



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

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DEL DESARROLLO
VEGETAL

“Participación del gen *MEDIADOR16* en la respuesta de la raíz de *Arabidopsis thaliana* al compuesto volátil fúngico 6-pentil-2H-piran-2-ona”

Tesis que presenta:
Q.F.B. Pedro Iván Huerta Venegas

Para obtener el grado de
Maestro en Ciencias en Biología Experimental

Director de tesis
D.C. José López Bucio
Co-director de tesis
D.C. León Francisco Ruíz Herrera

Morelia, Mich. Abril del 2018



RECONOCIMIENTOS.

Este trabajo se realizó 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 el D.C. León Francisco Ruiz Herrera con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Número de Becario 584703.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, José Manuel Huerta y Rosalinda Venegas, a mis hermanos y mis sobrinos por su apoyo incondicional y porque han sido una parte fundamental en cada paso de mi vida.

A mi asesor, el D.C. José López Bucio por la confianza puesta en mí y por permitirme ser parte de su increíble grupo de trabajo. Su guía y enseñanza me acompañarán por el resto de mi experiencia académica.

A mi coasesor, el D.C. León Francisco Ruíz Herrera por su apoyo, su amistad y consejos durante la realización de esta tesis.

A mi comité sinodal, la D.C. Eida María Guadalupe Beltrán Peña, el D.C. Asdrúbal Aguilera Méndez y el D.C. Josué Altamirano Hernández por su paciencia, disposición y por sus atinadas aportaciones en la realización y edición de este trabajo.

A mi compañero y amigo, el D.C. Salvador Barrera Ortiz por facilitar mi entrada al laboratorio, por brindarme su amistad y enseñarme lo necesario para trabajar en mi proyecto de tesis.

A mis compañeros y amigos de la MCBE, generación 2015-2017 (Agosto), su compañía fue invaluable.

A mis compañeros y amigos del IIQB, en especial a los integrantes del Laboratorio de Ecología Microbiana por su compañía y apoyo durante mis momentos difíciles.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Biología del Desarrollo Vegetal por arroparme desde el primer momento, su compañía y su ayuda nunca la olvidaré.

Al D.C. Javier Raya Gonzales por facilitarme la semillas que se utilizaron en este proyecto.

CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES.....	2
2.1.	Sistema radicular de <i>Arabidopsis</i>	2
2.1.1.	La raíz primaria	2
2.1.2.	Las raíces laterales	4
2.2.	Mantenimiento del meristemo radicular	6
2.2.1.	Nicho de las células iniciales.....	6
2.2.2.	Control de las divisiones asimétricas en el meristemo de la raíz primaria.....	8
2.3.	Morfógenos de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	11
2.3.1.	Las auxinas	11
2.3.2.	Transporte de auxinas en el sistema radicular	13
2.3.3.	Señalización de auxinas.....	16
2.4.	Las auxinas como reguladores del crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales	18
2.4.1.	Las auxinas controlan la especificación de las células iniciales y las divisiones celulares en el meristemo de la raíz primaria.....	18
2.4.2.	Las auxinas controlan la formación <i>de novo</i> de raíces laterales	19
2.5.	Organismos promotores del crecimiento vegetal.....	20
2.5.1.	La 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP) regula diferencialmente el crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	21
2.6.	El complejo MEDIADOR.....	27
2.6.1.	MEDIADOR16	30
3.	JUSTIFICACIÓN.....	34
4.	HIPÓTESIS.....	34
5.	OBJETIVOS.....	34
5.1.	Objetivo general.....	34
5.2.	Objetivos específicos.....	34
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
6.1.	Material biológico y condiciones de crecimiento	35

6.2.	Obtención de cruzas.....	35
6.3.	Efecto de la 6-PP sobre la arquitectura radicular de <i>med16-2</i>	36
6.4.	Actividad histoquímica <i>uidA</i> por microscopia de Nomarski.....	37
6.5.	Determinación del desarrollo de las raíces laterales.....	37
6.6.	Tinción con yoduro de propidio y microscopia confocal	38
6.7.	Análisis de datos.....	38
7.	RESULTADOS.....	40
7.1.	Arquitectura radicular de <i>med16-2</i>	40
7.2.	La subunidad MED16 controla la actividad proliferativa de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i>	41
7.3.	Efecto de la 6-PP y MED16 sobre el sistema radicular de <i>Arabidopsis</i>	43
7.4.	La 6-PP actúa a través de MED16 para regular la proliferación celular de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i>	44
7.5.	Efecto del 6-PP sobre el transporte y la acumulación de auxinas en el ápice de la raíz primaria	47
7.6.	La 6-PP modula la actividad del centro quiescente	49
7.7.	La 6-PP afecta diferencialmente la expresión de <i>SHR</i> y <i>SCR</i>	50
7.8.	La subunidad MED16 regula el desarrollo de las raíces laterales	51
7.9.	Expresión del gen reportero <i>DR5:GFP</i> en los primordios de las raíces laterales de Col-0 y <i>med16-2</i> en respuesta a la 6-PP	53
7.10.	Expresión de <i>PIN1</i> y <i>PIN3</i> en los primordios de las raíces laterales de Col-0 y <i>med16-2</i> en respuesta a la 6-PP	55
8.	DISCUSIÓN.....	57
8.1.	La subunidad MED16 es un regulador del crecimiento radicular.....	57
8.2.	La subunidad MED16 es un regulador negativo del desarrollo de los primordios de las raíces laterales	60
8.3.	La subunidad MED16 regula el efecto de la 6-PP sobre el crecimiento de la raíz de <i>Arabidopsis</i>	61
9.	CONCLUSIONES	64
10.	REFERENCIAS	66
11.	APENDICE.....	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía del sistema radicular de <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Figura 2. Modelo del desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis</i>	6
Figura 3. Modelo del mantenimiento indiferenciado de las células iniciales de la columnela (CIC).....	7
Figura 4. Divisiones asimétricas en la raíz de <i>Arabidopsis</i> ..	10
Figura 5. Rutas de la biosíntesis de auxinas.....	13
Figura 6. Transporte de auxinas a través de la membrana plasmática.....	15
Figura 7. Señalización de las auxinas.....	17
Figura 8. Señalización de auxinas durante la formación y desarrollo de las raíces laterales.....	20
Figura 9. Efecto de la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) en el crecimiento de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
Figura 10. Efecto de la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) en la expresión de la línea de respuesta a auxinas <i>DR5:GFP</i>	25
Figura 11. Expresión de los transportadores de eflujo de auxinas <i>PIN</i> en el ápice de la raíz primaria en respuesta a la 6-PP.....	26
Figura 12. El complejo pre-iniciador de la transcripción.....	28
Figura 13. Estructura teórica del complejo MEDIADOR (CM) de plantas.....	30
Figura 14. Fenotipo de las mutantes <i>med16</i> de <i>Arabidopsis</i>	32
Figura 15. Efecto de la 6-PP sobre la raíz primaria de la mutante <i>med16-2</i>	33
Figura 16. Arquitectura radicular de la mutante <i>med16-2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	41
Figura 17. Actividad proliferativa en el meristemo radicular.....	42
Figura 18. Efecto de la 6-PP sobre el sistema radicular de la mutante <i>med16-2</i> ..	44
Figura 19. Efecto de la 6-PP sobre la actividad proliferativa de <i>med16-2</i>	45
Figura 20. Efecto de la 6-PP y <i>MED16</i> sobre la expansión celular de <i>Arabidopsis</i>	46

Figura 21. Efecto de la 6-PP sobre la acumulación y transporte de auxinas en <i>med16-2</i> de <i>Arabidopsis</i>	48
Figura 22. Efecto de la 6-PP sobre la expresión de <i>WOX5:GFP</i> en los fondos genéticos Col-0 y <i>med16-2</i>	49
Figura 23. Efecto de la 6-PP sobre la expresión de <i>SCR::H2B:YFP</i> en el meristemo radicular de <i>Arabidopsis</i>	50
Figura 24. Efecto de la 6-PP sobre la expresión de <i>SHR:GFP</i> en el meristemo radicular de <i>Arabidopsis</i>	51
Figura 25. Efecto de la mutante <i>med16-2</i> en el desarrollo de las raíces laterales de <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
Figura 26. Efecto de la 6-PP en la expresión del gen reportero <i>DR5:GFP</i> durante la formación de las raíces laterales de plantas Col-0 y <i>med16-2</i>	54
Figura 27. Expresión de la línea transgénica <i>pPIN1::PIN1::GFP</i> en las plantas silvestres y mutantes <i>med16-2</i>	56
Figura 28. Expresión de la línea transgénica <i>pPIN3::PIN3::GFP</i> en las plantas silvestres y mutantes <i>med16-2</i>	57
Figura 29. Modelo propuesto sobre la participación de <i>MED16</i> en la señalización de la 6-PP y la regulación de la arquitectura radicular de <i>Arabidopsis</i>	65

RESUMEN

El compuesto volátil fúngico 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) forma parte de las moléculas liberadas por *Trichoderma atroviride* en su interacción con las plantas y promueve la formación de las raíces laterales y el crecimiento de la raíz primaria a través de mecanismos relacionados con la vía auxínica (Garnica-Vergara *et al.*, 2015). El complejo MEDIADOR es una estructura multiproteica conservada en los eucariotes que controla la unión entre la RNA polimerasa II y los factores de transcripción a la región promotora de los genes (Carlsten *et al.*, 2013).

En este trabajo encontramos que la subunidad MEDIADOR 16 (MED16) es un regulador del efecto de la 6-PP durante la reconfiguración de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*. Los estudios realizados revelaron que MED16 regula negativamente la división celular en el meristemo de la raíz primaria y controla la expresión de SHR, un factor de transcripción involucrado en el mantenimiento del meristemo y la regulación de las divisiones asimétricas de las células iniciales del córtex/endodermis. Los análisis de expresión de la línea reportera de las auxinas *DR5:GFP* mostraron que la regulación negativa de MED16 sobre la proliferación celular es independiente a la acumulación de auxinas en el meristemo de la raíz primaria y los primordios de las raíces laterales, en tanto que las líneas reporteras *WOX5:GFP*, *SHR:GFP* y *SCR:H2B:YFP* en plantas silvestres y en la mutante *med16-2* sugieren que la 6-PP modula la actividad del nicho de células iniciales por medio de MED16 en el meristemo de la raíz primaria.

PALABRAS CLAVE: *Arabidopsis*, 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP), auxinas, *MEDIADOR16*, proliferación celular.

ABSTRACT

The lactone 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP) synthesized is produced by *Trichoderma atroviride* during its interaction with plants and promotes the emergence of lateral roots and growth of the primary root through auxin-related mechanisms (Garnica-Vergara *et al.*, 2015). MEDIATOR comprises a conserved multiprotein complex that controls the binding of the enzyme RNA polymerase II and the transcription factors to the gene promoter regions (Carlsten *et al.*, 2013).

In this work we found that MEDIATOR 16 is required for the reconfiguration of the root system architecture in response to 6-PP in *Arabidopsis*. We found that the mutation of the *MEDIATOR16* gene (*med16-2*) increases the length of the primary root and the emergence of lateral roots. Our analyzes revealed that MED16 negatively regulates cell division in the primary root meristem and controls the expression of SHR, a transcription factor involved in the maintenance of the meristem and the regulation of the asymmetric cell division of the cortex/endodermis initial cells. Analysis of the expression of the auxin-related reporter *DR5:GFP* showed that the negative regulation of MED16 on cell proliferation is independent of auxin accumulation in the root meristem and in lateral root primordia, while the expression lines *WOX5:GFP*, *SHR:GFP* and *SCR:H2B:YFP* in the mutant background *med16-2* showed that 6-PP influence the activity of stem cell niche via MED16 in the root meristem.

KEYWORDS: *Arabidopsis*, 6-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PP), auxins, *MEDIADOR16*, cellular proliferation.

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento y desarrollo de las plantas depende de la capacidad del sistema radicular para captar agua y nutrientes del suelo (López-Bucio *et al.*, 2003). La raíz interactúa dinámicamente con otros organismos, particularmente en la rizósfera, una zona cercana a la raíz densamente poblada por bacterias y hongos. Algunas especies microbianas manifiestan propiedades promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth-Promoting, PGP, por sus siglas en inglés) debido a que pueden estimular de forma directa el crecimiento y desarrollo de las plantas mediante la producción de fitohormonas como auxinas, citocininas y/o moléculas de comunicación como los compuestos orgánicos volátiles (COV). Se ha establecido que los COV tienen un importante papel en la comunicación a larga distancia entre microorganismos-microorganismos, plantas-plantas y microorganismos-plantas (Ortiz-Castro *et al.*, 2009; Venturi y Keel, 2016).

La lactona insaturada 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) es un COV producido por hongos del género *Trichoderma* a la cual se le ha atribuido la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Vinale *et al.*, 2008; Kottb *et al.*, 2015). Recientemente se observó que la 6-PP modula el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* mediante la estimulación del transporte de auxinas y la expresión de los receptores de auxinas *TIR1*, *AFB2*, y *AFB3* y los factores de transcripción *ARF7* y *ARF19* en los primordios de las raíces laterales, además de EIN2, un factor clave en la señalización por etileno, que también modula la percepción de la 6-PP en la raíz primaria (Garnica-Vergara *et al.*, 2015).

Las auxinas son fitohormonas necesarias para el control de la proliferación, la expansión y la diferenciación celular durante el desarrollo vegetal ya que controlan la expresión de los genes que regulan la división celular (De Veylder *et al.*, 2007). Por otra parte, la expresión genética comprende varios procesos entre los que se incluye a la transcripción, donde el DNA de un gen es transcrito en RNA mensajero por la enzima RNA polimerasa II (RNA pol II; Hahn, 2004). Un elemento imprescindible de la transcripción es el complejo MEDIADOR (CM), el cual sirve como estructura de andamio para la unión de diversos factores de transcripción y

la RNA pol II a la región promotora de los genes (Hahn., 2004; Carlsten *et al.*, 2013). El CM es un complejo multiproteico necesario para la regulación la expresión de los genes asociados con el desarrollo vegetal y la tolerancia a estrés biótico y abiótico (Dwivedi *et al.*, 2017).

Partiendo con la premisa de que el CM forma parte del control de la expresión de los genes implicados en el crecimiento y el desarrollo vegetal, el presente proyecto de investigación plantea dilucidar cuál es la función del gen *MEDIADOR16* en el control del crecimiento radicular de *Arabidopsis thaliana* y en la regulación del crecimiento modulado por la 6-PP.

2. ANTECEDENTES

2.1. Sistema radicular de *Arabidopsis*

2.1.1. La raíz primaria

La raíz primaria de *Arabidopsis* está conformada por tejidos organizados en capas concéntricas sobrepuestas alrededor del haz vascular que consta del xilema y el floema. Partiendo desde el haz vascular como eje central, las capas se organizan de la siguiente forma: periciclo, endodermis, córtex y epidermis. En el ápice de la raíz también se encuentran la columnela y la cofia lateral de la raíz, dos tejidos de protección contra la abrasión provocada por el suelo. A pesar de poseer diferente identidad celular, todos los tejidos surgen a partir del meristemo de la raíz (Schiefelbein *et al.*, 1997). La raíz primaria se divide longitudinalmente en cuatro zonas: I) meristemática, II) transición, III) elongación y IV) diferenciación (**Fig. 1A**).

En la primera zona se localiza el meristemo radicular, constituido por el centro quiescente (CQ), las células iniciales del xilema, el floema, el periciclo, el córtex/endodermis (CICE), la epidermis, la columnela (CIC), la cofia lateral de la

raíz y por las células hijas formadas a partir de las divisiones asimétricas de las células iniciales (**Fig. 1C**) (Dolan *et al.*, 1993; Dolan *et al.*, 1994; Scheres *et al.*, 1994). Al CQ lo constituyen cuatro células que se dividen en raras ocasiones para reorganizar el nicho de células iniciales ante un daño o estrés ambiental. El CQ también es necesario para mantener indiferenciadas a las células iniciales, es decir el CQ conserva la pluripotencia (Van den Berg *et al.*, 1997; Heyman *et al.*, 2013). Por otra parte, las células iniciales se dividen asimétricamente para renovarse a sí mismas y para generar nuevas células hijas que continúan dividiéndose hasta que se diferencian y adquieren la identidad del tejido correspondiente. A la agrupación del CQ y de las células iniciales se les denomina como nicho de células iniciales (NCI) y al conjunto de células hijas que conformarán el cuerpo del sistema radicular se les denomina como nicho de células proliferativas (NCP).

La actividad mitótica del NCP disminuye conforme se alejan de la influencia del CQ y alcanzan la zona de transición para comenzar a incrementar su tamaño celular. En la zona de elongación, las células detienen su actividad mitótica y se expanden (Forouzesh *et al.*, 2013). En la zona de diferenciación las células gradualmente detienen el proceso de elongación y finalmente alcanzan su tamaño y forma definitiva. La zona de diferenciación de los pelos radiculares se distingue por la diferenciación de las células protovasculares en xilema y floema, y por la aparición de los pelos radiculares los cuales se forman a partir células epidérmicas especializadas (tricoblastos). Más arriba también se localiza la zona de diferenciación de las raíces laterales (**Fig. 1B**) (Dolan *et al.*, 1994; Mähönen *et al.* 2000; Grierson *et al.*, 2014).

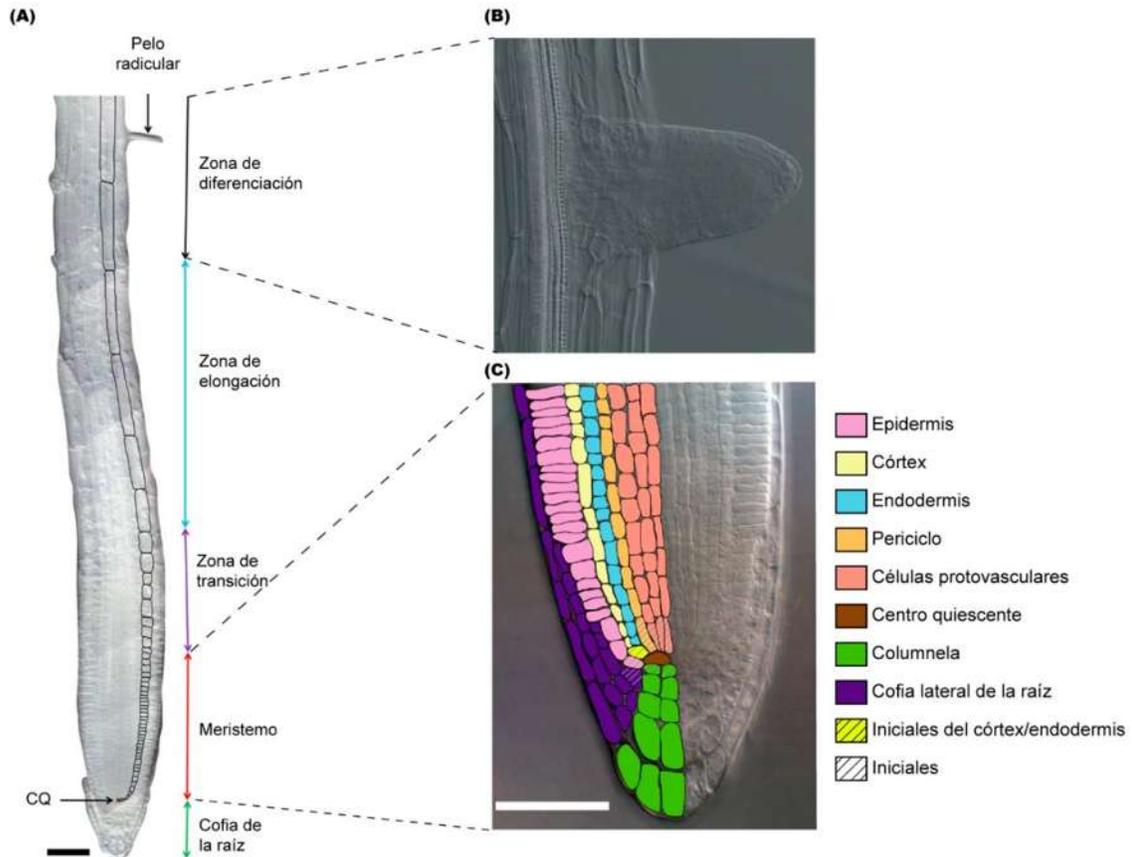


Figura 1. Anatomía del sistema radicular de *Arabidopsis thaliana*. Fotomontaje de micrografías obtenidas por microscopía de interferencia diferencial de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. (A) Representación de las zonas del crecimiento de la raíz primaria. El contorno negro sobre las células corticales representa las etapas del crecimiento y desarrollo celular. En el meristemo las células son mitóticamente activas. En la zona de transición las células comienzan a expandirse polarmente. En la zona de elongación las células pierden su capacidad mitótica y continúan expandiéndose. Finalmente en la zona de diferenciación las células alcanzan su longitud final y algunas células epidérmicas especializadas se diferencian en tricoblastos para originar a los pelos radiculares. (B) Surgimiento de las raíces laterales en la zona de diferenciación de estos órganos. (C) Organización de las células del meristemo radicular. El color café marca al centro quiescente, el cual está rodeado por las células iniciales marcadas por líneas diagonales. Los colores indican los diferentes tejidos que conforman a la raíz (modificado de De Smet, 2012; Barrada *et al.*, 2015).

2.1.2. Las raíces laterales

Las raíces laterales (RL) son estructuras alternadas y espaciadas que se localizan en la zona de diferenciación de la raíz primaria (De Smet *et al.*, 2007), su función principal es la captación de nutrientes y agua del suelo. La organización celular de las RL es similar al de la raíz primaria. Sin embargo, las RL son órganos que se originan postembrionariamente a partir de células del periciclo adyacentes

a los polos del protoxilema especificadas como células fundadoras de las raíces laterales (CFRL) (Dolan *et al.*, 1993; Dubrovsky *et al.*, 2008; De Smet *et al.*, 2007; Parizot *et al.*, 2008).

Una vez que las células del periciclo han sido especificadas como CFRL una serie de divisiones periclinales y anticlinales dan forma a los primordios de las raíces laterales (PRL) para crear un nuevo órgano lateral. La formación de los PRL involucra dos grandes fases del desarrollo: la primera es la fase temprana de la morfogénesis, la cual se divide en las etapas I-IV del desarrollo: en la I, las CFRL se dividen anticlinalmente para crear una capa longitudinal paralela al periciclo de aproximadamente de 8-10 células pequeñas. Después de un periodo de expansión radial, en la etapa II, las células hijas centrales se dividen periclinalmente para formar una nueva capa sobrepuesta (interna y externa). En la III las células centrales de la capa externa se dividen de manera periclinal para formar una nueva capa sobrepuesta (externa 2). En la etapa IV las células de la capa interna se dividen periclinalmente para formar la capa interna 2 confinada entre la capa interna 1 y la capa externa 1. De esta forma se crea un PRL con cuatro capas celulares confinadas entre el periciclo y la endodermis (**Fig. 2**).

La segunda fase incluye la formación del meristemo y se divide en las etapas V-VII. La formación del meristemo comienza con el establecimiento de un CQ en las células centrales de la segunda capa más externa del PRL en etapa V. Además, en las etapas V-VII divisiones sucesivas periclinales y anticlinales en las capas más externas dan origen a la endodermis, el córtex y la cofia de la raíz (**Fig. 2**) (Malamy y Benfey 1997; Goh *et al.*, 2016).

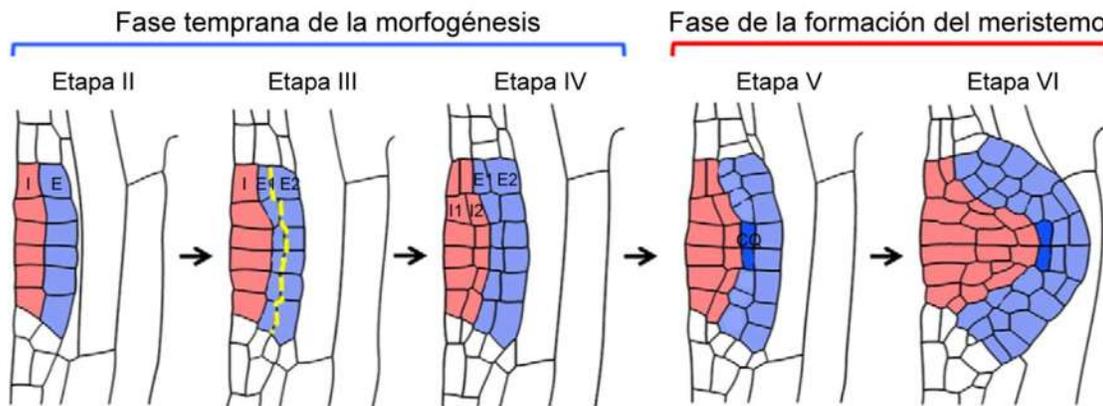


Figura 2. Modelo del desarrollo de los primordios de raíces laterales de *Arabidopsis*. El desarrollo de los primordios es bifásico con una fase temprana de la morfogénesis donde se forman hasta cuatro capas celulares por división asimétrica periclinal de las capas internas (I1, I2) y de las capas externas (E1, E2). En la fase de la formación del meristemo, desde la etapa V del desarrollo ocurre el establecimiento del centro quiescente (CQ) y la formación de la endodermis, el córtex y cófia de la raíz (modificado de Goh *et al.*, 2016).

2.2. Mantenimiento del meristemo radicular

2.2.1. Nicho de las células iniciales

El funcionamiento del meristemo requiere de un centro quiescente (CQ) funcional y del equilibrio entre el estado indiferenciado/diferenciado de las células iniciales, relacionado con la expresión del factor transcripcional *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5* (*WOX5*). El factor *WOX5* se expresa en las células del CQ e impide su división a través de la represión de la actividad de las proteínas ciclina D (*CYCLIND3;1* y *CYCLIND3;3*), es decir, *WOX5* es necesario para establecer la quiescencia del CQ (Forzani *et al.*, 2014). El factor *WOX5* también mantiene indiferenciadas a las células iniciales que rodean al CQ, al moverse desde el CQ hacia dichas células. En este sitio, *WOX5* recluta a los correpresores *TOPLESS/TOPLESS-RELATED* (*TPL/TPR*) y a la *HISTONA DESACETILASA19* (*HDA19*) para reprimir la expresión del gen que codifica para el factor *CYCLING DOF FACTOR* (*CDF4*), el cual permite la diferenciación de las células iniciales de la corteza (**Fig. 3**) (Pi *et al.*, 2015).

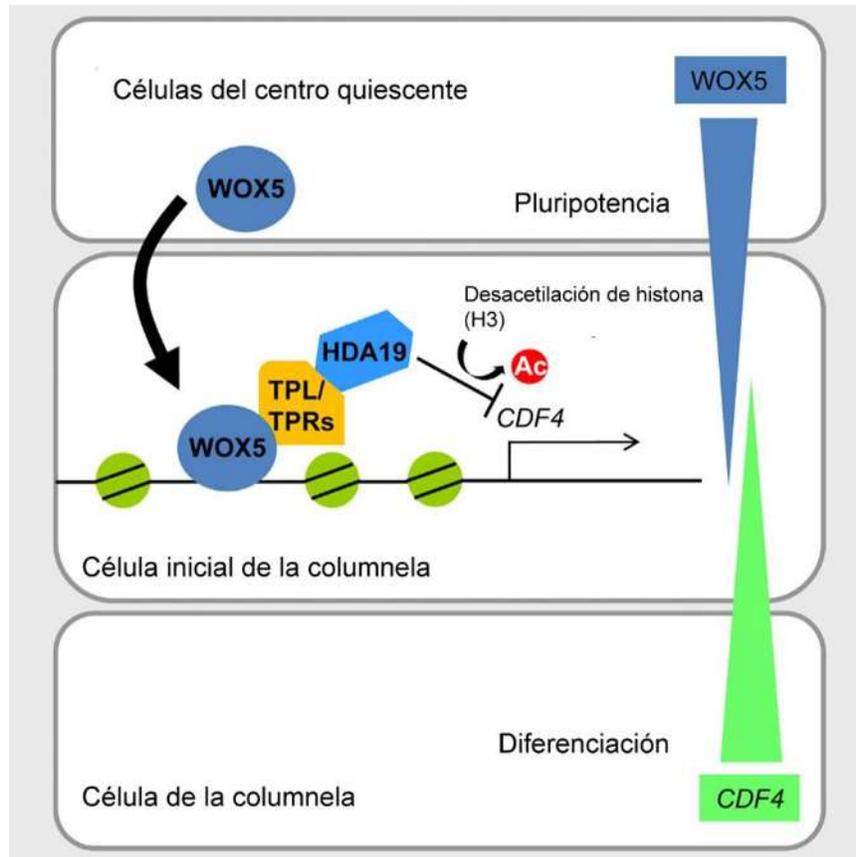


Figura 3. Modelo del mantenimiento indiferenciado de las células iniciales de la columna (CIC). WOX5 es un factor móvil que migra desde el CQ hacia las CIC donde recluta a los correpresores TPL, TPR y HDA19, los cuales reprimen la expresión del factor CYCLING DOF FACTOR (CDF4) (modificado de Pi *et al.*, 2015).

Los genes *PLETHORA (PLT)*, miembros de la familia AINTEGUMENTA-LIKE (AIL), codifican para proteínas que presentan el dominio APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF). A las PLT se les ha asignado funciones redundantes debido a que en las mutantes sencillas *plt1* y *plt2* se observó la diferenciación de las CIC y la reducción del tamaño del meristemo; mientras que en la doble mutante *plt1plt2* ocurre la diferenciación de las CIC y una marcada reducción en el crecimiento de la raíz primaria (Aida *et al.*, 2004). En cambio, la triple mutante *plt1 plt2 plt3* carece de raíz (Galinha *et al.*, 2007). No obstante, la expresión ectópica de *PLT1* o *PLT2* resulta en la proliferación de las células iniciales, así como en la formación ectópica del NCI (Dinneny y Benfey, 2008; Galinha *et al.*, 2007).

Los factores *SHORT-ROOT* (*SHR*) y *SCARECROW* (*SCR*) que pertenecen a la familia de proteínas GRAS (nombrados así por: *GIBBERELLIC-ACID INSENSITIVE*, *REPRESSOR of GAI* y *SCARECROW*), también son requeridos para el mantenimiento del meristemo radicular. En el CQ el complejo SHR-SCR promueve la expresión de *WOX5* (Sarkar *et al.*, 2007). El factor *SCR* se expresa en las células precursoras del CQ durante la embriogénesis, en las células iniciales del córtex/endodermis (CICE) y en las células de la endodermis (Wysocka-Diller *et al.*, 2000). La mutante con pérdida de función *scr-1* carece del CQ y de las CIC, lo que conduce a la pérdida del meristemo, por lo que se concluye que *SCR* es indispensable para la especificación del CQ y para el establecimiento de las células iniciales (Sabatini *et al.*, 2002). Por otra parte, *SHR* se expresa en el haz vascular de la raíz de *Arabidopsis* y se moviliza posiblemente a través de plasmodesmos con ayuda de *SHORT-ROOT INTERACTING EMBRYONIC LETHAL* (SIEL) hacia el CQ, la endodermis y las CICE donde regula positivamente la expresión de *SCR* (Nakajima *et al.*, 2001; Heidstra *et al.*, 2004; Wu y Gallagher, 2014). Por otra parte, el complejo SHR/SCR actúa en paralelo con las PLT para el mantenimiento del NCI (Aida *et al.*, 2004).

2.2.2. Control de las divisiones asimétricas en el meristemo de la raíz primaria

Las células iniciales se dividen asimétricamente para producir dos células con diferentes destinos celulares: una de ellas adquiere la identidad de inicial y permanece adyacente al CQ, mientras que la otra célula hija se diferencia y continúa dividiéndose simétricamente (Pillitteri *et al.*, 2016). El factor *WOX5* y la proteína *CYCD3*, ciclina que regula la transición entre las fases G1-S del ciclo celular, promueven la división asimétrica de las CIC en la embriogénesis (Sarkar *et al.*, 2007). Los factores *FEZ* y *SOMBRERO* (*SMB*) regulan directamente la actividad asimétrica de las CIC (Willemsen *et al.*, 2008). El factor *FEZ* se expresa en las CIC para activar la división asimétrica y en las células hijas activa la expresión de *SMB*; en cambio, *SMB* regula negativamente la expresión de *FEZ*

para reprimir posteriores divisiones y promover la diferenciación de las células hijas (**Fig. 4A**) (Willemsen *et al.*, 2008). El factor SMB actúa en paralelo con el represor RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) y las proteínas Auxin Response Factor (ARF) ARF10 y ARF16 para regular la división y diferenciación celular (Bennet *et al.*, 2014). El represor RBR ejerce su actividad mediante el secuestro y represión de los factores de transcripción E2F. En *Arabidopsis* los factores E2FA y E2FB promueven la expresión de genes requeridos para la síntesis del DNA en la fase S y la posterior división celular. Además, el factor E2FA también controla la expresión de los genes requeridos para la diferenciación celular. Mientras que las proteínas ARF10 y ARF16 determinan el número y la localización de las iniciales de la cofia lateral (Wang *et al.*, 2005; Wildwater *et al.*, 2005; Magyar *et al.*, 2012).

El complejo nuclear SHR-SCR regula la actividad asimétrica de las células iniciales, un ejemplo muy estudiado son las divisiones que generan a los tejidos del córtex y la endodermis. La formación del córtex y la endodermis comienza con la división asimétrica anticlinal de CICE, la cual genera dos células iniciales: una que renueva a la anterior célula inicial y la otra es la célula inicial del córtex/endodermis hija (CEH). A su vez, la CEH se divide asimétricamente de manera periclinal para producir una célula interna que se desarrolla como endodermis y otra externa que se diferencia como córtex (**Fig. 4 C, D**). La división asimétrica de CEH está controlada por el complejo SHR-SCR. Para ello, el factor SHR se moviliza desde las células protovasculares hacia la endodermis donde se une a SCR. A su vez, el complejo SHR-SCR promueve la transcripción de *SCR*, creándose de esta forma una retroalimentación positiva que limita el movimiento de SHR solo a las células que se diferenciaran como endodermis (**Fig. 4 C, D**) (Abrash y Bergmann, 2009). Específicamente, el complejo SHR-SCR y elementos adicionales como las proteínas RBR y *CYCD6;1* regulan la división asimétrica. En el modelo planteado, la proteína RBR se une al factor SCR para reprimir las divisiones asimétricas de la CICE y CEH. Por el contrario, el complejo SHR-SCR activa la expresión de *CYCD6;1*, cuya proteína se une a CYCLIN DEPENDENT KINASE B1 (CDKB1) para formar el complejo *CYCD6;1*-CDKB1 que disocia la unión de RBR-SCR (**Fig. 4 C, D**) (Sozzani *et al.*, 2010; Cruz-Ramírez *et al.*, 2012).

