

UCH-FC
MAG-B
M828
C. 1

Título de la Tesis:

Estudio del rol del tráfico endocítico en la
diferenciación de las células del periciclo a células
fundadoras de raíces laterales en *Arabidopsis*
thaliana.

**Tesis entregada a la Universidad de Chile en
cumplimiento parcial de los requisitos para optar al
grado de Magíster en Ciencias Biológicas.**

Por Stefanía Paula Morales Herrera

Marzo, 2017

Director de Tesis Dr. Lorena Norambuena Morales

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Stefanía Paula Morales Herrera

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 17 de Enero del 2017.

Director de Tesis:

Dr. Lorena Norambuena Morales



.....

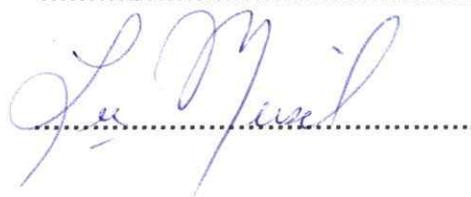
Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Michael Handford



.....

Dr. Lee Meisel



.....

Dedico esta tesis a mis padres por todos los sacrificios que han realizado para mi formación personal y profesional... Dedicado también a mis sobrinos "más nuevos" (Pedrito y Dieguito) que me dan todo el ánimo con esas sonrisitas que me regalan...

"Tu mente siempre te recuerda lo malo, lo difícil, lo negativo. Recuérdale tú a ella tu grandexa, tu inmensidad, tu pasión, tu fortaleza" (Jorge Álvarez Canacho)

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Stefania Paula Morales Herrera. Nací en una tarde de verano el día 2 de Enero de 1991 en la ciudad de Quillota. Soy la hija menor de Augusto y Sandra. Tengo tres hermanas mayores: Fabiola, Carolina e Ingrid. Actualmente soy tía de 6 sobrinos: Augusto, Cris, Laura, Arturo, Pedro y Diego. Desde pequeña he crecido en una familia unida y tradicional que me ha entregado valores como el respeto y la responsabilidad,. Estos valores me han permitido desenvolverse como la persona que soy actualmente. Desde el 1996 hasta el 2008 estudié en el Colegio San Ignacio de la Ssalle en Quillota, en el que pensaba irme por el mundo matemático, pero llegué al área de las Ciencias Biológicas cuando me presentaron a "Biotec". Es por esto que el 2009 entré a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile y con ello, me vine a Santiago. En esta nueva ciudad aprendí que puedo sobrevivir sola y entender que elegí lo que me gusta hacer, que mi familia siempre me apoyará para cumplir mis sueños y que "es lo mío". El 2014 me gané la Beca CONICYT para realizar mi Magíster en Cs. Biológicas en la Universidad de Chile en el Centro de Biología Molecular Vegetal. Durante mi Tesis de Magíster, descubrí que tengo las herramientas necesarias para seguir cumpliendo mis metas profesionales y que la gente que está en todas es la apropiada para mantener en mi vida. Es por esto, que "ad portas" de defender esta Tesis, espero que este sea el comienzo de nuevas aventuras y que lo mejor de mi vida esté por venir...

AGRADECIMIENTOS

Parto agradeciendo a mi Mamá y mi Papá, porque lo han dado todo por mí, me han apoyado en cada idea loca que se me ha ocurrido y me han soportado TODA MI VIDA!

También agradezco a mis hermanas Caro, Ingrid y Faby, por siempre apoyarme, a pesar de entender bien poco a lo que me dedico. Especialmente a la Caro que me motiva en todas las locuras y sueños que se me ocurren. Además a mis "hermanos" Augustito y Cristobital (que ya son Augusto y Cristóbal), por pensar que soy la "más seca" y siempre pensar que me la puedo. Agradezco a mis sobrinitos Laurita, Tutito, Pedrito y Dieguito, por los momentos que no necesitan palabras para hacerte feliz y animarte.

Doy gracias por tener amigas de toda la vida siempre presentes (Kissy, Vale y Jeka), que a pesar de no vernos tan seguido, la amistad lleva más de 15 años y sigue intactamente genial =)

Le doy gracias a mis amigos Biotec que quiero demasiado y que me han demostrado que la amistad es estar presente y pasarla bien, especialmente al Luisfe (por todos esos maridos que sólo tú recuerdas jajaja, mejor amigo hasta el fin (L)), a la Ceci (por tanta motivación y apañe junta en una sola persona, hermanas separadas al nacer), a la Chichizú (por siempre motivarme a hacer de todo jujuju y estar en todas conmigo), al Karlos (por ser odioso y quererme/criticarme con cariño), a la Vale (por ser mi roomie y apoyarme/aguantarme todos estos años), al Pito (aunque hayamos estado distanciados, hoy te siento súper mega presente en mi vida :D), a la Mística (por siempre tirar para arriba y ser tan mística jijiji), al Camilín (por a pesar de no demostrarnos tu cariño, yo sé que el cariño está presente) y al Sergio (por siempre preocuparse el cómo estoy, día a día). Porque a pesar de haberme visto en mis peores momentos, siempre han estado dándome fuerzas y apoyándome, entregándome lindos recuerdos de esta entretenida aventura.

Le doy gracias al Team LNM "original", que fueron los que me formaron en el mundo del laboratorio "de plantas", especialmente a la Tía Mirna, Ceci A., Patito, Claudín, Ricardito y Carlitos. Destacando a la Milycienta, una amiga que tendré hasta viejita, que está lejitos pero siempre presente (tantas aventuras vividas :D, gracias por todo).

También agradezco a todo el equipo humano del Centro de Biología Molecular Vegetal, los cuales entregaron un ambiente de discusión y distensión ideal para llevar a cabo esta Tesis de Magíster. Cabe mencionar a los "CSK y otras" (Maripi, Leti, Flaka, Hita, entre otros) y a la Vicky y la Gaby (Ange y Carmen-Gloria), que fueron los que me acogieron en estos últimos meses y

han dado todo su apoyo, apañe, motivación y locura para poder terminar esta etapa.

Le agradezco a la Profe Lore por ser mi tutora en mi Seminario de Título y en esta Tesis de Magíster, porque me ayudó a crecer como científica (y obvio a notar cosas que tan sólo una mujer apreciaría).

Se agradece a los investigadores que nos enviaron semillas de las líneas mutantes y transgénicas para poder llevar a cabo esta Tesis de Magíster: Dr. Tom Beeckman, Dr. Stephanie Roberts, Dr. Joop Vermeer, Dr. Philip Benfey y Dr. Natasha Raikhel.

Por último, pero no menos importante, se agradece a la Moral Distraída por motivarme a escribir esta Tesis de Magíster, porque sin su música pachanguera no podría haberla terminado, así que no olviden una gran enseñanza que me entregaron "*pero que rico que esto suena y que sabroso que se baila*".

FINANCIAMIENTO

Para la realización de esta Tesis de Magíster se contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT 1120289 dirigido por la Dra. Lorena Beatriz Norambuena Morales y a la Beca de Magíster Nacional CONICYT-PCHA/Magíster Nacional/2014-22141870.

Además se contó con el apoyo del proyecto VID Enlace Grant 2016ENL015/16 UCH.

ÍNDICE

BIOGRAFÍA.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
FINANCIAMIENTO.....	vi
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvii
ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. <i>Sistema radicular en Arabidopsis thaliana</i>	1
1.2 <i>Etapas en la formación de raíces laterales</i>	5
1.3 <i>Eventos moleculares y celulares involucrados en el priming de raíces laterales</i>	7
1.4 <i>Sistema de endomembranas en plantas</i>	10
1.5 <i>Efectos fisiológicos de Sortin2 en Arabidopsis thaliana</i>	12
1.6 <i>Planteamiento del Problema</i>	14

1.7 Hipótesis.....	16
1.8 Objetivo General.....	16
1.9 Objetivos Específicos.....	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 Líneas de semillas.....	18
2.2 Estratificación y esterilización de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>....	19
2.3 Crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	19
2.4 Tratamientos con Sortin2 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	20
2.5 Evaluación de la temporalidad de los eventos de priming de raíces laterales.....	21
2.5.1 Cuantificación de las células del periciclo que acumulaban los marcadores de priming de raíces laterales.....	22
2.6 Evaluación de la endocitosis desde membrana plasmática hacia la vacuola del trazador endocítico FM4-64.....	23
2.7 Análisis de la población de MVB/PVC/LE ARA7-positivos mediante inmunofluorescencia indirecta.	24
2.8 Visualización de marcadores fluorescentes mediante microscopía confocal.....	26
2.9 Evaluación de los niveles de transcritos de GATA23 y MAKR4.....	26
2.9.1 Extracción de ARN y generación de ADNc.....	27

2.9.2 Condiciones del ensayo RT-qPCR.....	28
2.10 Análisis Estadístico.....	32
3.RESULTADOS.....	33
3.1 Estudio de la temporalidad de los eventos moleculares y celulares de priming de raíces laterales promovidos por Sortin2.....	33
3.1.1 Evaluación de la endocitosis de PIN2-GFP en raíces de Arabidopsis thaliana.....	34
3.1.2 Evaluación de la activación del factor de transcripción GATA23 en las células del periciclo en tratamiento con Sortin2.....	37
3.1.3 Evaluación de la acumulación de la proteína MAKR4 en las células del periciclo en tratamiento con Sortin2.....	42
3.1.4 Análisis de la morfología de la endodermis bajo tratamiento con Sortin2.....	46
3.2 Estudio del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 en la colección de mutantes, con defectos en la formación de raíces laterales y defectos en el sistema de endomembranas, que presentan distinta sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2.....	51
3.2.1 Evaluación de la endocitosis hacia la vacuola del trazador endocítico FM4-64 en tratamiento con Sortin2 en la colección de mutantes, con defectos en la formación de raíces laterales y defectos en el sistema de endomembranas, que presentan distinta sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2.....	52
3.2.2 Análisis de la población de MVB/PVC/LE ARA7-positivos mediante	

<i>inmunofluorescencia bajo tratamiento con Sortin2.....</i>	<i>66</i>
<i>3.3 Evaluación de la inducción de los eventos de priming de raíces laterales por Sortin2 en la colección de mutantes, con defectos en la formación de raíces laterales y defectos en el sistema de endomembranas, que presentan distinta sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2.....</i>	<i>69</i>
<i>3.3.1 Evaluación de los niveles de transcrito de los genes GATA23 y MAKR4 bajo tratamiento con Sortin2.....</i>	<i>70</i>
4. DISCUSIÓN.....	79
<i>4.1 Existe una correlación entre la sensibilidad a la inducción de las raíces laterales por Sortin2 y la promoción del efecto endocítico gatillado por este compuesto.....</i>	<i>81</i>
<i>4.2 Existe una relación de causa-efecto entre la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillada por Sortin2 y la inducción de los eventos de activación de LRFCs.....</i>	<i>85</i>
<i>4.3 Sortin2 estimularía la relocalización de componentes macromoleculares para inducir la especificación de las LRFCs.....</i>	<i>92</i>
<i>4.4 El tratamiento con Sortin2 altera la morfología de las vacuolas.....</i>	<i>97</i>
5. CONCLUSIONES.....	101
6. BIBLIOGRAFÍA.....	103
7. ANEXOS.....	115
<i>ANEXO I: Mutantes que han sido descritas por presentar defectos en el tráfico de proteínas o en la formación de raíces laterales presentan</i>	

<i>distinta sensibilidad, a la de su parental silvestre, al efecto de Sortin2 en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.....</i>	<i>115</i>
<i>ANEXO II: Sensibilidad al efecto de Sortin2 en el trafico endocítico a la vacuola de las mutantes estudiadas.....</i>	<i>116</i>
<i>ANEXO III: Fenotipo de endosomas y vacuolas en las mutantes que presentan diferente sensibilidad al efecto de Sortin2 a la inducción de raíces laterales por Sortin2 respecto a su parental silvestre.....</i>	<i>130</i>
<i>ANEXO IV: La diferenciación de las células fundadoras de raíces laterales inducida por Sortin2 requiere del tráfico de MVB/PVC/LE hacia la vacuola funcional.....</i>	<i>133</i>
<i>ANEXO V: Lista de mutantes y líneas transgénicas de Arabidopsis que han sido descritas por presentar defectos en el tráfico de proteínas y/o formación de raíces laterales.....</i>	<i>134</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura de la raíz Primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Figura 2: Formación de raíces laterales en <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
Figura 3: Sistema de endomembranas en plantas.....	11
Figura 4: Estructura química del compuesto Sortin2.....	12
Figura 5: Esquema del proceso de internalización del trazador fluorescente FM4-64.....	24
Figura 6: Los productos amplificados mediante RT-qPCR de <i>GATA23</i> y <i>MAKR4</i> corresponden a productos únicos.....	29
Figura 7: Sortin2 induce la acumulación de PIN2-GFP en la vacuola a las 4 horas de tratamiento.....	36
Figura 8: Sortin2 promueve la activación transcripcional de <i>GATA23</i> en las células del periciclo de la zona de la raíz primaria cercana al meristema basal.....	39
Figura 9: La inducción de la activación transcripcional de <i>GATA23</i> ocurre a las 5 horas de tratamiento con Sortin2.....	40
Figura 10: La acumulación de <i>MAKR4</i> en una mayor población de LRFCs ocurre a las 5 horas de tratamiento con Sortin2.....	44
Figura 11: Sortin2 altera el patrón de expresión y de acumulación del marcador de endodermis <i>CASP1</i>	47
Figura 12: El tratamiento con Sortin2 altera la morfología de la vacuola en la epidermis, corteza, endodermis y periciclo de la raíz primaria de <i>A.thaliana</i>	49

Figura 13: Esquema de la estrategia que se utilizó para la clasificación de la sensibilidad de las mutantes a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2.....	55
Figura 14: <i>iaa28-1</i> y <i>slr1-1</i> son resistentes a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2.....	59
Figura 15: <i>cul1-6</i> , <i>vps53</i> y <i>sec15</i> son resistentes a la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillado por Sortin2.....	60
Figura 16: <i>aux1-21</i> , <i>acr4</i> y <i>vti12-1</i> son hipersensibles a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola promovido por Sortin2.....	61
Figura 17: 35S::PIN1, <i>vamp722</i> y <i>axr4-1</i> presentan un comportamiento similar al parental silvestre a la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillado por Sortin2.....	62
Figura 18: Sortin2 es incapaz de modificar el patrón de distribución del marcador de MVB/PVC/LE ARA7 en las raíces de las mutantes que son resistentes a Sortin2.....	67
Figura 19: Los ARNs aislados de raíces de plántulas Col-0 y de las mutantes <i>iaa28-1</i> y <i>slr1-1</i> están libres de ADNg y permiten producir ADNc de los cuales se pueden amplificar ORFs.....	72
Figura 20: Existe una correlación directa entre la masa de ADNc utilizado en la reacción de RT-qPCR y el Ct determinado mediante RT-qPCR.....	73
Figura 21: <i>GATA23</i> y <i>MAKR4</i> aumentan sus niveles de transcritos en las raíces de <i>A.thaliana</i> bajo tratamiento con Sortin2.....	76
Figura 22:El tratamiento con Sortin2 no modifica los niveles de transcrito de <i>GATA23</i> y <i>MAKR4</i> en las raíces de las mutantes resistentes a los efectos de Sortin2.....	77

