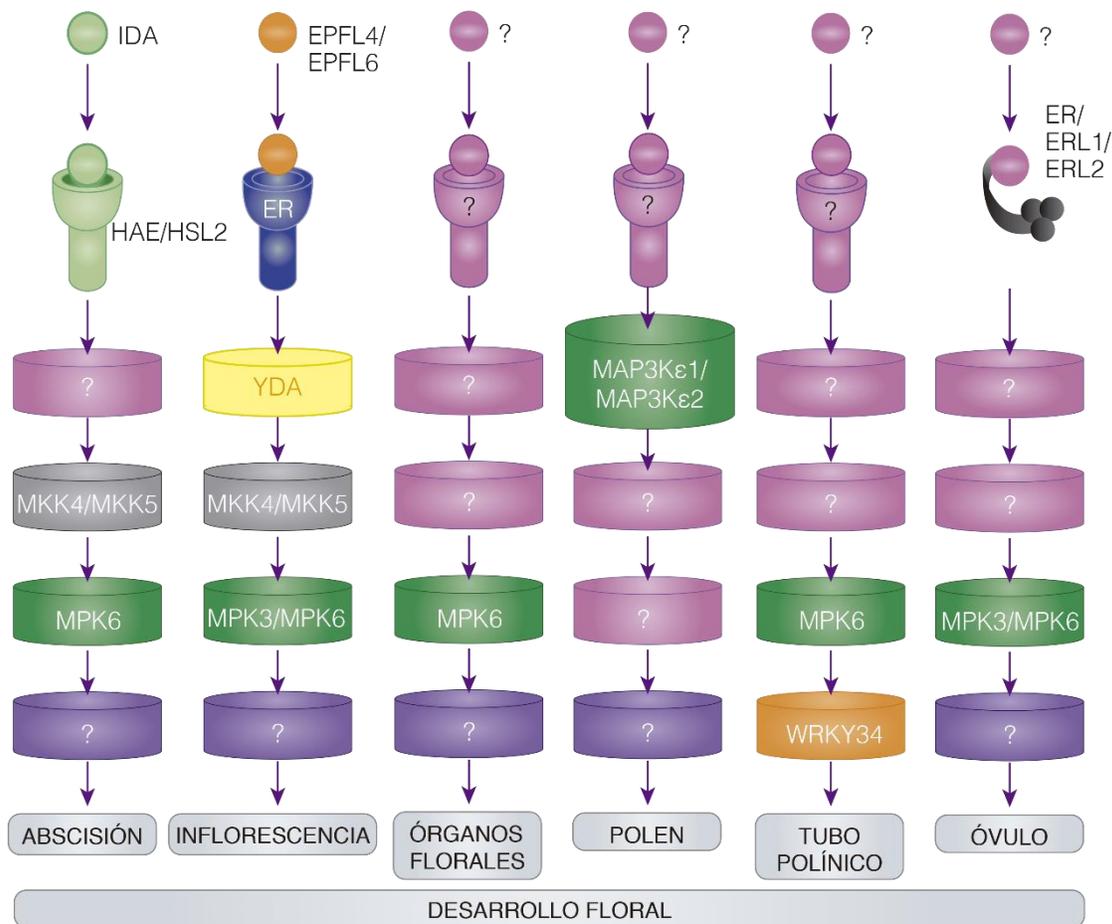
Las plantas mutadas en *MKK9* presentan retardo en la senescencia de hojas, mientras que la ganancia de función de *MKK9* resulta en una senescencia prematura. Estos resultados sugieren la participación de la cinasa *MKK9* en la vía de señalización involucrada en el proceso de senescencia de las hojas de *Arabidopsis*. Se ha propuesto que la fosfatasa *MPK6* participa corriente abajo de *MKK9* para regular la senescencia de las hojas debido a los resultados de los siguientes experimentos: ensayos de fosforilación de la *MKK9* sobre la fosfatasa *MPK6*, la mutante *mpk6* respecto al retraso en la senescencia es una fenocopia de *mkk9* y porque la senescencia prematura expresada por la ganancia de función de *MKK9* es suprimida en el fondo genético de *mpk6* (Zhou *et al.*, 2009). (Fig. 5B). Por otra parte, la evidencia de que la proteína

*MEKK1* se une al promotor de *WRKY53* e interactúa con el factor de transcripción *WRKY53* para formar un complejo, y que al fosforilar directamente a *WRKY53* incrementa su actividad de unión al ADN, de manera sorprendente finalizó con la propuesta de que los módulos de señalización en la vía MAPK mantienen una secuencia MPKKK-MPKK-MPK-substrato y que tienen una funcionalidad cinasa única. Con estos hallazgos a *MEKK1* se le ha relacionado con la señalización que regula la senescencia de las hojas de *A. thaliana*, debido a que estudios previos reportaron que el factor transcripcional *WRKY53* se encuentra involucrado en este proceso (Fig. 5B) (Miao *et al.*, 2007; Miao *et al.*, 2008).