En otro escenario se ha planteado que la CDKA;1 y RBR1 son los principales determinantes que permiten el inicio de las divisiones asimétricas (Weimer *et al.*, 2012).

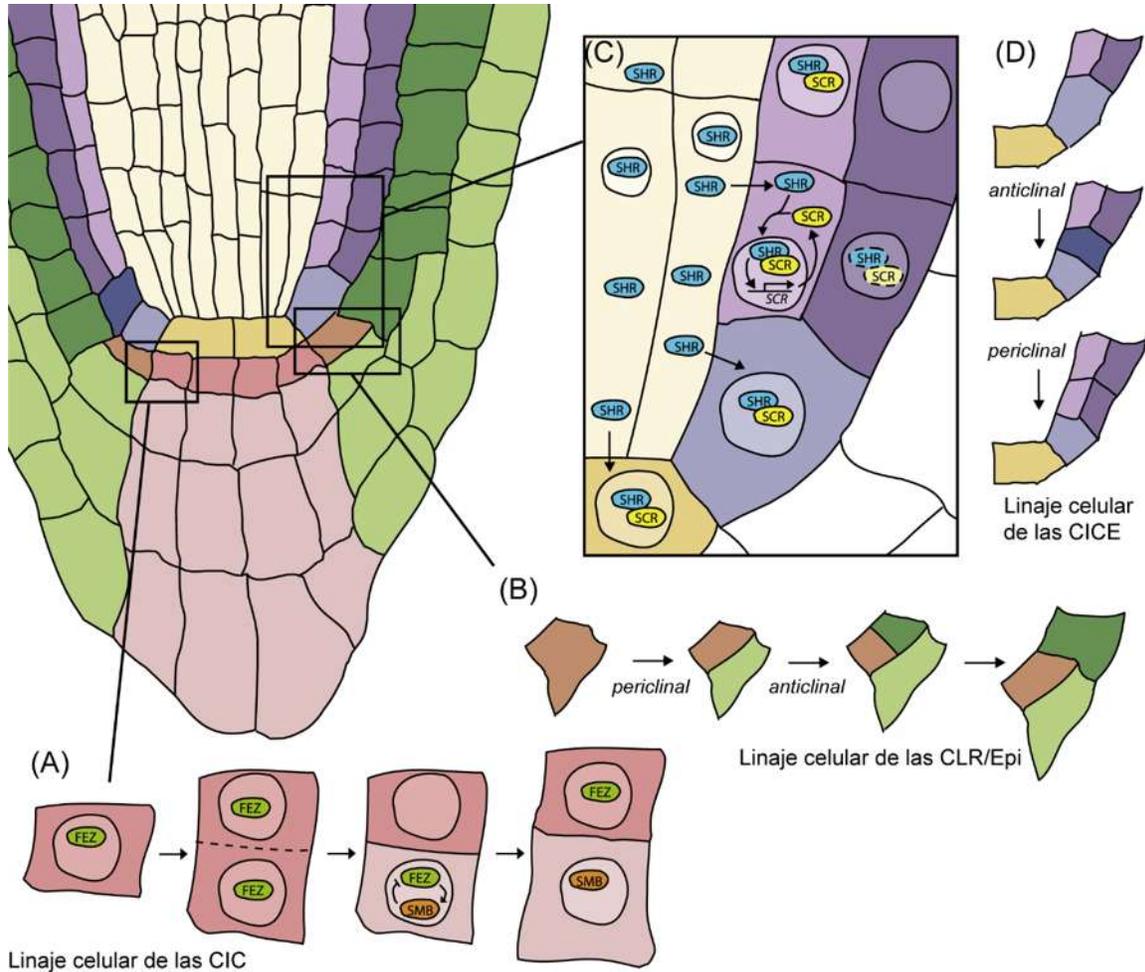


Figura 4. Divisiones asimétricas en la raíz de *Arabidopsis*. (A) División asimétrica de las células iniciales de la columela (CIC). El factor *FEZ* se expresa en las células iniciales y en las hijas donde activa a *SMB* para iniciar la diferenciación. (B) La célula inicial de la cofia lateral de la raíz/epidermis (CLR/Epi) entra en divisiones asimétricas periclinales para generar a la célula hija de la cofia lateral de la raíz y por división anticlinal a la epidermis. (C) Sistema de divisiones asimétricas de la célula inicial córtex/endodermis (CICE). *SHR* migra desde el haz vascular hacia la célula inicial del córtex/endodermis para activar a *SCR* y promover la división asimétrica. En la endodermis *SHR* y *SCR* crean una retroalimentación positiva de la expresión de *SCR* para limitar el movimiento de *SHR* y especificar el destino celular de la endodermis. (D) La división asimétrica anticlinal de la inicial CICE genera un precursor intermedio, que se divide periclinalmente para originar a la endodermis y el córtex (modificado de Abrash y Bergmann, 2009).

2.3. Morfógenos de la raíz de *Arabidopsis*

El crecimiento y diferenciación de la raíz de *Arabidopsis* están coordinados por fitohormonas con diferentes identidades químicas. Las fitohormonas son moléculas endógenas que actúan a concentraciones bajas, no tienen una función nutricional sino que actúan como compuestos de señalización que modulan la fisiología y el desarrollo vegetal (Sauer *et al.*, 2013). Las auxinas son fitohormonas que cumplen funciones esenciales en el control de la proliferación, la elongación y la diferenciación celular, en conjunto con las citocininas y el etileno (Stepanova y Alonso, 2009; Bishopp *et al.*, 2011).

2.3.1. Las auxinas

La auxina natural más abundante en las plantas es el ácido indol-3-acético (AIA) y hasta el momento es la mejor estudiada. Las auxinas se sintetizan en los cotiledones, las hojas jóvenes y el ápice de la raíz de *Arabidopsis* a partir de rutas metabólicas dependientes e independientes del Triptófano (Trp). En las rutas dependientes del Trp, el precursor del AIA es el L-Trp, el cual se sintetiza a partir del corismato como producto final de la ruta del shikímato (Ljung *et al.*, 2001; Ljung *et al.*, 2005; Ljung, 2013). Con base en los intermediarios que participan en la formación del AIA, se han caracterizado cuatro rutas dependientes del Trp. En la ruta del indol-3-acetaldoxima (IAOX), la conversión de L-Trp a IAOX está catalizada por las enzimas homólogas al citocromo p450 CYP79B2 y CYP79B3 encontradas casi exclusivamente en especies de la familia *Brassicaceae*. El IAOX es un metabolito secundario utilizado para la defensa, como los glucosinolatos y la camalexina, además del indol-3-acetonitrilo, un precursor del AIA.

En la ruta del indol-3-acetamida (IAM), la conversión del L-Trp en IAM ha sido bien estudiada en bacterias (*Agrobacterium tumefaciens*), mientras que en plantas, solo se ha logrado detectar la presencia de IAM y las hidrolasas IAM (AtAMI1, NtAMI1) que transforman al IAM en AIA. Además, las mutantes *cyp79b2* y *cyp79b3* tienen

niveles bajos de IAM por lo que se cree el IAOX está involucrado en la homeostasis de IAM.

Inicialmente se creía que en la ruta de la Triptamina (TAM), TAM era un precursor utilizado por la familia de enzimas flavin monooxigenasa YUCCA (YUC) para sintetizar AIA. Sin embargo, esto fue cuestionado a partir de que se observó que las enzimas YUC parecen estar más relacionadas con la ruta del ácido indol-3-piruvico (AIP). En la ruta del AIP participa la enzima triptófano aminotransferasa TAA1, la cual cataliza la conversión de L-Trp en AIP para que posteriormente las enzimas YUC catalicen la conversión del AIP en AIA (**Fig. 5**) (Mashiguchi *et al.*, 2011; Korasick *et al.*, 2013; Ljung, 2013). El genoma de *Arabidopsis* contiene 11 genes *YUC*. La sobreexpresión de los genes *YUC* con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (35S::*YUC*1, 2, 4, 6) produce defectos en el desarrollo de *Arabidopsis* relacionados con la sobreproducción de auxinas, mientras que en la triple mutante *yuc1yuc2yuc6* al igual que la mutante del gen *WEI8* que codifica para TAA1 (*wei8-1*) provoca defectos en el desarrollo relacionados con la deficiencia de auxinas (Cheng *et al.*, 2006; Stepanova *et al.*, 2008). A la fecha, se considera que la ruta que involucra al intermediario AIP es la principal vía de la biosíntesis de las auxinas, debido al impacto que tienen las enzimas YUC y TAA1 sobre el desarrollo de *Arabidopsis*.

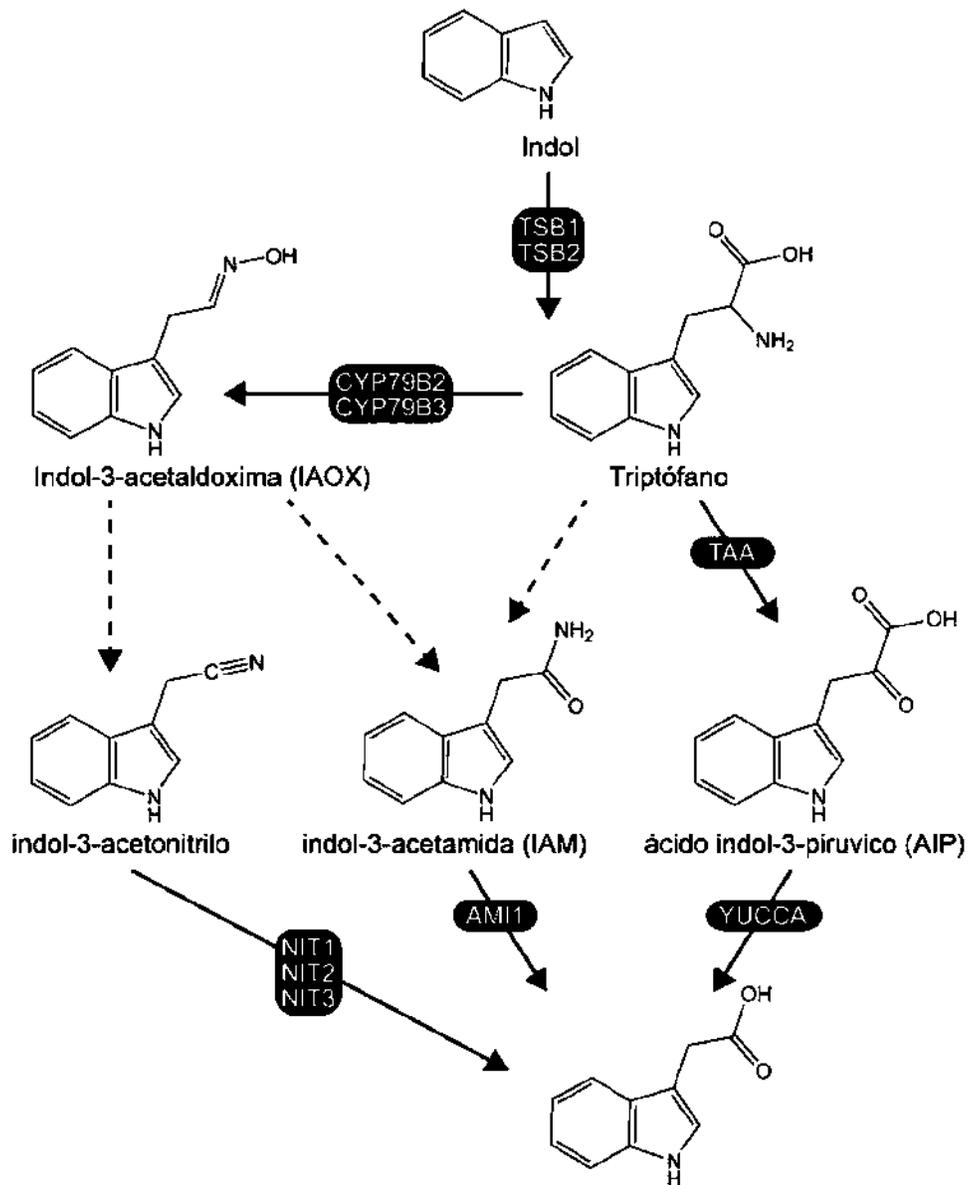


Figura 5. Rutas de la biosíntesis de auxinas. Las flechas continuas indican las rutas vías donde se han identificado las enzimas, en tanto que las flechas discontinuas denotan las rutas en las que no se han identificado todos los elementos involucrados en la biosíntesis de auxinas y pueden ser de uno o varios pasos (modificado de Korasick *et al.*, 2013).

2.3.2. Transporte de auxinas en el sistema radicular

El transporte y la biosíntesis local de auxinas generan un gradiente en el ápice de la raíz primaria y las RL con un máximo en la columnela, el CQ y las células del periciclo que dan lugar a las RL (CFRL y PRL) (Sabatini *et al.*, 1999;

Benková *et al.*, 2003). Las auxinas son transportadas por dos mecanismos interconectados: uno rápido y no direccional que sigue el flujo dictado por los tejidos maduros del floema. El otro direccional y lento, controlado por las proteínas que permiten el transporte polar de auxinas (TPA) célula a célula. El TPA es un sistema preciso y necesario para la formación del gradiente auxínico y el mantenimiento del máximo de auxinas en el ápice de la raíz (Grieneisen *et al.*, 2007).

Para describir el movimiento auxínico en el TPA, se utiliza al modelo de “influjo” y “eflujo” basado en la quimiosmosis del AIA y en la orientación celular de los transportadores. El AIA es un ácido débil ($pK_a=4,75$) que a pH ácido adquiere su forma protonada (AIAH) y a pH neutro su forma aniónica (AIA^-), mientras que la pared celular tiene un pH ácido de 5,5. En el medio extracelular, el AIAH es transportado por difusión pasiva hacia el citoplasma (**Fig. 6A**), en cambio el AIA^- es transportado en contra del gradiente electroquímico por las proteínas de influjo AUXIN1 /LIKE-AUXIN1 (AUX1/LAX) (**Fig. 6B**). El pH del citoplasma es neutro así que el AIA se desprotona y su forma aniónica AIA^- dificulta la difusión hacia el medio extracelular (Grieneisen *et al.*, 2007). Los transportadores transmembranales de eflujo de la familia de proteínas PIN-FORMED (PIN) y la subfamilia B de la ATP-*binding cassette* (ABCB) facilitan la difusión del AIA^- hacia el medio extracelular (**Fig. 6C**). Durante el transporte de auxinas las proteínas PIN y AUX1/LAX aprovechan el gradiente electroquímico generado por la naturaleza química de las auxinas mientras, que las proteínas ABCB1, 4, 19 transportan auxinas en contra de gradiente al acoplar su transporte con la hidrólisis del ATP (Geisler *et al.*, 2017).

Arabidopsis tiene ocho genes *PIN*, que codifican para dos grandes subfamilias proteínicas diferenciadas por la longitud el dominio central hidrofílico que separa a los dominios terminales amino y carboxilo hidrofóbicos. La subfamilia con mayor longitud del dominio hidrofílico está comprendida por las proteínas PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN6 y PIN7, localizados asimétricamente en la membrana plasmática. La subfamilia con ausencia o menor longitud del dominio hidrofílico

está formada por las proteínas PIN5 y PIN8, principalmente involucradas en la acumulación de las auxinas (Křeček *et al.*, 2009).

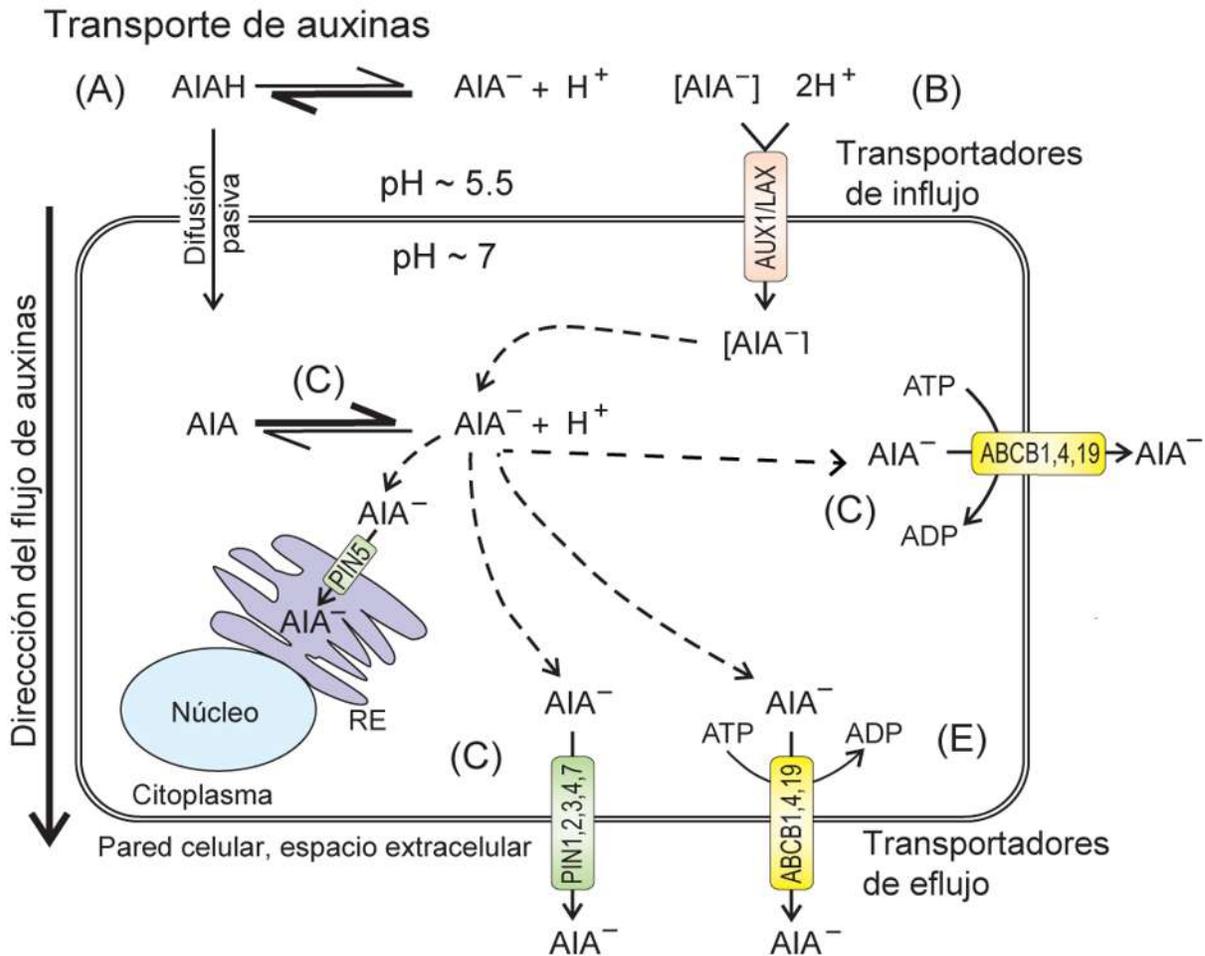


Figura 6. Transporte de auxinas a través de la membrana plasmática. (A) Las auxinas en su forma protonada (AIAH) son transportadas por difusión pasiva hacia el citoplasma. (B) Las auxinas en su forma aniónica (AIA⁻) fluyen por las proteínas AUX1/LAX en contra del gradiente electroquímico. (C) El pH citoplasmático provoca la desprotonación de las auxinas. Esta forma aniónica (AIA⁻) requiere de las proteínas PIN1, 2, 3, 4, 7 y ABCB1, 4, 19 para ser transportado hacia el medio extracelular. Algunas auxinas citosólicas se acumulan en el lumen del Retículo Endoplásmico (RE) por la proteína PIN5. Las proteínas ABCB necesitan de la energía donada por la hidrólisis del ATP para transportar a las auxinas hacia el medio extracelular (modificado de Petrášek y Friml, 2009).

Las auxinas fluyen hacia el ápice de la raíz a través del floema y son descargadas en las células del protofloema por acción del transportador AUX1. El destino acropetal hacia el ápice de la raíz ocurre por los transportadores PIN1, PIN3 y PIN7. En la columnela, PIN3 y PIN7 redirigen el flujo auxínico hacia la epidermis y la cofia lateral de la raíz. En la epidermis y el córtex, PIN2 redirige el flujo de

auxinas desde el meristemo hacia la zona de elongación apoyado por AUX1 y ABCB4, mientras que PIN1, PIN3 y PIN7 reingresan las auxinas de la epidermis al haz vascular (Petrášek y Friml, 2009).

El transporte de auxinas es crucial durante la iniciación y el desarrollo de las RL. Para ello, las proteínas PIN1 de las CFRL se relocalizan periclinalmente para redirigir el flujo de auxinas a los tejido internos proliferativos de los PRL. *PIN1* se expresa en las capas internas de los PRL en la etapa II del desarrollo. *PIN3* y *PIN4* lo hacen en la base del primordio a partir de la etapa V en las células precursoras de la columela. *PIN6* y *PIN7* se expresan en las etapas tempranas y en las márgenes del PRL en las etapas tardías (Benková *et al.*, 2003).

2.3.3. Señalización de auxinas

La respuesta celular en las zonas del crecimiento depende de la concentración de auxinas, del sistema de percepción de auxinas y de los factores AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) que activan o reprimen la expresión génica. Se ha propuesto dos sistemas de percepción de auxinas: el SCF^{TIR1-AFB}-AUX/IAA [SCF (SKP, CULLIN, F-BOX), TIR1/AFB (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX), AUX/IAA (AUXIN/INDOL-3-ACETIC ACID)] y ABP1 (AUXIN BINDING PROTEIN). Sin embargo, han surgido opiniones divididas sobre la participación de ABP1 durante el desarrollo vegetal debido a que las mutantes nulas *abp1c1* y *abp1-TD1* no presentan el fenotipo de resistencia a las auxinas y que el fenotipo anteriormente atribuido a las mutantes *abp1* no fue consecuencia de la afectación en la secuencia del gen *ABP1* (Strader y Zhao, 2016).

La percepción de auxinas por el complejo SCF^{TIR1-AFB}-AUX/IAA regula la actividad de los factores transcripcionales ARF antes del inicio de la transcripción genética. La transcripción depende de los niveles de concentración de auxinas. Cuando la concentración de auxinas son bajas, el represor AUX/IAA se encuentra unido a los factores ARF, bloqueando la transcripción de los genes. Adicionalmente, los

repressores AUX/IAA reclutan a los correpressores TOPLESS (TPL) y TOPLESS RELATED (TPR), los cuales impiden la actividad transcripcional mediante el reclutamiento de desacetilasas de histonas (HDAC) (**Fig. 7A**). El corresponsor TIR1/AFB está incorporado al complejo ubiquitina ligasa E3 SCF^{TIR1-*AFB*}. Cuando las concentraciones de auxinas son altas, estas se unen al corresponsor TIR1-*AFB*, que a su vez recluta a los repressores AUX/IAA hacia el complejo SCF^{TIR1-*AFB*} el cual ubiquitina al represor y permite su degradación proteolítica por el proteosoma 26S. Cuando los repressores AUX/IAA son degradados, los ARFs se liberan para promover la transcripción de los genes de respuesta a las auxinas (**Fig. 7B**) (Calderón-Villalobos *et al.*, 2010; Strader y Zhao, 2016; Weijers y Wagner, 2016)

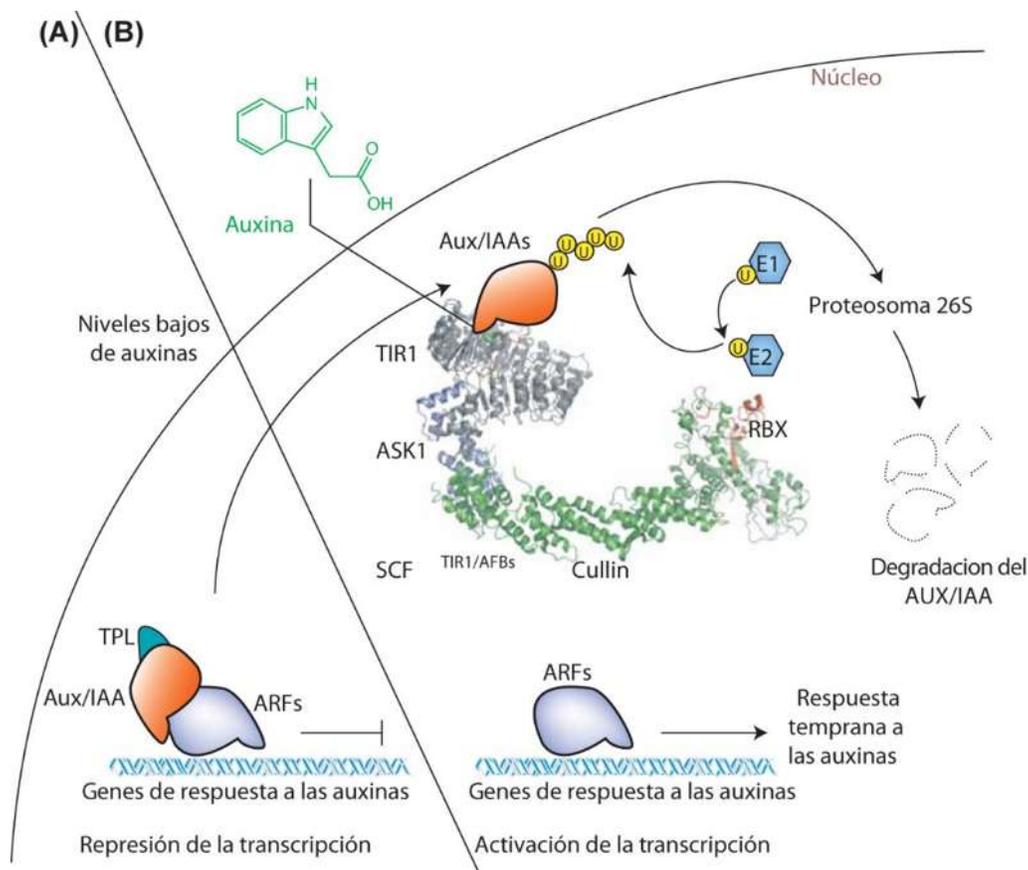


Figura 7. Señalización de las auxinas. (A) Cuando los niveles de las auxinas son bajos el represor AUX/IAA se une a los factores ARF y recluta a los correpressores TPL/TPR impidiendo la transcripción de los genes de respuesta a las auxinas. (B) Los niveles altos de auxinas promueven la transcripción al permitir que el corresponsor TIR1/AFB reclute al represor AUX/IAA hacia el complejo ubiquitina ligasa SCF^{TIR1/AFB}, el cual le agrega una cola de ubiquitinas mediante las enzimas E1, E2 y E3 y promueve su degradación mediante el proteosoma 26S liberando así a los factores ARF (modificado de Calderón-Villalobos *et al.*, 2010).

2.4. Las auxinas como reguladores del crecimiento de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales

2.4.1. Las auxinas controlan la especificación de las células iniciales y las divisiones celulares en el meristemo de la raíz primaria

Las auxinas coordinan el crecimiento de la raíz primaria a través de la regulación de la expresión de los factores involucrados en el establecimiento del NCI y la promoción de la división celular del NCP. Por ejemplo, la acumulación de auxinas en el CQ promueve la expresión de los factores *PLT*, involucrados en el establecimiento del NCI. Simultáneamente, los factores *PLT* controlan la expresión de *PIN1*, *PIN3* y *PIN7* para crear una red de retroalimentación que permite la acumulación de auxinas en el CQ (Aida *et al.*, 2004; Blilou *et al.*, 2005). La expresión de los genes *PLT* sigue un gradiente de distribución similar al auxínico que delimita las zonas del desarrollo de la raíz primaria (Mähönen *et al.*, 2014). Los niveles altos de la expresión de los genes *PLT* provocan el establecimiento del NCI; en cambio, niveles bajos de expresión inducen la actividad mitótica y la diferenciación de las células hijas (Galinha *et al.*, 2007). Mientras que las auxinas contribuyen en el establecimiento del NCI también participan en la diferenciación de las CIC a través de la activación de los factores ARF10 y ARF16, los cuales restringen la expresión de *WOX5* al CQ (Ding y Friml, 2010). Por otro lado, las auxinas también coordinan el crecimiento de la raíz primaria por medio de: I) la división celular al inducir la expresión de los genes que codifican para proteínas ciclinas y CDK que participan en la regulación del ciclo celular (Hemerly *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1994; Doerner y Celenza, 2000), II) la elongación celular al inducir la expresión de los genes que codifican para las bombas de protones H⁺-ATPasa y las proteínas expansinas, entre otras que modifican la pared celular durante la expansión (Majda y Robert, 2018); y III) la inhibición de la diferenciación celular al inducir la expresión de *ARR7* y *ARR19*, dos reguladores negativos de la vía de las citocininas (Bishopp *et al.*, 2011).

2.4.2. Las auxinas controlan la formación *de novo* de raíces laterales

La formación de las RL esta estimulada por el TPA y la biosíntesis local de auxinas (Bhalerao *et al.*, 2002). Para entender la organogénesis de las RL es necesario separar cada evento del desarrollo por módulos. En el primer módulo ocurre la “inducción” de las células del periciclo que se especificarán como CFRL, que inicia con la acumulación de auxinas en unas cuantas células del periciclo paralelas al protoxilema en la zona de transición de la raíz primaria. Después de la especificación de las CFRL, la expresión del transportador PIN3 se incrementa en un pequeño grupo de células endodérmicas adyacentes a las CFRL. En el segundo módulo, que se lleva a cabo en la zona de diferenciación, las auxinas a través de SOLITARY-ROOT (SLR)/IAA14 promueven la primera división asimétrica anticlinal que origina dos células hijas flanqueadas por células progenitoras más grandes. La primera división asimétrica marca la etapa I de los PRL. Posteriormente, en el tercer módulo una respuesta máxima de auxinas provocada por PIN1 coordina la proliferación de las células hijas a través de BODENLOS (BDL)/IAA12–MONOPTEROS (MP)/ARF5. En el cuarto modulo, las auxinas transportadas por PIN3 a través de SHORT HYPOCOTYL2 (SHY2)/IAA3 provocan que las células de la endodermis pierdan volumen progresivamente hasta que las membranas se fusionan para dejar paso al PRL en desarrollo. A diferencia de las células endodérmicas, las auxinas transportadas por LAX3 inducen la separación de las células del córtex y la epidermis a través de la señalización de SLR/IAA14 - ARF7-ARF19 para dejar paso al surgimiento de los PRL (**Fig. 8**) (Lavenus *et al.*, 2013; Perianez-Rodriguez *et al.*, 2014; Vilches-Barro y Maizel, 2015).

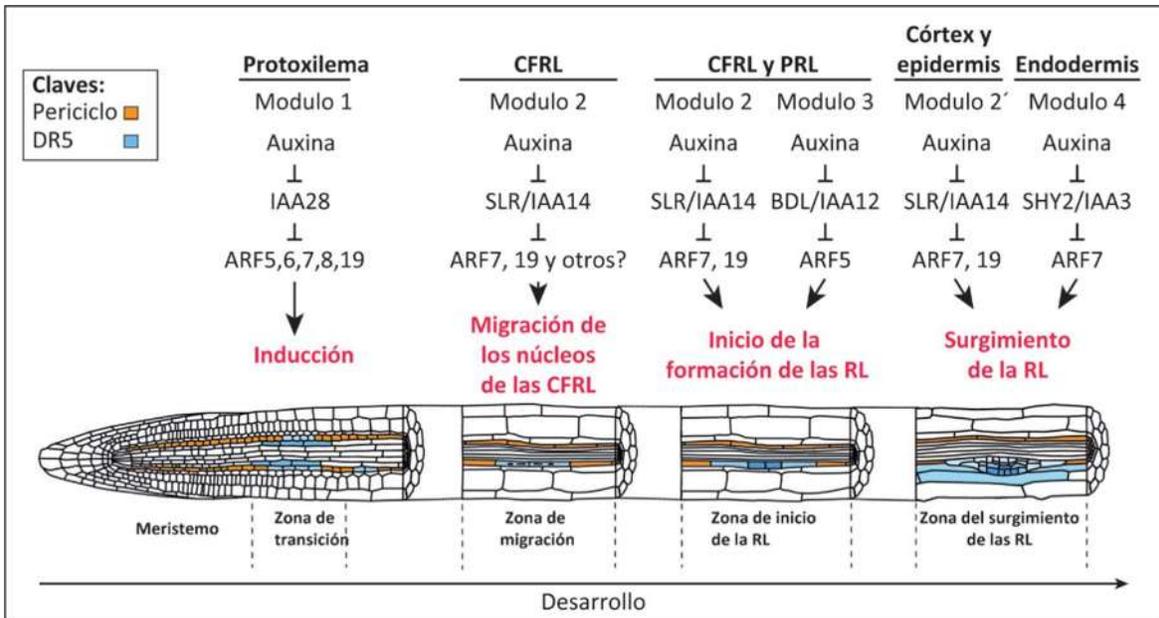


Figura 8. Señalización de auxinas durante la formación y desarrollo de las raíces laterales. Módulo 1: la especificación de las células fundadoras de las raíces laterales (CFRL) involucra al módulo de señalización entre IAA28 y los factores ARF5, 6, 7 y 19 en la zona de transición de la raíz primaria. Módulo 2: la acumulación de auxinas activa al módulo de señalización IAA14/SOLITARY ROOT (SLR)-ARF7, 19 para promover la migración de los núcleos hacia la membrana plasmática compartida en las CFRL. Módulo 2 y 3: los módulos de señalización IAA14/SLR-ARF7, 19 y BONDELOS (BDL)/IAA12-ARF5 son necesarios para el inicio de la primera división asimétrica que marca la etapa I del desarrollo del primordio de la raíz lateral (PRL). Conforme el PRL se desarrolla tiene que atravesar las capas superiores conformadas por la endodermis, el córtex y la epidermis. Este proceso es facilitado por la remodelación de la pared celular. El surgimiento de las raíces laterales es controlado por la activación de los módulos 2 y 4. Módulo 4: las auxinas a través del módulo de señalización SHORT HIPOCOTYL 2 (SHY)/IAA3 – ARF7 controlan la remodelación de la pared celular de la endodermis (modificado de Lavenus *et al.*, 2013).