Figura 23: La aceleración del tráfico endocítico a la vacuola inducido por Sortin2 sucede en tiempos previos a la activación transcripcional de GATA23 y acumulación de MAKR4 en las LRFCs por Sortin2.....	89
Figura 24: Modelo propuesto del mecanismo utilizado por Sortin2 para promover la relocalización de componentes promoviendo la especificación de las LRFCs.....	96
Figura 25: Mutantes con defectos en proteínas del sistema de endomembranas y mutantes de las diversas etapas de la formación de las raíces laterales presentan distinta sensibilidad al tratamiento con Sortin2.....	115
Figura 26: Sortin2 acelera la internalización del trazador endocítico FM4-64 hacia la vacuola en el ecotipo silvestre Col-0.....	116
Figura 27: Sortin2 acelera el tráfico desde la membrana plasmática a la vacuola del trazador endocítico FM4-64 en el ecotipo silvestre Ws.....	117
Figura 28: El tráfico endocítico hacia la vacuola de la línea sobreexpresora del facilitador de eflujo PIN1, se comporta como su parental Col-0 en tratamientos con Sortin2.....	118
Figura 29: El tráfico endocítico de la mutante del gen que codifica a la proteína de membrana asociada a vesículas: VAMP722, presenta un comportamiento similar al de su parental Col-0 frente a tratamiento con Sortin2.....	119
Figura 30: El tráfico endocítico a la vacuola de la mutante en el gen AXR4, es sensible como su parental Ws a Sortin2.....	120
Figura 31: El tráfico endocítico de la mutante ganancia de función de	

IAA28, es resistente al efecto inductor que produce Sortin2.....	121
Figura 32: El trafico endocítico a la vacuola de la mutante ganancia de función de IAA14 no es acelerado por Sortin2 como lo es en su parental silvestre.....	122
Figura 33: La mutante del gen que codifica la proteína de andamiaje CUL1 del complejo receptor SCF, es resistente a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2.....	123
Figura 34: La mutante en el gen que codifica a la proteína SEC15 que conforma parte del complejo exocítico, es resistente a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2.....	124
Figura 35: La mutante en el gen que codifica a la proteína VPS53 la que está asociada al <i>sorting</i> de proteínas vacuolares, es resistente a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2.....	125
Figura 36: La mutante en el gen que codifica a la proteína del facilitador de influxo de auxinas AUX1, es hipersensible a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2.....	126
Figura 37: La mutante en el gen que codifica a la proteína tipo serina/treonina quinasa ACR4, es hipersensible a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2.....	127
Figura 38: La mutante en el gen que codifica a la proteína VTI12 una <i>v-SNARE</i> asociada al transporte de vesículas, es hipersensible a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2.....	128
Figura 39: La mutante en el gen que codifica a la proteína F-box CEGENDUO es resistente* a la aceleración del tráfico endocítico hacia la	

vacuola por Sortin2.....129

**Figura 40: La aceleración del tráfico hacia la vacuola induciría la
diferenciación de células del periciclo a células fundadoras de raíces
laterales.....133**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de las líneas reporteras y sondas fluorescentes utilizadas en esta tesis.....	26
Tabla 2: Lista de los partidores utilizados para efectuar el RT-qPCR.....	31
Tabla 3: Localización de FM4-64 en la ruta endocítica durante la dinámica de endocitosis y sensibilidad de los efectos inducidos por Sortin2.....	64
Tabla 4: Resumen de la sensibilidad a la endocitosis de FM4-64 de las mutantes estudiadas.....	65
Tabla 5: Sensibilidad al efecto de Sortin2 en el tráfico endocítico de FM4-64, morfología de los endosomas y de las vacuolas en las líneas mutantes que presentan una sensibilidad diferente, de la de su parental silvestre, a la inducción de raíces laterales inducida por Sortin2.....	130
Tabla 6: Lista de mutantes y líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que presentan defectos en el tráfico de proteínas y en la formación de raíces laterales.....	134

ABREVIATURAS

35S	Promotor constitutivo 35S del virus mosaico de la coliflor
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AG	Aparato de Golgi
AM	Meristema apical
ARF	Factor que responde a auxina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AUX/IAA	Auxina/Ácido Indol Acético
BM	Meristema basal
BSA	Albúmina Sérica de Bovino
CASP	Dominio proteico de membrana de la Banda de Caspary
CEG	<i>Cegenduo</i>
CEI	Células iniciales de la endodermis y corteza
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CEI	Células iniciales de la endodermis y corteza
Col-0	Columbia-0
CUL1	<i>Cullin 1</i>
CW	Pared Celular
DEPC	Dietilpirocarbonato
DII	Dominio II de las proteínas Aux/IAA
DMSO	Dimetilsulfóxido

DZ	Zona de diferenciación
EE	Endosomas Tempranos
ER	Retículo Endoplasmático
EZ	Zona de elongación
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> o proteína fluorescente verde
IAA	Ácido indol acético
IBA	Ácido indol butírico
LE	Endosomas Tardíos
LRFCs	Células fundadoras de raíces laterales
LV	Vacuolas
LR/RL	<i>Lateral roots</i> o raíces laterales
MAKR4	Regulador de quinasa asociado a membrana 4
MP	Marcador de peso
MVB	Cuerpo multivesicular
MZ	Zona meristemática
NAA	Ácido 1-Naftalenacético
NPA	Ácido N-1-naftiltalámico
ORF	Marco de lectura abierto
PB	Pares de bases
PBS	Búffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pCycB1;1	Promotor endógeno del gen <i>CycB1;1</i>

pDR5	Promotor sintético inducible por auxina
PM	Membrana plasmática
PVC	Compartimento pre-vacuolar
QC	Centro quiescente
RSA	Sistema de arquitectura radicular
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real
SCF	Complejo contenedor de las proteínas Skp, Cullin y F-box
STN	Nicho de células madres
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
TGN	Red Trans-Golgi
Tm	Temperatura de desnaturación térmica
TZ	Zona de transición
WS	<i>Wassilewskija</i>
WT	<i>Wildtype</i> o silvestre

RESUMEN

Las raíces laterales (LR) se desarrollan post-embriónariamente a partir de células del periciclo que adquieren el destino de células fundadoras de raíces laterales (LRFs) en un proceso denominado *priming*. Este proceso involucra al menos dos etapas: la especificación de las LRFs y su posterior activación. La activación de las LRFs incluye diferentes eventos: la activación del factor de transcripción *GATA23*, la acumulación del regulador de quinasa asociado a membrana *MAKR4* y la disminución del volumen de las células de la endodermis contiguas a las LRFs. En contraparte, el evento que define la especificación de las LRFs todavía se desconoce. En nuestro laboratorio hemos evidenciado que la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola promueve la formación de LR independiente del complejo receptor de auxina *SCFTIR1/AFB1,2,3* utilizando el compuesto sintético Sortin2. Este biomodulador induce *de novo* la formación de LR sugiriendo que promueve la diferenciación de células del periciclo a LRFs. El objetivo de este trabajo fue establecer la relación entre la inducción de la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2 y la diferenciación de LRFs promovida por este compuesto. Encontramos que Sortin2 efectivamente promueve la diferenciación de las LRFs (inducción de la activación transcripcional de *GATA23* y la acumulación de *MAKR4* en las LRFs) en un proceso temporalmente posterior a la inducción del tráfico hacia la vacuola. Además, se utilizó la herramienta genética para estudiar la relación funcional entre el tráfico endocítico hacia la vacuola y la formación de raíces laterales. Se utilizaron mutantes, en el tráfico de proteínas o en la formación de LR, caracterizadas en nuestro laboratorio por poseer distinta sensibilidad a la inducción de la formación de raíces laterales con Sortin2. Se encontró que existía un 75% de correlación entre ambos efectos del compuesto, sugiriendo fuertemente de que se encuentran ligados y que la inducción del tráfico hacia la vacuola sería la causa de la promoción de la formación de raíces laterales gatillada por Sortin2. También se evidenció, que no tan sólo el tráfico endocítico desde la membrana plasmática (PM) hacia la

vacuola es importante para la acción de este biomodulador sino que también es vital la relocalización de algún/os componente/s macromolecular/es a la PM o al espacio apoplástico, ya que para ejercer su efecto en la formación de raíces laterales es necesario el correcto funcionamiento del tráfico endocítico retrógrado en donde participa VPS53 y la exocitosis hasta la PM en la que juega un rol SEC15. Por otra parte, también encontramos que existen eventos celulares y moleculares necesarios para la relocalización de componentes macromoleculares inducidos por Sortin2, que nos permiten posicionar el efecto celular que tiene Sortin2 río arriba de la activación de las LRFCs. En conjunto estos resultados nos indican que existe un proceso celular que impacta en el patrón de formación de las LR, en donde la inducción de la endocitosis hacia la vacuola y la relocalización de algún componente macromolecular promueven la especificación de las LRFCs, remodelando la arquitectura del sistema radicular.

ABSTRACT

Lateral roots (LR) are developed postembryonically from the xylem pole pericycle cells. These pericycle cells acquire the fate to be LR founder cells (LRFCs) in a process called priming that involves specification and activation of LRFCs. LRFC activation includes different events, such as activation of the transcription factor GATA23, accumulation of the membrane associated-kinase regulator MAKR4 in LRFCs and decreased volume of endoderm cells next to LRFCs. However, the nature of the event that defines LRFC specification is still unclear. We have shown that the induction of endocytic trafficking towards the vacuole promotes LR formation independently of the auxin receptor SCF^{TIR1/AFB1,2,3} by means of the synthetic compound Sortin2 which induces *de novo* LR formation, suggesting that the effect of Sortin2 is to differentiate pericycle cells to become LRFCs. The goal of this work is to unravel the relationship between the endocytic trafficking towards the vacuole and the fate acquisition of the LRFCs induced by Sortin2. We found that Sortin2 promotes LRFC differentiation (induction of transcriptional activity of GATA23 and MAKR4 accumulation in LRFCs) in a process temporally after the induction of endocytic trafficking toward the vacuole. Furthermore, a genetic approach was used to study the functional relationship between protein trafficking and LR formation, by analyzing known protein trafficking or known LR formation defective mutants, previously identified in our laboratory, that display different sensitivity to LR formation with Sortin2. We have found a 75% correlation between both effects of this biomodulator. These results strongly suggest that both effects are linked and establish that the induction of endocytic trafficking towards the vacuole causes lateral root formation induced by Sortin2. We observed that not only endocytic trafficking towards the vacuole is important for Sortin2 action, but also the relocation of some macromolecular component/s to the PM or apoplastic space is essential, since the retrograde endocytic trafficking depending on VPS53 and the SEC15-dependent-exocytosis to the PM are both required for

the effect of Sortin2 on LR formation. We have also found that cellular and molecular events are necessary for the relocation of macromolecular components induced by Sortin2, which also allows us to position the cellular effect of Sortin2 upstream of LRFC activation. Overall, these results suggest a cellular process that impacts the LR-program where the induction of endocytosis towards the vacuole as well relocation between compartments promote the specification of LRFCs, allowing root architecture remodeling in *Arabidopsis thaliana*.

INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos sésiles con la plasticidad para adaptarse a condiciones del medio ambiente. Esta plasticidad les ofrece una amplia gama de ventajas, ya que son capaces de modificar su estructura post-embrionariamente para responder a cambios en las condiciones ambientales a las que se enfrentan (Laplaze y col., 2007; Malamy, 2005). Es por estas razones que el crecimiento de las raíces y la arquitectura del sistema radicular (RSA, por sus siglas en inglés) son altamente relevantes para la adaptación de la planta al medio de crecimiento. RSA se denomina al arreglo espacial de las raíces de diferentes tipos, como raíz primaria, raíces laterales o secundarias, y raíces terciarias, etc. (Lynch, 1995). La RSA está determinada por factores genéticos de cada especie que puede ser modificada por señales ambientales (Malamy, 2005).

1.1. Sistema radicular en *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es una planta dicotiledónea miembro de la familia *Brassicaceae* y es utilizada como organismo modelo en biología vegetal, puesto que es conveniente de usar en experimentos de genética y porque su genoma ha sido secuenciado (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Además, se cuenta a la fecha con un amplio número de líneas mutantes que junto a los diferentes recursos genómicos que se han generado, se encuentran disponibles para la comunidad académica en el *Arabidopsis* Biological Resource Center (<http://abrc.osu.edu>) o en el European *Arabidopsis* Stock Center (<http://arabidopsis.info>) y organizados en la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>).

A. thaliana, al igual que toda las dicotiledóneas, en su estado embrionario se define el hipocotilo, dos cotiledones y la radícula, la cual al emerger se denomina raíz primaria (Berg, 2007). La simple estructura y patrón de desarrollo de la raíz de *A.thaliana* la hace un modelo ideal para estudiar la organogénesis de las raíces.

La raíz primaria consiste en varias capas concéntricas de distintos tejidos en el que el haz vascular está rodeado por la primera capa de la estela, llamada periciclo. La endodermis rodea al cilindro central y la corteza a la endodermis. Finalmente, la epidermis es la capa de células que recubre toda la raíz. Además, en el ápice de la raíz la caliptra, compuesta por las células de la *lateral*

root cap y la columela, protege a la punta de la raíz y facilita su movimiento a través del suelo. Al mismo tiempo, la raíz primaria está compuesta por al menos 15 tipos celulares donde cada tipo celular se origina de un grupo de células iniciales localizadas en la punta de la raíz en un nicho de células madres conocido como centro quiescente (QC). Cada tipo celular está restringido a una única fila de células. Por lo demás, la posición a lo largo del eje longitudinal de la raíz es un indicativo de la edad de las células, ya que las células más jóvenes se encuentran en la zona de la raíz cercana al QC, región con una alta tasa división celular, conocida como zona meristemática (MZ). Las células al elongar, su distancia desde el QC aumenta, comenzando el proceso de diferenciación en la zona de elongación (EZ) y luego terminando la madurez en la zona de diferenciación (DZ). La región que se encuentra entre la MZ y la EZ se ha denominado zona de transición (TZ) (Figura 1A, Cederholm y *col.*, 2012).

Las raíces laterales se originan post-embriónariamente desde los dos polos opuestos dentro del haz vascular que rodean el eje del xilema. Estos polos contienen a las células del periciclo adyacentes a los polos del xilema (Beeckman y *col.*, 2001; Laskowski, 2013). Las raíces laterales ayudan a la fijación de la planta al suelo y permiten el aumento de la superficie radicular, lo que incrementa la absorción de agua y nutrientes. Se ha propuesto que las plantas desarrollan sus raíces dependiendo de las condiciones ambientales para favorecer su supervivencia (Giehl y *col.*, 2012; Lima y *col.*, 2010; Linkohr y *col.*, 2002).