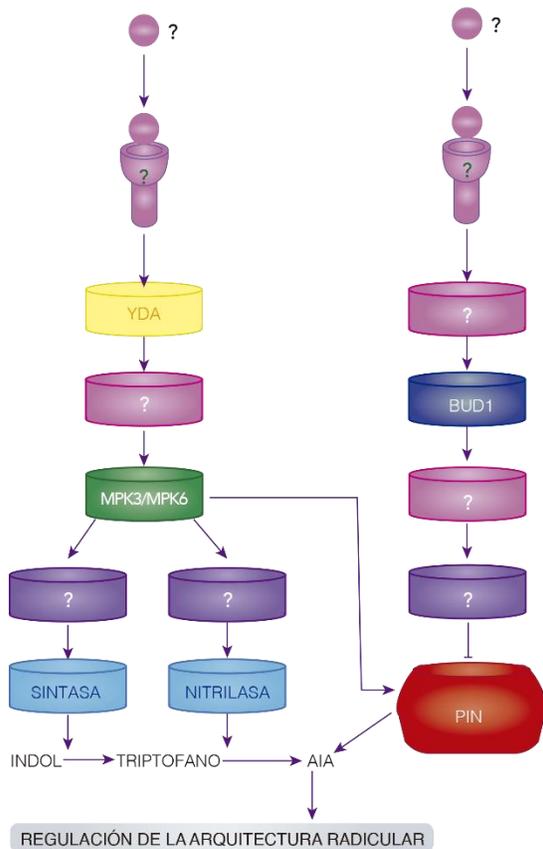
## 2.4. Desarrollo floral

### 2.4.1. Abcisión de órganos florales

Se ha sugerido que el gen *IDA* que codifica para un péptido pequeño de 77 aminoácidos es el estímulo



**Figura 6.** Vías de las MAPKs que regulan distintos procesos del desarrollo floral. La mayoría de estas vías MAPKs comparten componentes, pero se propone que la combinación con las otras proteínas, y el espacio-tiempo en que se encuentran determinan una respuesta específica.



**Figura 7. La regulación de la arquitectura radicular puede ser controlada de manera positiva o negativa por distintas vías de las MAPK.** YDA y MPK3/MPK6 promueven la expresión de enzimas involucradas en la síntesis del AIA. La misma vía puede participar en regulación de los transportadores PIN, los redirigen a las auxinas a zonas específicas donde regulan el desarrollo de las raíces laterales. De manera opuesta a YDA y a MPK3/MPK6, BUD1 regula negativamente a los transportadores PIN, afectando el desarrollo de raíces laterales.

que controla la abscisión floral (Butenko *et al.*, 2003). En *A. thaliana* se aisló la mutante *inflorescence deficient in abscission (ida)* la cual mantiene una deficiencia en la abscisión floral. HAESA (HAE) es el receptor de IDA propuesto, el cual es una cinasa de la familia ERECTA. Al reducir la función de HAE en plantas transgénicas antisentido se encontró un retardo en la senescencia floral y se observó que la severidad del fenotipo dependía de la cantidad de la proteína HAE producida (Jinn *et al.*, 2000). Las plantas con expresión *MKK4/MKK5* disminuida también mostraron fenotipos similares a los de las mutantes *ida*, sugiriendo que estas MAPKK son reguladores positivos de este proceso. Además en las plantas transgénicas con formas activas de *MKK4/MKK5* se rescató el fenotipo silvestre en las mutantes *ida* y

en la doble mutante de los genes parálogos *hae hsl2*. También se ha reportado que los genes de las cinasas *MPK6/MPK3* se expresan durante la abscisión de los órganos florales. En una línea transgénica se modificó *MPK6* en el motivo de activación para obtener una proteína disfuncional, posteriormente esta planta transgénica se cruzó con plantas *mpk3*, observándose en la doble mutante *mpk6 mpk3* fenotipos defectuosos en la abscisión más drásticos que los observados en las mutaciones simples de *mpk6* y *mpk3*. Estos datos sugieren la participación del módulo *MKK4/MKK5-MPK6/MPK3* corriente abajo de *IDA-HAE* en la regulación de la abscisión de los órganos florales (Fig. 6) (Cho *et al.*, 2008).