2.5. Organismos promotores del crecimiento vegetal

Una característica del sistema radicular vegetal es su capacidad para formar relaciones complejas con los organismos que habitan la rizósfera. Estas interacciones dependen de las condiciones ambientales y del intercambio de compuestos nutrimentales y/o moléculas de señalización. Las raíces de las plantas exudan diversos compuestos derivados de su metabolismo para atraer a microorganismos entre los que se incluyen a los microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGP, por sus siglas en inglés) como los hongos y bacterias. Estos organismo secretan fitohormonas como las auxinas y compuestos orgánicos volátiles (VOCs, por sus siglas en inglés) que modifican en el crecimiento vegetal, entre otras respuestas (Ortiz-Castro *et al.*, 2009; Venturi y Keel, 2016).

Diversas especies del género *Trichoderma* establecen relaciones benéficas con las plantas. *Trichoderma* mejora la resistencia al estrés biótico y abiótico mediante la inducción de la resistencia sistémica (RISR, por sus siglas en inglés) y mediante la promoción del crecimiento vegetal (Harman *et al.*, 2004; López-Bucio *et al.*, 2015). En particular, el mecanismo por el cual numerosas especies de *Trichoderma* promueven el crecimiento vegetal no ha sido completamente determinado. Contreras-Cornejo y col. (2009) reportaron que *T. virens* y *T. atroviride* aumentan la acumulación de biomasa de la parte aérea en plantas de *Arabidopsis* y el crecimiento del sistema radicular mediante la producción de dos compuestos relacionados al AIA, llamados indol-3-etanol (IEt) e indol-3-acetaldehído (AIA1d).

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) incluyen moléculas pequeñas (100-500 Da), hidrófobas y difusibles. Participan en la comunicación a larga distancia entre diferentes grupos biológicos (Harman *et al.*, 2004). El perfil de COV producidos por *Trichoderma* varía entre especies. Sin embargo, es común encontrar terpenos, hidrocarburos, alcoholes y cetonas (Nieto-Jacobo *et al.*, 2017). Los COV fúngicos funcionan como inductores de las respuestas de defensa contra patógenos como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, o *Pythium ultimum* y como promotores del crecimiento vegetal (Vinale *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2013; Contreras-Cornejo *et al.*, 2014; Kottb *et al.*, 2015). Anteriormente, Garnica-Vergara *et al.*, 2015 reportó que el perfil de COVs producidos por *T. atroviride* está integrado por cetonas, terpenos, alcoholes y por 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP), una alquil lactona clave en la promoción del crecimiento vegetal.

2.5.1. La 6-pentil-2H-piran-2-ona (6PP) regula diferencialmente el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*

La 6-PP es una lactona insaturada formada por el isómero 2H-pirano sustituido en su carbono 2 con un grupo funcional cetona y en el carbono 6 con un grupo pentil. La propiedad de la 6-PP como inductor del crecimiento vegetal fue explorada en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*), donde reportaron que

la aplicación del compuesto en las hojas incrementó la biomasa y el desarrollo del sistema radicular (Vinale *et al.*, 2008). En plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas durante 10 ddg, la 6-PP afectó la producción de biomasa de la parte aérea y el desarrollo del sistema radicular (**Fig. 9 A-D**). Garnica-Vergara y col. (2015), observaron que 75 μM fue la única concentración que estimuló el crecimiento de la raíz primaria, mientras que a partir de 125 μM se presentó el efecto contrario (**Fig. 9E**). La 6-PP también estimuló el surgimiento de las RL principalmente a 75-125 μM , mientras que a partir de 175 μM el número de RL fue similar al control (**Fig. 9F**). A diferencia de la raíz primaria, la 6-PP estimuló la emergencia de las RL de manera dependiente de la concentración. Como se muestra en la gráfica de la densidad de las RL de la **Figura 9G**, la cual se calculó al dividir el número de RL entre la longitud de la raíz primaria. Se observó que a partir de 125 μM la 6-PP incrementó la densidad de las RL; es decir, el número de RL por centímetro de raíz primaria. Por lo tanto, los anteriores resultados indican que la 6-PP regula diferencialmente el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis* al inhibir el crecimiento de la raíz primaria y promover el surgimiento de las RL (Garnica-Vergara *et al.*, 2015).

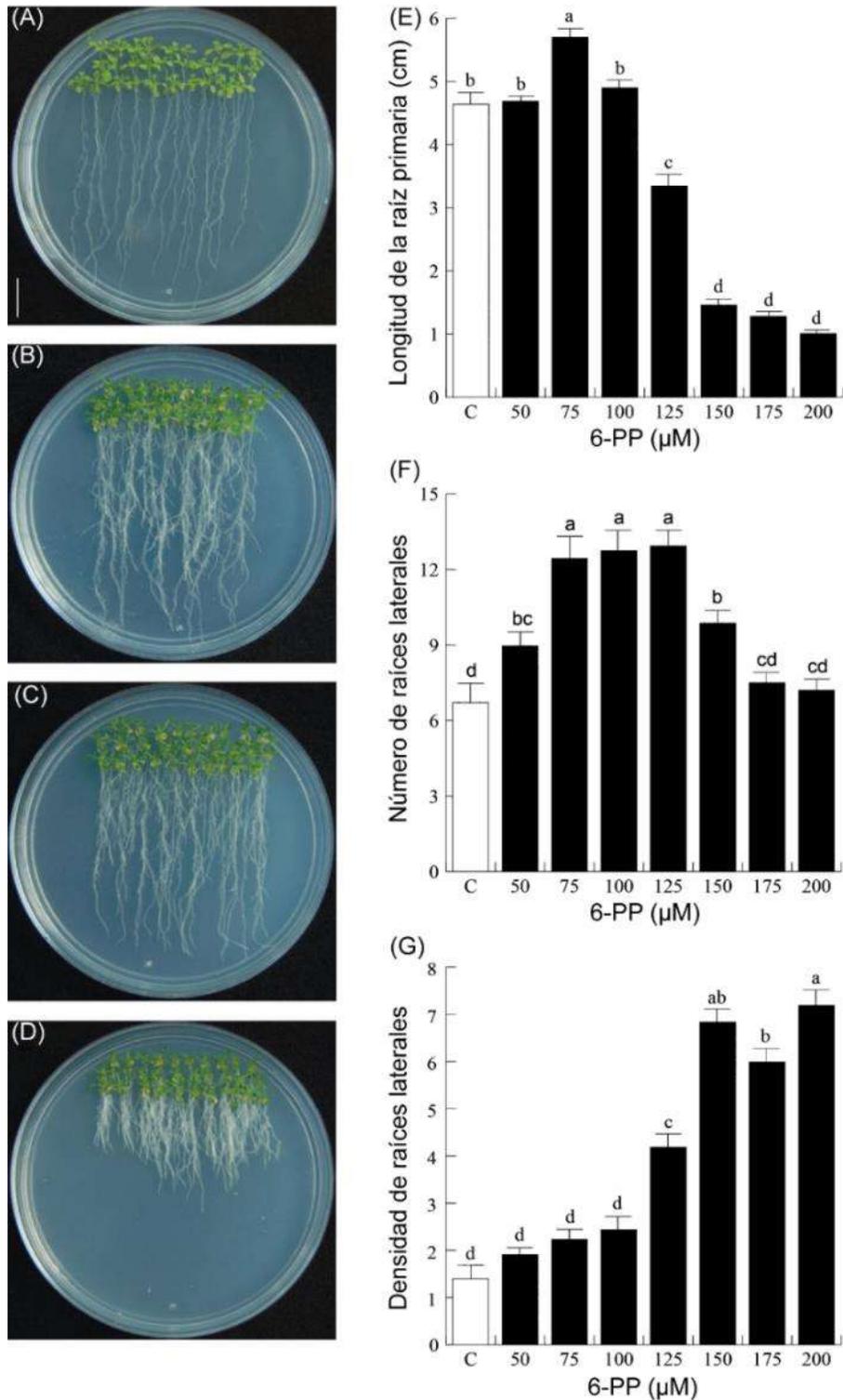


Figura 9. Efecto de la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) en el crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. (A-D) Fotografías representativas de las plántulas de *Arabidopsis thaliana* crecidas en (A) medio MS 0,2X suplementado con (B) 75, (C) 125 y (D) 150 μM de 6-PP. (E) Longitud de la raíz primaria. (F) Número de raíces laterales emergidas por planta. (G) Densidad de las raíces laterales (número de raíces laterales por centímetro de raíz primaria) (modificado de Garnica-Vergara *et al.*, 2015).

El fenotipo radicular mostrado a partir de 125 μM de 6-PP fue similar al provocado por la administración de auxinas exógenas, en el que concentraciones crecientes de 0.01-1 μM de AIA provocan la inhibición del crecimiento de la raíz primaria e indican la formación de las RL (Eliasson *et al.*, 1989; Okumura *et al.*, 2013). Por lo que Garnica-Vergara y col. (2015) analizaron la distribución de las auxinas en el ápice de la raíz primaria, los PRL y las RL emergidas en la línea reportera de las auxinas *DR5:GFP* de *Arabidopsis* en respuesta a la aplicación de 75 y 150 μM de 6-PP (**Fig. 10**). La 6-PP no modificó la expresión del reportero *DR5:GFP* en el ápice de la raíz primaria ni en las RL emergidas (**Fig. 10 A-F**). Sin embargo, los tratamientos con la 6-PP incrementaron la expresión de *DR5:GFP* en las etapas II y V del desarrollo de los PRL (**Fig. 10 G-L**). Lo anterior indicó el incremento del número y la densidad de las RL causado por la acumulación y/o la señalización de auxinas en los PRL.

Para esclarecer el incremento en la respuesta auxínica en las etapas II y V de los PRL se analizó la expresión de los transportadores de eflujo de auxinas (PIN's), los cuales tienen una función fundamental en el TPA (Petrášek y Friml, 2009). En las plántulas crecidas en medio MS 0.2X, los transportadores *PIN1*, *PIN3* y *PIN7* se expresaron en los haces protovasculares y la columnela; mientras que *PIN2* se expresó en los tejidos del córtex y la epidermis (**Fig. 11 A, E, I, M**). La adición de 75 μM de 6-PP incrementó la expresión de *PIN1*, *PIN2* y *PIN3* (**Fig. 11 B, D, F, H, J, L**). Sin embargo, en 150 μM de 6-PP se observó para *PIN1* y *PIN2* el efecto contrario, mientras que el incremento de la expresión de *PIN3* se mantuvo (**Fig. 11 C, D, G, H, K, L**). A diferencia de los otros transportadores, la 6-PP reprimió la expresión de *PIN7* (**Fig. 11 N-P**). Lo anterior indica que la 6-PP modifica la localización de los transportadores de eflujo de la familia PIN. Garnica-Vergara y col. (2015) sugirieron que las bajas concentraciones de 6-PP provocan el incremento de la expresión de los transportadores *PIN*, lo que a su vez aumenta el transporte de auxinas hacia los PRL para impulsar el crecimiento de las RL, mientras que altas concentraciones de 6-PP inhibieron el crecimiento de la raíz primaria mediante la disminución del flujo de auxinas hacia el meristemo debido al bloqueo de la expresión de los transportadores *PIN1* y *PIN7*.

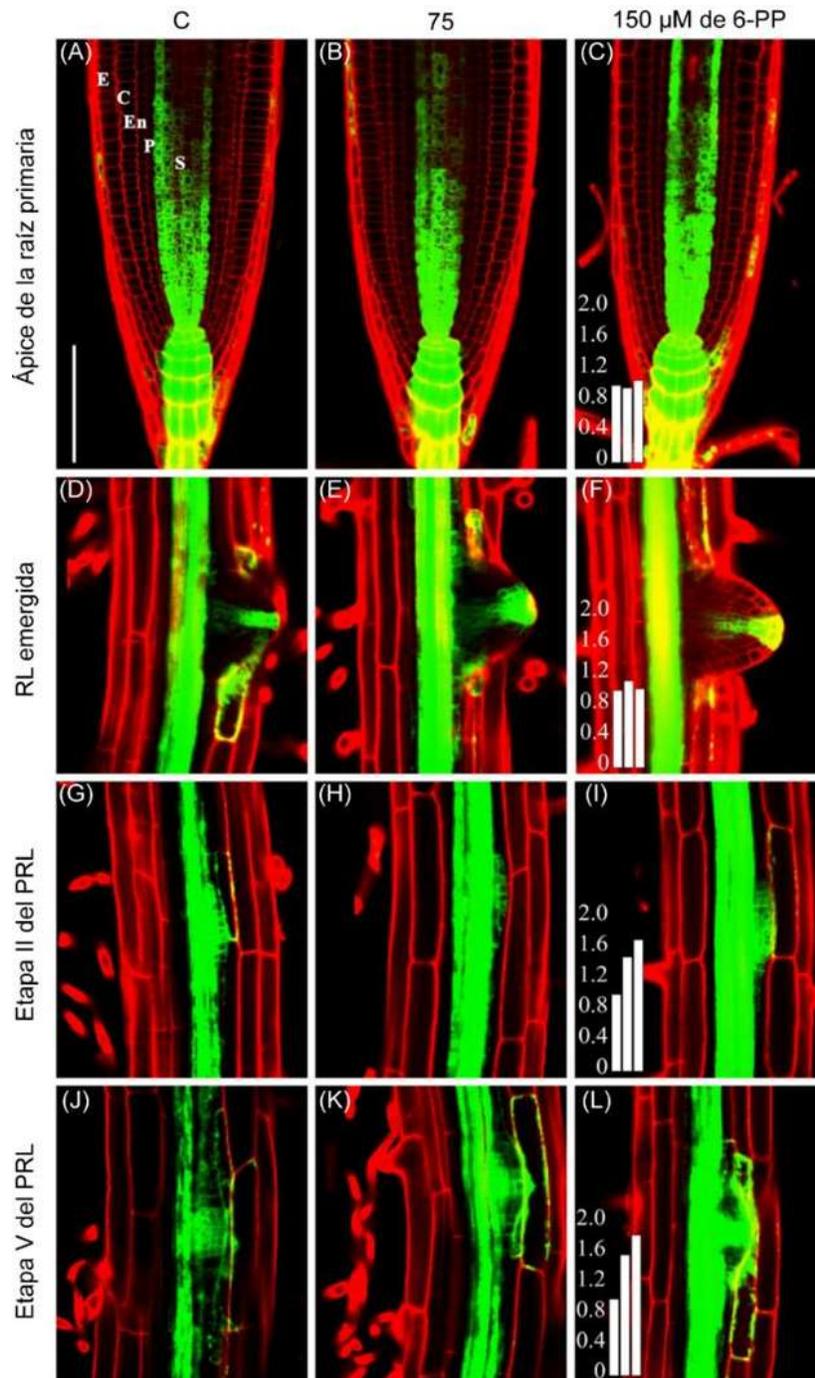


Figura 10. Efecto de la 6-pentil-2H-piran-2-ona (6-PP) en la expresión de la línea de respuesta a auxinas *DR5:GFP*. Plántulas transgénicas *DR5:GFP* fueron crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 75 y 150 μM de 6-PP se analizaron a los 5 días después de la germinación (ddg) mediante microscopía confocal. (A-C) Ápice de la raíz primaria. (D-F) Raíces laterales (RL) emergidas. (G-I) Etapa II del desarrollo de los primordios de las raíces laterales (PRL). (J-L) Etapa V del desarrollo de los PRL. Los insertos en (C, F, I y L) ilustran la diferencia de expresión de *DR5:GFP* entre control (barra izquierda) y los tratamientos con 75 (barra media) y 150 μM de 6-PP (barra derecha) (modificado de Garnica-Vergara *et al.*, 2015).

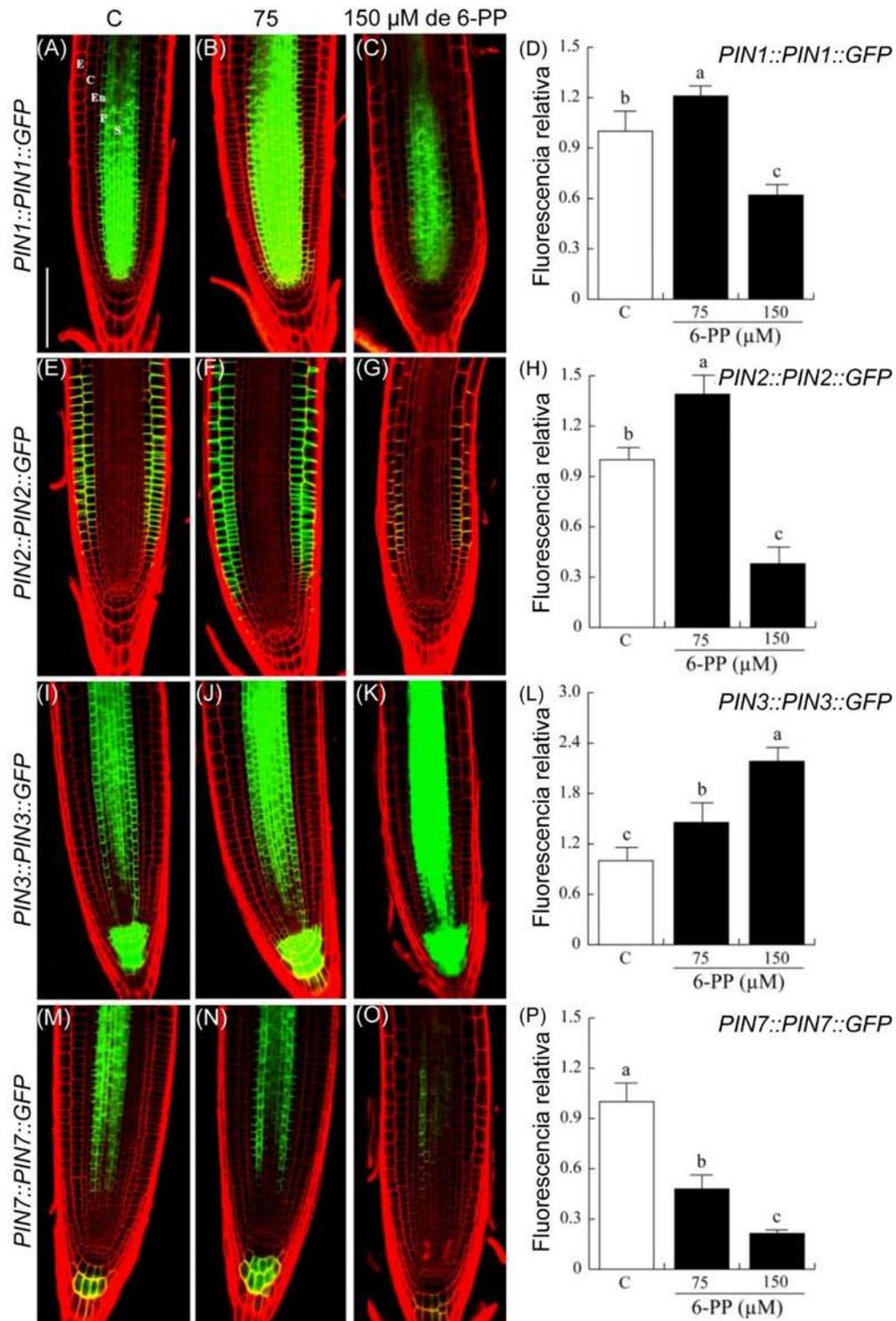


Figura 11. Expresión de los transportadores de eflujo de auxinas PIN en el ápice de la raíz primaria en respuesta a la 6-PP. Las líneas transgénicas (A-C) *PIN1::PIN1::GFP*; (E-G) *PIN2::PIN2::GFP*; (I-K) *PIN3::PIN3::GFP* y (M-O) *PIN7::PIN7::GFP* de *Arabidopsis* fueron crecidas en (A, E, I, M) medio MS 0,2X suplementado con (B, F, J, N) 75 μ M y (C, G, K, O) 150 μ M de 6-PP. Las plántulas con 5 ddg de edad fueron suspendidas en solución de yoduro de propidio y analizadas por microscopía confocal. Las gráficas (D, H, L, P) ilustran la expresión de cada gen reportero (modificado de Garnica-Vergara *et al.*, 2015).

2.6. El complejo MEDIADOR

El crecimiento de los organismos depende del estricto control espacio-temporal de la expresión genética. En las plantas, como en todos los organismos eucariontes, el ciclo celular que contribuye a la diferenciación y la formación de nuevos tejidos y órganos, depende de la expresión temporal de los genes que codifican para las proteínas ciclinas y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK, por sus siglas en inglés), que regulan la entrada, la progresión y la salida del ciclo en respuesta a señales del desarrollo intrínsecas y ambientales (De Veylder *et al.*, 2007). La expresión genética está comprendida por distintos procesos entre los que se incluye a la transcripción. La transcripción está catalizada por RNA polimerasas, que sintetizan moléculas de RNA tomando como base la secuencia molde del DNA. En los eucariontes existen cinco clases de RNA polimerasas (RNA pol I, II, III, IV y V) involucradas en la síntesis de distintos tipos de RNA (Paule y White, 2000; Zhou y Law, 2015). La RNA pol II transcribe los genes en RNA mensajeros (RNAm), que se utilizan para la síntesis de las proteínas durante la traducción (Hahn, 2004).

Un elemento imprescindible de la transcripción es el complejo MEDIADOR (CM), el cual se encarga de controlar la actividad y el reclutamiento de la RNA pol II y los factores de transcripción asociados durante la formación de la maquinaria transcripcional conocida como el complejo de pre-iniciación (**Fig. 12**) (Hahn., 2004; Carlsten *et al.*, 2013). El CM es una estructura multiproteica conservada en los eucariontes. Inicialmente fue identificado en levaduras y humanos (Kelleher *et al.*, 1990; Fondell *et al.*, 1996; Berk, 1999; Gu *et al.*, 1999) y recientemente en *Arabidopsis* (Bäckström *et al.*, 2007). El número de subunidades puede variar de entre 25 a 33 proteínas dependiendo de la especie. Sin embargo, hasta la fecha se han identificado solo 21 subunidades conservadas entre humanos, levaduras y plantas (Bäckström *et al.*, 2007). Las evidencias bioquímicas y bioinformáticas de las subunidades que conforman el CM de levaduras, metazoos y humanos revelaron una estructura compacta y modular formada por el modulo cabeza, el modulo intermedio y el modulo cola. Además, en el CM existe el módulo cinasa o

CDK8, el cual consiste de las proteínas CDK8, ciclina C, MED12 y MED13 (Asturias *et al.*, 1999; Dotson *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2002; Bourbon *et al.*, 2004; Robinson *et al.*, 2015).

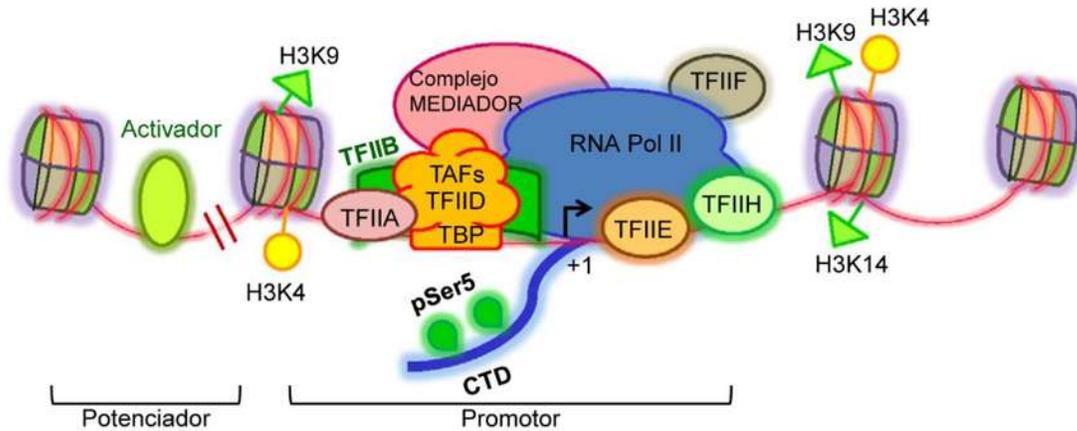


Figura 12. El complejo pre-iniciador de la transcripción. La formación del complejo de pre-iniciación está caracterizada por la unión de un activador a la región potenciador, para promover el reclutamiento de los factores de transcripción generales y la RNA pol II al promotor. Secuencialmente el complejo MEDIADOR y los factores FTII se unen a la región promotora para estabilizar la maquinaria transcripcional. Los nucleosomas que flanquean el promotor tienen un código de histonas las cuales indican el sentido de la transcripción activa. Estas modificaciones epigenéticas incluyen la acetilación de la histona H3 en las lisinas 9 y 14 (H3K9 / 14) y la metilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4). La repetición CTD de RNA pol II también se fosforila en cinco residuos de serina (modificado de Shandilya y Roberts, 2012).

En las plantas, el CM se caracterizó con base en la homología con los genes *MED* de *Sacharomyces cerevisiae* y *Homo sapiens*. En *Arabidopsis*, el CM está formado por 33 subunidades de las cuales cuatro solo se han encontrado en el CM de plantas (Bäckström *et al.*, 2007 Bourbon, 2008; Mathur *et al.*, 2011). Las subunidades del módulo CDK8 han sido evidenciadas mediante estrategias bioinformáticas. Reportes recientes sobre la función de MED12, MED13 y CDK8 también han mostrado la presencia del módulo cinasa en las plantas (González *et al.*, 2007; Gillmor *et al.*, 2010; Raya-González *et al.*, 2017).

Las subunidades MED6, MED8, MED11, MED17, MED18, MED20, MED22, MED28 y MED30 forman parte del módulo cabeza que interactúa con la RNA pol II (Larivière *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2014). A su vez, el sub-complejo MED8-MED18-

MED20 estabiliza la formación del complejo de pre-iniciación (Kim *et al.*, 1994; Larivière *et al.*, 2006; Takagi *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2010). Las subunidades MED17 y MED21 se interconectan con el módulo cinasa a través de la subunidad MED13 (Guglielmi *et al.*, 2004). Baumli *et al.* (2005) observaron que MED6 al formar un puente con MED7-MED21 causa un cambio conformacional que le permite al módulo interactuar con la RNA pol II. El gen ortólogo de MED1 no se ha detectado en plantas, exceptuando a las algas rojas (Koschubs *et al.*, 2010; Mathur *et al.*, 2011). Otra parte del CM está integrada por el módulo cola formado por las subunidades MED2, MED3, MED5, MED14, MED15, MED16 y MED23 que mantienen contacto directo con los factores de transcripción específicos y en consecuencia vinculan al complejo unido al DNA con la RNA pol II (**Fig. 13**).

Desde la identificación del CM en plantas, diversos reportes han indicado su función durante la regulación del desarrollo vegetal, la señalización hormonal y la tolerancia al estrés biótico y abiótico. En el desarrollo vegetal, las subunidades MED12 y MED13 del módulo CDK8 son reguladores globales necesarios para el desarrollo embrionario, la organogénesis de los meristemos apicales del brote y la raíz, y la etapa de floración durante las fases de transición del desarrollo de las plantas (dormancia-organogénesis, fases juvenil-adulta y vegetativa-reproductiva) (Gillmor *et al.*, 2010, 2014; Ito *et al.*, 2011). Estas proteínas participan en la especificación y el mantenimiento del NCI de la raíz primaria a través de la modulación de los transportadores PIN (Raya-González *et al.*, 2017). Al contrario de MED12 y MED13, MED25 regula negativamente el transporte de las auxinas y la transcripción de los genes de respuesta a las auxinas asociados con la proliferación y la expansión celular en la raíz primaria y las RL de *Arabidopsis* (Raya-González *et al.*, 2014). A su vez MED12 y MED13, MED8 y MED18 promueven la fase de floración a través de *FLOWERING LOCUS C (FLC)*, un represor floral que participa en la ruta de vernalización (Kidd *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2013; Lai *et al.*, 2014). La subunidad MED25 participa en el fotoperíodo al regular la expresión de *FLOWERING LOCUS T (FT)* durante la fase de floración actuando cascada abajo del fitocromo B (PHYB) (Cerdán y Chory, 2003).

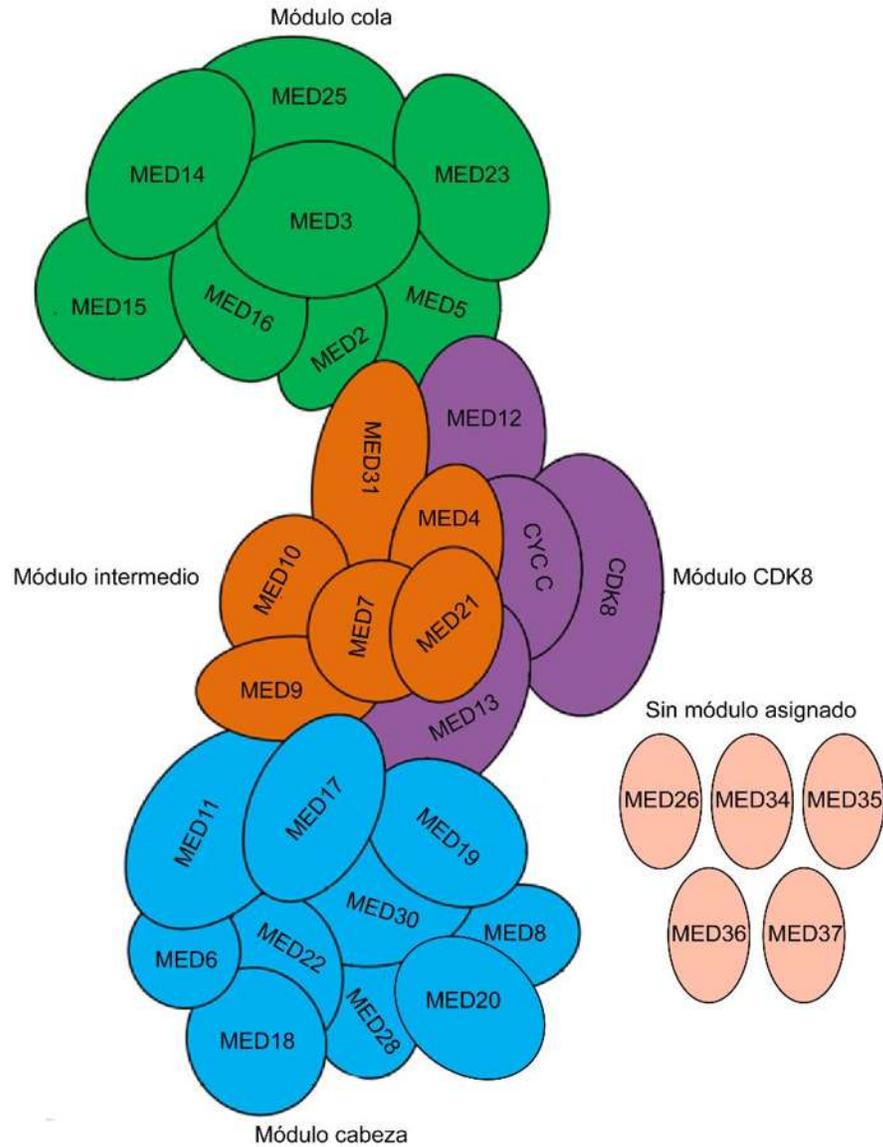


Figura 13. Estructura teórica del complejo MEDIADOR (CM) de plantas. El complejo mediador está arreglado en cuatro módulos. Las subunidades marcadas con color azul representan al módulo cabeza, con naranja al módulo intermedio, con verde al módulo cola y con púrpura al módulo CDK8. (Modificado de Samanta y Thakur, 2015). A las subunidades representadas en color salmón no se les ha incluido en ningún módulo del complejo mediador. Las subunidades MED34, MED35, MED36 y MED37 son específicas de plantas.

2.6.1. MEDIADOR16

La subunidad MED16 se ha relacionado con la expresión de genes asociados al desarrollo vegetal y a la tolerancia del estrés biótico y abiótico.

MED16 promueve la fase de floración en *Arabidopsis*, se ha observado que la mutante *sensitive to freezing (sfr6)/med16* florece tardíamente debido a la desregulación de la expresión de los genes asociados con el ritmo circadiano, que a su vez regulan la expresión de los genes *CONSTANS (CO)* y *FT* que participan en la ruta que regula el fotoperiodo (Knight *et al.*, 2008, 2009). En la tolerancia al estrés abiótico, MED16 en conjunto con las subunidades MED2 y MED14 participa en la tolerancia al frío y al estrés osmótico a través del control de la expresión de los genes *COR (COLD-REGULATED)*. En particular, estas subunidades reclutan a la RNA pol II durante la unión de los factores CBF (C-Box Binding Factor) a la secuencia promotora de los genes *COR* (Boyce *et al.*, 2003; Knight *et al.*, 2009; Hemsley *et al.*, 2014).

Las plántulas mutantes *med16* de *Arabidopsis* muestran un fenotipo clorótico cuando se cultivan en medio con niveles limitados de hierro (**Fig. 14 A**), al igual que presentan hipocótilos y cotiledones más largos (**Fig. 14 B, C**) (Zhang *et al.*, 2014). El fenotipo clorótico se debe a que MED16 regula la expresión de los genes de captación del hierro *IRT1 (IRON-REGULATED TRANSPORTER 1)* y *FRO2 (FERRIC REDUCTION OXIDASE 2)* al modular la unión del complejo FIT/Ib bHLH [FIT, (FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR) Ib bHLH, (Ib basic Helix-Loop-Helix)] a la secuencia promotora de los genes *IRT1* y *FRO2* (Zhang *et al.*, 2014).