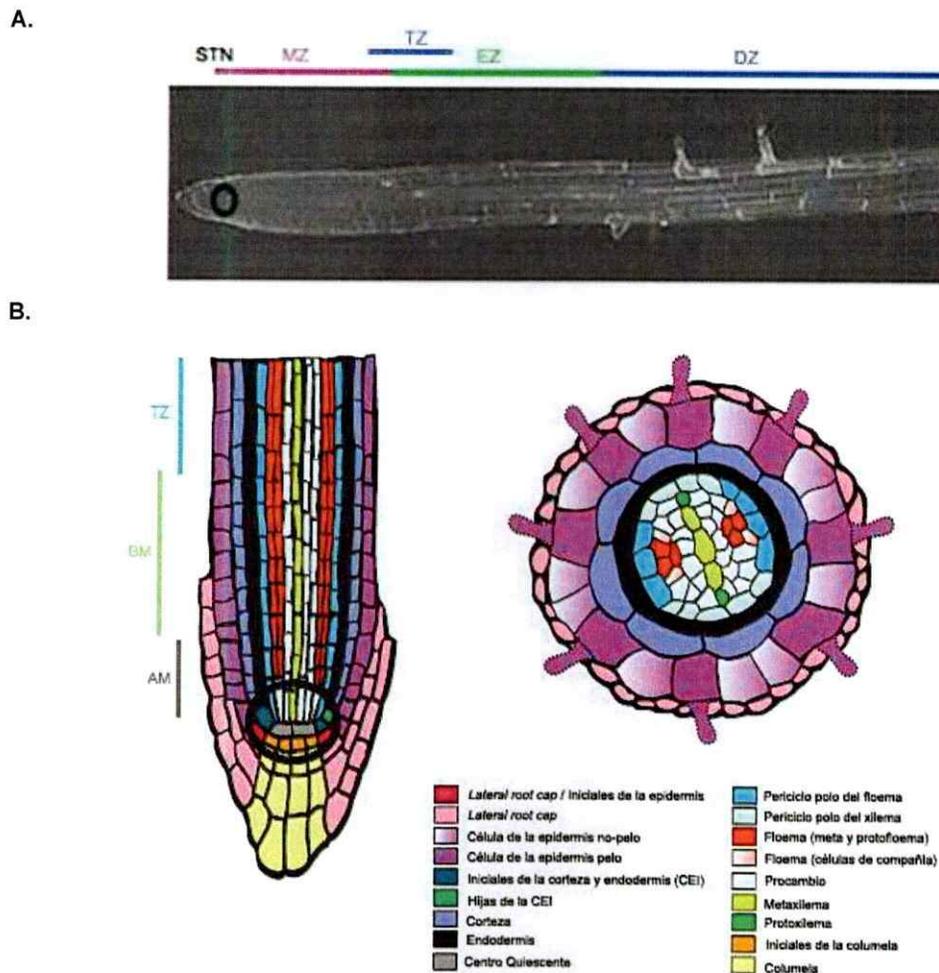


Figura 1: Estructura de la raíz primaria de *Arabidopsis thaliana*. (A) Raíz de una plántula de 5 días en donde se muestran las distintas zonas de desarrollo. El círculo negro representa el nicho de células madres (STN, por sus siglas en inglés), la zona meristemática (MZ), zona de elongación, zona de transición (TZ) y zona de diferenciación (DZ). (B) Representación esquemática de la sección longitudinal (izquierda) y transversal (derecha). Se puede observar en la sección longitudinal la zona del meristema apical (AM), el meristema basal (BM) y la TZ a lo largo de la raíz primaria. Además se distinguen los tipos celulares que conforman la raíz primaria: columela, células iniciales de la columela, protoxilema, metaxilema, procambio, floema (células de compañía), floema (meta y protofloema), periciclo adyacente a los polos del xilema, periciclo adyacente a los polos del floema, centro quiescente, endodermis, corteza, células iniciales de la corteza y endodermis (CEI), células hijas de las CEI, células de la epidermis que son pelos radicales, células de la epidermis que no son pelo radicales, *lateral root cap* y *lateral root cap* / células iniciales de la epidermis. Figura modificada de Cederholm y col., 2012

Se ha descrito que las auxinas, hormonas vegetales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas (Reinhardt y col., 2003; Tanaka

y col., 2006), son un regulador clave de la formación de raíces laterales (Benkova y col., 2003; Casimiro y col., 2001; Celenza y col., 1995; Dubrovsky y col., 2008). La vía canónica de señalización de auxina activa la familia de factores de transcripción denominados factores de respuesta a auxinas (ARFs), los que activan genes en respuesta a la presencia de auxina (Ulmasov y col., 1997). Los ARFs se encuentran regulados negativamente por proteínas nucleares conocidas como AUX/IAA (Auxina/Indol Ácido acético) (Tiwari y col., 2004). Dentro de la célula, la auxina es reconocida por el complejo receptor de auxina SCF^{TIR1/AFB1,2,3}, que induce la ubiquitinación y degradación de proteínas AUX/IAA mediante el proteosoma 26S y, por ende, la desinhibición de los ARFs, permitiendo de este modo la expresión de genes regulados por auxina, para así establecer un programa particular de desarrollo (Gray y col., 2001).

1.2 Etapas en la formación de raíces laterales

La formación de raíces laterales presenta las siguientes etapas de desarrollo (Figura 2): **Priming**, en donde determinadas células del periciclo adyacentes a los polos del xilema entran en una serie de eventos en que adquieren la identidad de células fundadoras de raíces laterales (LRFCs, por sus siglas en inglés) que culmina con la migración de los núcleos de las LRFCs hacia la pared celular común (De Smet y col., 2007). **Iniciación**, en donde ocurre la primera división anticlinal y asimétrica del par de LRFCs contiguas, dando lugar un primordio de raíz lateral (Estado I según Malamy & Benfey, 1997) que son células pequeñas flanqueadas por dos células que son más largas (Péret y col.,

2009). **Desarrollo de primordios de raíces laterales**, la primera división anticlinal y asimétrica origina dos células hijas pequeñas que continúan con sucesivas y ordenadas divisiones periclinales y anticlinales, formando los estados II al VII de primordios de raíces laterales (Casimiro y *col.*, 2001; Malamy & Benfey, 1997). **Emergencia de raíces laterales**, es la etapa en la cual el primordio de raíz lateral avanza su crecimiento y desarrollo a través de los tejidos externos hasta emerger desde la raíz primaria (Swarup y *col.*, 2008).

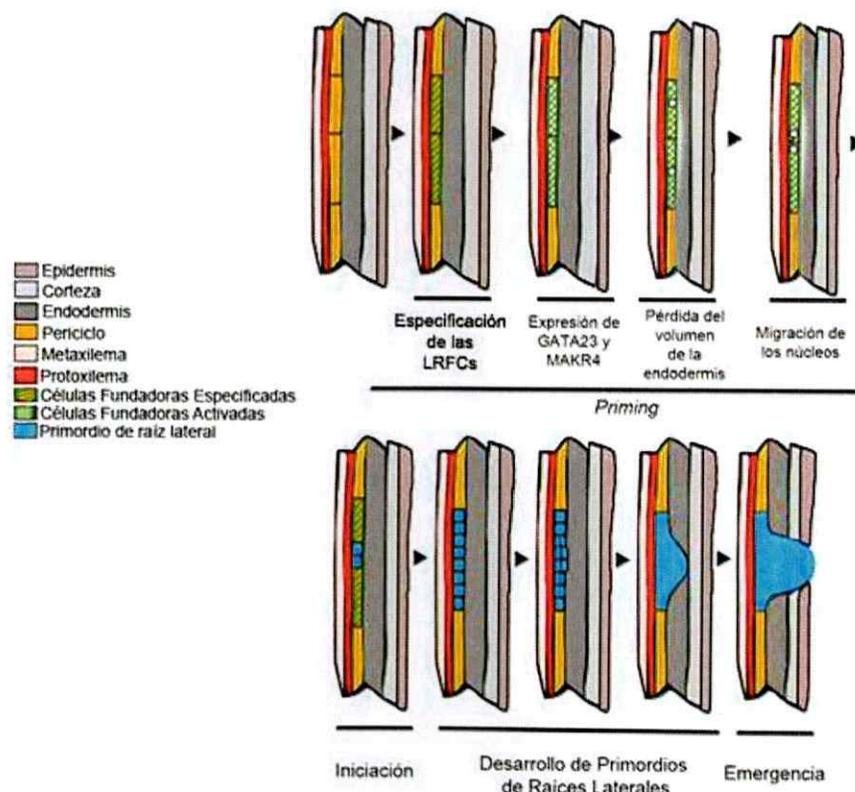


Figura 2: Formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Etapas de formación de raíces laterales. 1. Dos células contiguas del periciclo se ven sometidas a una etapa denominada *priming* en el que adquieren el destino de LRFCs a través de una serie de eventos que comienzan con el que especifica a las LRFCs. Luego le sigue un proceso de activación de las células fundadoras en que se expresa GATA23 y subsecuentemente MAKR4. En este proceso ocurre también la reducción del volumen de las células de la endodermis contiguas a las LRFCs. Los núcleos de las LRFCs se acercan. 2. Iniciación del primordio de raíz lateral, en donde ocurre la primera división anticlinal de las LRFCs. 3. Desarrollo del primordio de raíz lateral. 4. Emergencia del primordio de raíz lateral. (Figura modificada desde VanNorman y *col.*, 2013).

1.3 Eventos moleculares y celulares involucrados en el priming de raíces laterales

El *priming* de raíces laterales se ha dividido en dos procesos: especificación y activación de las LRFCs. La especificación de las LRFCs es cuando las células del periciclo adyacentes a los polos del xilema adquieren la competencia para recibir diversas señales de activación y convertirse en LRFCs. Por su parte, la activación de las LRFCs incluye diversos eventos que ocurren previo a la iniciación del primordio de raíz lateral (Van Norman y col., 2013).

Se ha evidenciado que existen acontecimientos que tienen lugar en el meristema basal de la raíz primaria que determinan el *priming* de las raíces laterales. En el meristema basal determinadas células del periciclo adyacentes a los polos del xilema adquieren la identidad de LRFCs (De Smet y col., 2007). Entre los acontecimientos que tienen lugar en el meristema basal destacan la señalización de auxina que ocurre en el cilindro central del meristema basal y las fluctuaciones periódicas en la actividad transcripcional del promotor sintético DR5, el cual responde a auxina (Ulmasov y col., 1997), que regularían el *priming* de las raíces laterales representando así los cambios en la distribución de auxinas que median el espaciamiento regular de las raíces laterales a lo largo de la raíz primaria (De Smet y col., 2007). Además, esta distribución regular es controlada por un mecanismo semejante a un reloj endógeno que genera oscilaciones génicas en las filas de células del protoxilema en la zona

de oscilación ubicada en el meristema basal de la raíz primaria (Moreno-Risueño y col., 2010).

Por otra parte, se han descrito diversos eventos de *priming* de raíces laterales que conforman parte de la activación de las LRFCs, sin embargo aún se desconoce cuál es el evento que especifica a las LRFCs (Van Norman y col., 2013). Se ha propuesto que auxina actúa como una señal de activación de las LRFCs, puesto que las células del periciclo que serán LRFCs requieren altos niveles de auxinas (Marhavy y col., 2013). Entre los eventos que conforman la activación de las LRFCs que dependen de la acumulación de auxinas, se encuentra la inducción de la expresión del factor de transcripción *GATA23*, el que se expresa específicamente en las células del periciclo adyacentes a los polos del xilema antes de la primera división asimétrica de las LRFCs y se correlaciona con la oscilación de los máximos de auxinas en el meristema basal (De Rybel y col., 2010). Además, mediante experimentos *in vivo* se demostró que *GATA23* se expresa en un momento previo a la migración de los núcleos que antecede a la primera división de las LRFCs (De Rybel y col., 2010). Igualmente, De Rybel y col., 2010 evidenciaron que el módulo de la señalización de auxina Aux/IAA28-ARF 5, 6, 7, 8, 19 controla la expresión de *GATA23* en el meristema basal, apoyando el rol de las auxinas en la etapa de *priming*.

Otro evento de activación de las LRFCs es el incremento de la expresión y acumulación del regulador de quinasa-asociado a membrana (MAKR4, por sus

siglas en inglés) en las LRFCs (Xuan y col., 2015). *MAKR4* se expresa en fase con la oscilación del reportero transcripcional de auxina, DR5, en la zona de oscilación y se induce en la capa del periciclo en donde la organogénesis de raíces laterales se lleva a cabo (Xuan y col., 2015). Además, se ha evidenciado que *MAKR4* se expresa específicamente en el polo del protoxilema del meristema basal y en los nuevos primordios de raíces laterales (Xuan y col., 2015). También la aplicación exógena de ácido indol acético (IAA) o ácido indol butírico (IBA) provoca un incremento en su expresión en el meristema basal de la raíz primaria. Xuan y col., 2015 han reportado que a nivel celular *MAKR4* se acumula en la membrana plasmática de las LRFCs previo a la migración de los núcleos de las LRFCs y, subsecuentemente, *MAKR4* se acumula en las capas celulares que rodean los estados tempranos de los primordios de raíces laterales.

Otro evento de activación de las LRFCs que se ha reportado es la pérdida del volumen de las células de la endodermis contiguas a las LRFCs (Vermeer y col., 2014). Además, las células de la endodermis se han diferenciado de las demás capas celulares por la "Banda de Caspary", la cual es conocida por ser la mayor barrera de difusión apoplástica en las raíces (Geldner, 2013). En Vermeer y col., 2014 se evidenció que las células de la endodermis que recubren a los primordios de raíces laterales pierden volumen, cambian de forma, y liberan las *tight junctions* que actúan como barrera de difusión para dar paso a los nuevos primordios de raíces laterales. Todo esto ocurre desde antes

de la primera división de las LRFCs y depende de la señalización de auxina (Vermeer y col., 2014).

Además se ha descrito que la migración de los núcleos hacia la pared celular común de las LRFCs activadas es un evento requerido para que el primordio de raíz lateral se pueda iniciar (De Rybel y col., 2010). Este evento es activado por *Lateral Organ Boundaries Domain 16* (LBD16) / *Asymmetric Leaves2-Like 18* (ASL18) en las LRFCs y es dependiente del módulo de señalización de auxinas SLR1/IAA14-ARF7, 19 (Goh y col., 2012).

1.4 Sistema de endomembranas en plantas

El sistema de endomembranas en plantas está compuesto por compartimentos membranosos que se interconectan física y funcionalmente a través de diversas vías de tráfico (Surpin y col., 2004; Pizarro & Norambuena, 2014; Figura 3). Los componentes del sistema de endomembranas en plantas son la membrana plasmática (PM), retículo endoplasmático (ER), aparato de Golgi (AG), vacuolas(LV), endosomas tempranos/red *trans Golgi* (EE/TGN), cuerpo multivesicular/compartimento pre-vacuolar/endosomas tardíos(MVB/PVC/LE) y endosomas de reciclaje (RE). El sistema de endomembranas tiene un rol importante respecto al movimiento de moléculas, en particular de proteínas, lípidos y polisacáridos (Jürgens, 2004; Šamaj y col., 2005). Las principales rutas de tráfico del sistema de endomembranas son la ruta secretoria y la ruta endocítica. La ruta secretoria (Flechas negras, Figura 3) considera el tráfico de

las proteínas que son sintetizadas *de novo* en el retículo endoplasmático y se dirigen por diferentes compartimentos al lugar donde cumplen su función. El paso final en la ruta secretoria es la exocitosis, lo que resulta en la fusión de vesículas con la membrana plasmática y la entrega del contenido de la vesícula a la superficie de la célula (Žárský y col., 2013). La ruta endocítica (Flechas rojas, Figura 3), involucra la captación de moléculas de la membrana plasmática y extracelulares y su posterior internalización. Después de la internalización desde la PM, las proteínas se dirigen a compartimentos endosomales incluyendo EE/TGN, MVB/PVC/LE y vacuola o bien se reciclan a la PM (Low & Chandra, 1994; Pizarro & Norambuena, 2014; Robinson y col., 2008).