### 2.4.2. Arquitectura de la inflorescencia y desarrollo de órganos florales

En *A. thaliana* el gen *ER* codifica para un receptor cinasa de la familia ERECTA y la pérdida de función de esta proteína en las plantas *er* mostró un fenotipo con inflorescencia compactada y pedicelos cortos (Torii *et al.*, 1996). Los péptidos *EPFL4* y *EPFL6* han sido reportados como los ligandos de ER. La doble mutante *epfl4 epfl6* presentó las mismas características de las plantas *er* y la sobreexpresión de ambos péptidos rescataron el fenotipo silvestre en las plantas *er*. Se ha propuesto que corriente abajo de *EPFL4/EPFL6-ER* la señalización se encuentra modulada por las MAPKs *YDA-MKK4/MKK5-MPK6/MPK3* (Fig. 6) (Uchida *et al.*, 2012), debido a que cuando se anula la función de *YDA*, el pedicelo se acorta y la inflorescencia se agrupa estrechamente, el efecto opuesto ocurre en las mutante de ganancia de función. Las líneas *MKK4/MKK5 ARNi* y la pérdida de función de las *MPK6/MPK3* presentaron los mismos defectos en la inflorescencia (Meng *et al.*, 2012), la mutante *mpk6* mostró una fertilidad masculina baja, la cual se relacionó con defectos en el tamaño de las anteras, debido a que estos órganos fueron más pequeños en la mutante que en la línea silvestre y estas anomalías dificultan la eficiencia en la polinización. En la versión mutante de *MPK6* modificada en el motivo de activación, se observó un fenotipo con sépalos y pétalos más pequeños, incluso los pétalos presentaron dobleces muy pronunciados, lo que ocasionó que el carpelo sobresaliera desde el extremo de la flor en etapas muy tempranas, lo que sugiere que esta cinasa modula el desarrollo de los órganos florales (Fig. 6) (Bush y Krysan, 2007).

### 2.4.3. Desarrollo del polen, crecimiento y orientación del tubo polínico

Se ha sugerido que las cinasas *MAP3Kε1/MAP3Kε2* participan en procesos involucrados en el funcionamiento normal de la membrana plasmática

del polen (**Fig. 6**), debido a que la pérdida de función de estas MAPKKK (MAP3K) presentó alteraciones en la estructura del polen: irregularidades en la membrana plasmática, engrosamiento de la intina y la degeneración de las mitocondrias, lo que comprometió la viabilidad del polen (Chaiwongsar *et al.*, 2006). Estudios previos mostraron que las mutantes *mpk6/mpk3* tienen defectos en la orientación del tubo polínico, presentando un crecimiento irregular que dificultó su llegada al funículo, lo que ocasionó una disminución en la entrada al micrópilo del óvulo (Guan *et al.*, 2014). También las mutaciones del factor de transcripción *WRKY34* y de su homólogo *WRKY2*, redujeron la viabilidad del polen y provocaron alteraciones en el crecimiento del tubo polínico. Estos resultados y los derivados de los ensayos de fosforilación, indican que la activación de *WRKY34* por las cinasas *MPK3/MPK6* controla el crecimiento del tubo polínico (**Fig. 6**) (Guan *et al.*, 2014).

#### 2.4.4. Desarrollo del óvulo

El receptor ER y sus parálogos *ERL1/ERL2* fueron reportados como reguladores de los procesos involucrados en el desarrollo normal del óvulo. La planta mutante en el gen del receptor *ERL2* presentó una haplo-insuficiencia en la fertilidad femenina, provocada por una proliferación celular reducida en el tegumento y por la interrupción del desarrollo del saco embrionario (Pillitteri *et al.*, 2007). Se ha señalado que las *MPK3/MPK6* actúan corriente abajo de *ER/ERL1/ERL2* (**Fig. 6**), debido a que las mismas alteraciones antes mencionadas se presentaron cuando la mutación en *MPK3* se encontraba en un fondo genético *mpk6* (Wang *et al.*, 2008).