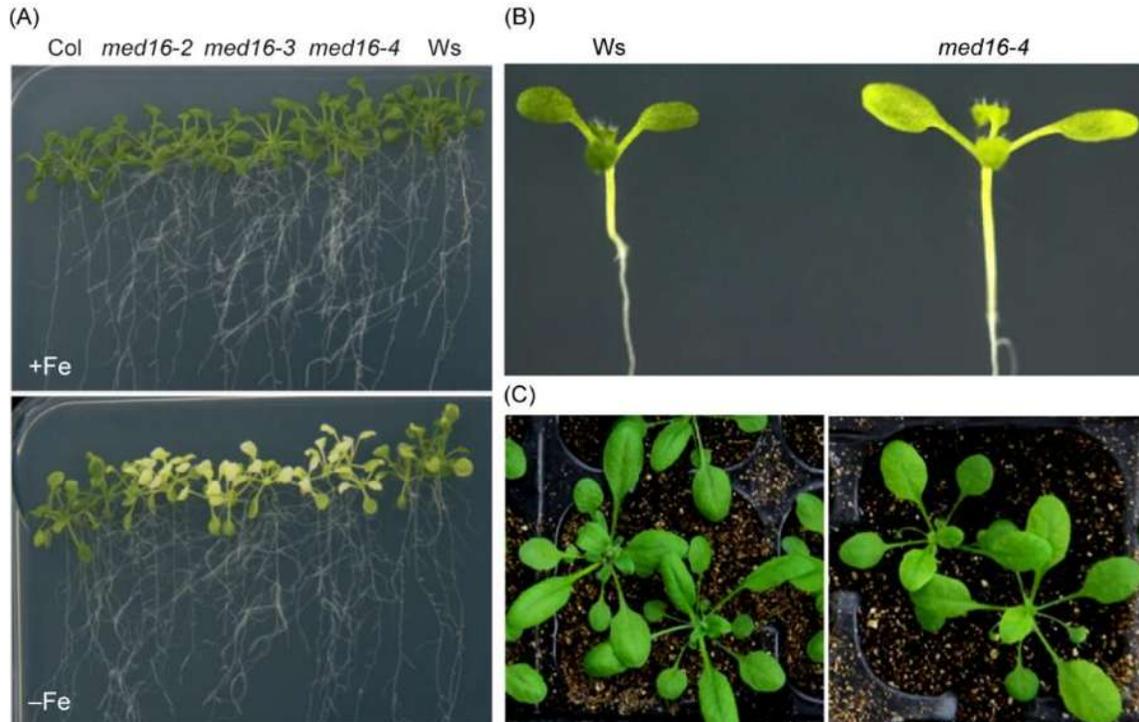


Figura 14. Fenotipo de las mutantes *med16* de *Arabidopsis*. (A) Plantas mutantes *med16* crecidas en medio con y sin limitación de hierro. (B) Comparación de los cotiledones y el hipocótilo de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Wassilewskija (Ws) y la mutante *med16-4*. (C) Comparación de las plantas Ws y *med16-4* sembradas en suelo (modificado de Zhang *et al.*, 2014).

Resultados previos a este trabajo han señalado que la mutante *med16-2* también es resistente a la inhibición de la raíz primaria provocada por el compuesto volátil 6-PP (**Fig. 15**) (Barrera-Ortiz, comunicación personal).

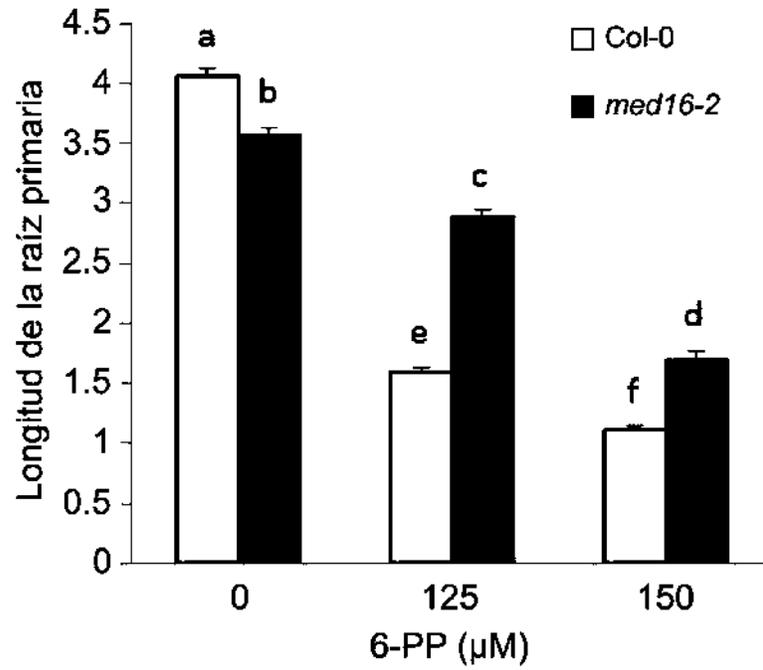


Figura 15. Efecto de la 6-PP sobre la raíz primaria de la mutante *med16-2*. Semillas Col-0 y *med16-2* fueron sembradas y crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 125 y 150 μM de 6-PP. Las plantas fueron medidas a los 10 días de edad (Barrera-Ortiz, comunicación personal).

3. JUSTIFICACIÓN

Un componente crítico de la transcripción es el complejo MEDIADOR, el cual, sirve como estructura de andamio para la unión de diversos factores de transcripción y la RNA pol II. La mutante *med16* es resistente a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria inducido por el volátil fúngico 6-PP. Por lo tanto, es importante determinar el posible mecanismo por el cual, MED16 regula el desarrollo de la raíz en respuesta a dicho compuesto en *Arabidopsis*.

4. HIPÓTESIS

MEDIADOR16 regula la respuesta de la raíz de *A. thaliana* al compuesto volátil 6-PP por un mecanismo dependiente de genes implicados en el mantenimiento del meristemo de la raíz primaria.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Caracterizar la participación del gen *MEDIADOR16* de *Arabidopsis* en la respuesta al compuesto volátil 6-PP durante el crecimiento radicular.

5.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la contribución de *MED16* en el desarrollo de la raíz de *Arabidopsis*.
- Analizar el papel de *MED16* en la configuración del sistema radicular de *Arabidopsis* en respuesta al volátil 6-PP.
- Evaluar la participación de las auxinas en la regulación del crecimiento de la raíz de *med16-2* en respuesta a 6-PP.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material biológico y condiciones de crecimiento

Para la realización de este trabajo se utilizaron semillas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo col-0), la mutante *med16-2* (Zhang *et al.*, 2014) y las líneas transgénicas *DR5::GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003), *pPIN1::PIN1::GFP* (Benková *et al.*, 2003), *pPIN3::PIN3::GFP* (Žádníková *et al.*, 2010), *CycB1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *WOX5::GFP* (Ding y Friml, 2010), *SHR::GFP* (Helariutta *et al.*, 2000) y *SCR::HB2::YFP* (Heidstra *et al.*, 2004). Los genes reporteros mencionados se movilizaron mediante cruces a la mutante *med16-2*. Las semillas fueron desinfectadas con etanol al 95% (v/v) durante 4 minutos y cloro al 10% (v/v) por 4 minutos. Posteriormente se realizaron cinco enjuagues con agua destilada estéril y se incubaron por 48 horas a 4 °C. Las semillas fueron germinadas en cajas de Petri de plástico (100 X 15 mm) que contenían medio MS 0,2X con 1.0% de agar (Murashige y Skoog, 1962) y medio suplementado con 125 y 150 µM de 6-PP. El medio de cultivo se preparó con sales MS (0,9 g/L) de Sigma-Aldrich y Sacarosa (6 g/L). Después de ajustar el pH a 7 se agregó fitoagar (10 g/L) de Phytotechnology. La 6-PP (Sigma-Aldrich) fue disuelta en etanol y fue agregada al medio antes de llegar al punto de solidificación. Las placas sembradas con las semillas se colocaron verticalmente en un ángulo de 65° para permitir el crecimiento de la raíz a lo largo de la superficie del fito agar. Las condiciones de crecimiento fueron de 16 horas luz, 8 horas oscuridad, una intensidad de luz de 100 µmol m²s⁻¹ a 22°C (condiciones mantenidas por la cámara de crecimiento Percival Scientific AR-95L).

6.2. Obtención de cruces

Las líneas marcadoras transgénicas que contienen a los genes reporteros *DR5::GFP* (Ottenschläger *et al.*, 2003), *pPIN1::PIN1::GFP* (Benková *et al.*, 2003), *pPIN3::PIN3::GFP* (Žádníková *et al.*, 2010), *CycB1::uidA* (Colón-Carmona *et al.*, 1999), *WOX5::GFP* (Ding y Friml, 2010), *SHR::GFP* (Helariutta *et al.*, 2000) y

SCR::HB2::YFP (Heidstra *et al.*, 2004) fueron movilizados a la planta mutante *med16-2* (Zhang *et al.*, 2014) mediante cruza. Las cruza se realizaron a través de polinizaciones en las cuales, se utilizó el polen de las plantas transgénicas para fecundar al estigma de las flores de la mutante *med16-2*. Las semillas del fruto (silicua) obtenido de la crusa fue almacenado y denominado como generación filial 1(F1). Las semillas F1 fueron desinfectadas, sembradas en medio MS 0,2X y las plántulas con fenotipo silvestre fueron seleccionadas. Las plántulas F1 seleccionadas fueron transferidas a suelo y crecidas en cámara de crecimiento Percival AR66L hasta la obtención de semillas en generación F2 por eventos de autopolinización. Las semillas F2 fueron desinfectadas, sembradas en medio de selección (MS 0,2X 30 μ M de kanamicina) y analizadas para seleccionar a las plántulas mutantes por medio del fenotipo y de la resistencia a kanamicina. Adicionalmente, las plántulas F2 seleccionadas fueron suspendidas en agua desionizada y montadas sobre un portaobjetos para observar la expresión del transgén con el microscopio confocal Olympus FV1000. Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a suelo y crecidas hasta obtener semillas en generación F3, donde el 100% de las semillas producen plántulas con fenotipo mutante y el transgén marcador. Las semillas F3 se utilizaron para la realización de los experimentos presentados en este trabajo.

6.3. Efecto de la 6-PP sobre la arquitectura radicular de *med16-2*

Semillas silvestres (col-0) y mutantes *med16-2* fueron sembradas en medio MS 0,2X y medio MS 0,2X suplementado con 125 μ M y 150 μ M de 6-PP, por triplicado. La arquitectura radicular de las plántula de *Arabidopsis* en condiciones control fueron analizadas a los 2, 4, 6 y 8 días después de su germinación (ddg). El efecto de la 6-PP sobre el sistema radicular fue analizado a los 10 ddg. El análisis de la arquitectura radicular consistió en la medición de la longitud de la raíz primaria; en el conteo del número de las raíces laterales emergidas (observadas con el microscopio estereoscópico modular Leica MZ6 con una magnificación de 30X); en la densidad de las raíces laterales, la cual se calculó

dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria; y en la medición de la longitud de las tres raíces laterales más distales al meristemo de la raíz. Se utilizaron 15 plántulas de *Arabidopsis* para cada experimento.

6.4. Actividad histoquímica *uidA* por microscopia de Nomarski

Las plántulas transgénicas de *CycB1:uidA* y la cruce *med16-2/CycB1:uidA* crecidas en medio MS 0,2X fueron analizadas a los 2, 4, 6 y 8 ddg, mientras que el efecto de las 6-PP sobre la actividad histoquímica del gen reportero de la β -glucuronidasa fue analizado a los 8 ddg. Los análisis consistieron en el conteo de células que expresan el gen marcador y en la medición de la longitud del meristemo de la raíz primaria. La expresión del gen marcador en el meristemo radicular se observa de coloración azul y posteriormente, se tomaron micrografías en un Microscopio de contraste de fases [Microscopio Nomarski] (Leica DFC450 C). Para observar la expresión del marcador *uidA*, las plántulas fueron incubadas en cajas para microtítulo con X-Gluc al 0,1% (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido) en un amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 al 0,1 M y un pH de 7) con $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ y $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ al 2 mM, durante la noche a 37 °C (Jefferson *et al.*, 1987). La solución X-Gluc fue removida y se clarificaron los tejidos con la solución 1 (HCL 0,24 N y metanol al 20% [v/v]) a 62 °C, posteriormente, al remover la solución 1 se agregó la solución 2 (NaOH al 7% [m/v] y etanol al 60% [v/v]) a temperatura ambiente. Al remover la solución 2 los tejidos fueron rehidratados con tratamientos de etanol al 40, 20 y 10% (v/v) sucesivos. El etanol al 10% se retiró para agregar glicerol al 50% (v/v) y las plántulas clarificadas se montaron entre portaobjetos y cubreobjetos sellados con barniz comercial para su posterior análisis. Se utilizaron al menos 10 plántulas por experimento.

6.5. Determinación del desarrollo de las raíces laterales

Los primordios de las raíces laterales (PRL) fueron cuantificados a los 4 ddg en plántulas silvestres y mutantes crecidas en los medios MS 0,2X y MS 0,2X con

6-PP. Antes de la cuantificación, las plántulas fueron clarificadas y fijadas para distinguir las diferentes etapas del desarrollo de las raíces laterales con ayuda del microscopio Leica CME con una magnificación de 40X. Los PRL fueron clasificados en 7 etapas hasta su emergencia, de acuerdo a lo reportado por Malamy y Benfey (1997). Los análisis reportados consisten en el conteo de PRL, en el total de primordios de raíces laterales y en la densidad de los primordios de las raíces laterales utilizando como mínimo 10 plantas por tratamiento.

6.6. Tinción con yoduro de propidio y microscopia confocal

Las raíces de las plántulas transgénicas *DR5::GFP*, *pPIN1::PIN1::GFP*, *pPIN3::PIN3::GFP*, *SCR::H2B::YFP*, *SHR::GFP*, y *WOX5::GFP* y las cruza con la mutante *med16-2* fueron crecidas en medio MS 0,2X y MS 0,2X con 6-PP. Cada muestra fue suspendida en solución de yoduro de propidio 0,1% (v/v) y colocada sobre un portaobjetos. Los MAR y las distintas etapas del desarrollo de las raíces laterales fueron analizados con un láser de argón de una longitud de onda de 568 nm de excitación y una ventana de emisión de 585-610 nm para el yoduro de propidio. La proteína verde fluorescente (GFP) fue analizada con una longitud de onda de 488 nm de excitación/ 505-550 nm de emisión y la proteína amarillo fluorescente (YFP) con una longitud de onda de 514 nm de excitación/ 527 nm de emisión usando un microscopio confocal (Olympus FV1200). Las micrografías del yoduro de propidio y de las proteínas fluorescentes fueron fusionadas para producir una imagen final. Para cada tratamiento, al menos 10 plantas transgénicas fueron documentadas.

6.7. Análisis de datos

Los análisis de datos para las líneas transgénicas y las correspondientes cruza con la mutante *med16-2* se realizaron con el software para el procesamiento de imágenes Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij>) en 10 micrografías

por línea y tratamiento. La fluorescencia de GFP y YFP en la punta de la raíz fue cuantificada determinando los pixeles de interés (verde y amarillo respectivamente) en una área definida. Entonces se obtuvo un unidad de valor arbitraria ($UA = \text{pixeles}/\mu\text{m}^2$), la cual se normalizó a 1 en la condición control y los tratamientos con 6-PP fueron ajustados relativos al valor normalizado. Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con el software STATISTICA 10 (StatSoft, Inc., 2011) mediante pruebas de varianza y significancia de Tukey con una $p < 0,05$. Los grupos estadísticamente similares se representaron con letras minúsculas idénticas, mientras que los grupos estadísticamente diferentes se representaron con letras minúsculas no idénticas.

7. RESULTADOS

7.1. Arquitectura radicular de *med16-2*

Para caracterizar la contribución de la subunidad MED16 en el desarrollo radicular de *Arabidopsis*, analizamos diferentes parámetros de la arquitectura radicular de las plántulas silvestres del ecotipo Col-0 y la mutante *med16-2* a los 2, 4, 6 y 8 ddg de edad. Los análisis de la arquitectura radicular revelaron que *med16-2* desde los 4 ddg presenta una mayor longitud de la raíz primaria y más del doble de RL emergidas en comparación con Col-0 (**Fig. 16 A-B**). En consecuencia, la densidad de las RL de la mutante incrementó hasta 3 veces, lo que indica que *med16-2* presenta una mayor cantidad de RL emergidas por centímetro de la raíz primaria (**Fig. 16 C**). Posteriormente, analizamos la longitud de las RL, donde observamos que las RL de *med16-2* son hasta siete veces más largas que Col-0 desde los 6 ddg (**Fig. 16 D**). El incremento en la densidad de las RL en *med16-2* permanece constante desde los 4-8 ddg, lo que indica que MED16 participa en la formación *de novo* de PRL.

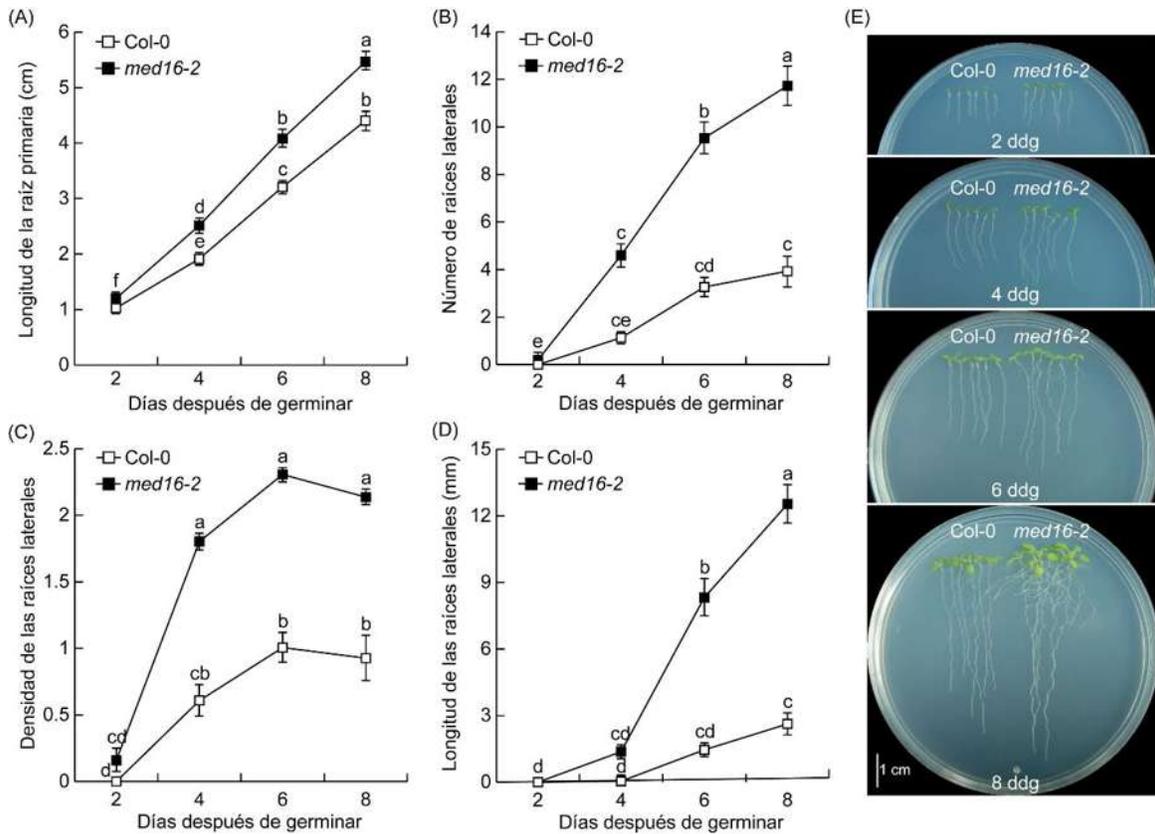


Figura 16. Arquitectura radicular de la mutante *med16-2* de *Arabidopsis thaliana*. (A-D) La raíz de las plántulas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 y la mutante *med16-2* crecidas en medio MS 0,2X fueron analizadas a los 2, 4, 6 y 8 ddg de edad. (A) Longitud de la raíz primaria. (B) Número de raíces laterales. (C) Densidad de las raíces laterales. (D) Longitud de las raíces laterales. (E) Fotografías representativas de la cinética de crecimiento. Las barras representan el error estándar de una n=15 plantas y los grupos estadísticamente diferentes representados por letras minúsculas fueron obtenidos por una ANOVA factorial y la prueba Tukey $p < 0,05$.

7.2. La subunidad MED16 controla la actividad proliferativa de la raíz primaria de *Arabidopsis*

El crecimiento está estrechamente ligado a la actividad proliferativa de los tejidos. Para evaluar la participación de MED16 en el crecimiento de la raíz primaria de *Arabidopsis*, utilizamos la línea transgénica *CycB1:uidA* en el fondo genético Col-0 y *med16-2*. El gen reportero *CycB1:uidA* es una construcción formada por el promotor del gen *CycB1;1* de *Arabidopsis* fusionado al gen *uidA* de *Escherichia coli* que codifica para la β -glucuronidasa (GUS) (Colón-Carmona *et al.*, 1999). La GUS es una hidrolasa que escinde al ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucorónico (X-Gluc) para producir al cloro-bromoindigo de color azul

intenso que indica la división celular. La proliferación celular representada como el número de células que expresan GUS fue evaluada en las plántulas silvestre y mutante a los 2, 4, 6 y 8 ddg de edad. La proliferación celular de *med16-2* fue dos veces más activa que en la línea silvestre durante la cinética analizada (**Fig.17 A, B**). Se conoce que el tamaño del meristemo depende de la actividad proliferativa del NCP (Moubayidin *et al.*, 2010). El tamaño del meristemo de *med16-2* hasta el día 4 ddg fue un 67% más grande que Col-0, sin embargo a partir de 6 ddg no existe diferencia significativa entre la longitud del meristemo de *med16-2* y Col-0 (**Fig. 17 C**). Cabe destacar que la mutante *med16-2* alcanzó desde los primeros días del desarrollo radicular la máxima actividad proliferativa y la longitud máxima del meristemo lo que se relaciona con un rápido crecimiento (**Fig. 17 B, C**).

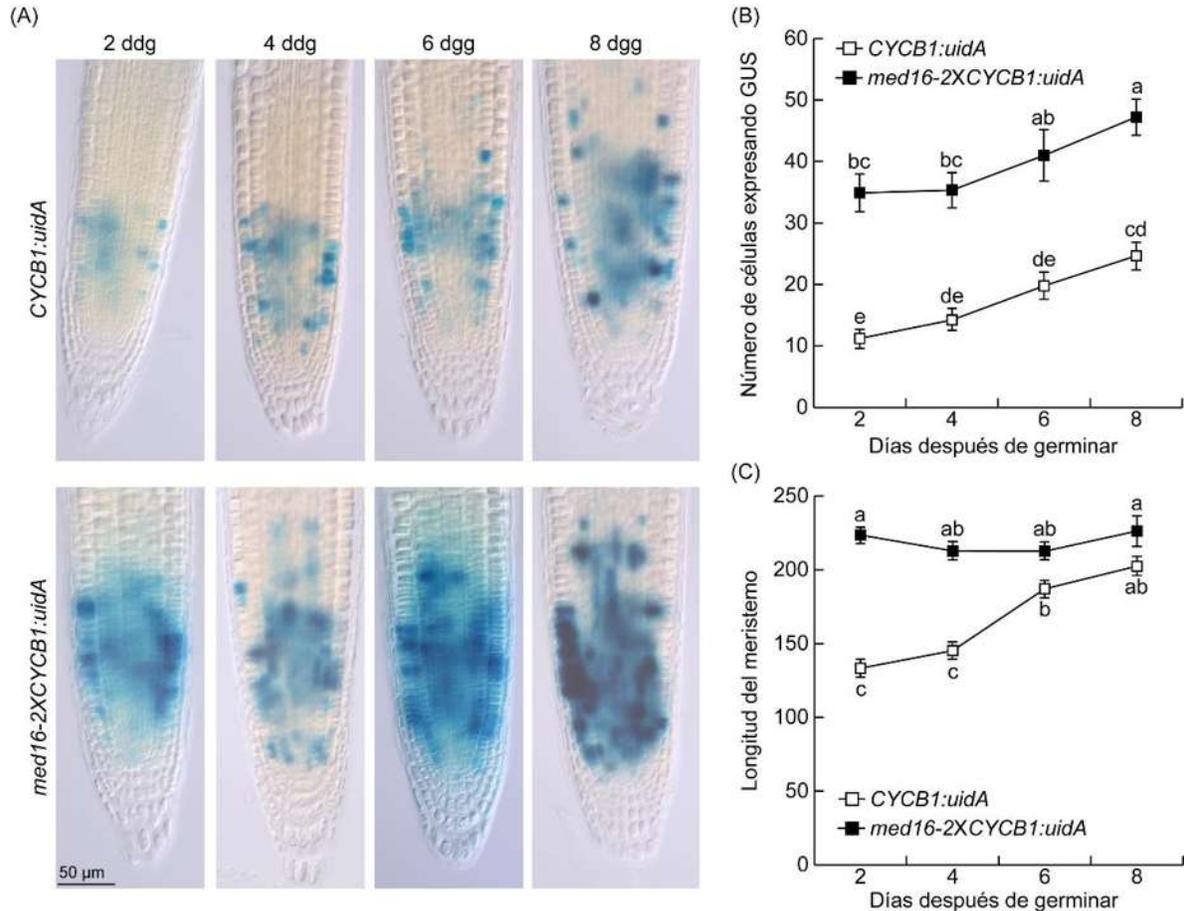


Figura 17. Actividad proliferativa en el meristemo radicular. (A) Micrografías representativas de la actividad proliferativa de la línea transgénica reportera de la división celular *CycB1.uidA* y la cruz *med16-2XCycB1:uidA* crecidas en medio MS 0,2X a los 2, 4, 6 y 8 ddg. (B) Número de células que expresan GUS. (C) Longitud del meristemo. Las barras representan el error estándar de una n=10 plantas y los grupos estadísticamente diferentes representados por letras minúsculas fueron obtenidos por una ANOVA factorial y la prueba Tukey $p < 0,05$.

7.3. Efecto de la 6-PP y MED16 sobre el sistema radicular de *Arabidopsis*

La 6-PP es un COV producido por hongos del género *Trichoderma*, que inhibe la longitud de la raíz primaria e induce la formación de las RL a través de las auxinas (Garnica-Vergara *et al.*, 2015). Barrera-Ortiz, comunicación personal observo que la mutante *med16-2* es resistente a la inhibición de la raíz primaria provocada por la 6-PP, aunque el mecanismo de la resistencia involucrado en este efecto aún no se conoce. Para determinar la función de MED16 en la modulación del sistema radicular de *Arabidopsis* en respuesta al volátil fúngico, sembramos semillas Col-0 y *med16-2* en medio MS 0,2X suplementado con 125 y 150 μM de 6-PP. En el análisis de la arquitectura radicular de plántulas con 10 ddg de edad se observó que la 6-PP provocó un acortamiento en la raíz primaria de Col-0 mientras que *med16-2* sólo fue resistente al acortamiento provocado por 125 μM de 6-PP (**Fig. 18 B**). A diferencia del efecto observado en la raíz primaria, las plántulas Col-0 experimentaron un incremento en el número de RL emergidas cuando son crecidas con 125 y 150 μM de 6-PP (**Fig. 18 A-D, E**). También observamos que *med16-2* fue insensible al efecto promotor de la 6-PP durante el desarrollo de las RL (**Fig. 18 E**). Un abrupto incremento en la densidad de las RL de Col-0 fue observado debido a la reducción en la longitud de la raíz primaria y a la inducción de las RL, en cambio en *med16-2* el incremento en la densidad de las RL fue gradual (**Fig. 18 F**). Los datos anteriores indican que MED16 es un regulador del efecto de la 6-PP sobre el crecimiento de la raíz primaria y que la mutación del gen fue suficiente para incrementar el número de RL emergidas.

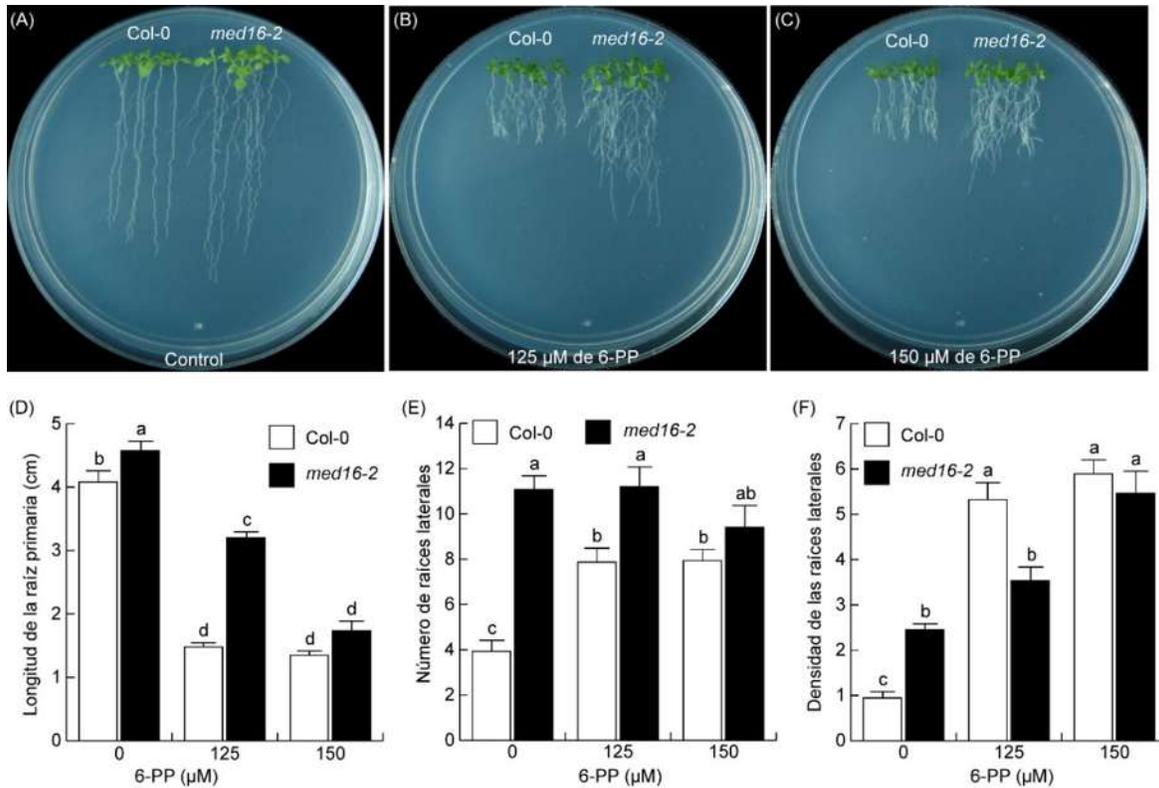


Figura 18. Efecto de la 6-PP sobre el sistema radicular de la mutante *med16-2*. Semillas Col-0 y *med16-2* fueron sembradas en (A) medio MS 0,2X suplementado con (B) 125 y (C) 150 μM de 6-PP. La raíz de las plántulas fue evaluada a los 10 ddg de edad. (D) Longitud de la raíz primaria. (E) Número de raíces laterales. (F) Densidad de las raíces laterales. Las barras representan el error estándar de una n=15 plantas y los grupos estadísticamente diferentes representados por letras minúsculas fueron obtenidos por una ANOVA factorial y la prueba Tukey $p < 0,05$.

7.4. La 6-PP actúa a través de MED16 para regular la proliferación celular de la raíz primaria de *Arabidopsis*

Para evaluar como MED16 regula el crecimiento de la raíz en respuesta a la 6-PP, analizamos la proliferación celular de la línea reportera *CycB1:uidA* y medimos la longitud de las células del córtex ubicadas en la zona de diferenciación de plántulas Col-0 y *med16-2* con 8 ddg de edad. El compuesto fúngico inhibió de forma dosis dependiente la actividad proliferativa y el tamaño del meristemo de la línea silvestre (**Figs. 19, 20**). En condiciones control, la proliferación celular de la mutante *med16-2* fue 65% más activa que Col-0. La adición de 125 μM de 6-PP modificó ligeramente la proliferación en el meristemo de *med16-2*, mientras que en Col-0 la actividad proliferativa fue reducida hasta un

40% respecto al control. Al comparar la proliferación de *med16-2* y Col-0 con 125 μM de 6-PP se observó que Col-0 fue 129% menos proliferativa que *med16-2*. La adición de 150 μM de 6-PP inhibió el 44% de la actividad proliferativa de *med16-2*, mientras que para Col-0 se redujo el 64% respecto al control. Al comparar la proliferación de *med16-2* y Col-0 con 150 μM de 6-PP pudimos observar que Col-0 fue 155% menos proliferativa que *med16-2* (**Fig. 19 A, B**). Un efecto similar se observó en el tamaño del meristemo de Col-0 y *med16-2*. En condiciones control el meristemo de ambas líneas es del mismo tamaño. La adición de 125 μM no afectó el tamaño del meristemo de *med16-2*, en cambio en Col-0 fue reducido 21% con respecto a control. La adición de 150 μM de 6-PP redujo el tamaño del meristemo de Col-0 hasta un 43% mientras que para *med16-2* fue de un 33% con respecto al control (**Fig. 19 A, C**).