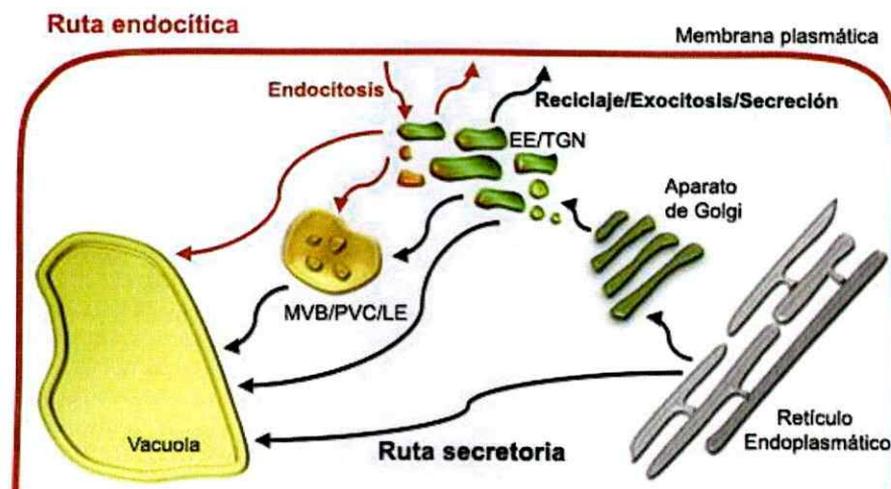


Figura 3: Sistema de endomembranas en plantas. El sistema de endomembranas en plantas se compone por compartimentos y componentes de tráfico que son conservados entre la mayoría de los eucariotes. La ruta endocítica (flechas rojas) incluye el tráfico en vías que involucran la relocalización de proteínas desde membrana plasmática a compartimentos intracelulares que incluyen TGN/EE, MVB/PVC/LE y vacuola. La ruta secretoria (flechas negras) incluye vías que involucran el direccionamiento de proteínas sintetizadas *de novo* desde el retículo endoplasmático hacia su compartimento de residencia (Figura modificada de Pizarro & Norambuena, 2014).

Interesantemente, distintos procesos de desarrollo de las plantas dependen del tráfico de proteínas por las diversas rutas del sistema de endomembranas, como la elongación celular, la formación de la pared celular, la defensa a patógenos, la remodelación del citoesqueleto, entre otros. (Drakakaki y col., 2009; Grunewald & Friml, 2010; Surpin & Raikhel, 2004). El sistema de endomembranas también está involucrado en el transporte polar de auxina que depende de facilitadores que se localizan polarizadamente en la membrana plasmática y que trafican mediante endocitosis a los endosomas y reciclan a la membrana plasmática (Paciorek & Bergmann, 2010).

1.5 Efectos fisiológicos del compuesto Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*

Sortin2 (Figura 4) es un compuesto químico de bajo peso molecular que se identificó por su capacidad de interferir en la destinación a la vacuola de la proteína carboxipeptidasa Y en *Saccharomyces cerevisiae* (Zouhar y col., 2004) y *A. thaliana* (Pérez-Henríquez y col., 2012).

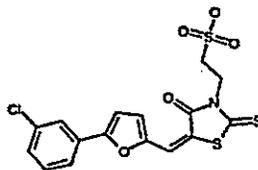


Figura 4: Estructura química del compuesto Sortin2. Sortin2 es un compuesto químico sintético de baja masa molecular que fue identificado desde una colección de 4.800 compuestos químicos (Zouhar y col., 2004).

Se encontró que Sortin2 induce la endocitosis de membrana plasmática en las células de la epidermis del meristema basal de la raíz primaria de *A. thaliana* (Pérez-Henríquez y col., 2012). El tratamiento con Sortin2 desencadena

la acumulación en la vacuola de proteínas localizadas en la membrana plasmática. Esta acumulación es inhibida al bloquear el tráfico endocítico desde MVB/PVC/LE hacia la vacuola con el compuesto Wortmanina (Pérez-Henríquez y col., 2012).

También se ha visto en *Arabidopsis* que Sortin2 inhibe el crecimiento de la raíz primaria (Zouhar y col., 2004) e incrementa el número de raíces laterales a través de un proceso que es independiente del complejo receptor de auxina SCF^{TIR1/AFB1,2,3} (Pérez-Henríquez y col., 2012). Interesantemente, al inhibir el tráfico endocítico desde MVB/PVC/LE hacia la vacuola se inhibe el efecto inductor de raíces laterales promovido por Sortin2 (Pérez-Henríquez y col., 2012). En las plantas que crecen en condiciones controles, las alteraciones del tráfico de MVB/PVC/LE a vacuola no son relevantes para la formación de raíces laterales. Esto ha permitido que nuestro grupo de investigación postule que el tráfico endocítico hacia la vacuola posee un papel en la formación de raíces laterales por Sortin2 (Pérez-Henríquez y col., 2012).

Para determinar las proteínas del sistema de endomembranas que son importantes para que Sortin2 induzca la formación de raíces laterales, en nuestro laboratorio se realizó una búsqueda de mutantes que han sido descritas por sus defectos en el funcionamiento del sistema de endomembranas. Se seleccionaron 21 mutantes en las que su producto proteico está descrito por poseer un papel clave en diferentes procesos como la endocitosis, reciclaje y exocitosis. En estas mutantes se evaluó la sensibilidad a Sortin2 con respecto a

la formación de raíces laterales y se encontraron mutantes con distinta sensibilidad a Sortin2 (Cruz-Amaya & Norambuena, resultados no publicados; Anexo 1).

Siguiendo la misma aproximación, utilizando diferentes mutantes descritas por ser defectuosas en las etapas de la formación de raíces laterales, dilucidamos que Sortin2 afecta un paso previo a la iniciación de raíces laterales (Morales-Herrera, 2015; Anexo 1). Además, evidenciamos en Morales-Herrera, 2015 que Sortin2 promueve los eventos moleculares claves para la iniciación de raíces laterales como: 1. *GATA23*, factor de transcripción que se ha descrito por controlar la identidad de las LRFCs (De Rybel y *col.*, 2010); 2. *CycB1;1*, ciclina dependiente de quinasa que evidencia activa división celular (De Smet et al., 2007); y 3. DR5, promotor sintético que responde a auxina (Sabatini y *col.*, 1999). Esto y otros antecedentes muestran que Sortin2 induce un evento previo a la iniciación en la organogénesis de las raíces laterales, en el que las células del periciclo se diferencian a LRFCs.

1.6 Planteamiento del problema

En plantas el sistema de endomembranas ha sido implicado en una serie de eventos importantes para procesos de desarrollo, como en señalización hormonal y procesos de organogénesis (Surpin & Raikhel, 2004; Drakakaki y *col.*, 2009; Grunewald & Friml, 2010).

El sistema de endomembranas, en el contexto de formación de raíces laterales-

dependientes de auxina, juega un rol importante, ya que establece la localización subcelular y la polaridad de los facilitadores de auxina (Geldner y col., 2001; Friml y col., 2003). Sin embargo, el compuesto sintético Sortin2 induce un mecanismo de formación de raíces laterales independiente del complejo receptor de auxina SCF^{TIR1/AFB1,2,3} (Pérez-Henríquez y col., 2012). Tratamientos con Sortin2 inducen una aceleración del tráfico de proteínas desde la membrana plasmática a la vacuola (Pérez-Henríquez y col., 2012). Esto hace suponer que existe una conexión entre el tráfico endocítico hacia la vacuola y la formación de raíces laterales inducida por Sortin2. En base a esto se propone estudiar el rol del tráfico endocítico hacia la vacuola en la formación de raíces laterales utilizando el biomodulador Sortin2.

En este trabajo de tesis proponemos como hipótesis que "La aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 diferencia a las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales promoviendo la organogénesis de raíces laterales en *A. thaliana*". Para evaluar esta hipótesis se estudiará la temporalidad de los eventos moleculares de *priming* inducidos por Sortin2, utilizando las líneas reporteras pGATA23::NLS-GFP y pMAKR4::GFP-MAKR4 y evaluando el cambio en la morfología de las células de la endodermis. Esta temporalidad se comparará con la temporalidad de su efecto en la aceleración del tráfico hacia la vacuola por este biomodulador visualizando la internalización de membrana plasmática como propuesta de un nuevo evento de *priming* de raíces laterales. Además, se estudiará el tráfico

hacia la vacuola del trazador endocítico FM4-64 y el aumento en la población de MVB/PVC/LE inducido por Sortin2 en mutantes con diferente sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2. También se evaluarán los eventos de *priming* de raíces laterales inducidos por Sortin2 en las mutantes que presenten resistencia al efecto en el tráfico endocítico promovido por Sortin2 mediante la determinación de los niveles de transcritos de *GATA23* y *MAKR4*.

1.7 Hipótesis de trabajo

La aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 diferencia a las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales promoviendo la organogénesis de raíces laterales en *A. thaliana*.

1.8 Objetivo General

Determinar la relación causal entre la inducción de la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2 y el evento de diferenciación de células fundadoras de raíces laterales promovido por Sortin2 en *A. thaliana*.

1.9 Objetivos Específicos

1. Estudiar la temporalidad de los eventos moleculares y celulares de *priming* de raíces laterales promovidos por Sortin2.
2. Evaluar la inducción del tráfico hacia la vacuola ejercido por Sortin2 en la colección de mutantes, con defectos en la formación de raíces laterales y defectos en el sistema de endomembranas, que presentan distinta

sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2.

3. Evaluar la inducción de los eventos de *priming* de raíces laterales por Sortin2 en la colección de mutantes, con defectos en la formación de raíces laterales y defectos en el sistema de endomembranas, que presentan distinta sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Líneas de semillas

Se usaron líneas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre ecotipo Columbia-0 (Col-0) y Wassilewskija (Ws). También se utilizaron las líneas transgénicas pGATA23::nls-GFP (De Smet y col., 2007), pMAKR4::GFP-MAKR4(Xuan y col., 2015), pCAPS1::CASP1-mcherry (Vermeer y col., 2014), pCASP1::γTIP-CITRINE (Vermeer y col., 2014), p35S::GFP:δ-TIP (Avila y col., 2003) y pPIN2::PIN2-GFP (Xu & Scheres, 2005), las líneas mutantes en la formación de raíces laterales: *axr4-1* (Hobbie y Estelle, 1995), *aux1-21* (Swarup y col., 2004), *acr4* (De Smet y col., 2008), *ceg* (Dong y col., 2006), *cul1-6* (Moon y col., 2007), *iaa28-1*(Rogg y col, 2001) *ysl1-1* (Fukakiy col., 2002) y las líneas mutantes en el tráfico de proteínas *sec15* (Hála y col., 2008), *vamp722* (Zhang y col., 2011), *vps53*(Wang y col., 2011), *vti12-1* (Surpin y col., 2003). Las semillas se obtuvieron desde los laboratorios colaboradores de Dr. Tom Beeckman (VIB, Bélgica), Dr. Stephanie Roberts (UMEA, Suecia), Dr. Joop Vermeer

(Universidad de Zurich, Suiza), Dr. Philip Benfey (Universidad de Duke, Estados Unidos) y Dr. Natasha Raikhel (UCR, Estados Unidos).

2.2 Estratificación y esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *A.thaliana* fueron esterilizadas con el método de cloro gaseoso (Cl_2). El protocolo de esterilización consistió en lo siguiente: 1) En un desecador se colocó una gradilla con los tubos abiertos que contienen las semillas. En un vaso precipitado de 100 mL se adicionaron 80 mL de cloro comercial (4,9% hipoclorito de sodio) y 700 μ L de ácido clorhídrico 32% (MERCK) donde el producto de la reacción es cloro gaseoso. 2) El cloro gaseoso esterilizó las semillas por 16 horas, en la campana de extracción. 3) Los tubos se dejaron ventilando por 2 horas en la cámara de flujo laminar LAMINAIRE que confiere un ambiente estéril. 4) Finalmente se guardaron las semillas en 1 mL de agua estéril a 4°C en oscuridad durante al menos 24 horas con el propósito de estratificar las semillas.

2.3 Crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Semillas de *A.thaliana* esterilizadas y estratificadas se sembraron en placas cuadradas (12 x 12 cm) que contenían medio de cultivo de planta MS-agar 0,5X (Medio de cultivo Murashige y Skoog 0,22% p/v (PhytoTechnology Laboratories), sacarosa 1% p/v (MERCK), fitoagar 0,7% p/v (PhytoTechnology Laboratories), mioinositol 0,01% p/v (PhytoTechnology Laboratories), MES 0,05% p/v (PhytoTechnology Laboratories), pH 5,7). Se dispusieron las placas

de manera vertical para que las plántulas crecieran en la superficie del medio de cultivo. Las placas se incubaron en una cámara de cultivo con una intensidad lumínica de 6.000 lux y fotoperíodo de 16 horas de luz a 22°C y 8 horas de oscuridad a 18°C.

2.4 Tratamientos con Sortin2 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Para efectuar los tratamientos con Sortin2, a partir de una solución stock de 20 mg/mL (en dimetil sulfóxido 100% (DMSO, Winkler), ChemBridge San Diego, CA) se diluyó en Medio Sólido de Cultivo (MS-agar) o en Medio Líquido de Cultivo (MS-líquido) hasta la concentración de 25 µg/mL, se ajustó el volumen de DMSO para que así el MS-agar o MS-líquido alcance una concentración final de DMSO 1%(Pérez-Henríquez *y col.*, 2012). Cabe mencionar, que el MS-líquido contiene los mismos componentes del MS-agar excepto el gelificante fitoagar (PhytoTechnology Laboratories). Los medios de cultivo contienen una concentración final 1% v/v de DMSO usada como condición control. Además se ha reportado que la concentración de DMSO que se utilizó no afecta el desarrollo de las plántulas de *Arabidopsis* (Zouhar *y col.*, 2004). Los MS-agar y MS-líquido que contenían Sortin2 y DMSO 1% fueron pre-incubados por 96 horas en condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad a 22°C, con intensidad lumínica de 6.000 lux, ya que resultados en el laboratorio indican que la mayor actividad inductora de raíces laterales es en esas condiciones.

2.5 Evaluación de la temporalidad de los eventos de priming de raíces laterales.

Plántulas de 7 días de las diversas líneas reporteras se cultivaron como se describe en la sección 2.3 y se traspasaron a placas de 6 pocillos con MS-líquido suplementado con Sortin2 o DMSO1% (Control).

Para determinar la temporalidad de la activación del factor de transcripción de GATA23, se analizó la activación transcripcional de GATA23 en las células del periciclo utilizando la línea reportera pGATA23::NLS-GFP (De Smet y *col.*, 2007) (ver sección Resultados 3.1.2).

Además, con el fin de evaluar el tiempo en que el tratamiento con Sortin2 induce la acumulación de MAKR4 en la PM de las células del periciclo, se estudió la temporalidad de la acumulación de la proteína MAKR4 en plántulas de la línea transgénica pMAKR4:GFP-MAKR4 (Xuan y *col.*, 2015) (ver sección Resultados 3.1.3).

También, se determinó la estructura de la endodermis, capa celular que rodea al periciclo que cambia durante el proceso organogénico (Vermeer y *col.*, 2014). Se evaluó la acumulación y localización del marcador de las células de la endodermis pCASP1::CASP1-mCherry (Vermeer y *col.*, 2014)(ver sección Resultados 3.1.4). CASP1 se expresa y localiza en células diferenciadas de la endodermis (Vermeer y *col.*, 2014).