#### Conclusión

Las cascadas de señalización de la MAPK en plantas además de relacionarse con las respuestas de defensa o tolerancia a estreses, también participan en la regulación de distintos procesos del desarrollo. Las investigaciones que se han realizado con el fin de entender el enlace de la vía MAPK con el desarrollo de las plantas, presentan un panorama complejo que involucra una red de señalización que depende de conexiones entre las fitohormonas, los estímulos ambientales, las interacciones con otras proteínas o con el ADN y una actividad que deriva del espacio y tiempo. Hasta el momento se desconocen muchos de los componentes proteicos de las diferentes vías de las MAPK en plantas. Al parecer varias de las respuestas del desarrollo en plantas son moduladas por una señalización que depende de las mismas proteínas MAPKs. Sin embargo, lo que determina el tipo de respuesta son los diferentes estímulos y receptores que direccionarán a las proteínas MAPKs para que

activen sustratos específicos, los cuales regularán la expresión génica o la actividad de otras proteínas. El progreso de nuevas tecnologías y estrategias experimentales está permitiendo la elucidación de la funcionalidad que tienen las proteínas MAPKs para interactuar directa o indirectamente con los factores que regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas.

#### Referencias

- Bayer M, Nawy T, Giglione C, Galli M, Meinel T, Lukowitz W (2009) Paternal control of embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 323: 1485-1488.
- Bergmann DC, Lukowitz W, Somerville CR (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPK kinase. *Science* 304: 1494-1497.
- Bush SM, Krysan PJ (2007) Mutational evidence that the *Arabidopsis* MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *J Exp Bot* 58: 2181-2191.
- Butenko MA, Patterson SE, Grini PE, Stenvik GE, Amundsen SS, Mandal A, Aalen RB (2003) Inflorescence deficient in abscission controls floral organ abscission in *Arabidopsis* and identifies a novel family of putative ligands in plants. *Plant Cell* 15: 2296-2307.
- Chaiwongsar S, Otegui MS, Jester PJ, Monson SS, Krysan PJ (2006) The protein kinase genes *MAP3Ke1* and *MAP3Ke2* are required for pollen viability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 48: 193-205.
- Chaiwongsar S, Strohm AK, Su S-H, Krysan PJ (2012) Genetic analysis of the *Arabidopsis* protein kinases *MAP3Ke1* and *MAP3Ke2* indicates roles in cell expansion and embryo development. *Frontiers Plant Sci* 228: 1-10.
- Cho SK, Larue CT, Chevalier D, Wang H, Jinn T-L, Zhang S, Walker JC (2008) Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 15629-15634.
- Colcombet J, Hirt H (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413: 217-226.
- Costa LM, Marshall E, Tesfaye M, Silverstein KA, Mori M, Umetsu Y, Otterbach SL, Papareddy R, Dickinson HG, Boutiller K, VandenBosch KA, Ohki S, Gutierrez JF (2014) Central cell-derived peptides regulate early embryo patterning in flowering plants. *Science* 344: 168-172.
- Dai Y, Wang H, Li B, Huang J, Liu X, Zhou Y, Mou Z, Li J (2006) Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 308-320.
- Forde BG, Cutler SR, Zaman N, Krysan PJ (2013) Glutamate signalling via a MEKK1 kinase-dependent pathway induces changes in *Arabidopsis* root architecture. *Plant J* 75: 1-10.
- Guan Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S (2014) Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in *Arabidopsis*. *PLOS*