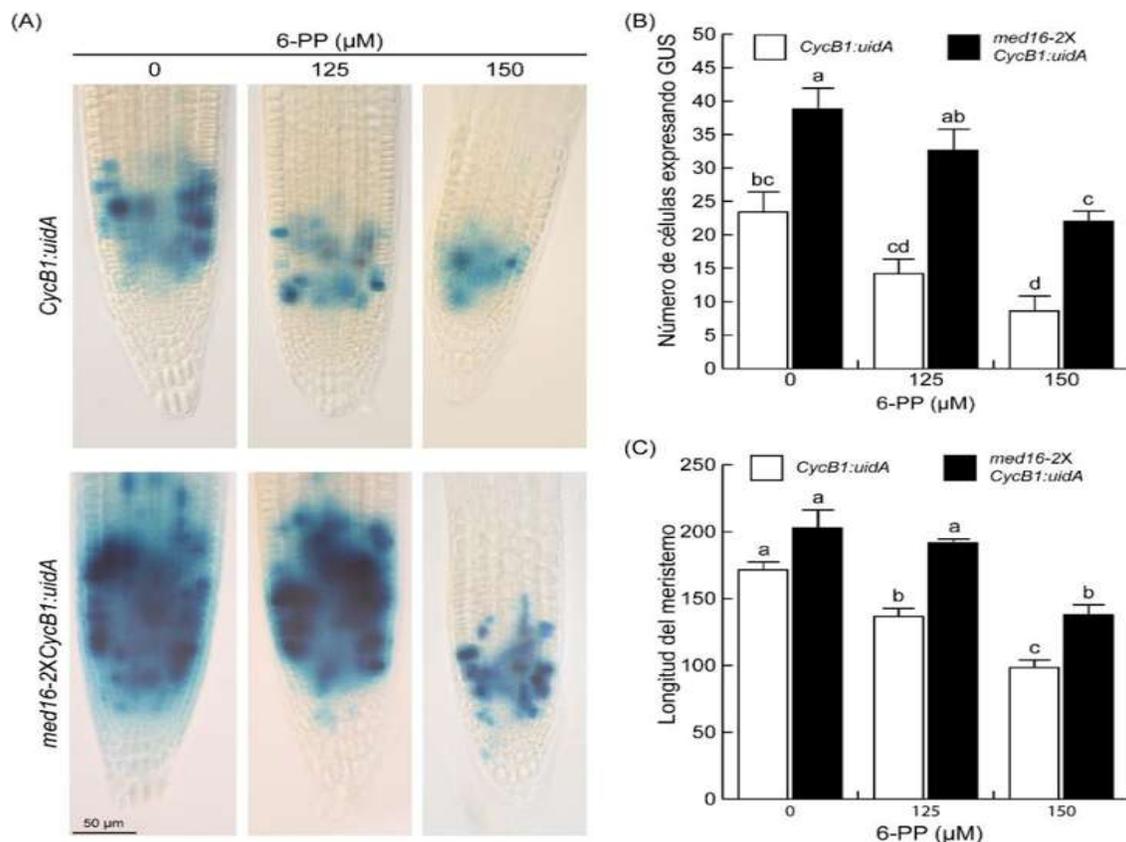


Figura 19. Efecto de la 6-PP sobre la actividad proliferativa de *med16-2*. (A) Fotografías representativas de la actividad proliferativa de la línea transgénica *CycB1:uidA* y la cruz *med16-2XCycB1:uidA* crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 125 y 150 μM de 6-PP y analizadas a los 8 ddp de edad. (B) Número de células expresando GUS. (C) Longitud del meristemo. Las barras representan el error estándar de una n=10 plantas y los grupos estadísticamente diferentes representados por letras minúsculas fueron obtenidos por una ANOVA factorial y la prueba Tukey p<0,05.

El crecimiento de la raíz primaria depende tanto de la proliferación como de la elongación celular (Alarcón *et al.*, 2014). Para evaluar cuál es la influencia de MED16 sobre la expansión celular, decidimos medir la longitud de tres células del córtex por planta en la zona de diferenciación de la raíz primaria en plántulas Col-0 y *med16-2* con 8 ddg de edad debido a que en esta zona las células han alcanzado su tamaño final. La mutación del gen *MED16* no alteró la expansión de las células del córtex (**Fig. 20**). La adición de 125 μM de 6-PP redujo aproximadamente un 20% la longitud celular de ambas líneas y en 150 μM de 6-PP Col-0 fue ligeramente más sensible que *med16-2*. En conjunto, los resultados sugieren que MED16 es un regulador del crecimiento de la raíz que actúa a través de la inhibición de la proliferación (**Fig. 19**) y que el efecto inhibitorio de la 6-PP sobre la proliferación celular es llevado a cabo en parte por la actividad regulatoria de MED16.

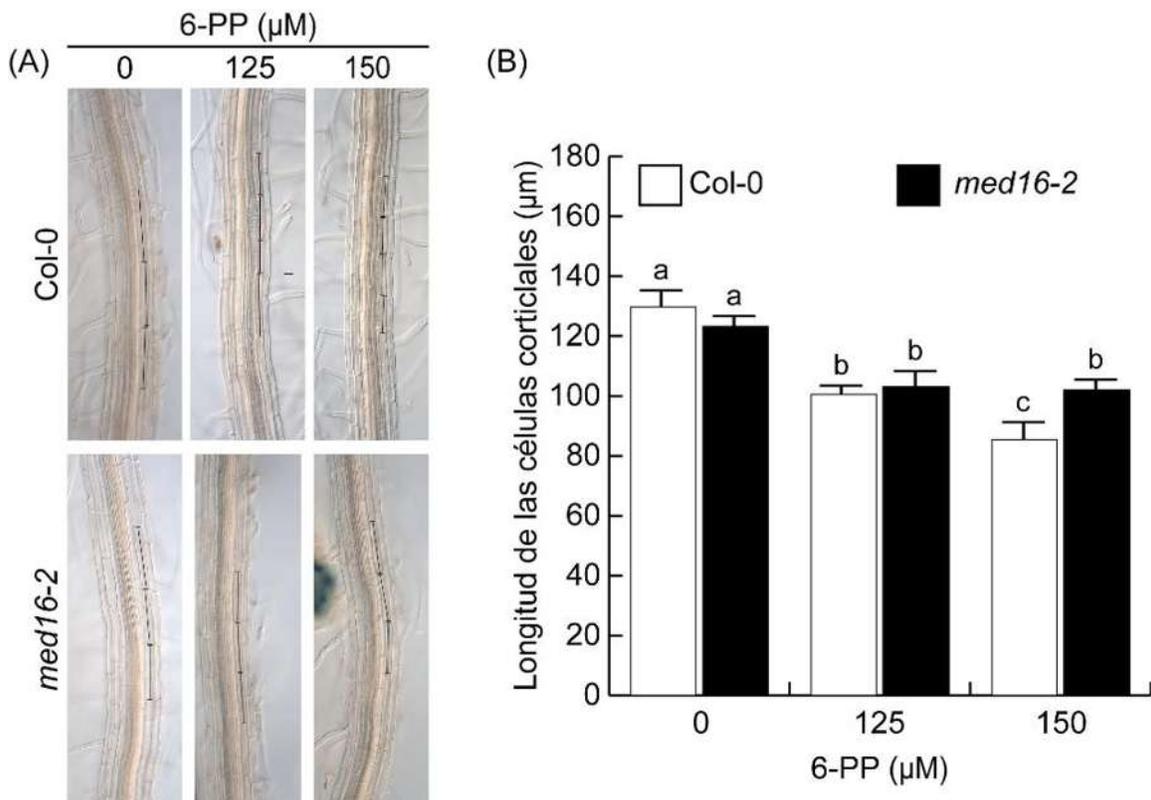


Figura 20. Efecto de la 6-PP y MED16 sobre la expansión celular de *Arabidopsis*. A) Fotografías representativas de la zona de diferenciación de la raíz primaria de Col-0 y *med16-2* crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 125 y 150 μM de 6-PP y analizadas a los 8 ddg de edad. Las barras negras indican la longitud de las células del córtex. (B) Medición de la longitud de las células del córtex. Las barras representan el error estándar de una $n=39$ células corticales y los grupos estadísticamente diferentes representados por letras minúsculas fueron obtenidos por una ANOVA factorial y la prueba Tukey $p<0,05$.

7.5. Efecto del 6-PP sobre el transporte y la acumulación de auxinas en el ápice de la raíz primaria

Anteriormente Garnica-Vergara y col. (2015) demostraron que la 6-PP no modifica la expresión del gen de respuesta a las auxinas *DR5:GFP* en el meristemo radicular y que dicho compuesto regula diferencialmente la expresión de los genes del transporte de auxinas *PIN1*, *PIN2*, *PIN3* y *PIN7*. En el presente estudio observamos que la 6-PP no modificó la expresión del gen *DR5:GFP* en meristemo de Col-0 y *med16-2* (**Fig. 21 M**). Al analizar la expresión del gen *pPIN1::PIN1::GFP* observamos que la 6-PP reprimió la expresión de *PIN1* hasta un 50% en Col-0. Interesantemente, la expresión de *PIN1* fue reducida hasta un 50% en la mutante *med16-2* y la adición de 6-PP no modificó esta respuesta (**Fig. 21 N**). Contrario a lo observado en la expresión de *PIN1*, la adición de 6-PP no alteró la expresión de *pPIN3::PIN3::GFP* en Col-0; sin embargo, incrementó ligeramente la expresión de *PIN3* en *med16-2* (**Fig. 21 O**).

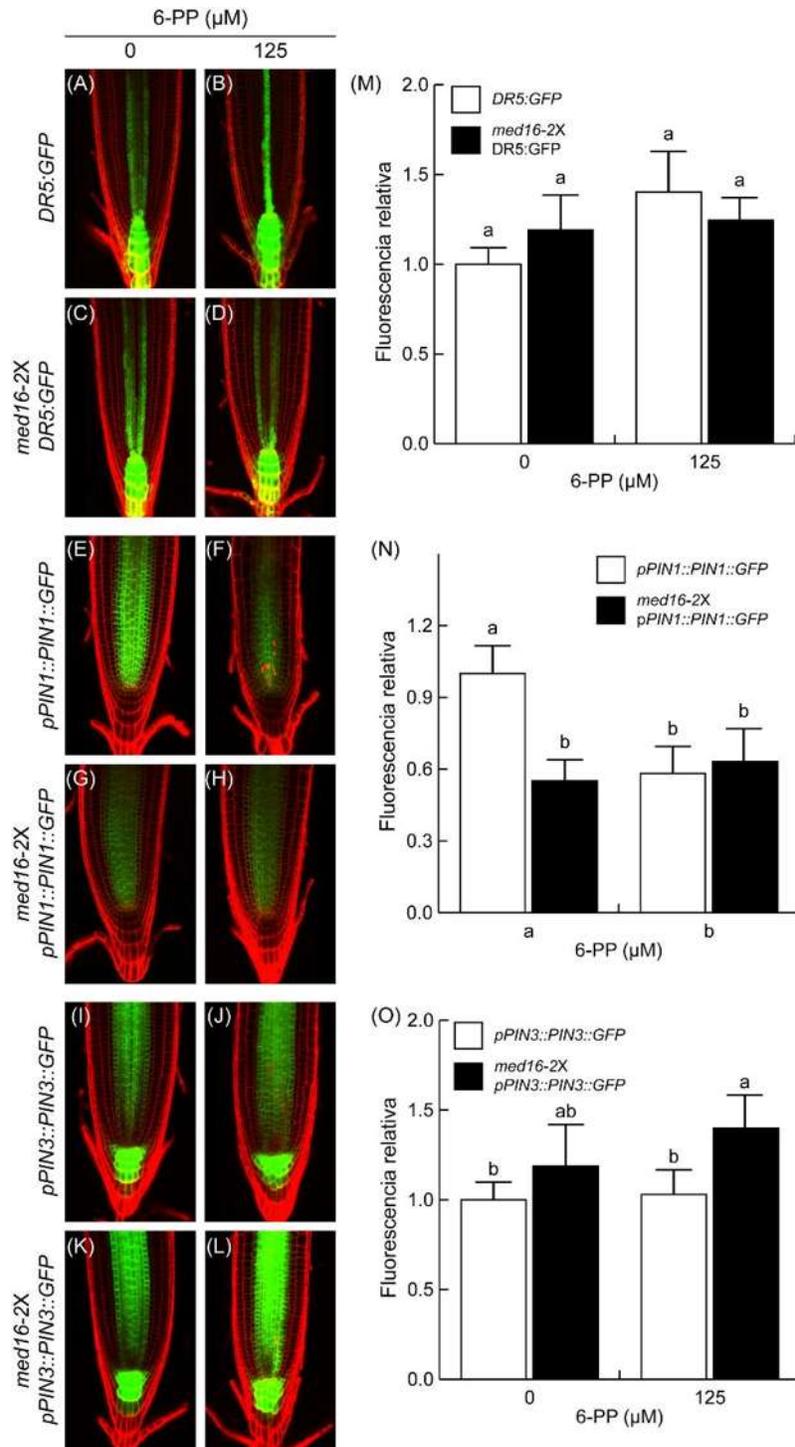


Figura 21. Efecto de la 6-PP sobre la acumulación y transporte de auxinas en *med16-2* de *Arabidopsis*. Las líneas transgénicas con los genes reporteros fueron germinadas y crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 125 μM de 6-PP. La raíz de las plántulas fue evaluada a los 8 ddg de edad por microscopía confocal. (A-D) Micrografías representativas de la expresión de *DR5::GFP*; (E-H) *PIN1::PIN1::GFP*; (I-L) *PIN3::PIN3::GFP*. (M-O) La intensidad de la fluorescencia para cada línea reportera en respuesta a la 6-PP se representa en unidades de fluorescencia relativa. Las barras representan el error estándar de una $n=10$ plantas y los grupos estadísticamente diferentes representados por letras minúsculas fueron obtenidos por una ANOVA factorial y la prueba Tukey $p < 0,05$.

7.6. La 6-PP modula la actividad del centro quiescente

El crecimiento de la raíz primaria depende de la actividad meristemática mantenida por el CQ. El factor *WOX5* mantiene la quiescencia del CQ y la pluripotencia de las iniciales del NCI (Sarkar *et al.*, 2007; Forzani *et al.*, 2014). Para determinar cómo la 6-PP afecta la actividad proliferativa en el meristemo a través de la subunidad *MED16*, decidimos evaluar la expresión del reportero *WOX5:GFP* en *Col-0* y *med16-2* en respuesta a 125 μ M de 6-PP. En las plántulas *Col-0* crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 6-PP, se detectó que la expresión de *WOX5* aumentó hasta un 90% en las células del CQ. También observamos que la 6-PP incrementa el número de células que expresan *WOX5* en *Col-0*; a diferencia de *Col-0*, la 6-PP no modificó la expresión de *WOX5* en la mutante *med16-2* (Fig. 22 A, B). Por lo tanto, la 6-PP inhibe la proliferación celular del meristemo de la raíz primaria de *Col-0* a través de la sobreexpresión de *WOX5* y requiere a *MED16* como mediador de su efecto.

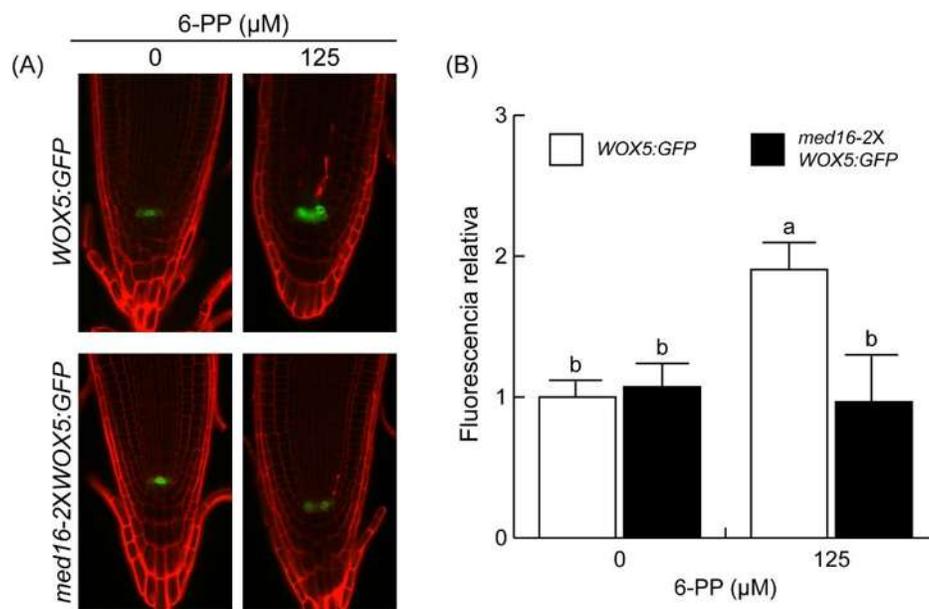


Figura 22. Efecto de la 6-PP sobre la expresión de *WOX5:GFP* en los fondos genéticos *Col-0* y *med16-2*. (A) Micrografías de microscopía confocal representativas de la expresión de *WOX5:GFP*. Las plantas fueron germinadas y crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 125 μ M de 6-PP. La raíz de las plántulas fue evaluada a los 8 ddg de edad. (B) La medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a la 6-PP se representa como unidades de fluorescencia relativa. Las barras representan el error estándar de una n=10 plantas y los grupos estadísticamente diferentes representados por letras minúsculas fueron obtenidos por una ANOVA factorial y la prueba Tukey $p < 0,05$.

7.7. La 6-PP afecta diferencialmente la expresión de *SHR* y *SCR*

Los factores *SHR* y *SCR* están involucrados en el mantenimiento del meristemo radicular, específicamente promueven la expresión de *WOX5* y controlan las divisiones asimétricas de las células iniciales (Sarkar *et al.*, 2007). Por lo que decidimos investigar cuál es la función de *MED16* y que efecto tiene la 6-PP sobre la expresión de los genes reporteros *SHR::GFP* y *SCR::HB2::YFP* en *Col-0* y *med16-2*. Observamos que la 6-PP inhibió el dominio de expresión de *SCR::HB2::YFP* de *Col-0* y *med16-2* (**Fig. 23**). Este resultado sugiere que la 6-PP no requiere de la subunidad *MED16* para inhibir la proliferación celular a través de la represión de *SCR*.

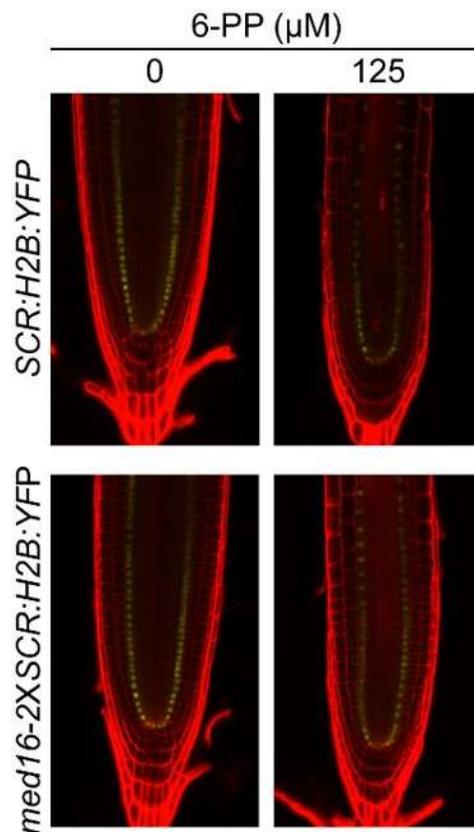


Figura 23. Efecto de la 6-PP sobre la expresión de *SCR::H2B::YFP* en el meristemo radicular de *Arabidopsis*. Micrografías representativas de la expresión de *SCR::H2B::YFP* en *Col-0* y *med16-2* obtenidas por microscopía confocal. Las plantas fueron germinadas y crecidas durante 8 ddg en medio MS 0,2X suplementado con 125 μM de 6-PP.

Al contrario del efecto observado en la expresión de *SCR::H2B::YFP*, la adición de 6-PP no modificó la expresión de *SHR:GFP* en el meristemo radicular de Col-0 y *med16-2*. Resulta interesante resaltar que la mutación del gen *MED16* provocó la reducción en aproximadamente el 50% de la expresión de *SHR:GFP*, respecto a la observada en Col-0 (**Fig. 24 A, B**).

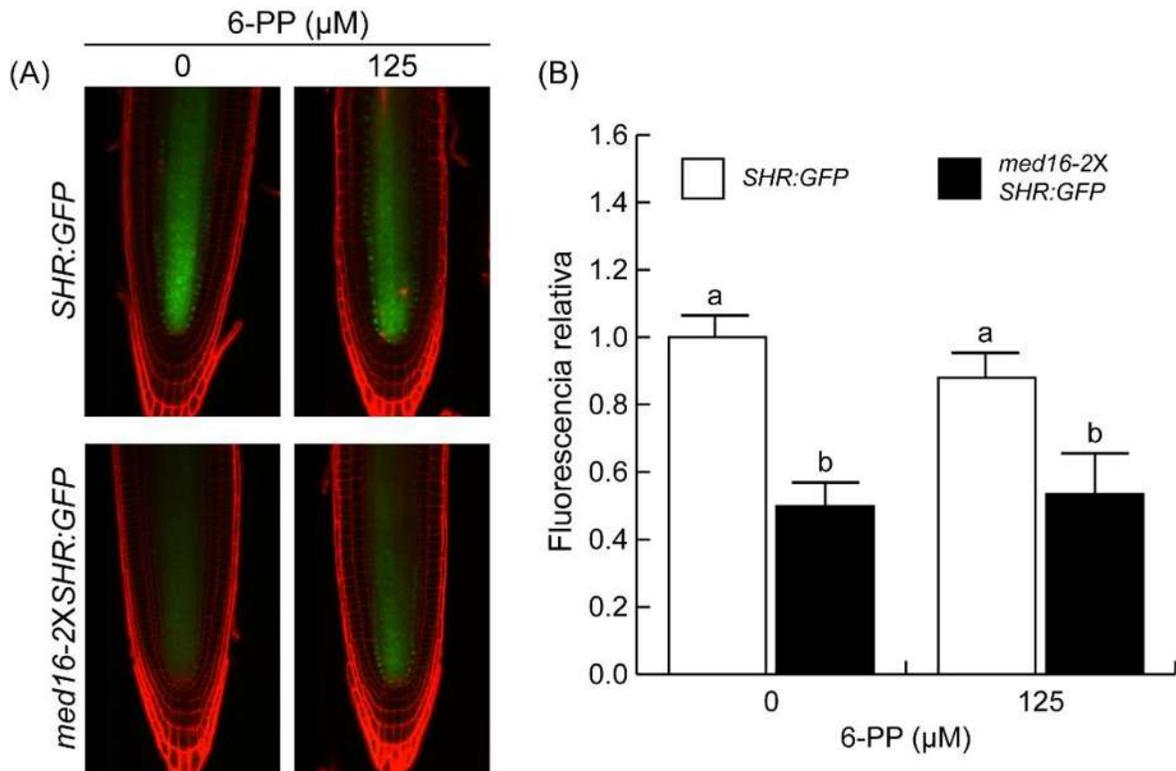


Figura 24. Efecto de la 6-PP sobre la expresión de *SHR:GFP* en el meristemo radicular de *Arabidopsis*. (A) Fotografías representativas de la expresión de *SHR:GFP* en Col-0 y *med16-2* obtenidas por microscopía confocal. Las plantas fueron germinadas y crecidas durante 8 ddg en medio MS 0,2X suplementado con 125 y 150 μM de 6-PP. (B) La medición de la intensidad de fluorescencia del gen reportero en respuesta a la 6-PP se representa como unidades de fluorescencia relativa. Las barras representan el error estándar de una n=10 plantas y los grupos estadísticamente diferentes representados por letras minúsculas fueron obtenidos por una ANOVA factorial y la prueba Tukey $p < 0,05$.

7.8. La subunidad MED16 regula el desarrollo de las raíces laterales

Resultados anteriores mostraron que la 6-PP indujo mayor número de RL emergidas en Col-0, mientras que la mutante *med16-2* presentó mayor cantidad de RL desde el control (**Fig. 18E**). Para caracterizar detalladamente la formación

de las RL en plántulas Col-0 y *med16-2* con 4 ddg de edad, cuantificamos las etapas del desarrollo de los PRL (I-VII) y las RL emergidas en respuesta a 125 μ M de 6-PP. En la **figura 25 A** se puede observar que *med16-2* y la 6-PP no alteraron el desarrollo de las etapas de los PRL; sin embargo, la mutante *med16-2* presentó mayor número de RL emergidas con respecto a control. Para ampliar el escrutinio del desarrollo de RL en *med16-2*, cuantificamos las RL emergidas en plántulas con 2, 4 y 6 ddg de edad en respuesta a 125 μ M de 6-PP. La 6-PP incrementó hasta 2.5 veces el número de RL emergidas en Col-0 desde el 6 ddg respecto al control. Nuevamente, los datos obtenidos indicaron que la mutación del gen *MED16* incrementó hasta 6 veces el número de RL emergidas en plántulas con 4 o 6 ddg de edad, respecto a Col-0 control. La adición de 6-PP no modificó el desarrollo de las RL en *med16-2* (**Fig. 25 B**). Posteriormente, cuantificamos los PRL en plántulas con 4 ddg de edad, tratadas con 125 μ M de 6-PP. La mutante *med16-2* posee la misma cantidad de PRL que Col-0 en condiciones control y con 6-PP (**Fig. 25 C**). Col-0 y *med16-2* mostraron la misma densidad de primordios de RL en condiciones control. Sin embargo, la densidad de PRL disminuyó en *med16-2* cuando se expuso a 125 μ M de 6-PP (**Fig. 25 D**).

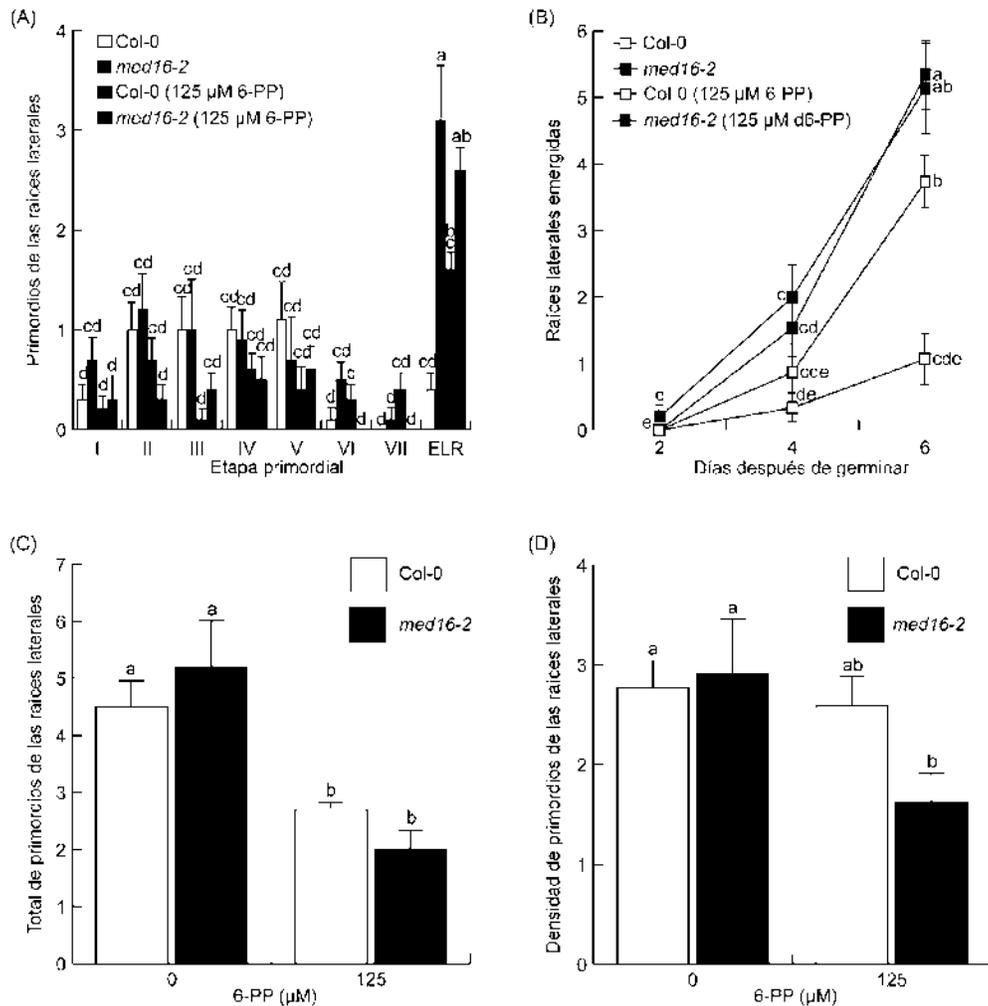


Figura 25. Efecto de la mutación *med16-2* en el desarrollo de las raíces laterales de *Arabidopsis thaliana*. Semillas Col-0 y *med16-2* fueron germinadas y crecidas durante 2, 4 y 6 ddg en medio MS 0,2X suplementado con 125 μM de 6-PP. (A) Primordios de las raíces laterales (PRL) en plántulas con 4 ddg de edad. (B) Cinética de las RL emergidas en plántulas con 2, 4 y 6 ddg de edad. (C) Total de PRL por planta en plántulas con 4 ddg de edad. (D) Densidad de las RL en plántulas con 4 ddg de edad. Las barras representan el error estándar de una n=15 plantas y los grupos estadísticamente diferentes representados por letras minúsculas fueron obtenidos por una ANOVA factorial y la prueba Tukey p<0,05.

7.9. Expresión del gen reportero *DR5:GFP* en los primordios de las raíces laterales de Col-0 y *med16-2* en respuesta a la 6-PP

El efecto promotor de la 6-PP sobre la ramificación de las RL en Col-0 es provocado por el incremento del flujo de auxinas hacia los PRL (Garnica-Vergara *et al.*, 2015). Para evaluar cuál es la influencia de MED16 sobre la señalización y/o acumulación de auxinas en los PRL, analizamos la expresión del gen reportero *DR5:GFP* en las plántulas silvestre y mutante *med16-2* tratadas con 125 μM de 6-

PP. De acuerdo a lo reportado por Garnica-Vergara y col. (2015), el compuesto fúngico promovió la expresión de *DR5:GFP* en las etapas I-VII del desarrollo de los PRL. En la **figura 26** se puede observar que la expresión del gen *DR5:GFP* disminuyó en los tejidos vasculares, los PRL y las RL emergidas de *med16-2* desde la condición control; además, la 6-PP no promovió la expresión *DR5:GFP* en la mutante.

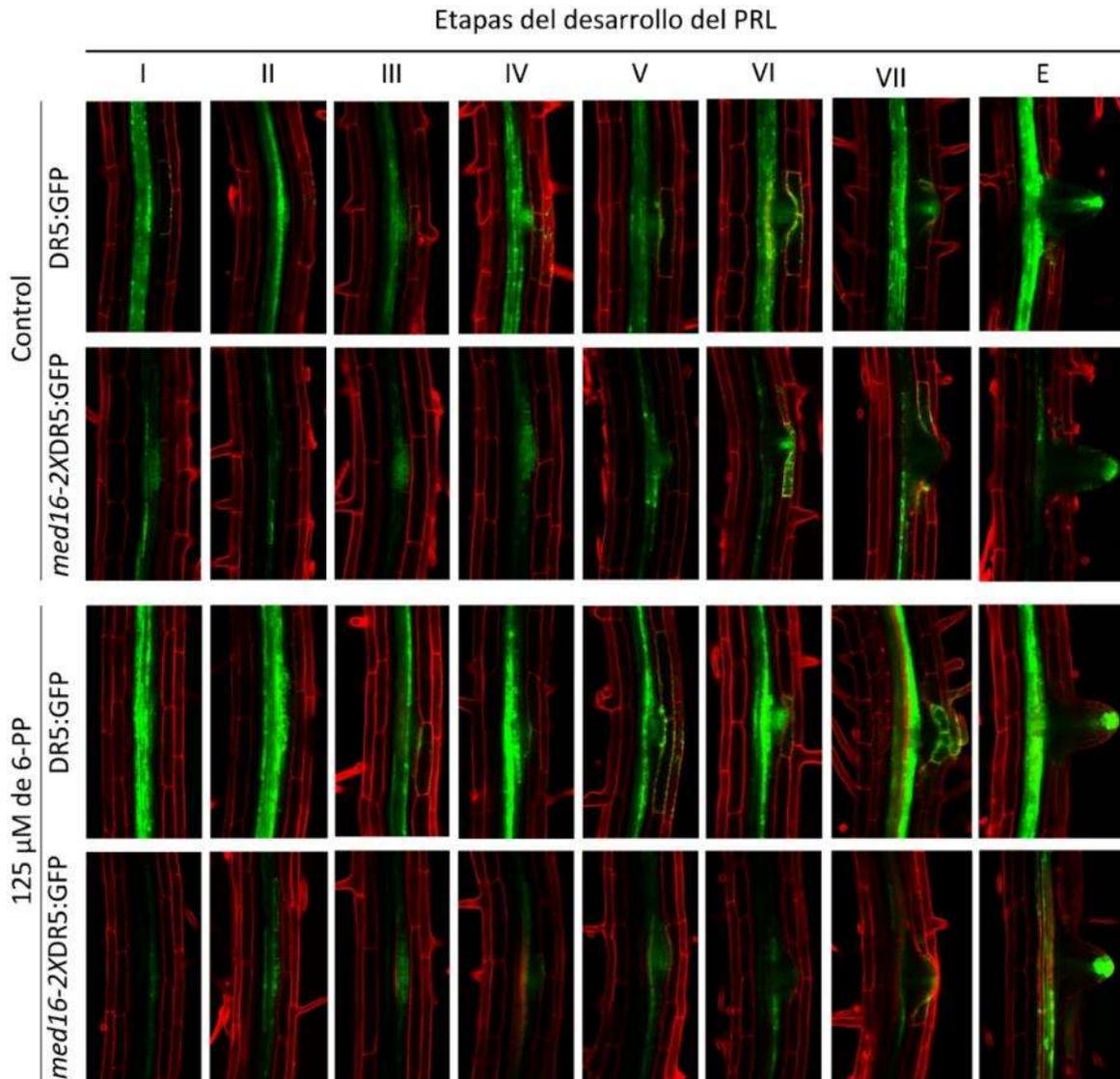


Figura 26. Efecto de la 6-PP en la expresión del gen reportero *DR5:GFP* durante la formación de las raíces laterales en plantas *Col-0* y *med16-2*. Las micrografías muestran la expresión de *DR5:GFP* en los PRL y las RL emergidas de la raíz de *Col-0* y *med16-2* germinadas y crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 125 µM de 6-PP. Los análisis se realizaron en plántulas con 4-7 ddd de edad por microscopía confocal.

7.10. Expresión de *PIN1* y *PIN3* en los primordios de las raíces laterales de Col-0 y *med16-2* en respuesta a la 6-PP

Los datos anteriores sugieren que la mutante *med16-2* podría haber presentado una deficiencia en el transporte de auxinas hacia los PRL. El transportador *PIN1* es necesario para establecer el gradiente de auxinas, mientras que el transportador *PIN3* establece el flujo de auxinas hacia las células de la endodermis para promover el surgimiento de las raíces laterales (Benková *et al.*, 2003; Marhavý *et al.*, 2013). Para evaluar cuál es la influencia de *MED16* sobre la expresión de los transportadores *PIN*, analizamos la expresión las líneas transgénicas *pPIN1::PIN1::GFP* y *pPIN3::PIN3::GFP* en las plántulas silvestre y mutante *med16-2* tratadas con 125 μ M de 6-PP. Como observamos en la **figura 27**, el compuesto fúngico y la mutación del gen *MED16* no modificaron la expresión del gen reportero *pPIN1::PIN1::GFP* en los tejidos vasculares, los PRL o las RL emergidas.