Por otra parte, con el propósito de estudiar si el volumen de la vacuola disminuía en tratamiento con Sortin2, se utilizó la línea p35S::GFP- δ TIP (Avila y col., 2003), en que se observó la estructura de la vacuola en todas las capas celulares de la raíz visualizando la proteína de fusión GFP- δ TIP (Loque y col., 2005), asociada a la proteína reportera GFP (ver sección Resultados 3.1.4). Además se trabajó con la línea reportera pCASP1:: γ -TIP-CITRINE (Vermeer y col., 2014), en la que se visualizó la proteína de fusión γ -TIP-CITRINE en la endodermis de la raíz (Ludevid y col., 1992) (ver sección Resultados 3.1.4), asociada a la proteína reportera CITRINE.

Finalmente, para evaluar el evento que se propuso como un nuevo evento de *priming* de raíces laterales gatillado por Sortin2 es que se evaluó en la epidermis del meristema basal de la línea transgénica pPIN2::PIN2-GFP el tiempo en que se detecta la internalización de PIN2-GFP desde la membrana plasmática a la vacuola, en tratamiento con Sortin2 (ver sección Resultados 3.1.1).

2.5.1 Cuantificación de las células del periciclo que acumulaban los marcadores de priming de raíces laterales.

Para la cuantificación de las células del periciclo que acumulaban GFP en las células en donde se expresaba GATA23, se evaluó el número de células del periciclo que contenían GFP en su núcleo y se relativizó al número de células

del periciclo totales en el campo visual al utilizar un aumento de 400X (entre 6-10 células).

Además, para cuantificar las células del periciclo que acumulaban GFP-MAKR4, se evaluó el número de células del periciclo que contenían GFP-MAKR4 en sus membranas plasmáticas y se relativizó al número de células del periciclo totales en los 0,2 mm de raíz principal estudiadas (entre 27-30 células).

2.6 Evaluación de la endocitosis desde membrana plasmática hacia la vacuola del trazador endocítico FM4-64.

Según lo reportado en Pérez-Henríquez y *col.*, 2012 el tratamiento con Sortin2 acelera la endocitosis hasta la vacuola del trazador fluorescente FM4-64. Por ello se analizó la internalización de FM4-64 hacia la vacuola en tratamiento con Sortin2 en las mutantes *axr4-1*, *aux1-21*, *acr4*, *ceg*, *cul1-6*, *iaa28-1*, *sec15*, *slr1-1*, *vamp722*, *vps53* y *vti12-1*. Para el estudio de la internalización del trazador endocítico FM4-64, plántulas de 7 días se incubaron a 4°C por 10 min en 5 µM FM4-64 (stock 16mM, Invitrogen) diluido en MS-líquido. Esto se consideró el tiempo 0 de la dinámica de endocitosis. La internalización de FM4-64 en las plántulas se siguió por distintos tiempos en los distintos tratamientos a 22°C en las células de la epidermis del meristema basal de la raíz primaria (Figura 5).

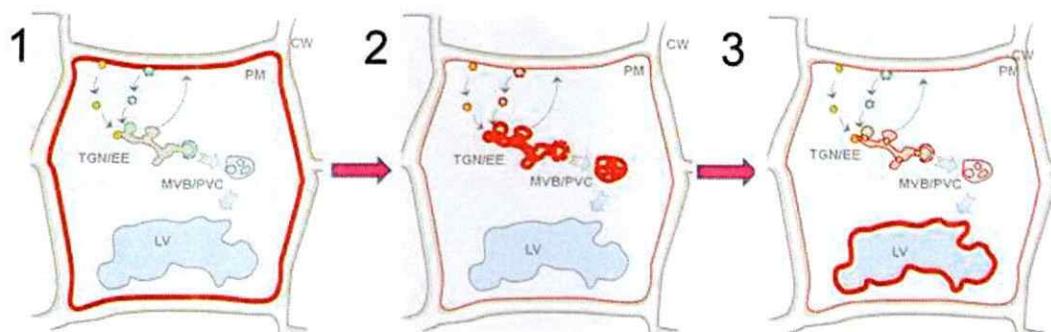


Figura 5: Esquema del proceso de internalización del trazador fluorescente FM4-64. Para estudiar la internalización del trazador endocítico FM4-64 se realiza previamente una incubación a 4°C de FM4-64 (5µM) por 10 minutos. Posteriormente comienza la visualización de la internalización (tiempo 0) a 22°C en la cual en los primeros minutos se observa el FM4-64 en la membrana plasmática (PM) de las células (1). Luego, se encuentra el trazador además en los endosomas (TGN/EE y MVB/PVC) (2). Finalmente, la sonda fluorescente llega también a la membrana de la vacuola (LV) (3).

2.7 Análisis de la población de MVB/PVC/LE ARA7-positivos mediante inmunofluorescencia indirecta.

Mediante el uso del anticuerpo primario anti-ARA7 (Ueda y col., 2001) se analizó la población de MVB/PVC/LE-ARA7 en tratamiento con Sortin2 en las células de la epidermis del meristema basal de la raíz primaria de plántulas silvestres del ecotipo Col-0 y de las mutantes *cul1-6*, *iaa28-1*, *sec15*, *slr1-1* y *vps53*. Para realizar la inmunofluorescencia indirecta se siguió el protocolo del Dr. Ricardo Tejos (Universidad Arturo Prat) que presenta modificaciones al publicado en Paciorek y col, 2006: 1) *Fijación del tejido*: Se fijaron las plántulas de las líneas de *Arabidopsis* en una solución de paraformaldehído 4% en buffer fosfato salino 1X (PBS, por sus siglas en inglés) con TritónX-100 (Tx-100) 0,5% v/v por 1 hora en una cámara de vacío. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 1X y 3 lavados con H₂O de calidad Milli-Q (5 minutos, cada lavado). Después se montaron las plántulas en un portaobjeto SuperFrost™ (ThermoScientific) que

permite una mayor adherencia del tejido. Al día siguiente, se removió con un bisturí la parte aérea de las plántulas y con un lápiz hidrofóbico se marcó una zona alrededor de las raíces. 2) *Digestión de la pared celular*: A continuación, para digerir la pared celular de manera de facilitar el acceso de los anticuerpos respectivos, se trató con 2,5% de la enzima driselasa (proveniente de *Basidiomycetes*, SIGMA) en una solución de PBS 1X por 1 hora a 37°C. Después, se efectuaron 2 lavados con PBS 1X con Tx-100 0.05% v/v por 10 minutos. 3) *Permeabilización del tejido*: Posteriormente, se permeabilizaron las membranas con una solución de 10% DMSO (Winkler), 3% IGEPAL (Winkler) en PBS 1X a temperatura ambiente por 1 hora. Luego, se realizaron 2 lavados con PBS 1X con Tx-100 0.05% v/v por 10 minutos. 4) *Inmunofluorescencia*: A continuación, se bloqueó el portaobjetos con una solución de 3% de Albúmina Sérica de Bovino (BSA, por sus siglas en inglés) en PBS 1X por 1 hora a temperatura ambiente. Luego, se incubó con el anticuerpo policlonal primario anti-ARA7 (producido por conejo (Ueda y col., 2001)) en una dilución 1:200 en una solución de 3% de BSA en PBS 1X por 4 horas. Después, se lavó 4 veces con PBS 1X con Tx-100 0.05% v/v por 10 minutos. Posteriormente, se incubó el anticuerpo secundario anti-conejo IgG (H+L) (producido por cabra) conjugado al fluorocromo Cy3 (KPL) por 2 horas en una dilución 1:600 en una solución de BSA al 3% en PBS 1X. 5) *Montaje final de las muestras*: Finalmente, para el manejo de las muestras se utilizó el medio de montaje "R-Fluor" (90% glicerol, 10% PBS 1X y DAPCO(SIGMA) 25 mg/mL a pH 8,5), el cual previene el rápido fotoblanqueado de Cy3 (Kong y col., 2007) y se cubrieron con un cubreobjetos.

Se visualizaron las muestras inmediatamente y/o se almacenaron en oscuridad a -20°C para su posterior observación.

2.8 Visualización de marcadores fluorescentes mediante microscopía confocal.

Se realizó la visualización de las líneas reporteras y la sonda fluorescente Cy3 mediante el microscopio confocal Zeiss LSM 710. Además, para la observación de la sonda fluorescente FM4-64 se utilizó el microscopio confocal Zeiss LSM 510. Para cada fluoróforo se utilizó el respectivo láser de excitación y filtros de emisión indicados en la Tabla 1. El análisis de las imágenes se efectuó mediante el software ZEN blue 2012 (©Carl Zeiss Microscopy).

Tabla 1: Lista de las líneas reporteras y sondas fluorescentes utilizadas en esta tesis.

Línea reportera/Sonda fluorescente	Proteína fluorescente	Láser de excitación (nm)	Filtro de emisión (nm)
pGATA23::NLS-GFP	GFP	488	493-550
pMAKR4::GFP-MAKR4	GFP	488	484-626
pCASP1::CASP1-mCherry	mCherry	543	548-699
p35S::GFP- δ TIP	GFP	488	519-690
pCASP1:: γ -TIP-CITRINE	CITRINE	514	493-535
pPIN2::PIN2-GFP	GFP	488	493-554
FM4-64		543	LP560
Cy3		543	612-758

2.9 Evaluación de los niveles de transcritos de GATA23 y MAKR4.

Se analizaron los niveles de transcritos de *GATA23* y *MAKR4* en plántulas de 7 días crecidas en MS-agar de las líneas de *Arabidopsis* Col-0, *iaa28-1*, *slr1-1*, *sec15* y *vps53* que se trataron por 24 horas en MS-agar conteniendo DMSO 1% (Control), Sortin2 25 μ g/mL y NAA 10 μ M como control positivo de la inducción

de *GATA23* y *MAKR4*. Pevio a la colección del tejido, se decapitó la parte aérea y la zona meristemática de la raíz primaria de las plántulas con un bisturí. A continuación, se colectaron las raíces para ser congeladas en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.9.1 Extracción de ARN y generación de ADNc.

Se aisló el ARN total de cada una de las muestras de raíz de las diferentes líneas utilizando el Kit Invitek de Stratec® siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Luego se cuantificó la concentración de los ácidos nucleicos utilizando el espectrofotómetro EPOCH™ 2 (Biotek), midiendo la absorbancia a $\lambda=260$ nm. Además, se midió en la $\lambda=280$ nm para obtener el índice 260/280, el cual debe estar en un rango entre 1.8-2.0, ya que estos valores sugieren que la muestra cumple con los rangos de pureza requeridos para una eficiente reacción de retrotranscripción (ThermoScientific, 2011).

Luego para asegurar que el ARN esté libre de ADN genómico se realizó el tratamiento con DNAsa I (ThermoScientific®) a 37°C por 40 minutos en el que un volumen de ARN equivalente a $3,5\ \mu\text{g}$ se incubó con 0.05X Buffer DNAsa I con MgCl_2 , 1 U/ μL del inhibidor de RNAsa Ribolock™, 0.025 U/ μL DNAsa I y H_2O tratada con DEPC en un volumen final de 20 μL . Posteriormente se evaluaron los parámetros de calidad y concentración de los ácidos nucleicos en las muestras utilizando el EPOCH™ 2 (Biotek). Además para verificar que el ARN estuviera libre de ADN genómico (ADNg), se realizó una reacción de PCR

utilizando partidores 250 nM, Buffer de reacción Paq (Agilent) 1X, dNTPs 0.25 mM, Paq (Agilent) 0.05 U/ μ L y H₂O tratada con DEPC, en un volumen final de 20 μ L, para amplificar un fragmento del gen de actina utilizando la ADN polimerasa Paq5000 (Agilent) y los partidores de *ACTINA11* 5'CAC ACT TTC TAC AAT GAG CT 3' y 3'GCA GTG ATC TCT TTG CTC AT5' diseñados en base a la secuencia AT3G12110 disponible en TAIR. Las condiciones de la amplificación eran las siguientes: un ciclo inicial de 10 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos de 25 segundos a 94°C, 25 segundos a 54°C y 30 segundos a 72°C, finalmente un ciclo de 5 minutos a 72°C.

Después de comprobar que el ARN estuviese libre de ADN, se procedió a efectuar la reacción de retrotranscripción del ARN para obtener ADNc utilizando oligoAP 0.025 μ g/ μ L, Buffer de reacción RT-ImProm-II™ 1X, MgCl₂3mM, Ribolock™ 1U/ μ L, dNTPs 0.5 mM, RT-ImProm-II™ 0.05 U/ μ L y H₂O tratada con DEPC, en un volumen final de 40 μ L. Posteriormente para verificar la calidad del ADNc se amplificó mediante PCR, utilizando la ADN polimerasa Paq5000 (Agilent), el marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de *ACTINA11* utilizando los partidores y condiciones experimentales indicadas previamente.

2.9.2 Condiciones del ensayo RT-qPCR.

Una vez obtenido el ADNc y comprobada su integridad, se amplificó mediante RT-qPCR, utilizando las parejas de partidores, correspondientes a los genes

codificados *GATA23* y *MAKR4* de *A.thaliana* (Tabla 2). Todos los partidores se diseñaron en base a las correspondientes secuencias publicadas en TAIR y seleccionaron mediante la herramienta Primer Blast de la página NCBI (Tabla 2), siguiendo las recomendaciones de la plataforma *online*. Posteriormente, se verificaron los parámetros termodinámicos de interacción para cada par de partidores en <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>. Se ingresaron las secuencias de los partidores en la plataforma *online* y se verificó la eficiencia en términos de formación de horquillas (*hairpin*), dímeros del propio partidador (*self-dimer*) y dímeros entre partidores (*hetero-dimer*) ($\Delta G > -7$).

Además, como genes normalizadores se utilizaron los genes *AP2M* (AT5G46630), *TIP41-like* (AT4G34270) y *UNKNOWN1* (AT4G16100), en los que se ha evidenciado que sus niveles de transcrito no cambian bajo tratamiento con Sortin2 (Pérez-Henríquez, 2016). Por lo que para elegir el gen de referencia a utilizar se usó el programa Normfinder (Andersen y *col.*, 2004).

Para realizar las reacciones de RT-qPCR se utilizó el Kit Brilliant III SYBR® de Stratagene (Agilent), el cual contiene el Master Mix de qPCR Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green y ROX como sonda de referencia para normalizar la señal de fluorescencia de las reacciones en fluctuaciones no relacionadas al PCR. En la reacción de RT-qPCR se usó un volumen de 20µl, donde el templado de ADNc representó el 5% del volumen total (1µl), 1X de Master Mix de qPCR Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green (Taq ADN polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y la sonda SYBR Green), 150 nM de ROX (stock de 10µM), 100nM de cada partidador (stock de 10µM) y 8.3 µL de H₂O libre de ribonucleasas. Las condiciones de la

amplificación eran las siguientes: un ciclo inicial de 3 minutos a 95°C, seguido por 60 ciclos de 20 segundos a 95°C y 20 segundos a 60°C y un último ciclo de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 55°C y 30 segundos a 95°C.

Además para corroborar la linealidad del rango dinámico de la reacción de RT-qPCR, se evaluó el nivel de transcrito del gen normalizador en diluciones seriadas de ADNc equivalentes a 10 ng, 5ng y 1ng. Luego se graficó el Ct (ciclo umbral), número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente sobrepase el umbral (es decir, la fluorescencia de fondo), en función del logaritmo de la masa de las muestras de ADNc para determinar la relación lineal entre estos parámetros. Posteriormente, para corroborarla especificidad de los partidores diseñados se analizaron las curvas de disociación al realizar un RT-qPCR con la cantidad de ADNc seleccionada (Figura 6).