- Genetics 10: 1-12.
- Guan Y, Lu J, Xu J, McClure B, Zhang S** (2014) Two mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, are required for funicular guidance of pollen tubes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 165: 528-533.
- Hara K, Kajita R, Torii KU, Bergmann DC, Kakimoto T** (2007) The secretory peptide gene EPF1 enforces the stomatal one-cell-spacing rule. *Genes Dev* 21: 1720-1725.
- Hunt L, Gray JE** (2009) The signaling peptide EPF2 controls asymmetric cell divisions during stomatal development. *Curr Biol* 19: 864-869.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang S, Hirt H, Wilson C, Heberle-Bors E, Ellis B. E, Morris PC, Innes RW, Ecker JR, Scheel D, Klessig DF, Machida Y, Mundy J, Ohashi Y, Walker JC** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7: 301-308.
- Jinn TL, Stone JM, Walker JC** (2000) HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev* 14: 108-117.
- Lampard GR, Macalister CA, Bergmann DC** (2008) *Arabidopsis* stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* 322: 1113-1116.
- López JS, Dubrovsky JG, Raya J, Ugartechea C, López J, Luna LA, Ramos M, León P, Guevara AA** (2014) *Arabidopsis thaliana* mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *J Exp Bot* 65: 169-183.
- Long Y, Scheres B, Blilou I** (2015) The logic of communication: roles for mobile transcription factors in plants. *J Exp Bot* 66: 1133-1144.
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C** (2004) A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116: 109-119.
- MacAlister CA, Ohashi-Ito K, Bergmann DC** (2007) Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* 445: 537-540.
- McCarty DR, Chory J** (2000) Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* 103: 201-209.
- Meng X, Wang H, He Y, Liu Y, Walker JC, Torii KU, Zhang S** (2012) A MAPK Cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates *Arabidopsis* inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *Plant Cell* 24: 4948-4960.
- Miao Y, Laun TM, Smykowski A** (2007) *Arabidopsis* MEK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. *Plant Mol Biol* 65: 63-76.
- Miao Y, Smykowski A, Zentgraf U** (2008) A novel upstream regulator of WRKY53 transcription during leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol* 10: 110-120.
- Müller J, Beck M, Mettlich U, Komis G, Hause G, Menzel D, Samaj J** (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. *Plant J* 61:234-248.
- Nadeau JA, Sack FD** (2002) Control of stomatal distribution on the *Arabidopsis* leaf surface. *Science* 296: 1697-1700.
- Pawson T, Scott JD** (2005) Protein phosphorylation in signaling – 50 years and counting. *Trends Biochem Sci* 30: 286-290.
- Pearson G, Robinson F, Gibson TB, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH** (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Rev* 30: 153-183.
- Pillitteri LJ, Bemis SM, Shpak ED, Torii KU** (2007) Haploinsufficiency after successive loss of signaling reveals a role for ERECTA-family genes in *Arabidopsis* ovule development. *Development* 134: 3099-3109.
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H** (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 12: 1-6.
- Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW** (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6940-6943.
- Schaller GE, Bishopp A, Kieber JJ** (2015) The Yin-Yang of Hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell* 27: 44-63.
- Shpak ED, McAbee JM, Pillitteri LJ, Torii KU** (2005). Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases. *Science* 309: 290-293.
- Singh P, Mohanta TK, Sinha, AK** (2015) Unraveling the intricate nexus of molecular mechanisms governing rice root development: OsMPK3/6 and auxin-aytokinin interplay. *PLOS One* 10: 1-18.
- Smékalová V, Luptovciak I, Komis G, Samajová O, Ovecka M, Dorskocilova A, Takác T, Vadovic P, Novák O, Pechan T, Ziemann A, Kosútová P, Samaj J** (2014) Involvement of YODA and mitogen activated protein kinase 6 in *Arabidopsis* post-embryonic root development through auxin up-regulation and cell division plane orientation. *New Phytol* 203: 1175-1193.
- Smertenko AP, Chang HY, Sonobe S, Fenyk SI, Weingartner M, Bogre L, Hussey PJ** (2006) Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *J Cell Sci* 119: 3227-3237.
- Su SH, Suarez MC, Krysan P** (2007) Genetic interaction and phenotypic analysis of the *Arabidopsis* MAP kinase pathway mutations mek1 and mpk4 suggests signaling pathway complexity. *FEBS* 581: 3171-3177.
- Tena G, Asai T, Chiu WL, Sheen J** (2001) Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol* 4: 392-40.
- Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RE, Komeda Y** (1996) The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* 8: 735-746.
- Uchida N, Lee JS, Horst RJ, Lai HH, Kajita R, Kakimoto T, Tasaka M, Torii KU** (2012). Regulation of inflorescence architecture by intertissue layer ligand-receptor communication between endodermis and phloem. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:

6337-6342.

- Wang H, Liu Y, Bruffett K, Lee J, Hause G, Walker JC, Zhang S** (2008) Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsis* ovule development. *Plant Cell* 20: 602–613.
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S** (2007) Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 63–73.
- Xu J, Zhang S** (2015) Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends Plant Sci* 20: 56-64.
- Yang KY, Liu Y, Zhang S** (2001) Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 741–746.
- Zhou C, Cai Z, Guo Y, Gan S** (2009) An *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase cascade, MKK9-MPK6, plays a role in leaf senescence. *Plant Physiol* 150: 167–177.