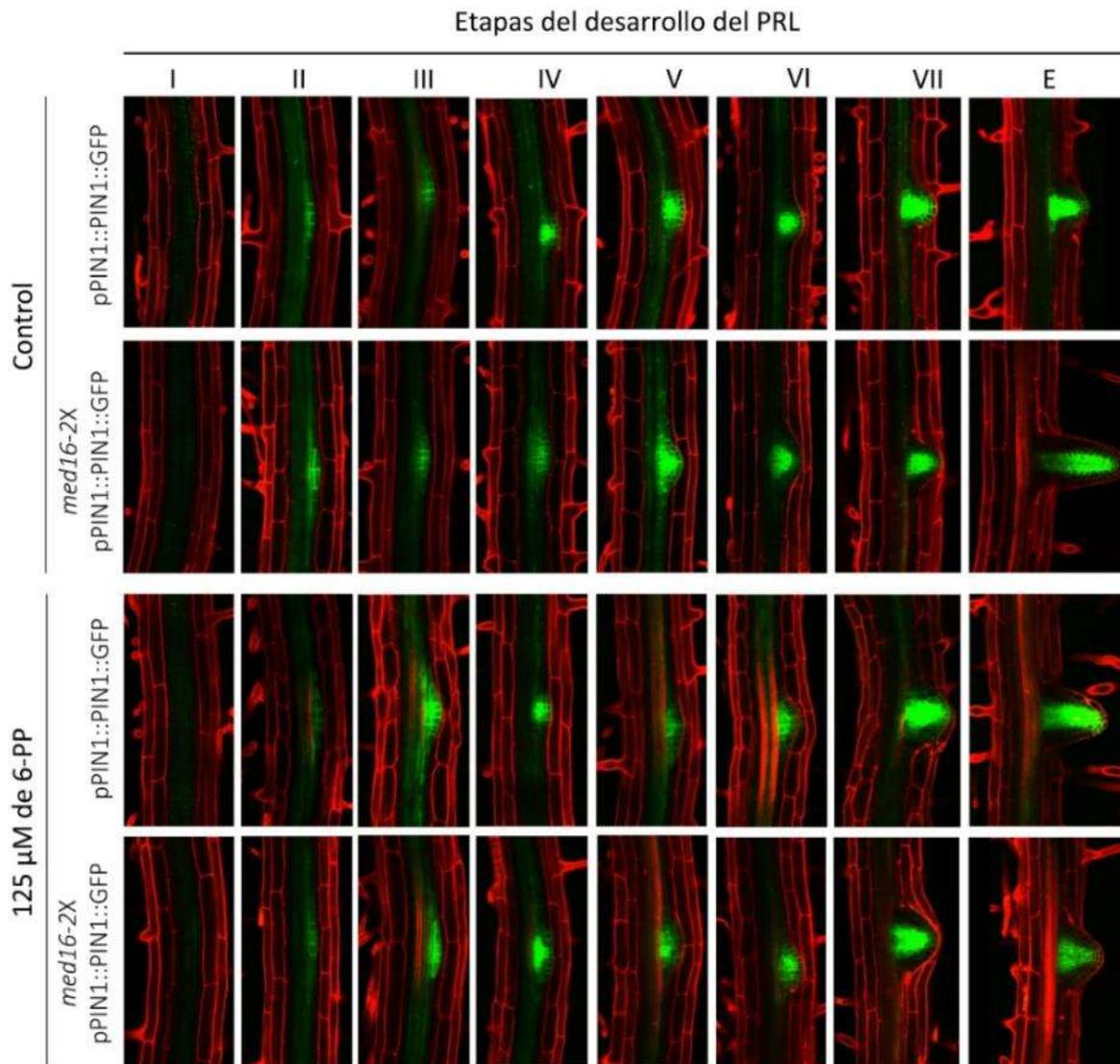


Figura 27. Expresión de la línea transgénica *pPIN1::PIN1::GFP* en las plantas silvestre y mutante *med16-2*. Las micrografías son representativas de la expresión de *pPIN1::PIN1::GFP* en los PRL y las RL emergidas de Col-0 y *med16-2* germinadas y crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 125 μM de 6-PP. Los análisis se realizaron en plántulas con 4-7 ddd de edad por microscopía confocal.

Al evaluar la expresión de *pPIN3::PIN3::GFP* se observó que la 6-PP incrementa la expresión de *PIN3* en los tejidos vasculares, los PRL y las RL emergidas de Col-0. La mutación en el gen *MED16* incrementó de la expresión de *PIN3* en los tejidos vasculares, los PRL y las RL emergidas; además, la 6-PP no modificó la expresión *PIN3* en la mutante (**Fig. 28**).

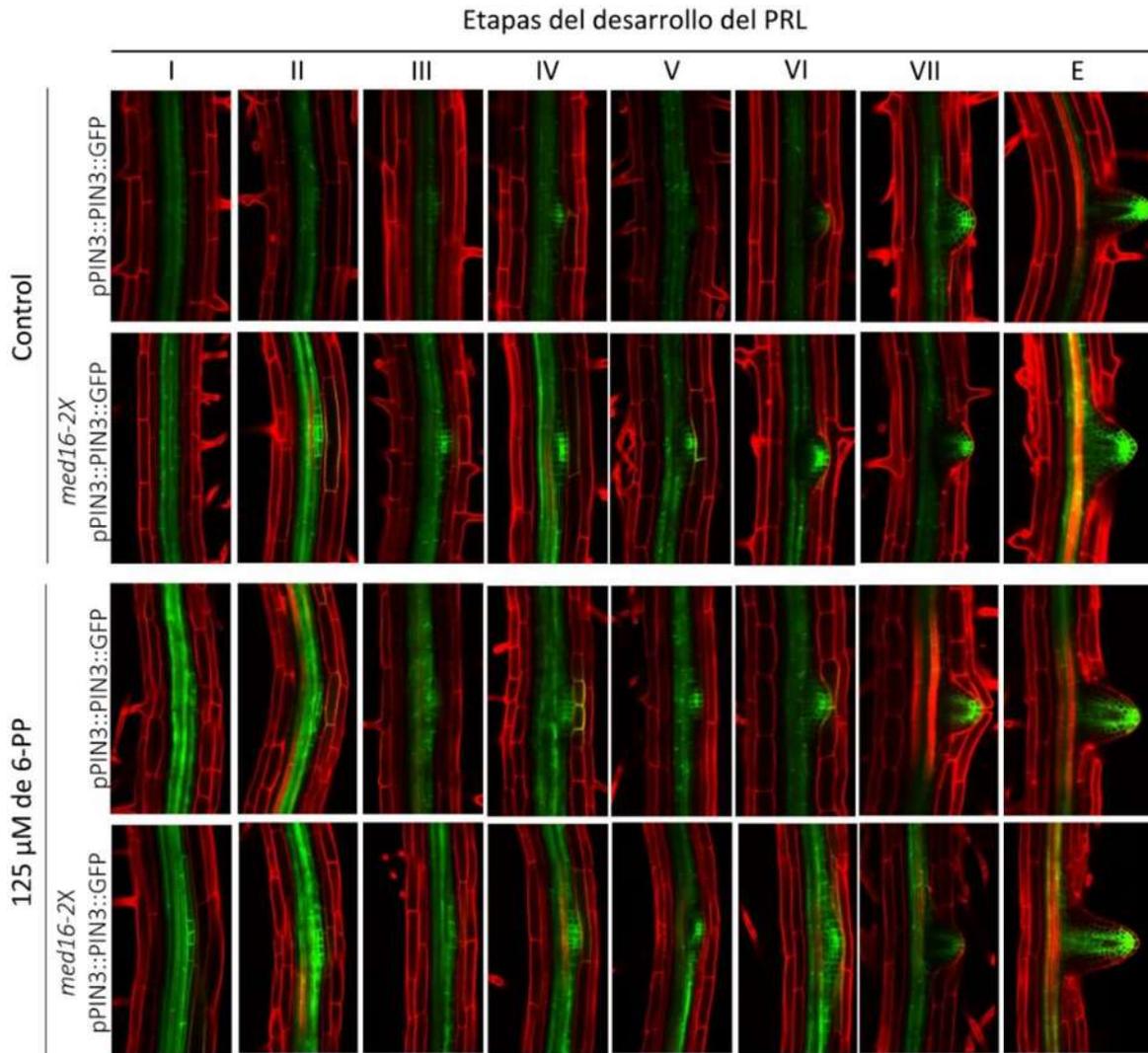


Figura 28. Expresión de la línea transgénica *pPIN3::PIN3::GFP* en las plantas silvestre y mutante *med16-2*. Las micrografías son representativas de la expresión de *pPIN3::PIN3::GFP* en los PRL y las RL emergidas de Col-0 y *med16-2* germinadas y crecidas en medio MS 0,2X suplementado con 125 μM de 6-PP. Los análisis se realizaron en plántulas con 4-7 ddd de edad por microscopía confocal.

8. DISCUSIÓN

8.1. La subunidad MED16 es un regulador del crecimiento radicular

Las subunidades que integran el complejo MEDIADOR (CM) de las plantas están implicadas en múltiples procesos biológicos, como la tolerancia al estrés biótico y abiótico, la señalización hormonal y el desarrollo vegetal (Buendía-Monreal y Gillmor, 2016; Dwivedi *et al.*, 2017). Sin embargo, considerando que el

CM es un componente esencial de la transcripción genética, se conoce escasamente cual es la participación del CM en el desarrollo del sistema radicular. Hasta el momento solo las subunidades MED12, MED13 y PFT1/MED25 se han relacionado con el crecimiento radicular de *Arabidopsis* (Raya-González *et al.*, 2014; Raya-González *et al* 2017). En particular, la subunidad MED25 está involucrada en la regulación de la arquitectura radicular debido a que la mutante *pft1-2/med25* desarrolla una raíz primaria más larga y más raíces laterales como consecuencia del incremento en el transporte de auxinas, y de la división y expansión celular (Raya-González *et al.*, 2014).

En este estudio se investigó cuál es la influencia de MED16 sobre la arquitectura radicular de *Arabidopsis*. Los resultados revelaron que la mutante *med16-2* presentó mayor crecimiento de la raíz primaria y número de raíces laterales (RL) emergidas desde las condiciones control respecto a Col-0 (**Fig. 16 A, B**). Para investigar si MED16 es un regulador el crecimiento de la raíz primaria que actúa a través de la proliferación y/o la expansión celular, analizamos la expresión del gen reportero *CycB1:uidA* y medimos la longitud de las células corticales diferenciadas de la raíz primaria en la mutante *med16-2*. Los resultados revelaron que la mutación del gen *MED16* no modifica la expansión de las células corticales en condiciones control (**Fig. 20**), en tanto que la proliferación celular fue hasta dos veces más activa en *med16-2* que en Col-0 (**Fig. 17B**). Estos resultados sugieren que la subunidad MED16 es un regulador negativo de la división celular en el meristemo de la raíz primaria. Debemos destacar que *med16-2* alcanzó desde los primeros días del desarrollo radicular su máxima actividad proliferativa (**Fig. 17**).

El tamaño del meristemo es un indicador de la proliferación celular promovida por las auxinas a través del incremento en la expresión de genes que codifican para las ciclinas (CYCA, CYCB y CYCD) y las CDKs (CDKA y CDKB) que regulan al ciclo celular (Hemerly *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1994). El flujo de auxinas hacia el ápice de la raíz está asociado con una alta actividad proliferativa (Grieneisen *et al.*, 2007). Para entender cómo es que MED16 regula la proliferación celular por medio de las auxinas decidimos analizar la expresión del reportero de respuesta a

las auxinas *DR5:GFP* en *med16-2*. La expresión del gen reportero *DR5:GFP* no cambió en el meristemo radicular de *med16-2* (**Fig. 21M**). Esto indica que MED16 regula la proliferación por mecanismos independientes a la señalización y/o acumulación de auxinas.

El crecimiento de la raíz depende de la actividad de los factores que participan en el mantenimiento del meristemo. El complejo SHR-SCR promueve la expresión de *WOX5* y controlan la divisiones asimétricas que originan a la endodermis y córtex (Nakajima *et al.*, 2001; Cruz-Ramírez *et al.*, 2012). Para explorar el posible mecanismo a través del cual MED16 regula la división celular por medio de los factores *WOX5*, *SHR* o *SCR*, decidimos analizar la expresión de las líneas reporteras *WOX5:GFP*, *SCR:H2B:YFP* y *SHR:GFP* en la raíz primaria de *med16-2*. La mutación en el gen *MED16* no provocó cambios en la expresión de *WOX5* y *SCR* en condiciones control (**Figs. 22, 23**). Sin embargo, en la mutante *med16-2* la expresión de *SHR* se redujo hasta un 50% en comparación con Col-0 en condiciones control (**Fig. 24**). Se sabe que el factor *SHR* funciona de forma concentración dependiente y su abundancia cambia a medida que la raíz se desarrolla. La expresión alta de *SHR* inhibe la división periclinal de la endodermis, mientras que los niveles intermedios de *SHR* promueven la formación del córtex (Koizumi *et al.*, 2012). Wang y col. (2011) reportaron que la supresión del 20-80% de la expresión de *PtSHR* y *AtSHR* en *Populus tremula* y *Arabidopsis thaliana* respectivamente, conduce a un crecimiento vegetal acelerado debido al incremento de la proliferación celular. Específicamente en *Arabidopsis*, la desregulación de *AtSHR* provocó la germinación prematura de las semillas y un crecimiento acelerado postembrionario que se reflejó en un incremento de la longitud de la raíz primaria y los cotiledones (Wang *et al.*, 2011). A la luz de los resultados, la subunidad MED16 surge como un regulador negativo de la proliferación celular en el meristemo de la raíz primaria que actúa a través de: I) la regulación parcial de la expresión del factor *SHR*, cuya reducción de la expresión del 20-80% impulsa la proliferación celular del NCP; o bien, II) como un regulador negativo de la actividad de la proteína CYCB1 durante la progresión de la fase G2-M del ciclo celular.

8.2. La subunidad MED16 es un regulador negativo del desarrollo de los primordios de las raíces laterales

El presente estudio mostró que la mutante *med16-2* del gen *MED16* incrementa el número de RL emergidas. La formación de las RL es un proceso coordinado por el TPA y la señalización de auxinas (Malamy y Benfey 1997; Lavenus *et al.*, 2013). Para evaluar si la subunidad MED16 es un regulador negativo de la formación de las RL que actúa a través de mecanismos auxínicos, evaluamos la expresión de la línea reportera de respuesta a las auxinas *DR5:GFP* en la mutante *med16-2*. Contrario a lo observado en la raíz primaria en condiciones control (**Fig. 21M**), la mutante *med16-2* mostró una expresión reducida del reportero *DR5:GFP* en el haz vascular, los PRL, y las RL emergidas y esto indica una baja concentración de auxinas en las zonas del desarrollo de las RL (**Fig. 26**). Los niveles bajos de auxinas podrían estar asociados a un transporte auxínico deficiente por lo que analizamos el nivel de proteínas transportadoras de eflujo de auxinas, utilizando las líneas *pPIN1::PIN1::GFP* y *pPIN3::PIN3::GFP*. En el desarrollo de las RL el transportador PIN1 es necesario para el establecimiento de un gradiente de auxinas con la máxima acumulación en la punta del PRL (Benková *et al.*, 2003). Mientras que, el transportador PIN3 establece el flujo de auxinas hacia las células de la endodermis para inducir su rompimiento y promover el desarrollo del PRL (Marhavý *et al.*, 2013). Sin embargo, el nivel de PIN1 en la mutante fue similar al control (**Fig. 27**); mientras que, el nivel de PIN3 se incrementó (**Fig. 28**). Por lo tanto, la reducción del flujo auxínico en la raíz de la mutante *med16-2* no fue ocasionada por la inhibición del TPA.

La disminución de los niveles auxínicos en la raíz de *Arabidopsis* provocados por compuestos inhibidores del TPA como el ácido N-1-naftiltalámico (NPA) o el ácido 2,3,5-triyodobenzoico (TIBA) reducen el número de RL emergidas por planta (Casimiro *et al.*, 2001; López-Bucio *et al.*, 2002). Sin embargo, la disminución en la expresión del reportero *DR5:GFP* contrastó con el fenotipo mostrado por *med16-2* que presentó mayor cantidad de RL que el control. No obstante, el nivel del transportador PIN3 incrementó en *med16-2*. Los datos anteriores sugieren que en

la mutante *med16-2* un flujo mínimo de auxinas fue suficiente para iniciar con el desarrollo de las RL, mientras que el flujo de auxinas hacia la endodermis promovido por el transportador PIN3 estimuló su emergencia.

Ante dicha evidencia experimental se propone como alternativa para un futuro trabajo, realizar una caracterización de la biosíntesis de auxinas en la mutante *med16-2*, así como de otros genes transportadores de auxinas como *AUX1*, *LAX3*, *PIN2*, y *ABCB19* para determinar que ocasiona el flujo deficiente de auxinas hacia los PRL (Marchant *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2007; Swarup *et al.*, 2008). Alternativamente también se propone realizar ensayos de sensibilidad de auxinas, así como generar dobles mutantes con los genes que participan en la vía de señalización de auxinas para determinar si MED16 regula la actividad de algunos de estos elementos.

8.3. La subunidad MED16 regula el efecto de la 6-PP sobre el crecimiento de la raíz de *Arabidopsis*

Recientemente se reportó que la 6-PP, un COV producido por hongos del género *Trichoderma*, regula la configuración de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* de manera dependiente de la concentración. En dicho trabajo se observó que las concentraciones de 75-150 μM de 6-PP incrementaron el número de RL emergidas por planta; mientras que, a partir de 125 μM se inhibió el crecimiento de la raíz primaria (Garnica-Vergara *et al.*, 2015). Para evaluar cuál es la participación de MED16 en el efecto de la 6-PP sobre el crecimiento de la raíz primaria y las RL, crecimos a la mutante *med16-2* en presencia de 125 y 150 μM de 6-PP, dos concentraciones que inhibieron del crecimiento de la raíz primaria y estimularon el desarrollo de las RL en Col-0 (Garnica-Vergara *et al.*, 2015). Los análisis de la arquitectura radicular revelaron que *med16-2* fue resistente a la inhibición del crecimiento de la raíz primaria y al efecto promotor de las RL (**Figs. 18, 25**).

Garnica-Vergara y col. (2015) reportaron que la 6-PP inhibe el crecimiento de la raíz primaria a través de la represión de la actividad proliferativa del meristemo radicular; así que evaluamos la actividad proliferativa de *med16-2*, por medio del gen reportero *CyCB1:uidA*. Los análisis evidenciaron que 125 μ M de 6-PP no afectó la actividad proliferativa de *med16-2*; sin embargo, 150 μ M de 6-PP inhibió hasta un 44% la actividad proliferativa de la mutante (**Fig. 19**). También analizamos la expresión de las líneas transgénicas *WOX5:GFP*, *SHR:GFP* y *SCR:H2B:GFP* en la mutante *med16-2* con 125 μ M de 6-PP. Los resultados mostraron que la 6-PP no modifica la expresión de *SHR* en Col-0 ni en *med16-2* (**Fig. 24**), en cambio inhibió el dominio de expresión de *SCR* en Col-0 y *med16-2* de manera similar (**Fig. 23**). Por otra parte, el volátil 6-PP incrementó la expresión de *WOX5* en Col-0 mientras que en *med16-2* permaneció igual que la condición control. El factor *WOX5* impide la división mitótica de las células del CQ y mantiene indiferenciadas a las CIC (Forzani *et al.*, 2014; Pi *et al.*, 2015). Análisis con la línea transgénica sobreexpresora 35S-*WOX5* mostraron que la sobreexpresión de *WOX5* inhibe el crecimiento de la raíz al promover la división de las iniciales e impedir la diferenciación celular (Sarkar *et al.*, 2007). Estos resultados sugieren que la 6-PP actúa a través de *MED16* para estimular la expresión de *WOX5* e inhibir el crecimiento de la raíz primaria.

Previamente Garnica-Vergara y col. (2015) observaron que 75 y 150 μ M de 6-PP no modificaron los niveles de expresión del reportero de auxinas *DR5:GFP* en el meristemo de la raíz primaria; mientras que, incrementó el flujo de auxinas en los PRL. Asociado con el incremento del flujo de auxinas en los PRL, 75 μ M de 6-PP aumentó la expresión de los genes *PIN1*, *PIN2* y *PIN3* en el meristemo de la raíz primaria (Garnica-Vergara *et al.*, 2015). Por lo tanto, evaluamos las líneas reporteras de *Arabidopsis* *DR5:GFP*, *pPIN1::PIN1::GFP* y *pPIN3::PIN3::GFP* en la raíz primaria y los PRL de Col-0 y *med16-2* con 6-PP. En el presente estudio encontramos que 125 μ M de 6-PP no modifica la expresión del reportero *DR5:GFP* en el meristemo de Col-0 y *med16-2* (**Fig. 21M**). Sorpresivamente, la expresión de *PIN1* se mostró disminuida en el meristemo de la raíz primaria de *med16-2* desde la condición control y la adición de 125 μ M de 6-PP no afecta su

expresión (**Fig. 21N**). Contrario a lo reportado por Garnica-Vergara y col. (2015) la adición de 6-PP no modificó la expresión de *PIN3* en Col-0 y solo mostró un ligero incremento en el meristemo de *med16-2* (**Fig. 21O**).

En los PRL observamos que 125 μ M de 6-PP incrementó la expresión del reportero *DR5:GFP* en Col-0; sin embargo, en *med16-2* observamos niveles bajos de expresión desde la condición control y la adición de 6-PP no modificó esta respuesta (**Fig. 26**). Además, observamos que la mutación del gen *MED16* no modifica el nivel del transportador PIN1, en tanto que incrementó el nivel del transportador PIN3 en condiciones control. Interesantemente, la adición de 125 μ M de 6-PP no modificó el nivel de PIN1 y PIN3 mostrada por la mutante *med16-2* (**Figs. 27, 28**). Lo anterior nos sugiere que MED16 no tiene relación con el efecto provocado por la 6-PP durante el desarrollo de los PRL.

Por consiguiente, proponemos a la subunidad MED16 como un modulador de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*. Los resultados revelaron que la 6-PP actuó a través de MED16 por mecanismos aún desconocidos para incrementar la expresión de *WOX5*, el cual está asociado con el bloqueo de la diferenciación celular (Sarkar *et al.*, 2007). En cambio, la 6-PP inhibió la expresión de *SCR* en Col-0 y *med16-2*, un factor de transcripción asociado con la promoción de las divisiones asimétricas que originan a las células endodermis/córtex (Cruz-Ramírez *et al.*, 2012). Por lo tanto, lo anterior sugiere que la 6-PP inhibió el crecimiento de la raíz primaria de las plantas silvestres al disminuir la frecuencia de la división y la diferenciación celular en el meristemo de manera dependiente e independiente de MED16 (**Fig. 29**).

También encontramos que la subunidad MED16 es un regulador de la arquitectura radicular de *Arabidopsis* y que actúa a través de la inhibición de la proliferación celular por dos posibles mecanismos: I) influyendo a SHR, que es un factor móvil que regula la proliferación celular de forma dependiente de la concentración. Niveles altos de SHR en el meristemo provocan la división asimétrica de las células iniciales, mientras que niveles intermedios impulsan la proliferación celular del NCP (Wang *et al.*, 2011; Koizumi *et al.*, 2012). Proponemos que MED16 está

involucrado en la regulación positiva de la expresión de *SHR* para impedir que las células se dividan desmesuradamente. II) *MED16* actúa como un regulador negativo de la actividad de las proteínas *CYCB* necesarias para permitir la progresión de las fases G2/M del ciclo celular, a la vez que regula negativamente la expresión de *PIN3* (**Fig. 29**).

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el gen *MEDIATOR16*, que codifica para la subunidad *MED16* del CM, es un regulador de la arquitectura radicular de *Arabidopsis thaliana*. Los análisis de la proliferación celular mostraron que *MED16* controla la frecuencia de la división en el meristemo de la raíz primaria y el desarrollo de las raíces laterales a través de la regulación positiva de la expresión de *SHR*, o bien, a través de la regulación negativa de la actividad de la proteína *CYCB1* durante la progresión de las fases Gap2-Mitosis del ciclo celular por mecanismos independientes a la acumulación y/o señalización de auxinas. Sin embargo, *MED16* parece controlar la expresión de los genes *PIN1* y *PIN3*, dos transportadores involucrados en el desarrollo de las raíces laterales. Por otra parte, también encontramos que la 6-PP actúa a través de la subunidad *MED16* para regular positivamente la expresión de *WOX5*. Finalmente, observamos que la 6-PP regula negativamente la expresión del *SCR*, por lo que el efecto inhibitorio de la 6-PP en el crecimiento de la raíz primaria es causado por un desbalance entre los eventos de la proliferación y diferenciación en el meristemo radicular (**Fig. 29**).

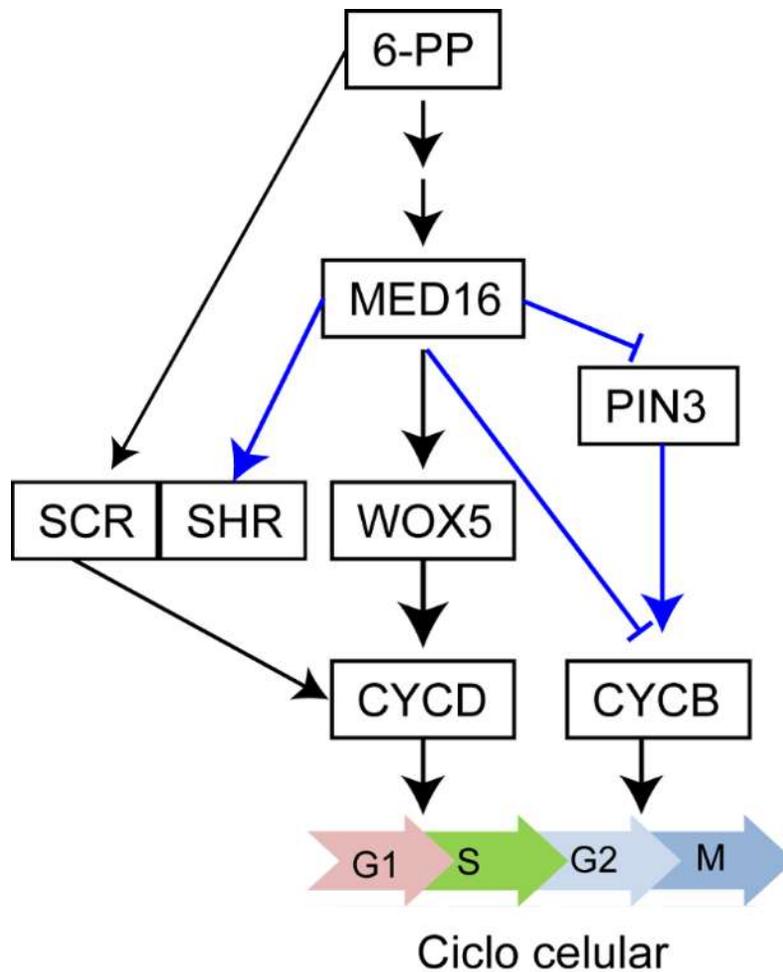


Figura 29. Modelo propuesto sobre la participación de MED16 en la señalización de la 6-PP y la regulación de la arquitectura radicular de *Arabidopsis*. Las líneas negras indican la señalización promovida por el efecto de la 6-PP y las líneas azules indican la señalización exclusiva de MED16. 6-PP actúa por mecanismos desconocidos a través de MED16 para regular positivamente la expresión de WOX5, a la vez que regula negativamente la expresión de SHR. Las líneas azules indican la señalización regulada por MED16. La subunidad MED16 actúa por dos posibles mecanismos para inhibir la división celular en el meristemo de la raíz primaria. i) MED16 regula positivamente a SHR para impedir la proliferación del NCP. ii) MED16 puede actuar como un regulador negativo de la actividad de las proteínas CYCB1 necesaria para permitir la progresión de las fases G2/M del ciclo celular y también actúa como un inhibidor de la expresión de PIN3 durante la formación de las raíces laterales.

10.REFERENCIAS

- Abrash E.B. & Bergmann D.C. (2009).** Asymmetric cell divisions: a view from plant development. *Developmental Cell* 16:783-196.
- Aida M., Beis D., Heidstra R., Willemsen V., Blilou I., Galinha C., Nussaume L., Noh Y-S., Amasino R. & Scheres B. (2004).** The *PLETHORA* genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* 119:109–120.
- Alarcón M.V., Lloret P.G. & Salguero J. (2014).** Synergistic action of auxin and ethylene on root elongation inhibition is caused by a reduction of epidermal cell length. *Plant Signaling & Behavior* 9:3.
- Asturias F.J., Jiang Y.W., Myers L.C., Gustafsson C.M. & Kornberg R.D. (1999).** Conserved structure of Mediator and RNA Polymerase II holoenzyme. *Science* 283:985-987.
- Bäckström S., Elfving N., Nilsson R., Wingsle G. & Björklund S. (2007).** Purification of plant Mediator from *Arabidopsis thaliana* identifies PFT1 as the Med25 subunit. *Molecular Cell* 26:717-729.
- Barrada A., Montane M.H., Robaglia C. & Menand B. (2015).** Spatial regulation of root growth: placing the plant TOR pathway in a developmental perspective. *International Journal of Molecular Sciences* 16:19671-19697.
- Baumli S., Hoepfner S. & Cramer P. (2005).** A conserved mediator hinge revealed in the structure of the MED7.MED21 (Med7.Srb7) heterodimer. *Journal of Biological Chemistry* 280:18171-18178.
- Bennet T., van den Toorn A., Willemsen V. & Scheres B. (2014).** Precise control of plant stem cell activity through parallel regulatory inputs. *Development* 141:4055-4064.
- Benková E., Michniewicz M., Sauer M., Teichmann T., Seifertová D., Jürgens G. & Friml J. (2003).** Local efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115:591-602.
- Berk A.J. (1999).** Activation of RNA polymerase II transcription. *Current Opinion in Cell Biology* 11:330-335.
- Bhalerao R.P., Eklöf J., Ljung K., Marchant A., Bennett M. & Sandberg G. (2002).** Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 29:325-332.

- Bishopp A., Benkova E. & Helariutta Y. (2011).** Sending mixed messages: auxin-cytokinin crosstalk in roots. *Current Opinion in Plant Biology* 14:10-16.
- Blilou I., Xu J., Wildwater M., Willemsen V., Papanov I., Friml J., Heidstra R., Aida M., Palme K. & Scheres B. (2005).** The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433:39-44.
- Bourbon H.M. (2008).** Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Research* 36:3993-4008.
- Boyce J.M., Knight H., Deyholos M., Openshaw M.R., Galbraith D.W., Warren G. & Knight M.R. (2003).** The *srf6* mutant of *Arabidopsis* is defective in transcriptional activation via CBF/DREB1 and DREB2 and shows sensitivity to osmotic stress. *Plant Journal* 34:395-406.
- Buendía-Monreal M. & Gillmor C.S. (2016).** Mediator: A key regulator of plant development. *Developmental Biology* 419:7-18.
- Cai G., Imasaki T., Yamada K., Cardelli F., Takagi Y. & Asturias F.J. (2010).** Mediator head module structure and functional interactions. *Nature Structural & Molecular Biology* 17:273-279.
- Calderon-Villalobos L.I., Tan X., Zheng N. & Estelle M. (2010).** Auxin perception-structural insights. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a005546.
- Carlsten J.O.P., Zhu X. & Gustafsson C.M. (2013).** The multitasking Mediator Complex. *Cell* 153:531-537.
- Casimiro I., Marchant A., Bhalerao R.P., Beeckman T., Dhooge S., Swarup R., Graham N., Inzé D., Sandberg G., Casero P.J. & Bennett, M. (2001).** Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell* 13:843-852.
- Cerdán P.D. & Chory J. (2003).** Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423:881-885.
- Colón-Carmona A., You R., Haimovitch-Gal T. & Doerner P. (1999).** Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *Plant Journal* 20:503-508.
- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C. & López-Bucio J. (2009).** *Trichoderma virens* a plant beneficial fungus enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149:1579-1592.

- Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Herrera-Estrella A. & López-Bucio J. (2014).** The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission. *Plant Soil* 379:261-274.
- Cheng Y., Xinhua D. & Zhao Y. (2006).** Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 20:1790-1799.
- Cruz-Ramírez A., Díaz-Triviño S., Blilou I., Grieneisen V.A., Sozzani R., Zamioudis C., Miskolczi P., Nieuwland J., Benjamins R., Dhonukshe P., Caballero-Pérez J., Horvath B., Long Y., Mähönen A.P., Zhang H., Xu J., Murray J.A.H., Benfey P.N., Bako L., Marée A.F.M. & Scheres B. (2012).** A bistable circuit involving SCARECROW–RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* 150:1002–1015.
- De Dorlodot S., Forster B., Pagès L., Price A., Tuberosa R. & Draye X. (2007).** Root system architecture: opportunities and constraints for genetic improvement of crops. *Trends in Plant Sciences* 12:474-481
- De Smet I., Tetsumura T., De Rybel B., Frei dit Frey N., Laplaze L., Casimiro I., Swarup R., Naudts M., Vanneste S., Audenaert D., Inzé D., Bennett M.J. & Beeckman T. (2007).** Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* 134:681-690.
- De Smet I. (2012).** Lateral root initiation: one step at a time. *New Phytologist* 193:867-873.
- De Veylder L., Beeckman T. & Inzé D. (2007).** The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature* 8:655-665.
- Ding Z. & Friml J. (2010).** Auxin regulates distal stem cell differentiation in *Arabidopsis* roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:12046-12051.
- Dinneny J.R. & Benfey P.N. (2008).** Plant stem cell niches: Standing the test of time. *Cell* 132: 553-557.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K. & Scheres B. (1993).** Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 119:71-84.
- Dolan L., Duckett C.M., Grierson C., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C., Poethig S. & Roberts K. (1994).** Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* 120:2465-2474.