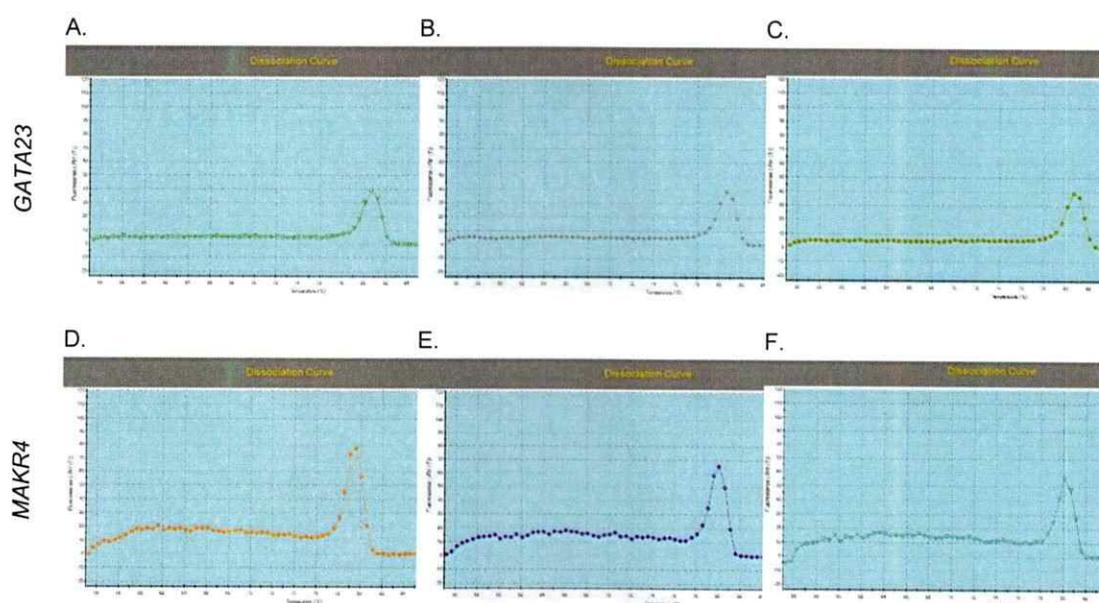


Figura 6: Los productos amplificados mediante RT-qPCR de *GATA23* y *MAKR4* corresponden a productos únicos. Las curvas de disociación de las hebras del ADN del producto amplificado mediante RT-qPCR de un fragmento del ORF de *GATA23* muestran sólo un pico agudo en las muestras de ADNc de Col-0 en tratamiento control (A), Col-0 en tratamiento con Sortin2 (B) y Col-0 en tratamiento con NAA (C). Con respecto a las curvas de disociación que se obtuvieron en las reacciones de RT-qPCR para amplificar un fragmento del ORF de *MAKR4* se verifica que sólo un pico en las muestras de ADNc de Col-0 en tratamiento control (D), Col-0 en tratamiento con Sortin2 (E) y Col-0 en tratamiento con NAA (F). La aparición de un pico único indica que muy probablemente existe sólo un fragmento que se está amplificando y cuantificando en la reacción.

Por otra parte, se determinó la eficiencia de los partidores en la reacción de RT-qPCR usando el programa LinReg (Pfaffl, 2001) y se determinaron los cambios de niveles de transcrito usando la ecuación de Pfaffl (Ramakers y col., 2003).

Tabla 2: Lista de los partidores utilizados para efectuar el RT-qPCR. Nombre de los partidores utilizados, sus secuencias, número de bases del partidor, los loci que amplifican y la Tm de cada partidor.

Nombre	Posición	Secuencia (codones)	Largo (bp)	Gen	Tm (°C) partidor
AP2M-F	5'	TCGATTGCTTGGTTTGG AAGAT	22	At5g46630	54,9
AP2M-R	3'	TCTGCACTTAGCGTGGA CTCTGTTT	26	At5g46630	60,7
TIP41-like-F	5'	GTGAAAAGTGTGGAGA GAAGCAA	24	At4g34270	55,0
TIP41-like-R	3'	TCAACTGGATACCCTTT CGCA	21	At4g34270	56,3
qUNK1_Fw	5'	GGAGATTAAGCAACCTG AGGAGTG	24	At4g16100	57,1
qUNK1_Rv	3'	GTGGTGGTGGTGGAGG AGAC	20	At4g16100	60,0
qGATA23-F1	5'	AGACGATCAGAGTTATT GGGTATTC	25	At5g26930	54,1
qGATA23-R1	5'	CCTCCTTTAGACTCCTT CGTTTC	23	At5g26930	54,9
qMAKR4-F	5'	CGGACGAAGTCTTCTAC AAAGG	22	At2g39370	55,2
qMAKR4-R	5'	ATTCGTCGTCCAAGGTG TAATC	22	At2g39370	54,7
oligoAP	5'	CGCCACGCGTCTCGACT AGTACTTTTTTTTTTTT TTTTT	37	-	72,8

2.10 Análisis estadístico.

Para cada experimento se evaluaron tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas. Los datos obtenidos se graficaron y analizaron estadísticamente usando el programa computacional Graphpad Prism 5.0®. Para determinar diferencias significativas entre los respectivos tratamientos se aplicó la prueba t-Student de dos colas, considerando cuatro niveles de significancia: ns= $p > 0,05$, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ y ***= $p < 0,001$.

RESULTADOS

3.1 Estudio de la temporalidad de los eventos moleculares y celulares de priming de raíces laterales promovidos por Sortin2.

En nuestro laboratorio hemos caracterizado al compuesto Sortin2 como un inductor de la formación de raíces laterales mediante un mecanismo independiente del complejo receptor de auxina SCF^{TIR1/AFB1,2,3} en *Arabidopsis thaliana* (Pérez-Henríquez y col., 2012; Morales-Herrera y col., en preparación). Además, en Morales-Herrera, 2015 se evidenció que Sortin2 actúa previo a la etapa de iniciación en la formación de raíces laterales. Mediante las diversas estrategias utilizadas se encontró que mutantes con defectos en la etapa de iniciación de las raíces laterales son resistentes a la inducción de raíces laterales por Sortin2. Además, contábamos con el antecedente de que el tratamiento con Sortin2 promueve la expresión del factor de transcripción que controla la identidad de las LRFCs, *GATA23* (Morales-Herrera, 2015; Pérez-Henríquez, 2016). Por lo tanto, se propuso estudiar la temporalidad en que Sortin2 induce los eventos de *priming* de raíces laterales. Para esto se utilizaron las diversas líneas reporteras de los eventos de *priming* como son: la activación transcripcional de *GATA23* en las LRFCs usando la línea pGATA23::nls-GFP

(De Rybel *et al.*, 2010) para visualizar la acumulación de GFP en las células en donde se expresa *GATA23* endógenamente, la acumulación de MAKR4 en las PMs de las LRFs al emplear pMAKR4::GFP-MAKR4 (Xuan *et al.*, 2015), y el cambio en la morfología de la endodermis y la estructura de la vacuola de sus células utilizando las líneas pCASP1::CASP1-mCherry (Vermeer *et al.*, 2014) y pCASP1::YIP-CITRINE (Vermeer *et al.*, 2014). En este contexto estudiamos la temporalidad que presenta la inducción del tráfico hacia la vacuola por Sortin2 utilizando la línea pPIN2::PIN2-GFP (Xu y Scheres, 2005; Pérez-Henríquez *et al.*, 2012). La estrategia del estudio de la temporalidad de estos eventos celulares y moleculares bajo tratamiento con Sortin2 permitirá comparar la temporalidad de los eventos de activación de las LRFs, y el efecto de Sortin2 en la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola con el fin de poder situar la inducción de la endocitosis hacia la vacuola como un evento de *priming* de raíces laterales.

3.1.1 Evaluación de la endocitosis de PIN2-GFP en raíces de Arabidopsis thaliana.

En la literatura se ha visualizado la localización subcelular del marcador de membrana plasmática PIN2-GFP (Xu & Scheres, 2005) que trafica y recicla constitutivamente entre la membrana plasmática y los endosomas (Geldner *et al.*, 2001). En Pérez-Henríquez *et al.*, 2012 se reportó que después de 6 horas de tratamiento con Sortin2, PIN2-GFP se acumula en la vacuola. Esta acumulación es inhibida al bloquear el tráfico endocítico desde MVB/PVC/LE

hacia la vacuola con Wortmanina, por lo que el efecto de Sortin2 al inducir la endocitosis hacia la vacuola de PIN2-GFP nos permitió evaluar el efecto acelerador del tráfico endocítico que provoca Sortin2 y comparar su temporalidad con los eventos de *priming* de raíces laterales reportados en la literatura.

Para evaluar la temporalidad de la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola se utilizó la línea transgénica pPIN2::PIN2-GFP y se traspasaron a tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO1% (Control) y Sortin2 plántulas de 7 días crecidas en MS-agar por diversos tiempos de tratamiento. En la Figura 7 (panel superior) se muestra la localización polarizada de PIN2-GFP en la membrana plasmática en tratamiento control en todos los tiempos estudiados. En contraste, en la condición con Sortin2 a las 4 horas se visualiza la acumulación de PIN2-GFP en la vacuola (Figura 7, panel inferior). Esto nos revela que la inducción del tráfico hacia la vacuola es promovida previo a las 4 horas de tratamiento con Sortin2, ya que para visualizar que PIN2-GFP está acumulado en la vacuola se debió previamente inducir el tráfico endocítico hacia la vacuola.

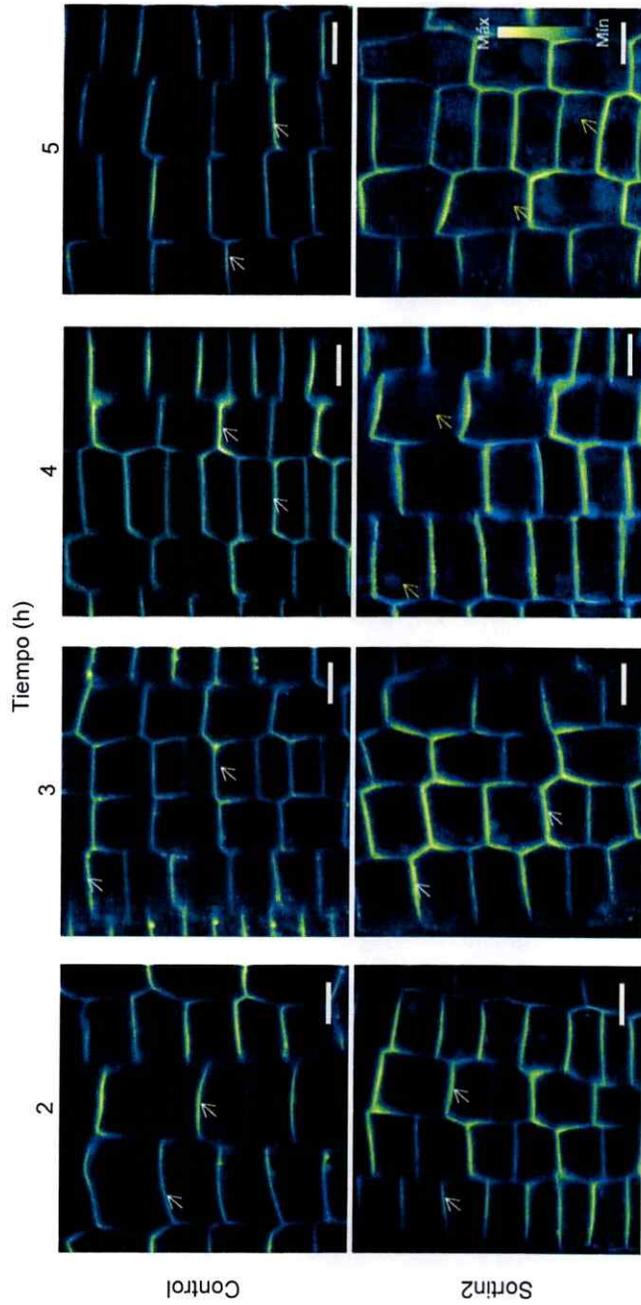


Figura 7: Sortin2 induce la acumulación de PIN2-GFP en la vacuola a las 4 horas de tratamiento. Plántulas de 7 días de la línea reportera pPIN2::PIN2-GFP se trataron en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control, panel superior) y con Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (panel inferior) por los tiempos indicados. En la condición control PIN2-GFP muestra el típico patrón polarizado en la membrana plasmática de la raíz primaria (flechas blancas). En contraste, en tratamiento con Sortin2 luego de 4 horas la proteína de fusión PIN2-GFP se comienza a visualizar en el lumen vacuolar (flechas amarillas) similar a lo reportado en Pérez-Henríquez y col., 2012. Se realizaron 3 réplicas experimentales analizando 3 plántulas en cada réplica. La intensidad de fluorescencia de GFP se pseudocoloreó acorde a la escala indicada, en donde blanco y negro representan la intensidad de fluorescencia, máximo y mínimo, respectivamente. Las imágenes se tomaron con un aumento de 400X y un zoom de 4X. Las barras de tamaño corresponden a 10 μm .

3.1.2 Evaluación de la activación del factor de transcripción GATA23 en las células del periciclo en tratamiento con Sortin2.

En De Rybel y *col.*, 2010 se reportó que el factor de transcripción GATA23 es el factor clave que especifica la identidad de las células del periciclo a LRFCs. Además, mediante experimentos *in vivo* demostraron que GATA23 se expresa previo a la migración de los núcleos en las LRFCs y que su expresión se observa además en una zona cercana al meristema basal de la raíz primaria (De Rybel y *col.*, 2012). Utilizando la línea reportera pGATA23::nls-GFP, que nos permite estudiar la expresión de este factor mediante la acumulación de la proteína reportera GFP en el núcleo de las LRFCs, se evaluó la activación transcripcional del factor de transcripción GATA23 en tratamiento con Sortin2 (Figura 8 y 9). Además, teniendo en cuenta que la acumulación de PIN2-GFP en la vacuola en el tratamiento con Sortin2 demora 4 horas, se realizaron los tratamientos en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control) o Sortin2 por 1, 2, 3, 4, 5, 24 y 96 horas en plántulas de 7 días crecidas en MS-agar. Se encontró que a las 96 horas de tratamiento con Sortin2 se visualiza una mayor población de células positivas a GFP en la zona cercana al meristema basal de la raíz primaria (Figura 8, panel izquierdo), al comparar con la condición control (Figura 8, panel derecho).

Al evaluar la acumulación de la proteína reportera GFP comandada por el promotor de GATA23 en la porción de la raíz primaria cercana al meristema basal (Figura 9), se encontró que en la condición control a medida que pasan

las horas de incubación la población de LRFCs que acumulaban en sus núcleos GFP aumentaba y poseían un patrón alternado a lo largo de la raíz primaria (Figura 9, panel superior). Por otra parte, el tratamiento con Sortin2 también promueve el incremento de la población de LRFCs que expresan *GATA23* (Figura 9, panel inferior). Este aumento es más rápido y dramática, puesto que a las 5 horas de tratamiento se visualiza que en la mayoría de células del periciclo *GATA23* está activo transcripcionalmente (Figura 9, panel inferior). Inclusive, el patrón alternado de la activación transcripcional de *GATA23* se pierde, ya que se comienzan a visualizar las LRFCs en ambos polos del periciclo. Estos resultados indican que Sortin2 induce la activación transcripcional de *GATA23* en una mayor población de células del periciclo, lo que indica que Sortin2 promueve la diferenciación a LRFCs.

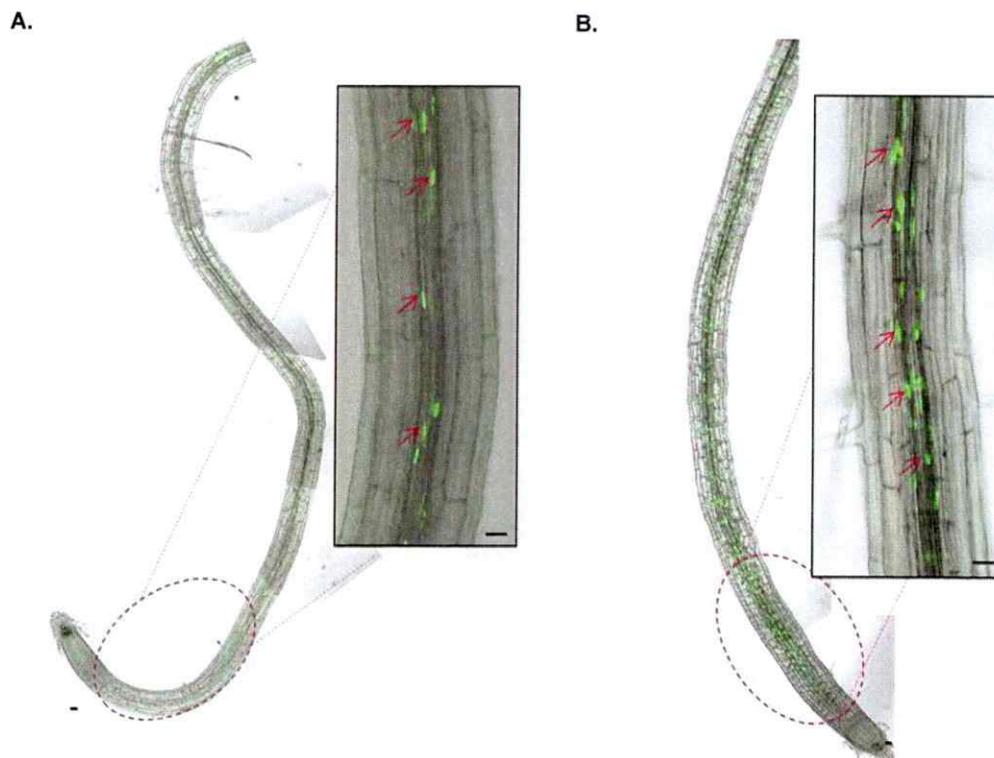
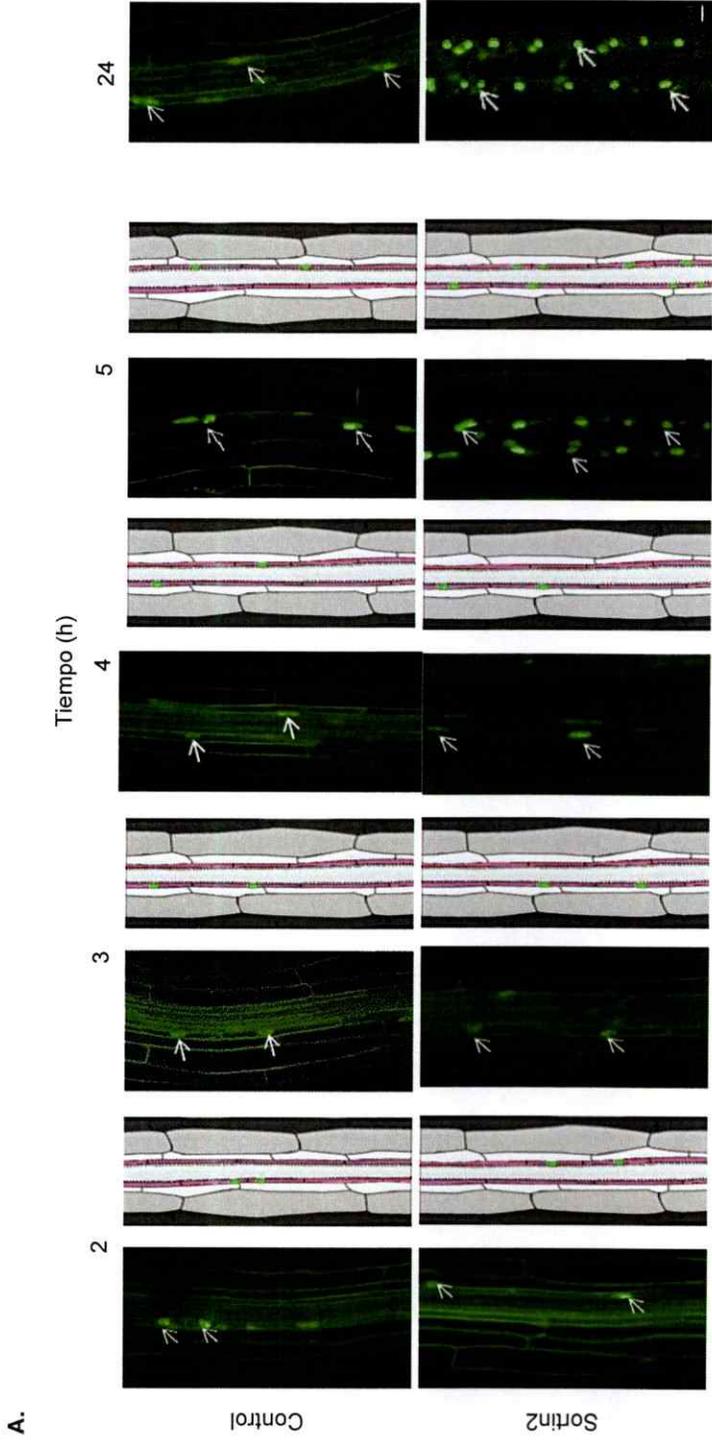


Figura 8: Sortin2 promueve la activación transcripcional de *GATA23* en células del periciclo de la zona de la raíz primaria cercana al meristema basal. Plántulas de 7 días de la línea reportera p*GATA23*::GFP-nls se trataron en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control, **A**) y con Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**B**) por 96 horas. Se puede observar una porción de la raíz primaria en donde se distingue una población de células fundadoras que acumulan en su núcleo GFP reportando la activación transcripcional del promotor de *GATA23* en ambas condiciones. En la zona de la raíz primaria cercana al meristema basal se observa que en la condición con Sortin2 hay una mayor población de células que acumulan GFP en las células en donde se expresa *GATA23* (flechas rosadas). Estos análisis corresponden a 2 réplicas experimentales con 3 plántulas cada una. Las barras de tamaño corresponden a 20 μm .



B.

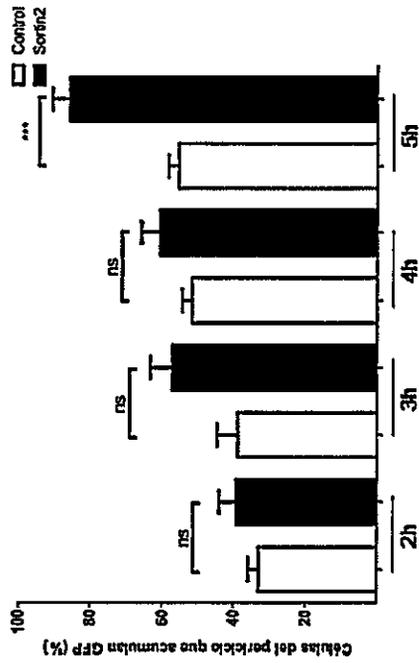


Figura 9: La inducción de la activación transcripcional de *GATA23* ocurre a las 5 horas de tratamiento con Sortin2. A. Plántulas de 7 días de la línea reportera p*GATA23::GFP-nls* se trataron en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control, panel superior) y con Sortin2 25 µg/mL (panel inferior) por los tiempos indicados. A medida que transcurren las horas de tratamiento se ve un aumento de la población de células del pericilo que acumulan en su núcleo GFP (flechas blancas) en ambas condiciones, tal como se presentan en los esquemas dibujados. Por otra parte, desde las 5 horas de tratamiento se observa que en la condición con Sortin2 hay una mayor población de células fundadoras de raíces laterales que acumulan GFP, comparado con la condición control (flechas blancas), lo que se visualiza en los diagramas realizados. Esta condición se vuelve más evidente a las 24 horas de tratamiento. **B.** Cuantificación de células del pericilo que acumulan GFP en sus núcleos con respecto al número de células del pericilo en el campo visual. Los resultados se expresan en porcentaje. Las barras corresponden al error estándar. Se evaluaron estadísticamente los datos con la prueba de t-student, ***= $p < 0.001$; ns=no significancia. Estos análisis corresponden a tres réplicas experimentales con 3 plántulas cada una. Las imágenes fueron capturadas utilizando un aumento de 400X. La barra de tamaño corresponde a 10 µm.

3.1.3 Evaluación de la acumulación de la proteína MAKR4 en las células del periciclo en tratamiento con Sortin2.

Se ha descrito que *MAKR4* se expresa en los polos del protoxilema del meristema basal (Jaillais y col., 2011) y en los sitios de formación de raíces laterales (Xuan y col., 2015). Además, se ha reportado a nivel celular que *MAKR4* se acumula en la membrana plasmática de las LRFCs previo a la migración de los núcleos y posterior a la activación transcripcional de *GATA23* (Xuan y col., 2015). Por ello su acumulación es considerada un evento de *priming* de raíces laterales. Estos antecedentes nos hicieron preguntar si Sortin2 al ejercer su efecto inductor de raíces laterales, induce también la acumulación de *MAKR4* en las LRFCs y si es así, en qué temporalidad lo hace. Para responder este cuestionamiento se sometieron plántulas de 7 días crecidas en MS-agar de la línea transgénica *pMAKR4::GFP-MAKR4* a tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control) o Sortin2 por 1, 3, 4, 5 y 24 horas. Esta línea reportera nos permitió visualizar la acumulación de *GFP-MAKR4* en la PM de las LRFCs como se observa en la Figura 10, teniendo en cuenta que la acumulación de *PIN2-GFP* en la vacuola ocurre a las 4 horas de tratamiento con Sortin2.

Al evaluar la acumulación la proteína *MAKR4* fusionada a la proteína reportera *GFP* en los primeros 0,2 cm de la raíz primaria, encontramos que en tratamiento control *MAKR4-GFP* se acumula en las PMs de las LRFCs (Figura 10, panel superior). Se observa que las LRFCs positivas para *MAKR4-GFP*

presentan un patrón alternado a lo largo del eje de la raíz primaria (Figura 10, panel superior). En el tratamiento con Sortin2 MAKR4-GFP también se acumula en las PMs de las LRFCs (Figura 10, panel inferior). Sin embargo, a las 5 horas el patrón alternado a lo largo de la raíz primaria se pierde, puesto que ambos polos del periciclo presentan células con MAKR4-GFP en sus PMs. Además, a las 24 horas de tratamiento con Sortin2, se observó que esta proteína se acumula también en las células de otras capas celulares de la raíz primaria incluyendo endodermis, corteza y epidermis (Figura 10, panel inferior). Estos resultados implican que el tratamiento con Sortin2 induce la acumulación de MAKR4 en las LRFCs a las 5 horas. Esta inducción indica la presencia de una mayor población de LRFCs, porque en ambos polos del periciclo se visualiza la acumulación de MAKR4-GFP. Inclusive la temporalidad de la acumulación de MAKR4-GFP coincide con la temporalidad en que ocurre la activación transcripcional de *GATA23* en las LRFCs, lo que es distinto a lo descrito en la literatura en que se propone que la acumulación de MAKR4 en las LRFCs sucede después de la activación transcripcional de *GATA23* en las LRFCs (Xuan y col., 2015), sin embargo, la ventana temporal específica no ha sido estudiada hasta el momento.

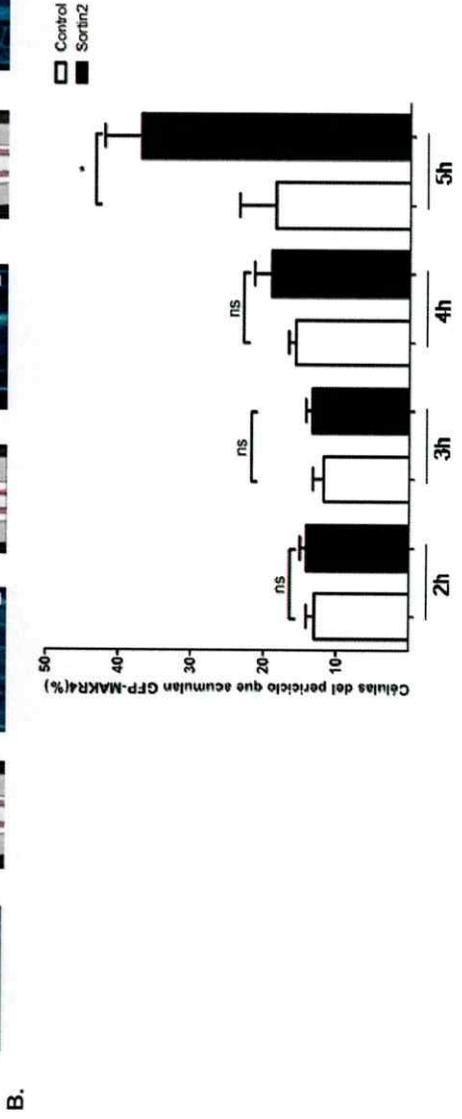
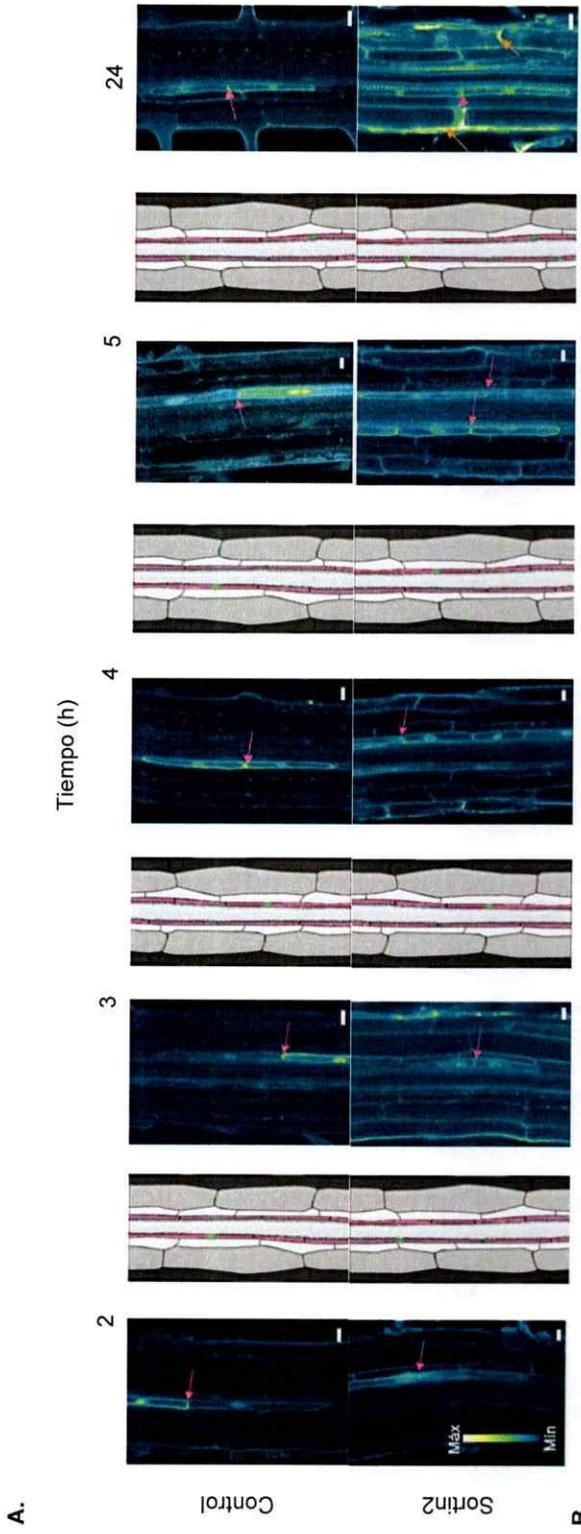


Figura 10: La acumulación de MAKR4 en una mayor población de LRFs ocurre a las 5 horas de tratamiento con Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea reportera pMAKR4::GFP-MAKR4 se trataron en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control, panel superior) y con Sortin2 25 µg/mL (panel inferior) por los tiempos indicados. Se observa la acumulación y localización de la proteína GFP-MAKR4 en la membrana de las células fundadoras de raíces laterales (flechas rosadas, coloración verde/amarilla) en ambos tratamientos, tal como se representa en los diagramas. A las 5 horas de tratamiento con Sortin2 se observa que en ambos polos del periciclo se acumula GFP-MAKR4, lo que se visualiza también en el esquema dibujado. A las 24 horas de tratamiento con Sortin2 se ve una localización y acumulación ectópica de GFP-MAKR4 (flechas naranjas) acumulándose también en células de la epidermis, corteza y endodermis de la raíz primaria. **B.** Cuantificación de células del periciclo que acumulaban GFP-MAKR4 con respecto al número de células del periciclo presentes en los 0,2 cm de raíz principal estudiada. Los resultados se expresan en porcentaje. Las barras corresponden al error estándar. Se evaluaron estadísticamente los datos con la prueba de t-student, * $p < 0,05$; ns=no significancia. Estos resultados corresponden a tres réplicas experimentales (n=3 en cada réplica). La intensidad de fluorescencia de GFP se pseudocoloreó acorde a la escala indicada, en donde blanco representa el máximo de fluorescencia y negro el mínimo. Las imágenes se tomaron con un aumento de 400X. Las barras de tamaño corresponden a 10 µm.