- Dotson M.R., Yuan C.X., Roeder R.G., Myers L.C., Gustafsson C.M., Jiang Y.W., Li Y., Kornberg R.D. & Asturias F.J. (2000).** Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97:14307-14310.
- Dubrovsky J.G., Sauer M., Napsucialy-Mendivil S., Ivanchenko M.G., Friml J., Shishkova S., Celenza J. & Benková E. (2008).** Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:8790-8794.
- Dwivedi N., Kumar V., & Thakur J. K. (2017).** Convergence of stress-induced hormone signaling pathways on a transcriptional co-factor. P. 285-317. En: Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress. (Pandey G.K., ed). Department of Plant Molecular Biology. University of Delhi South Campus. New Delhi. India.
- Eliasson L., Bertell G., & Bolander. (1989).** Inhibitory action of auxin on root elongation not mediated by ethylene. *Plant Physiology* 91:310-314.
- Ferreira P.C., Hemerly A.S., Engler J.D., van Montagu M., Engler G. & Inzé D. (1994).** Developmental expression of the *Arabidopsis* cyclin gene *cyc1At*. *The Plant Cell* 6:1763–1774.
- Fondell J.D., Ge H. & Roeder R.G. (1996).** Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:8329-8333.
- Forouzesh E., Goel A., Mackenzie S.A. & Turner J. A. (2013).** In vivo extraction of *Arabidopsis* cell turgor pressure using nanoindentation in conjunction with finite element modeling. *The Plant Journal* 73:509-520.
- Forzani C., Willemsen V., Aichinger E., Laux T., Sornay E. & Murray J.A.H., (2014).** WOX5 suppresses *CYCLIN D* activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Current Biology* 24:1939-1944.
- 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.
- Garnica-Vergara A., Barrera-Ortiz S., Muñoz-Parra E., Raya-Gonzales J., Méndez-Bravo A., Macías-Rodríguez L., Ruiz-Herrera L.F. & López-Bucio J. (2015).** 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* 209:1496-1512.

- Geisler M., Aryal B., di Donato M. & Hao P. (2017).** A critical view on ABC transporters and their interacting partners in auxin transport. *Plant and Cell Physiology* 58:1601-1614.
- Gillmor C.S., Park M.Y., Smith M.R., Pepitone R., Kerstetter R.A. & Poethig R.S. (2010).** The MED12-MED13 module of Mediator regulates the timing of embryo patterning in *Arabidopsis*. *Development* 137:113-122.
- Gillmor C.S., Silva-Ortega C.O., Willmann M.R., Buendía-Monreal M. & Poethig R.S. (2014).** The *Arabidopsis* Mediator CDK8 module genes CCT (MED12) and GCT (MED13) are global regulators of developmental phase transitions. *Development* 141:4580-4589.
- Goh T., Toyokura K., Wells D.M., Swarup K., Yamamoto M., Mimura T., Weijers D., Fukaki H., Laplace L., Bennett M.J. & Guyomarc'h S. (2016).** Quiescent center initiation in the *Arabidopsis* lateral root primordia is dependent on the SCARECROW transcription factor. *Development* 143:3363-3371.
- González D., Bowen A.J., Carroll T.S. & Conlan R.S. (2007).** The transcription corepressor LEUNIG interacts with the histone deacetylase HDA19 and mediator components MED14 (SWP) and CDK8 (HEN3) to repress transcription. *Molecular and Cellular Biology* 27:5306–5315.
- Grieneisen V.A., Xu J., Marée A.F.M., Hogeweg P. & Scheres B. (2007).** Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449:1008-1013.
- Grierson C., Nielsen E., Ketelaarc T. & Schiefelbein J. (2014).** Root hairs. *The Arabidopsis Book* e0172.
- Gruber B.D., Giehl R.F.H., Friedel S. & von Wirén N. (2013).** Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiology* 163:161-179.
- Guglielmi B., Van Berkum N.L., Klapholz B., Bijma T., Boube M., Boschiero C., Bourbon H.M., Holstege F.C.P. & Werner M. (2004).** A high resolution protein interaction map of the yeast mediator complex. *Nucleic Acids Research* 32:5379–5391.
- Gu W., Malik S., Ito M., Yuan C.X., Fondell J.D., Zhang X., Martinez E., Qin J. & Roeder R.G. (1999).** A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcription regulation. *Molecular Cell* 3:97-108
- Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I. & Lorito M. (2004).** *Trichoderma* species-opportunistic avirulent plant symbionts. *Nature* 2:43-56.

- Hahn S. (2004).** Structure and mechanism of the RNA Polymerase II transcription machinery. *Nature Structural & Molecular Biology* 11:394-403.
- Hemsley P.A., Hurst C.H., Kaliyadasa E., Lamb R., Knight M.R., De Cothi E.A., Steele J.F. & Knight H. (2014).** The *Arabidopsis* Mediator Complex subunits MED16, MED14, and MED2 regulate Mediator y RNA Polimerase II recruitment to CBF-Responsive Cold-Regulated genes. *Plant Cell* 26:465-484.
- Heidstra R., Welch D., & Scheres B., (2004).** Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect *Arabidopsis* SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes & Development* 18:1964-1969.
- Helariutta Y., Fukaki H., Wysocka-Diller J., Nakajima K., Jung J., Sena G., Hauser M. & Benfey P.N. (2000).** The *SHORT-ROOT* gene controls radial patterning of the *Arabidopsis* root through radial signaling. *Cell* 101:555-567.
- Hemerly A.S., Ferreira P., de Almeida Engler J., Van Montagu M., Engler G. & Inzé D. (1993).** *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *The Plant Cell* 5:1711–1723.
- Heyman J., Cools T., Vandebussche F., Heyndrickx K.S., Van Leene J., Vercauteren I., Vanderauwera S., Vandepoele K., De Jaeger G., Van Der Straeten D. & De Veylder, L. (2013).** ERF115 controls root quiescent center cell division and stem cell replenishment. *Science* 342:860-863.
- Hung R., Lee S. & Bennett J.W. (2013).** *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal Ecology* 6:19-26.
- Ito J., Sono T., Tasaka M. & Furutani M. (2011).** MACCHI-BOU 2 is required for early embryo patterning and cotyledon organogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 52:539–552
- Jefferson R.A., Kavanagh T.A. & Bevan M.W. (1987).** GUS fusions: β -glucuronidase as sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *European Molecular Biology Organization Journal* 13:3901-3097.
- Kelleher III R.J., Flanagan P.M. & Kornberg R.D. (1990).** A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61:1209-1215.
- Kidd B.N., Edgar C.I., Kumar K.K., Aitken E.A., Schenk P.M., Manners J.M. & Kazan K. (2009).** The mediator complex subunit PFT1 is a key regulator of jasmonate dependent defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:2237–2252

- Kim Y.J., Björklund S., Li Y., Sayre M.H. & Kornberg R.D. (1994).** A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77:599-608.
- Knight H., Thomson A.J.W. & McWatters H.G. (2008).** Sensitive to freezing6 integrates cellular and environmental inputs to the plant circadian clock. *Plant Physiology* 148:293–303.
- Knight H., Mugford S.G., Ulker B., Gao D., Thorlby G. & Knight M.R. (2009).** Identification of SFR6, a key component in cold acclimation acting post-translationally on CBF function. *Plant Journal* 58:97–108.
- Koizumi K., Hayashi T., Wu S. & Gallagher K.L. (2012).** The SHORT-ROOT protein acts as a mobile, dose-dependent signal in patterning the ground tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:13010-13015.
- Korasick D.A., Enders T.A. & Strader L.C. (2013).** Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* 64:2541-2555.
- Koschubs T., Lorenzen K., Baumli S., Sandstrom S., Heck A. J. & Cramer P. (2010).** Preparation and topology of the Mediator middle module. *Nucleic Acids Research* 38:3186-3195.
- Kottb M., Gigolashvili T., Großkinsky D.K. & Piechulla B. (2015).** *Trichoderma* volatiles effecting *Arabidopsis*: from inhibition to protection against phytopathogenic fungi. *Frontiers in Microbiology* 6:995.
- Křeček P., Skůpa P., Libus J., Naramoto S., Tejos R., Friml J. & Zažímalová E. (2009).** The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* 10:249.
- Lai Z., Schluttenhofer C.M., Bhide K., Shreve J., Thimmapuram J., Lee S.Y., Yun D.J. & Mengiste T. (2014).** MED18 interaction with distinct transcription factors regulates multiple plant functions. *Nature Communications* 5:3064.
- Larivière L., Geiger S., Hoepfner S., Rother S., Strasser K. & Cramer P. (2006).** Structure and TBP binding of the Mediator head subcomplex Med8-Med18-Med20. *Nature Structural & Molecular Biology* 13:895-901.
- Larivière L., Plaschka C., Seizl M., Wenzek L., Kurth F. & Cramer P. (2012).** Structure of the Mediator head module. *Nature* 492:448-451.
- Laurenzio L., Wysockadiller J., Malamy J.E., Pysh L., Helariutta Y., Freshour G., Hahn M.G., Feldmann K.A. & Benfey P.N. (1996).** The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 86:423–433.

- 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. *Cell* 18:450-458.
- Liu Y., Ranish J.A., Aebersold R. & Hahn S. (2001).** Yeast nuclear extract contains two major forms of RNA Polymerase II Mediator Complex. *Journal of Biological Chemistry* 276:7169-7175.
- Ljung K., Bhalerao R.P. & Sandberg G. (2001).** Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* 28:465-474.
- Ljung K., Hull A.K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J. & Sandberg G. (2005).** Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell* 17:1090–1104.
- Ljung K. (2013).** Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140:943:950.
- López-Bucio J., Hernández-Abreu E., Sánchez-Calderón L., Nieto-Jacobo M.F., Simpson J. & Herrera-Estrella L. (2002).** Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* 129:244-256.
- López-Bucio J., Cruz-Ramirez A. & Herrera-Estrella L. (2003).** The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology* 6:280-287.
- López-Bucio J., Pelagio-Flores R. & Herrera-Estrella A. (2015).** *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae* 196:109-123.
- Magyar Z., Horváth B., Khan S., Mohammed B., Henriques R., De Veylder L., Bakó L., Scheres B. & Bögre L. (2012).** *Arabidopsis* E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *The EMBO Journal* 31:1480-1493.
- Mähönen A.P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P.N. & Helariutta Y. (2000).** A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Development* 14:2938-2943.
- Mähönen A.P., ten Tusscher K., Siligato R., Smetana O., Díaz-Triniño S., Salojärvi J., Wachsman G., Prasad K., Heidstra R. & Scheres B. (2014).** PLETHORA gradient formation mechanism separates auxin responses. *Nature* 515:125-129.

- Majda M. & Robert S. (2018).** The role of auxin in cell wall expansion. *International Journal of Molecular Sciences* 19:951.
- Malamy J.E. & Benfey P.N. (1997).** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124:33-44.
- Marchant A., Bhalerao R., Casimiro I., Eklof J., Casero P.J., Bennett M. & Sandberg G. (2002).** AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* 14:589–597.
- Marhavý P., Vanstraelen M., De Rybel B., Zhaojun D., Bennett M.J., Beeckman T. & Benková E. (2013).** Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *The EMBO Journal* 32:149-158.
- Mashiguchi K., Tanaka K., Sakai T., Sugawara S., Kawaide H., Natsume M., Hanada A., Yaeno T., Shirasu K., Yao H., McSteen P., Zhao Y., Hayashi K-i., Kamiya Y. & Kasahara H. (2011).** The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:18512-18517.
- Mathur S., Vyas S., Kapoor S. & Tyagi K. (2011).** The Mediator Complex in plants: structure, phylogeny, and expression profiling of representative genes in a dicot (*Arabidopsis*) and a monocot (Rice) during reproduction and abiotic stress. *Plant Physiology* 157:1609-1627.
- Moubayidin L., Perilli S., Dello Iorio R., Di Mambro R., Costantino P. & Sabatini S. (2010).** The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root Meristem growth phase. *Current Biology* 20:1138-1143.
- Murashige T. & Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- Nakajima K., Sena G., Nawy T. & Benfey P.N. (2001).** Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* 413:307–311.
- Nieto-Jacobo M.F., Steyaert J.M., Salazar-Badillo F.B., Vi Nguyen D., Rostás M., Braithwaite M., De Souza J.T., Jimenez-Bremont J.F., Ohkura M., Stewart A. & Mendoza-Mendoza A. (2017).** Environmental growth conditions of *Trichoderma spp.* affects indole acetic acid derivatives volatile organic compounds and plant growth promotion. *Frontiers in Plant Science* 8:102.
- Okumura K-I., Goh T., Toyokura K., Kasahara H., Takebayashi Y., Mimura T., Kamiya, Y., & Fukaki, H. (2013).** GNOM/FEWER ROOTS is required for the establishment of an auxin response maximum for *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell Physiology* 54:406-417.

- Ortíz-Castro R., Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L. & López-Bucio J. (2009).** The role of microbial signals in plant growth and development. *Plant Signaling & Behavior* 4:701-712.
- Ottenschläger I., Wolff P., Wolverton C., Bhalerao R.P., Sandberg G., Ishikawa H., Evans M. & Palme K. (2003).** Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:2987-2991.
- Parizot B., Laplaze L., Ricaud L., Boucheron-Dubuisson E., Bayle V., Bonke M., De Smet I., Poethig S.R., Helariutta Y., Haseloff J., Chriqui D., Beeckman T. & Nussaume L. (2008).** Diarch symmetry of the vascular bundle in *Arabidopsis* root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiology* 146:140-148.
- Paule, M.R. & White R.J. (2000).** Transcription by RNA polymerase I and III. *Nucleic Acids Research* 28:1283-1298.
- Perianez-Rodriguez J., Manzano C. & Moreno-Risueno M.A. (2014).** Post-embryonic organogenesis and plant regeneration from tissues: two sides of the same coin? *Frontiers in Plant Science* 5:219.
- Petrášek J. & Friml J. (2009).** Auxin transport routes in plant development. *Development* 136:2675-2688.
- Pi L., Aichinger E., van der Graaff E., Llavata-Peris C.I., Weijers D., Hennig L., Groot E. & Laux T. (2015).** Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of *CDF4* expression. *Developmental Cell* 33:576-588.
- Pillitteri L.J., Guo X. & Dong J. (2016).** Asymmetric cell division in plants: mechanisms of symmetry breaking and cell fate determination. *Cell and Molecular Life Sciences* 73:4213-4229.
- Raya-González J., Ortiz-Castro R., Ruiz-Herrera L.F., Kazan K. & López-Bucio J. (2014).** PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME1/MEDIATOR25 regulates lateral root formation via auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 165:880-894.
- Raya-González J., López-Bucio J.S., Prado-Rodriguez J.C., Ruíz-Herrera L.F., Guevara-García A.A. & López-Bucio J. (2017).** The MEDIATOR genes MED12 and MED13 control *Arabidopsis* root system configuration influencing sugar and auxin responses. *Plant Molecular Biology* 95:141-156.

- Robinson J.P., Trnka M.J., Pellarin R., Greenberg C.H., Bushnell D.A., Davis R., Burlingame A.L., Sali A. & Kornberg R.D. (2015).** Molecular architecture of the yeast mediator complex. *Journal of Structural Biology* 4:e08719.
- Sabatini S., Beis D., Wolkenfelt H., Murfett J., Guilfoyle T., Malamy J., Benfey P., Leyser O., Bechtold N., Weisbeek P. & Scheres B. (1999).** An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the *Arabidopsis* root. *Cell* 99:463–472.
- Sabatini S., Heidstra R., Wildwater M. & Scheres B. (2002).** SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the *Arabidopsis* root meristem. *Genes & Development* 17:354-358.
- Samanta S. & Thakur J. (2015).** Importance of Mediator complex in the regulation and integration of diverse signaling pathways in plants. *Frontiers in Plant Science* 6:757.
- Sarkar A.K., Luijten M., Miyashima S., Lenhard M., Hashimoto T., Nakajima K., Scheres B., Heidstra R. & Laux T. (2007).** Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* 446:811-814.
- Sauer M., Robert S. & Kleine-Vehn J. (2013).** Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany* 64:2565–2577.
- Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C. & Weisbeek P. (1994).** Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. *Development* 120:2475-2487.
- Schiefelbein J.W., Masucci J.D. & Wang H. (1997).** Building a root: the control of patterning and morphogenesis during root development. *The Plant Cell* 9:1089-1098.
- Shandilya J. & Roberts S.G.E. (2012).** The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochimica Biophysica Acta* 1819:391-400.
- Sozzani R., Cui H., Moreno-Risueno M.A., Busch W., Van Norman J.M., Vernoux T., Brady S.M., Dewitte W., Murray J.A.H. & Benfey P.N. (2010).** Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* 466:128-132.
- Strader L.C. & Zhao Y. (2016).** Auxin perception and downstream events. *Current Opinion in Plant Biology* 33:8-14.

- Stepanova A.N., Robertson-Hoyt J., Yun J., Benavente L.M., Xie D-Y., Doležal K., Schlereth A., Jürgens G. & Alonso J.M. (2008).** TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell* 133:177-191.
- Stepanova A.N. & Alonso J.M. (2009).** Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Current Opinion in Plant Biology* 12:548-555.
- Suzuki N., Bassil E., Hamilton J.S., Inupakutika, M.A., Zandalinas, S.I., Triphaty D., Luo Y., Dion E., Fukui G., Kumazaki A., Nakao R., Rivero R.M., Verbeck G.F., Azad R.K., Taatjes D.J., Nää A.M., III F.A., Nogales E. & Tjian R. (2002).** Structure, function, and activator-induced conformation of the CSRP coactivator. *Science* 295:1058-1062.
- Swarup K., Benková E., Swarup R., Casimiro I., Péret B., Yang Y., Parry G., Nielsen E., De Smet I., Vanneste S., Levesque M.P., Carrier D., James N., Calvo V., Ljung K., Kramer E., Roberts R., Graham N., Marillonnet S., Patel K., Jones J.D.G., Taylor C.G., Schachtman D.P., May S., Sandberg G., Benfey P., Friml J., Kerr I., Beeckman T., Laplaze L. & Bennett M. J. (2008).** The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology* 10:946.
- Takagi Y., Calero G., Komori H., Brown J.A., Ehrensberger A.H., Hudmon A., Asturias F. & Kornberg R.D. (2006).** Head module control of mediator interactions. *Molecular Cell* 23:355-364.
- Tsai K.L., Tomomori-Sato C., Sato S., Conaway R.C., Conaway J.W. & Asturias F.J. (2014).** Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional mediator complex. *Cell* 157:1430-1444.
- Van der Berg C., Willemsen V., Hendriks G., Weisbeek P. & Scheres B. (1997).** Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 390:287-289.
- Venturi V. & Keel C. (2016).** Signaling in the rhizosphere. *Trends in Plant Science* 21:187-198.
- Vilches-Barro A. & Maizel A. (2015).** Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 23:31-38.
- Vinale F., Sivasithamparam K., Ghisalberti E.L., Marra R., Barbetti M.J., Li H., Woo S.L. & Lorito M. (2008).** A novel role for Trichoderma secondary

- metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72:80-86.
- Wang J-W., Wang L-J., Mao Y-B., Cai W-J., Xue H-W. & Chen X-Y. (2005).** Control of root cap formation by MicroRNA-targeted auxin response factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:2204-2216.
- Wang J., Andersson-Gunnerås S., Gaboreanu I., Hertzberg M., Tucker, M.R., Zheng B., Leśniewska J., Mellerowicz E.J., Laux T., Sandberg G. & Jones B. (2011).** Reduced expression of the SHORT-ROOT gene increases the rates of growth and development in hybrid poplar and *Arabidopsis*. *PLOS One* 6:e28878.
- Weijers D. & Wagner D. (2016).** Transcriptional responses to the auxin hormone. *Annual Reviews* 67:539-574.
- Weimer A.K., Nowack M.K., Bouyer D., Zhao X., Harashima H., Naseer S., De Winter F., Dissmeyer N., Geldner N. & Schnittger A. (2012).** RETINOBLASTOMA RELATED1 regulates asymmetric cell divisions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 24:1-13.
- Wildwater M., Campilho A., Perez-Perez J.M., Heidstra R., Blilou I., Korthout H., Chatterjee J., Mariconti L., Gruissem W. & Scheres B. (2005).** The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* 123:1337-1349.
- Willemsen V., Bauch M., Bennett T., Campilho A., Wolkenfelt H., Xu J., Haseloff J. & Scheres B. (2008).** The NAC domain transcription factors FEZ and SOMBRERO control the orientation of cell division plane in *Arabidopsis* root stem cells. *Developmental Cell* 15:913-922.
- Wu G., Lewis D.R. & Spalding E.P. (2007).** Mutations in *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporters separate the roles of acropetal and basipetal auxin transport in lateral root development. *Plant Cell* 19:1826–1837.
- Wu S. & Gallagher K.L. (2014).** The movement of the non-cell-autonomous transcription factor SHORT-ROOT relies on the endomembrane system. *The Plant Journal* 80:396-409.
- Wysocka-Diller J.W., Helariutta Y., Fukaki H., Malamy J.E. & Benfey P.N. (2000).** Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. *Development* 127:595–603.
- Žádníková P., Petrášek J., Marhavý P., Raz V., Vandenbussche F., Ding Z., Schwarzerová K., Morita M.T., Tasaka M., Hejátko J., Van Der Straeten D.,**

- Friml J. & Benková E. (2010).** Role of PIN-mediated auxin efflux in apical hook development of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 137:607-617.
- Zhang Y., Wu H., Wang N., Fan H., Chen C., Cui Y., Liu H. & Ling H-Q. (2014).** Mediator subunit 16 functions in the regulation of iron uptake gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 203:770-783.
- Zheng Z., Guan H., Leal F., Grey P.H. & Oppenheimer D.G. (2013).** Mediator subunit18 controls flowering time and floral organ identity in *Arabidopsis*. *PLOS ONE* 8:e53924.
- Zhou M. & Law J.A. (2015).** RNA Pol IV and V in gene silencing: rebel polymerases evolving away from Pol II's rules. *Current Opinion in Plant Biology* 27:154-164.

11. APENDICE

Publicación en preparación

Funciones del complejo **MEDIADOR** en las respuestas de las plantas al estrés abiótico

*Pedro Iván Huerta Venegas, José López Bucio, León Francisco Ruiz Herrera
y Elda Beltrán Peña*

Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, UMSNH

Resumen

Las plantas para adaptarse a situaciones adversas del ambiente han desarrollado una gran diversidad de vías de señalización que convergen en la expresión genética. Uno de los procesos fundamentales para la decodificación de la información contenida en los genes a proteínas, es el proceso de transcripción. En la transcripción participan elementos localizados en los promotores, la RNA polimerasa II y sus factores asociados. En la última década se ha evidenciado la importancia fundamental del complejo multiproteínico denominado MEDIADOR, debido a su poder integrador para hacer converger diferentes vías de señalización, antes de canalizar las instrucciones para la transcripción a la maquinaria de la RNA pol II y responder así a estímulos ambientales, hormonales o nutrimentales. En este artículo se revisa la participación de las subunidades del complejo MEDIADOR en las respuestas al estrés abiótico generado por condiciones de crecimiento desfavorables para las plantas.

Palabras clave: Transcripción, complejo MEDIADOR, estrés abiótico.

Abstract

Functions of MEDIATOR complex in response to abiotic stress of plants. Plants have a great diversity of molecular mechanisms directed by signaling pathways that converge on gene expression for adaptation to unfavorable environmental conditions. One of the fundamental steps in the genetic expression is the transcription process. A critical component of transcription is the MEDIATOR complex, which serves as a scaffold structure for the binding of various transcription factors to the RNA polymerase II during the activation of genes involved in responses to environmental, hormonal or nutritional stimuli. Currently, MEDIATOR has emerged as a sensor that regulates responses for various types of stress. We review the involvement of the different subunits of the complex in responses to abiotic stress generated by unfavorable environmental conditions for plants.

Keywords: Transcription, MEDIATOR complex, abiotic stress.

Introducción

Los cambios en el ambiente alteran el crecimiento y desarrollo de las plantas y de esta forma afectan la producción de alimentos a nivel mundial. Las plantas son organismos sésiles y como tales, para sobrevivir, tienen que adaptarse a los factores que derivan en el estrés abiótico (Pereira, 2016). Dichos factores incluyen a: altos o bajos niveles de luz, radiación ultravioleta A y B (UV-A y UV-B), temperaturas elevadas y temperaturas bajas que provocan enfriamiento y congelamiento, la sequía, las inundaciones, la acumulación de metales y la salinidad en los suelos, la deficiencia y/o toxicidad por nutrimentos (Ahmad y Prasad, 2012). A nivel molecular, una de las primeras consecuencias del estrés abiótico es la generación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ROS y RNS, por sus siglas en inglés) las cuales alteran la actividad enzimática y dañan la integridad del DNA (Gill y Tuteja, 2010). Por ello las plantas cuentan con mecanismos dirigidos por fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) y el etileno que les permiten responder al agobio. El ABA es una fitohormona que participa en diversos aspectos del crecimiento, desarrollo y en la adaptación al estrés biótico y abiótico (Zhang, 2014). También el ABA es el regulador central de las respuestas al estrés osmótico, a la deshidratación, a las temperaturas extremas y al estrés salino (Skubacz et al., 2016; Suzuki et al., 2016). Por otra parte, el etileno está involucrado en las respuestas a la sequía, al ozono, a la inundación, a las temperaturas extremas, al

daño mecánico, a la radiación y a la salinidad (Gamalero y Glick, 2012; Tao et al., 2015). Esencialmente estas dos fitohormonas controlan la expresión de los genes que codifican para la síntesis de proteínas utilizadas por las plantas para protegerse contra el daño provocado por el estrés abiótico.

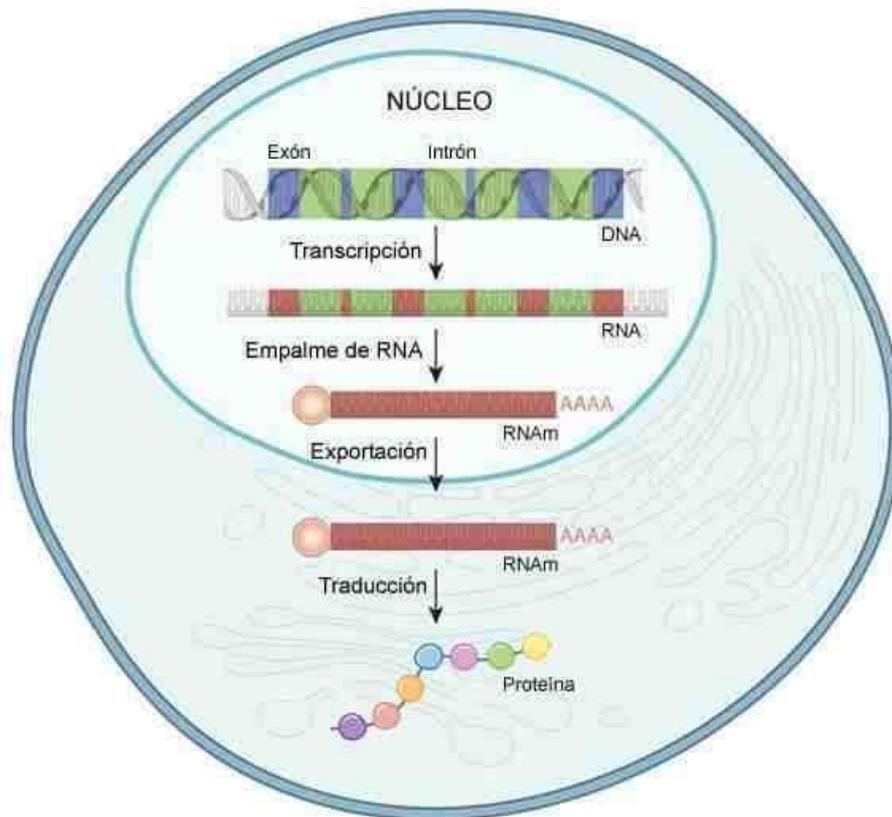


Figura 1. Flujo de la información del DNA a la síntesis de proteínas en eucariontes. El DNA es transcrito a RNAm. Durante el procesamiento inicial del RNAm algunas regiones (intrones) son removidas y las regiones remanentes (exones) son unidas. La molécula del RNAm (rojo) está modificada en el extremo 5' por una capucha CAP (esfera) y en el extremo 3' se une la cola poli A para permitir que el transcrito maduro se exporte desde el núcleo hacia el citoplasma. Una vez en el citoplasma el RNAm se traduce a una proteína (Modificado de O'Connor y Adams, 2010).

La expresión genética comprende varios procesos, entre los que se incluye la transcripción, donde ocurre la producción del RNA mensajero (RNAm) y la traducción o síntesis de las proteínas, las cuales coordinan la función celular. La síntesis del RNA durante la transcripción (Fig. 1), es un proceso realizado por las

Funciones del complejo mediador en las respuestas de las plantas al estrés abiótico

generales (GTFs, General Transcription Factors). Posteriormente, la RNA pol II se une con la subunidad TFIIF y estabiliza la formación del PIC. En seguida, el complejo MEDIADOR y los factores transcripcionales TFIIE y TFIIF son reclutados por el PIC para estabilizar la maquinaria de transcripción (Fig. 2) (Thomas y Chiang, 2006; Shandilya y Roberts, 2012). Por lo antes mencionado, al CM se le considera esencial para las diferentes vías de señalización que conducen a la regulación de la transcripción por la RNA pol II, debido a que integra y hace converger a las señales que se originan en respuesta al estrés abiótico (Tabla 1) (Samanta y Thakur, 2015).

TABLA 1
Subunidades del CM de *Arabidopsis* que participan en el estrés abiótico y su relación con las fitohormonas.

Subunidades	Módulo	Señalización fitohormonal	Función en las respuestas al estrés	Referencia
MED2	Cola		Aclimatación al frío	Hemsley et al., 2014
MED5	Cola		Regula la vía de los fenilpropanoides	Bonawitz, et al., 2011; Bonawitz, et al., 2014
MED14	Cola	ABA	Aclimatación al frío, estrés salino	Pasrija y Thakur, 2012; Hemsley et al., 2014
MED16	Cola	Etileno	Aclimatación al frío, tolerancia al estrés osmótico, regulación de la homeostasis del hierro	Warren et al., 1996; Boyce et al., 2003; Knight et al., 2009; Pasrija y Thakur, 2012; Hemsley et al., 2014; Yang et al., 2014; Zhang et al., 2014
MED25	Sin asignación	ABA	Estrés salino, estrés por sequía, regulación de la homeostasis del hierro	Elfving et al., 2011; Chen et al., 2012; Yang et al., 2014
MED37	Sin asignación	BR	Estrés salino, al frío, sequía	Alvim et al., 2001; Hong et al., 2008; Pasrija y Thakur, 2012.

Composición del complejo MEDIADOR en diferentes organismos

El CM primero se descubrió en las levaduras en 1990, pocos años después se reportó en humanos (Kelleher et al., 1990; Fondell et al., 1996; Berk, 1999; Gu et al., 1999) y tomó más de una década purificar y caracterizar el CM en los cultivos en suspensión de *Arabidopsis* (Bäckström et al., 2007). Dicho complejo también se encuentra en ratones, insectos y gusanos (Jiang et al., 1998; Kwon et al., 1999; Malik y Roeder, 2000; Park et al., 2001). Las predicciones bioinformáticas que incluyen 16 especies vegetales que representan el reino vegetal completo, establecen la existencia del complejo MEDIADOR en los principales cereales como el arroz (Mathur et al., 2011). El CM es un conglomerado multiproteico de tamaño enorme y para evitar confusiones con los nombres de las subunidades, se adoptó una nomenclatura unificada para cada subunidad utilizando las siglas MED. El número de subunidades del CM puede variar de 25 a 30 dependiendo de la especie. Otra característica sobresaliente del CM es su estructura modular, formada por el módulo cabeza, el módulo medio y el módulo cola, estos tres módulos juntos forman lo que se conoce como el corazón del CM. Además en el CM existe un módulo cinasa o CDK8, el cual consiste de las proteínas CDK8, Ciclina C, MED12 y MED13 (Asturias et al., 1999; Dotson et al., 2000; Bourbon et al., 2004).

En levaduras el complejo MEDIADOR está formado por aproximadamente 25 subunidades proteínicas (Kim et al., 1994), incluyendo los polipéptidos codificados por los genes *SUPPRESSOR OF RNA POLYMERASE B8 (SRB8)*, *SUPPRESSOR OF RNA POLYMERASE B9 (SRB9)*, *SUPPRESSOR OF RNA POLYMERASE B10 (SRB10)* y *SUPPRESSOR OF RNA POLYMERASE B11 (SRB11)* (Fig. 3) (Liao et al., 1995; Liu et al., 2001; Guglielmi et al., 2004). En las plantas, el complejo MEDIADOR se caracterizó con base a la similitud de sus secuencias con las de *Sacharomyces cerevisiae*. En *Arabidopsis*, el CM está formado por 21 subunidades conservadas y seis específicas (Bäckström et al., 2007). Sin embargo, análisis posteriores revelaron que las subunidades MED27, MED32 y MED33 son homólogas respectivamente, de las MED3/MED27, MED2/MED29 y MED5/MED24 de levaduras y metazoos (Bourbon, 2008; Mathur et al., 2011). Las subunidades del módulo cinasa en *Arabidopsis* se identificaron por aproximaciones bioinformáticas, sin embargo, reportes posteriores sobre la función de las mutantes *med12* y *med13* indicaron la presencia del módulo cinasa (Gillmor et al., 2010). En un estudio reciente se reportó la posible existencia de la subunidad MED26 en las plantas

Funciones del complejo mediador en las respuestas de las plantas al estrés abiótico

terrestres basándose en las investigaciones con *Oryza sativa*. No obstante, esta subunidad no fue detectada en el grupo de las algas y en contraparte sólo fue identificada la subunidad MED1 en el alga roja *Cyanidioschyzon merolae* (Mathur et al., 2011). Por lo tanto, se ha establecido que el complejo MEDIADOR de *Arabidopsis* está formado por 32 subunidades proteínicas (Fig. 3).

Módulo Cabeza				Módulo Intermedio				Módulo Cola				Sin asignación				CDK8			
	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Arabidopsis</i>		<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Arabidopsis</i>		<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Arabidopsis</i>		<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Arabidopsis</i>		<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Arabidopsis</i>
MED6				MED1				MED2				MED25				MED12			
MED8				MED4				MED3				MED26				MED13			
MED11			*	MED7			*	MED5			*	MED34				cdk8			
MED17				MED9				MED14				MED35				cyclinC			
MED18				MED10				MED15				MED36							
MED19			*	MED21				MED16				MED37							
MED20			*	MED31				MED23											
MED22			*																
MED28																			
MED30																			

Figura 3. Las subunidades del complejo mediador en *Sacharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens* y *Arabidopsis thaliana*. Las subunidades aisladas por métodos bioquímicos están marcadas con azul. Las subunidades identificadas por métodos bioinformáticos están marcadas en naranja. Las subunidades están agrupadas de acuerdo a su localización dentro del complejo mediador. Los asteriscos representan duplicados parálogos de las subunidades en el complejo mediador de *Arabidopsis* (Modificado de Yang et al., 2016).

Organización modular del complejo MEDIADOR

Las evidencias bioquímicas en las subunidades que conforman el CM de levaduras, de humanos y de metazoos revelan una estructura compacta del complejo (Fig. 3) (Asturias et al., 1999; Dotson et al., 2000; Liu et al., 2001; Suzuki et al., 2002; Robinson et al., 2015). En las plantas, se ha establecido que las subunidades MED6, MED8, MED11, MED17, MED18, MED20, MED22, MED28 y MED30 forman parte del módulo cabeza que interactúa con la RNA pol II (Larivière et al., 2012; Tsai et al., 2014). A su vez, el sub-complejo MED8-MED18-MED20 estabiliza la formación del PIC (Kim et al., 1994; Larivière et al., 2006; Takagi et al., 2006; Cai et al., 2010). Las subunidades MED17 y MED21 se interconectan con el módulo cinasa a través de la subunidad MED13 (Guglielmi et al., 2004). Baumli et al., 2005 observaron que MED6 al formar un puente con MED7-MED21 causa un cambio conformacional que le permite al módulo interactuar con la RNA pol II. El gen ortólogo de MED1 no se ha detectado en plantas, exceptuando a las algas rojas (Koschubs et al., 2010; Mathur et al., 2011).

Otra parte del CM está integrada por el módulo cola formado por las subunidades MED2, MED3, MED5, MED14, MED15, MED16 y MED23 que mantienen contacto directo con los factores de transcripción específicos y en consecuencia vinculan al complejo unido al DNA con la RNA pol II. En las levaduras, estos genes tienden a contener elementos TATA y su expresión depende de los complejos SAGA y Swi/Snf. En estos organismos, las señales causadas por varios tipos de estrés, por limitaciones nutricionales, o señales involucradas en vías del desarrollo, son percibidas por dichas subunidades (Ansari y Morse, 2012). En levaduras a la fecha las subunidades del módulo cinasa o CDK8 no se han podido aislar junto con el resto de subunidades del complejo (Liao et al., 1995; Liu et al., 2001). Sin embargo, en *Arabidopsis* el efecto fenotípico de las mutantes *med12* y *med13* sugiere la existencia del módulo CDK dentro del complejo mediador (Gillmor et al., 2010). Básicamente, la asociación del módulo CDK con el núcleo del CM implica la inhibición de la función de la RNA pol II (Balciunas y Ronne, 1995; Borggreffe et al., 2002; Plaschka et al., 2015).

Subunidades del complejo MEDIADOR implicadas en la adaptación al estrés abiótico

MEDIADOR 5

La subunidad MED5 del complejo MEDIADOR de plantas se caracterizó en *Saccharomyces cerevisiae* como Med5/Nut1, la cual, estructuralmente se localiza junto con Med2, Med3 y Med15 (Fig. 4) (Beve et al., 2005). En *Arabidopsis*, MED5 está codificada por los genes parálogos *MED5b/REF4* (*REDUCED EPIDERMAL FLORESCENCE 4*) y *MED5a/RFR1* (*REF4-RELATED 1*) (Dolan y Chapple, 2017). Ambas subunidades son parcialmente redundantes y tienen actividad en la homeostasis de los fenilpropanoides (Bonawitz et al., 2011). Las mutaciones *ref4* causan enanismo e inhiben la biosíntesis de los fenilpropanoides mientras que las dobles mutantes *ref4 rfr1* mejoran la expresión de los genes de la biosíntesis e incrementan la acumulación de los productos río abajo de la vía permitiendo la restauración del crecimiento por la deficiencia de lignina (Bonawitz et al., 2011; Bonawitz et al., 2014). La lignina (polímero de naturaleza aromática con alto peso molecular que tiene como base estructural unidades de fenilpropano) es un componente importante de la pared celular, que proporciona protección de las células vegetales contra los factores adversos del medio ambiente. También los fenilpropanoides participan en forma importante en las respuestas al estrés

Funciones del complejo mediador en las respuestas de las plantas al estrés abiótico

ambiental incluyendo la radiación UV (Tabla 1) (Dixon y Paiva, 1995; Izbianska et al., 2014).

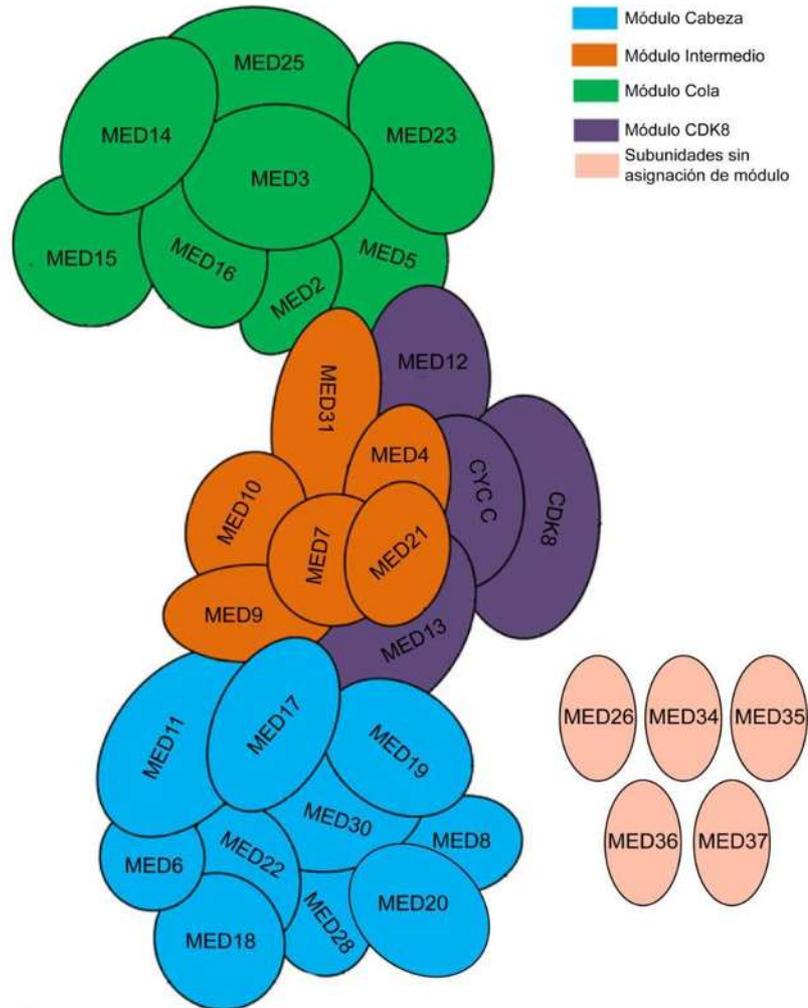


Figura 4. Estructura del complejo mediador (CM) de plantas. El complejo mediador está arreglado en cuatro módulos. Las subunidades marcadas con color azul representa al módulo cabeza, con color naranja al módulo intermedio, el verde marca al módulo cola (MED25 no forma parte del CM de levaduras) y el púrpura representa al módulo CDK8. (Modificado de Samanta y Thakur, 2015). A las subunidades representadas en color salmón no se les ha incluido en ningún módulo del complejo mediador. Las subunidades MED34, MED35, MED36 y MED37 son específicas de plantas.

MEDIADOR 14

En levaduras, la subunidad MED14 funciona como puente entre los tres módulos del CM por lo que su función es crítica durante los procesos de transcripción genética (Robinson et al., 2015). En las plantas MED14 inicialmente fue nombrada como STRUWWELPETER (SWP), una proteína requerida para el reclutamiento de la RNA pol II. La mutación en el gen *SWP* provoca enanismo y muestra una reducción en la longitud de los órganos del follaje de *Arabidopsis* debido a que incide en el tiempo de proliferación celular, reduce el número de células durante las primeras etapas de la iniciación de los primordios y afecta la organización del meristemo apical del brote (Autran et al., 2002). Pasrija y Thakur 2012, encontraron que las auxinas disminuyen el nivel de transcripción de *MED14*, en tanto que el ABA lo incrementa. Aunado a esto, los niveles del transcrito de *MED14* también aumentaron en condiciones de estrés salino (Pasrija y Thakur, 2012), lo que sugiere una posible relación entre MED14 y ABA durante la adaptación ambiental a dicho estrés. Además del estrés salino, MED14 también controla la aclimatación a bajas temperaturas junto con las subunidades MED2 y MED16 a través de la regulación de la transcripción de los genes *COR* (*Cold-Regulated*) (Hemsley et al., 2014) (Tabla 1).

MEDIADOR 16

MED16 está conservado en levaduras, animales y plantas (Bäckström et al., 2007). La subunidad MED16/SENSITIVE TO FREEZING 6 fue identificada en las mutantes de *Arabidopsis thaliana* incapaces de aclimatarse al frío (Warren et al., 1996). La baja de temperatura ambiental, alrededor de 2-5 °C, afecta adversamente el crecimiento y el desarrollo vegetal por lo que las plantas activan mecanismos de adaptación codificados en los genes *COR* (Tomashow et al., 1997). La expresión de los genes *COR* depende de los factores de transcripción CBF1, CBF2 y CBF3 (C-box binding factor 1, 2 y 3) (Shi et al., 2017), también conocidos en *Arabidopsis* como DREB1B, DREB1C y DREB1A, respectivamente (Liu et al., 1998). MED16/SFR6 tiene una función crítica durante la transcripción de los genes *COR* actuando río abajo de los factores CBF (Knight et al., 2009). MED16 en conjunto con las subunidades MED14 y MED2 es necesaria para el reclutamiento de la RNA pol II durante la unión de los factores CBF a los elementos C-repeat/drought responsive element (CRT/DRE) de la región promotora de los genes *COR* (Hemsley et al., 2014).

MED16/SFR6 también ha sido implicado en la tolerancia al estrés osmótico. En las plantas mutantes *sfr6* I está bloqueada la expresión de los genes *COR* dependiente de CRT y esto conduce a la disminución de la tolerancia al estrés y la incapacidad de aclimatación al frío (Boyce et al., 2003). Pasrija y Thakur, 2012 vincularon a MED16 con las respuestas al estrés salino debido a que la presencia de NaCl en el medio incrementó sus niveles de expresión. En respuesta a otras hormonas vegetales, sólo los Brasinoesteroides (BR) fueron capaces de disminuir la expresión de *MED16*. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido alguna relación entre los BR y otras fitohormonas con las respuestas al estrés abiótico regulada por MED16. Adicionalmente, MED16 también está involucrada en la respuesta por deficiencia del hierro al modular la expresión de los genes de captación del hierro *IRT1* (*IRON-REGULATED TRANSPORTER 1*) y *FRO2* (*FERRIC REDUCTION OXIDASE 2*). Dicha modulación se regula mediante la interacción del factor de transcripción FIT (*FER-LIKE IRON DEFICIENCY-INDUCED TRANSCRIPTION FACTOR*) con la proteína Ib bHLH (Ib basic Helix-Loop-Helix) y la consiguiente formación del complejo FIT/Ib bHLH, el cual se une al promotor de los genes *IRT1* y *FRO2* (Zhang et al., 2014). El hierro es un nutriente esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas pero es tóxico en exceso (Li et al., 2016). La utilización de antagonistas del etileno intensifican los efectos adversos provocados por el hierro, como la inhibición de la longitud de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*, mientras que las mutantes sobreproductoras del etileno (*eto1-1* y *eto1-2*) redujeron significativamente la inhibición, por lo cual se sugirió que el etileno desempeña una función esencial en la homeostasis del hierro (Li et al., 2015). Por otra parte, MED16 también controla la homeostasis del hierro mediante la asociación con los factores de transcripción EIN3 (*ETHYLENE INSENSITIVE 3*) y EIL1 (*ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE 1*) involucrados en la vía de señalización del etileno a través de la subunidad MED25 (Yang et al., 2014). Sin embargo, la conexión directa entre MED16 y el etileno durante la resistencia al exceso del hierro no ha sido totalmente clarificada (Tabla 1).

MEDIADOR 25

MED25, inicialmente denominada PFT1 (*PHYTOCRHOME AND FLOWERING TIME1*), es una proteína nuclear que actúa río abajo de PHYB para regular la expresión de *FLOWERING LOCUS T (FT)* durante la fase de floración en *Arabidopsis* (Cerdán y Chory, 2003; Bäckström et al., 2007). MED25, también se ha relacionado con el mantenimiento de los niveles redox en la raíz (Sundaravelpandian et al., 2013), con la defensa contra patógenos (Kidd et al.,

2009), en procesos de desarrollo como la formación de las raíces laterales (Raya-González et al., 2015), en la homeostasis del hierro junto con MED16 (Yang et al., 2014) y en otras respuestas relacionadas al estrés abiótico. MED25 es requerida durante la represión transcripcional de los genes de respuesta al crecimiento, a la sequía, al ABA y a la resistencia a salinidad (Elfving et al., 2011; Chen et al., 2012). En el estrés salino, MED25 funciona río abajo de los factores de transcripción DREB2A, ZFHD1 y MYB-like promoviendo el reclutamiento de la RNA pol II a través de un mecanismo conservado en todas las especies vegetales (Elfving et al., 2011). La represión de los genes en respuesta a la sequía involucra la interacción de MED25 y el factor de transcripción DREB2A (Elfving et al., 2011). La mutante *med25* incrementa el nivel de expresión de los genes marcadores de respuesta a la sequía, mientras que la mutante *dreb2a* disminuye la expresión de los mismos genes lo que indica funciones opuestas durante la aclimatación (Elfving et al., 2011).

El ABA está íntimamente relacionado con la sequía, el calor y la salinidad (Suzuki et al., 2016). MED25 como muchas otras proteínas, está involucrada en la regulación del ABA a través del factor de transcripción ABA INSENSITIVE5 (ABI5) (Chen et al., 2012). ABI5 funciona en la señalización de ABA y es muy importante en las adaptaciones fisiológicas durante las condiciones ambientales desfavorables (Skubacz et al., 2016). En la ausencia del ABA, MED25 es requerido para mantener los niveles bajos de la proteína ABI5, en tanto induce la transcripción de *ABI5* después del tratamiento con ABA (Chen et al., 2012). La función ambigua y aparentemente antagónica de MED25 durante la señalización del ABA demuestra un papel importante en las respuestas a estímulos ambientales diversos.

MEDIADOR 37

MED37 es una subunidad del complejo mediador específica de las plantas identificada en *Arabidopsis* por inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-AtMed6 (Bäckström et al., 2007). También MED37 es conocida como BiP1 (BINDING INMUNOGLOBULIN PROTEIN1), una proteína del retículo endoplasmático (RE) inicialmente caracterizada como un miembro de la familia de las chaperonas HSP70 (Heat Shock Protein 70) (Rose et al., 1989). En *Arabidopsis*, BiP participa en el desarrollo del gametofito femenino y es esencial para la regulación de la proliferación del endospermo (Maruyama et al., 2016). MED37 es inducible por brasinoesteroides y estímulos lumínicos (Hong et al., 2008; Pasrija y Thakur, 2012). La expresión de *MED37* también es sobreexpresada en estrés ocasionado por frío y salinidad, sin embargo, dicha expresión es desregulada en presencia del ácido jasmónico (JA) (Pasrija y Thakur, 2012). En plantas de tabaco y soya, la

sobreexpresión de BiP atenúa el estrés e incrementa la tolerancia a la sequía (Alvim et al., 2001). Lo anterior sugiere que MED37 funciona como un centro regulador de distintas vías de señalización durante las respuestas a diversos estímulos ambientales.

Conclusión

El complejo MEDIADOR en *Arabidopsis thaliana* está integrado por 32 subunidades proteínicas que orquestan la transcripción mediante el control de la actividad y el reclutamiento de la RNA pol II y de los factores asociados. Su función es la integración de las señales ambientales, nutricionales y hormonales, así como la expresión de los genes implicados en el desarrollo y crecimiento vegetal en condiciones desfavorables. Las mutantes de los genes *MED5* (*med5a* y *med5b*) están afectadas en la biosíntesis de fenilpropanoides, así como en la resistencia al estrés abiótico. La mutante *med16* es incapaz de adaptarse a las bajas temperaturas por defectos en la expresión de los genes *COR* de adaptación al enfriamiento/congelamiento. *MED25* es requerida durante el crecimiento, la sequía y resistencia a la salinidad y *MED25* junto con *MED16* están involucradas en la homeostasis del hierro a través de la regulación de los genes de respuesta al etileno. La expresión de *MED37* también es sobrerregulada por el estrés ocasionado por frío y salinidad y se ve positivamente afectada por los cambios en iluminación. En conjunto, esta información destaca el papel preponderante del complejo MEDIADOR en la biología de los vegetales.

Agradecimientos

A la CIC de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Bibliografía

- Ahmad P. y Prasad M. N. V. 2012. Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change. Department of Plant Sciences. University of Hyderabad, India. 509 pp.
- Alvim F. C., Carolino S. M. B., Cascardo J. C. M., Nunes C. C., Martinez C. A., Otoni W. C. y Fontes E.P.B. 2001. Enhanced accumulation of BiP in transgenic plants confers tolerance to water stress. *Plant Physiol.* 126:1042-1054.

- Ansari S. A. y Morse R. H. 2012. Selective role of Mediator tail module in the transcription of highly regulated genes in yeast. *Transcription* 3:110-114.
- Asturias F. J., Jiang Y. W., Myers L. C., Gustafsson C. M. y Kornberg R. D. 1999. Conserved structure of Mediator and RNA Polymerase II holoenzyme. *Science* 283:985-987.
- Autran D., Jonak C., Belcram K., Beemster G. T. S., Kronenberger J., Grandjean O., Inzé D. y Traas J. 2002. Cell number and leaf development in Arabidopsis: a functional analysis of the *STRUWWELPETER* gene. *EMBO J.* 21:6036-6049.
- Bäckström S., Elfving N., Nilsson R., Wingsle G. y Björklund S. 2007. Purification of plant Mediator from *Arabidopsis thaliana* identifies PFT1 as the Med25 subunit. *Mol. Cell* 26:717-729.
- Balciunas D. y Ronne H. 1995. Three subunits of the RNA polymerase II mediator complex are involved in glucose repression. *Nucleic Acids* 23:4421-4425.
- Baumli S., Hoepfner S., y Cramer P. 2005. A conserved mediator hinge revealed in the structure of the MED7.MED21 (Med7.Srb7) heterodimer. *J. Biol. Chem.* 280:18171-18178.
- Beve J., Hu G-Z., Lawrence C.M., Balciunas D., Werngren O., Hultenby K., Wibom R., Ronne H. y Gustafsson C.M. 2005. The structural and functional role of Med5 in the yeast mediator tail module. *J. Biol. Chem.* 280:41366-41372.
- Berk A. J. 1999. Activation of RNA polymerase II transcription. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:330-335.
- Bonawitz N. D., Soltau W. L., Blatchley M. R., Powers B. L., Hurlock A. K., Seals L. A., Weng J-K., Stout J. y Chapple C. 2011. REF4 y RFR1, subunits of the transcriptional coregulatory complex mediator, are required for phenylpropanoid homeostasis in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* 287:5434-5445.
- Bonawitz N. D., Kim J. I., Tobimatsu Y., Ciesielski P. N., Anderson N. A., Ximenes E., Maeda J., Ralph J., Donohoe B. S., Ladisch M. y Chapple C. 2014. Disruption of mediator rescues the stunted growth of lignin-deficient Arabidopsis mutant. *Nature* 509:376-380.
- Borggreve T., Davis R., Erdjument-Bromage H., Tempst P. y Kornberg R. D. 2002. A complex of the Srb8, -9, -10, and -11 transcriptional regulatory proteins from yeast. *J. Biol. Chem.* 277:44202-44207.
- Bourbon H. M., Aguilera A., Ansari A. Z., Asturias F. J., Berk A. J., Björklund S., Blackwell T. K., Borggreve T., Carey M., Carlson M., Conaway J. W., Conaway R. C., Emmons S. W., Fondell J. F., Freedman L. P., Fukasawa T., Gustafsson C. M., Han M., He X., Herman P. K., Hinnebusch A. G., Holmberg S., Holstege F. C., Jaehning J. A., Kim Y-J., Kuras L., Leutz A., Lis J. T.,

- Meisterernest M., Naar A. M., Nasmyth K., Parvin J. D., Ptashne M., Reinberg D., Ronne H., Sadowski I., Sakurai H., Sipiczki M., Sternberg P. W., Stillman D. J., Strich R., Struhl K., Svejstrup J. Q., Tuck S., Winston F., Roeder R. G. y Kornberg R.D. 2004. A unified nomenclature for protein subunits of mediator complex linking transcriptional regulators to RNA polymerase II. *Mol Cell* 14:553-557.
- Bourbon H. M. 2008. Comparative genomics supports a deep evolutionary origin for the large, four-module transcriptional mediator complex. *Nucleic Acids Res.* 36:3993-4008.
- Boyce J. M., Knight H., Deyholos M., Openshaw M. R., Galbraith D. W., Warren G. y Knight M. R. 2003. The *str6* mutant of *Arabidopsis* is defective in transcriptional activation via CBF/DREB1 and DREB2 and shows sensitivity to osmotic stress. *Plant J.* 34:395-406.
- Cai G., Imasaki T., Yamada K., Cardelli F., Takagi Y. y Asturias F.J. 2010. Mediator head module structure and functional interactions. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17:273-279.
- Carlsten J. O. P., Zhu X. y Gustafsson C. M. 2013. The multitasking Mediator Complex. *Cell* 38:531-537.
- Cerdán P. D. y Chory J. 2003. Regulation of flowering time by light quality. *Nature* 423:881-885.
- Chen R., Jiang H., Li L., Zhai Q., Qi L., Zhou W., Liu X., Li H., Zheng W., Sun J. y Li C. 2012. The *Arabidopsis* Mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors. *Plant Cell* 24:2898-2916.
- Dixon R. A. y Paiva N. L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.
- Dolan W. L. y Chapple C. 2017. Conservation and divergence of mediator structure and function: Insights from plants. *Plant Cell Physiol.* 58:04-21.
- Dotson M. R., Yuan C. X., Roeder R. G., Myers L. C., Gustafsson C. M., Jiang Y. W., Li Y., Kornberg R. D. y Asturias F. J. 2000. Structural organization of yeast and mammalian mediator complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:14307-14310.
- Elfving N., Davoine C., Benlloch R., Blomberg J., Brännström J., Müller D., Nilsson A., Ulfstedt M., Ronne H., Wingsle G., Nilsson O. y Björklund S. 2011. The *Arabidopsis thaliana* Med25 mediator subunit integrates environmental cues to control plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 108:8245-8250.

- Fondell J. D., Ge H. y Roeder R. G. 1996. Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 8329–8333.
- Gamalero E. y Glick B. R. 2012. Ethylene and abiotic stress tolerance in plants. P. 395-412. En: *Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate.* (Parvaiz Ahmad y M. N. V. Prasad, Eds). Department of Plant Sciences. University of Hyderabad. India.
- Gill S. S. y Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48:909-930.
- Gillmor C. S., Park M. Y., Smith M. R., Pepitone R., Kerstetter R. A. y Poethig R. S. 2010. The MED12-MED13 module of Mediator regulates the timing of embryo patterning in *Arabidopsis*. *Development* 137:113–122.
- Gu W., Malik S., Ito M., Yuan C. X., Fondell J. D., Zhang X., Martinez E., Qin J. y Roeder R. G. 1999. A novel human SRB/MED-containing cofactor complex, SMCC, involved in transcriptional regulation. *Mol. Cell* 3:97–108.
- Guglielmi B., Van Berkum N. L., Klapholz B., Bijma T., Boube M., Boschiero C., Bourbon H. M., Holstege F. C. P. y Werner M. 2004. A high resolution protein interaction map of the yeast mediator complex. *Nucl. Acids Res.* 32:5379–5391.
- Hahn S. 2004. Structure and mechanism of the RNA Polymerase II transcription machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:394-403.
- Hemsley P. A., Hurst C. H., Kaliyadasa E., Lamb R., Knight M. R., De Cothi E. A., Steele J. F. y Knight H. 2014. The *Arabidopsis* Mediator Complex subunits MED16, MED14, and MED2 regulate Mediator y RNA Polimerase II recruitment to CBF-Responsive Cold-Regulated genes. *Plant Cell* 26:465-484.
- Hong Z., Jin H., Tzfira T. y Li J. 2008. Multiple mechanism-mediated retention of a detective Brassinosteroid receptor in the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:3418-3429.
- Izbianska K., Arasimowicz-Jelonek M. y Deckert J. 2014. Phenylpropanoid pathway metabolites promote tolerance response of lupine roots to lead stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110:61-67.
- Jiang Y. W., Veschambre P., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Conaway J. W., Conaway R. C. y Kornberg R. D. 1998. Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:8538-8343.

- Kelleher R. J., Flanagan P. M. y Kornberg R. D. 1990. A novel Mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61:1209–1215.
- Kidd N. B., Edgar C. I., Kumar K. K., Aitken E. A., Schenk P. M., Manners J. M. y Kazan K. 2009. The Mediator Complex subunit PFT1 is a key regulator of jasmonate-dependent defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 21:2237-2252.
- Kim Y. J., Björklund S., Li Y., Sayre M. H. y Kornberg R. D. 1994. A multiprotein mediator of transcriptional activation and its interaction with the C-terminal repeat domain of RNA polymerase II. *Cell* 77:599-608.
- Knight H., Mugford S. G., Ülker B., Gao D., Thorlby G. y Knight M. R. 2009. Identification of SFR6, a key component in cold acclimation acting post-translationally on CBF function. *Plant J.* 58:97-108.
- Koschubs T., Lorenzen K., Baumli S., Sandstrom S., Heck A. J. y Cramer P. 2010. Preparation and topology of the Mediator middle module. *Nucleic Acids Res.* 38:3186-3195.
- Kwon J. Y., Park J. M., Gim B. S., Han S. J., Lee J. y Kim Y. J. 1999. *Caenorhabditis elegans* Mediator complexes are required for developmental-specific transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:14990-14995.
- Lariviere L., Geiger S., Hoepfner S., Rother S., Strasser K. y Cramer P. 2006. Structure and TBP binding of the Mediator head subcomplex Med8-Med18-Med20. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:895-901.
- Lariviere L., Plaschka C., Seizl M., Wenzek L., Kurth F. y Cramer P. 2012. Structure of the Mediator head module. *Nature* 492:448-451.
- Lee Y. C., Park J. M., Min S., Han S. J. y Kim Y.-J. 1999. An activator binding module of yeast RNA Polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell Biol.* 19:2967-2976.
- Li G., Xu W., Kronzucker H. J. y Shi W. 2015. Ethylene is critical to the maintenance of primary root growth and Fe homeostasis under Fe stress in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 66:2041-2054.
- Li G., Kronzucker H. J. y Shi W. 2016. Root developmental adaptation to Fe toxicity: mechanism and management. *Plant Signal. Behav.* 11:e1117722.
- Li Y., Björklund S., Jiang Y. W., Kim Y.-J., Lane W. S., Stillman D. J. y Kornberg R. D. 1995. Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of the mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:10864-10868.
- Liao S.-M., Zhang J., Jeffery D. A., Koleske A. J., Thompson C. M., Chao A. J., Viljoe M., van Vuuren H. J. J. y Young R. A. 1995. A kinase-cyclin pair in the RNA polymerase II holoenzyme. *Nature* 374:193-196.

- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1391-1406.
- Liu Y., Ranish J. A., Aebersold R. y Hahn, S. 2001. Yeast nuclear extract contains two mayor forms of RNA Polymerase II Mediator Complex. *J. Biol. Chem.* 276:7169-7175.
- Malik S. y Roeder R.G. 2000. Transcriptional regulation through Mediator-like coactivators in yeast and metazoan cells. *Trends Biochem. Sci.* 25:277-83.
- Mathur S., Vyas S., Kapoor S. y Tyagi K. 2011. The Mediator Complex in plants: structure, phylogeny, and expression profiling of representative genes in a dicot (*Arabidopsis*) and a monocot (Rice) during reproduction and abiotic stress. *Plant Physiol.* 157:1609-1627.
- Maruyama D. y Higashiyama T. 2016. The end of temptation: the elimination of persistent synergid cell identity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 34:122-126.
- O'Connor C.M. y Adams J.U. 2010. *Essentials of Cell Biology*. Cambridge, MA: NPG Education. *Massachusetts*, United States.
- Park J. M., Gim B. S., Kim J. M., Yoon J. H., Kim H. S., Kang J. G. y Kim Y. J. 2001. *Drosophila* Mediator complex is broadly utilized by diverse gene-specific transcription factors at different types of core promoters. *Mol. Cell Biol.* 21:2312-2323.
- Pasrija R. y Thakur J.K. 2012. Analysis of differential expression of Mediator subunit genes in *Arabidopsis*. *Plant Signal Behav.* 7:1676-1686.
- Paule M. R. y White R. J. 2000. Transcription by RNA polymerase I and III. *Nucleic Acids Res.* 28:1283-1298.
- Pereira A. 2016. Plant abiotic stress challenges from the changing environment. *Front. Plant Sci.* 7:1123.
- Plaschka C., Lariviere L., Wenzek L., Seizl M., Hemann M., Tegunov D., Petrotchenko E. V., Borchers C. H., Baumeister W., Herzog F., Villa E. y Cramer P. 2015. Architecture of the RNA polymerase II-Mediator core initiation complex. *Nature* 518:376-380.
- Raya-González J., Ortiz-Castro R., Ruiz-Herrera L.F., Kazan K. y López-Bucio J. 2015. PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME1/MEDIATOR25 regulates lateral root formation via auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 165:880-894.

- Robinson J. P., Trnka M. J., Pellarin R., Greenberg C. H., Bushnell D. A., Davis R., Burlingame A. L., Sali A. y Kornberg R. D. 2015. Molecular architecture of the yeast mediator complex. *J Biophys. Struct. Biol.* 4:e08719
- Rose M. D., Misra L. M. y Vogel J. P. 1989. *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian *BiP/GRP78* gene. *Cell* 57:1211-1221.
- Samanta S. y Thakur J. 2015. Importance of Mediator complex in the regulation and integration of diverse signaling pathways in plants. *Front. Plant. Sci.* 6:757
- Shandilya J. y Roberts S. G. E. 2012. The transcription cycle in eukaryotes: From productive initiation to RNA polymerase II recycling. *Biochim. Biophys. Acta* 1819:391-400.
- Shi Y., Huang J., Sun T., Wang X., Chenqi Z., Ai Y. y Gu H. 2017. The precise regulation of different COR genes by individual CBF transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *J. Integr. Plant Biol.* 59:118-133.
- Skubacz A., Daszkowska-Golec A. y Szarejko I. 2016. The role and regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Front. Plant Sci.* 7:1184.
- Sundaravelpandian K., Chandrika N. N. y Schmidt W. 2013. PFT1, a transcriptional Mediator complex subunit, controls root hair differentiation through reactive oxygen species (ROS) distribution in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 197:151-161.
- Suzuki N., Bassil E., Hamilton J. S., Inupakutika M. A., Zandalinas S. I., Tripathy D., Luo Y., Dion E., Fukui G., Kumazaki A., Nakao R., Rivero R. M., Verbeck G. F., Azad R. K., Taatjes D. J., Nää, A. M., Ill F. A., Nogales E. y Tjian R. 2002. Structure, function, and activator-induced conformation of the CSRFP coactivator. *Science* 295:1058-1062.
- Suzuki N., Bassil E., Hamilton J. S., Inupakutika M. A., Zandalinas S. I., Tripathy D., Luo Y., Dion E., Fukui G., Kumazaki A., Nakano R., Rivero R. M., Verbeck G. F., Azad R. K., Blumwald E. y Mittler R. 2016. ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and heat stress. *PLoS ONE* 11: e0147625.
- Tao J.-J., Chen H.-W., Ma B., Zhang W.-K., Chen S.-Y. y Zhang J.-S. 2015. The role of ethylene in plants under salinity stress. *Front. Plant Sci.* 6:1059.
- Takagi Y., Calero G., Komori H., Brown J. A., Ehrensberger A. H., Hudmon A., Asturias F. y Kornberg R. D. 2006. Head module control of mediator interactions. *Mol. Cell* 23:355-364.
- Thomas M.C. y Chiang C-H. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 41:105-178.

- Tomashow M. F., Stockinger E. J., Jaglo-Ottosen K. R., Gilmour S. J. y Zarka D. G. 1997. Function and regulation of *Arabidopsis thaliana* COR (cold-regulated) genes. *Acta Physiol. Plant* 19:497-504.
- Tsai K. L., Tomomori-Sato C., Sato S., Conaway R. C., Conaway J. W. y Asturias F. J. 2014. Subunit architecture and functional modular rearrangements of the transcriptional mediator complex. *Cell* 157:1430-1444.
- Wang X., Sun Q., Ding Z., Ji J., Wang J., Kong X., Yang J. y Cai G. 2014. Redefining the modular organization of the core Mediator complex. *Cell Res.* 24:796-808.
- Warren G., McKown R., Marin A. y Teutonico R. 1996. Isolation of mutations affecting the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 111:1011-1019.
- Yang Y., Ou, B., Zhang J., Si W., Gu H., Qin G. y Qu L-J. 2014. The *Arabidopsis* Mediator subunit MED16 regulates iron homeostasis by associating with EIN3/EIL1 through subunit MED25. *Plant J.* 77:838-851.
- Yang Y., Li L. y Qu L.J. 2016. Plant Mediator complex and its critical functions in transcription regulation. *J. Integr. Plant Biol.* 58:106-118.
- Zhang Y., Wu H., Wang N., Fan H., Chen C., Cui Y., Liu H. y Ling H-Q. 2014. Mediator subunit 16 functions in the regulation of iron uptake gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 203:770-783.
- Zhang, D. 2014. *Abscisic Acid: Metabolism, transport and signaling*. New York, NY: Springer
- Zhou M. y Law J. A. 2015. RNA Pol IV and V in gene silencing: rebel polymerases evolving away from Pol II's rules. *Curr. Opin. Plant Biol.* 27:154-164