3.1.4 Análisis de la morfología de la endodermis bajo tratamiento con Sortin2

Las células de la endodermis están provistas de la "Banda de Caspary", la cual tiene la función de seleccionar lo que ingresa y sale del cilindro vascular (Mauseth, 1988). En Vermeer y *col.*, 2014 utilizando la línea reportera pCASP1::CASP1-mCherry se evidenció que las células de la endodermis que recubren a las LRFCs pierden volumen, cambian de forma, y liberan las *tight junctions*, que actúan como barrera de difusión, para dar paso a los nuevos primordios de raíces laterales. Esto ocurre desde antes de la primera división de las LRFCs. Para analizar si Sortin2 está afectando la morfología de esta capa celular esto, plántulas de 7 días de la línea reportera pCASP1::CASP1-mCherry crecidas en MS-agar se traspasaron a tratamiento Control (DMSO1%) y Sortin2 por 2 y 24 horas. Esta línea nos permitió visualizar la acumulación de CASP1 que forma parte de la banda de Caspary asociada a la proteína reportera mCherry, encontrando que a las 2 horas de tratamiento con Sortin2 ocurre una mayor acumulación de esta proteína en las células de la endodermis comparada con el tratamiento control (Figura 11). Sin embargo, no se visualiza ningún cambio en el volumen de las células endodermiales. A las 24 horas de tratamiento, el patrón de expresión y acumulación de CASP1 se modifica, ya que se puede visualizar que también células en la epidermis acumulan esta proteína (Figura 11E-F), lo cual no sucede en la condición control (Figura 11C-D). Por lo que Sortin2 modificaría el patrón de acumulación de CASP1, pero no

se pudo detectar un cambio en el volumen de las células de la endodermis.

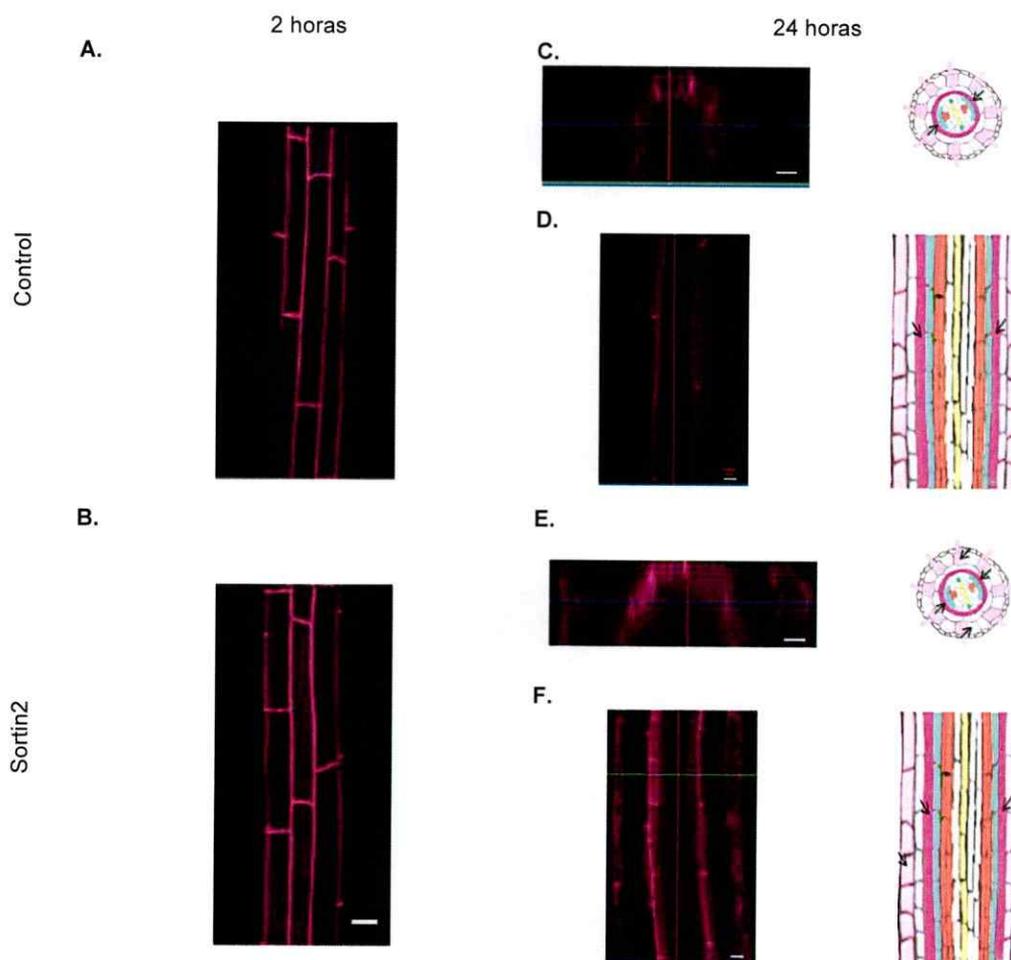


Figura 11: Sortin2 altera el patrón de expresión y de acumulación del marcador de endodermis CASP1. Plántulas de 7 días de la línea reportera pCASP1::CASP1-mCherry se trataron en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control) y con Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 2 y 24 horas. Se visualiza una mayor acumulación de CASP1-mCherry en las células de la endodermis en tratamiento con Sortin2 por 2 horas (B) que en tratamiento control (A) mediante una reconstrucción tridimensional de las imágenes. Al analizar la localización de CASP1 a las 24 horas en la raíz primaria en condición control, transversalmente (C) y longitudinalmente (D), se ve que CASP1-mCherry se acumula en la endodermis, tal como se representa en los esquemas correspondientes en donde las flechas negras indican el posicionamiento de la endodermis. En cambio, en tratamiento con Sortin2 al visualizar transversalmente (E) y longitudinalmente (F) se observa que Sortin2 altera el patrón de acumulación de CASP1-mCherry, ya que como se indica en los esquemas esta proteína se acumula ectópicamente en la epidermis de la raíz primaria (flechas negras). Los esquemas fueron modificados desde Cederholm y col., 2012 para facilitar la comprensión de las imágenes. Se realizaron 3 réplicas experimentales ($n=9$). Las imágenes se tomaron con un aumento de 400X. Las barras de tamaño corresponden a 10 μm .

Respecto al cambio en el volumen de las células de la endodermis, se postula que es la vacuola de estas células la que se remodela y pareciera fragmentarse en pequeñas vacuolas permitiendo el cambio de la célula (Vermeer y col., 2014). Es por esto que evaluamos la morfología de la vacuola de las diversas capas de la raíz principal en tratamiento con Sortin2. Para efectuar esta tarea se utilizaron plántulas de 7 días de las líneas transgénicas p35S::GFP:δ-TIP y pCASP1::γTIP-CITRINE sometidas a tratamiento Control y Sortin2 por 2 horas, debido a que desde ese tiempo se visualizó un cambio en la acumulación de la proteína CASP1 en la endodermis y por lo tanto el efecto de Sortin2 en esa capa celular (Figura 11).

Para visualizar la estructura de la vacuola diversos estudios han utilizado a las líneas transgénicas de *Arabidopsis* que presentan las proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIP, por sus siglas en inglés) asociadas a proteínas fluorescentes, como p35S::GFP:δ-TIP (Avila y col., 2003) y pCASP1::γTIP-CITRINE (Vermeer y col., 2014). En la Figura 12, se visualiza la acumulación y localización de la proteína de fusión GFP-δTIP en las distintas capas celulares (epidermis, corteza y endodermis). Se ven estructuras más complejas de la vacuola en las capas celulares, que han sido denominadas *bulbs* y *sábanas* en la literatura (Saito y col., 2011) en tratamiento con Sortin2 (Figura 12B) comparado con la condición control (Figura 12A). Esto indica que este compuesto altera la morfología de la vacuola en las células de la endodermis. El efecto de Sortin2 en la estructura de la vacuola de las células del hipocotilo había sido

reportado (Zouhar y *col.*, 2004), consistentemente con lo observado en la raíz. La línea pCASP1:: γ TIP-CITRINE permite visualizar la acumulación de γ TIP-CITRINE específicamente en las células de la endodermis. Como se muestra en la Figura 12C y 12D, al realizar una reconstrucción tridimensional se encontró que la proteína γ TIP-CITRINE se acumula en estructuras más complejas en el tratamiento con Sortin2 comparado al Control, semejante a lo visto con GFP- δ TIP en la endodermis de la raíz principal (Figura 12B). Esto sugiere que Sortin2 modifica la estructura de la vacuola en las capas celulares de las raíces, tal como lo efectúa en las células del hipocotilo (Zouhar y *col.*, 2004).

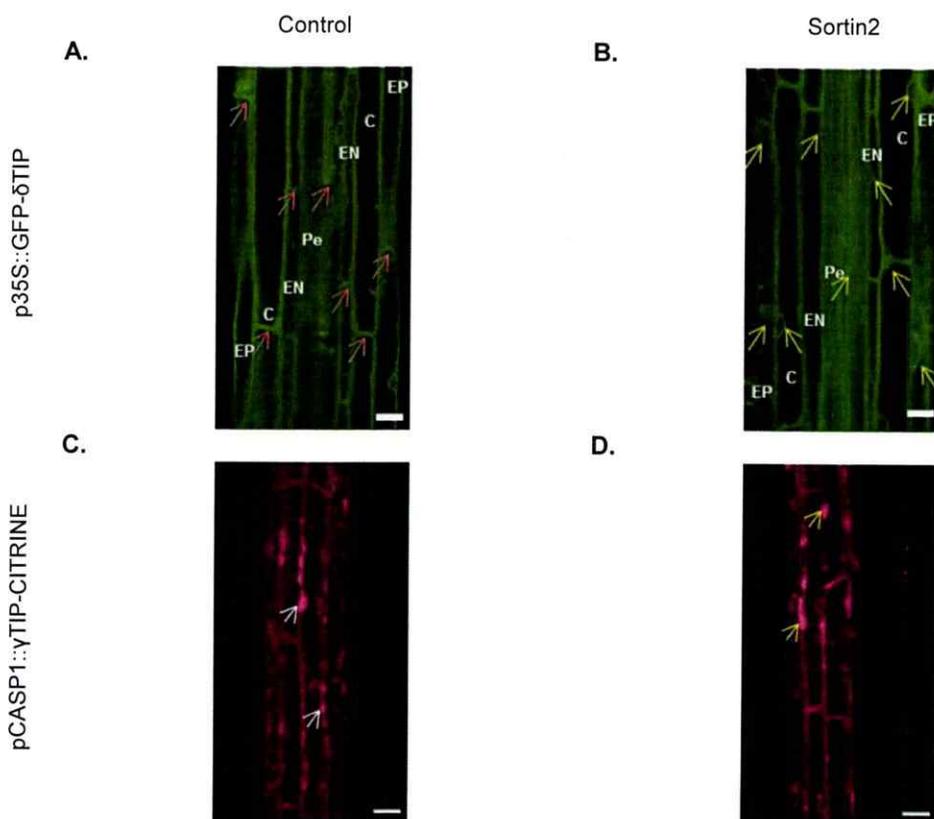


Figura 12: El tratamiento con Sortin2 altera la morfología de la vacuola en la epidermis, corteza, endodermis y periciclo de la raíz primaria de *A. thaliana*. Plántulas de 7 días de las líneas reporteras p35S::GFP- δ TIP (A) y (B) y pCASP1:: γ TIP-CITRINE (C) y (D) se trataron en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control) y con Sortin2 25 μ g/mL por 2 horas. Al estudiar la localización de GFP- δ TIP en la zona de diferenciación de la raíz primaria se distinguió la vacuola en las distintas capas celulares de la raíz: epidermis (EP), corteza (C), endodermis (EN) y periciclo (Pe). En la condición control la morfología de la vacuola es un continuo con pliegues (flechas rosadas). En cambio, en tratamiento con Sortin2 se ven estructuras más complejas como "bulbs" y sábanas (flechas amarillas), lo que indica un cambio en la dinámica de la configuración de la vacuola. Al analizar en una reconstrucción 3D la localización de γ TIP-CITRINE se visualiza la conformación de la vacuola en la endodermis. Se observó una mayor acumulación de γ TIP-CITRINE bajo tratamiento con Sortin2 (flechas amarillas), comparado con la condición control (flechas blancas). Se realizaron 2 réplicas experimentales utilizando p35S::GFP: δ -TIP y 1 réplica experimental para pCASP1:: γ TIP-CITRINE con 2 plántulas en cada réplica. Las imágenes fueron capturadas con un aumento de 400X. Las barras de tamaño corresponden a 10 μ m.

Con los resultados obtenidos se visualiza que el volumen de la endodermis no se ve afectado en tratamiento con Sortin2. Sin embargo, la estructura de la vacuola de las células de la endodermis se encuentra alterada en tratamientos con Sortin2. La complejidad de las vacuolas no permite evidenciar si su volumen en las células de la endodermis contiguas a las LRFCs variaba en el tratamiento con Sortin2.

Los resultados obtenidos para el tratamiento con Sortin2 en los eventos de *priming* de raíces laterales, nos indican que la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2 es un evento temporalmente previo a la promoción de los eventos de *priming* de la organogénesis de raíces laterales descritos en la literatura, ya que la activación de la transcripción de *GATA23* y la acumulación de *MAKR4* en las LRFCs ocurren a tiempos posteriores de la acumulación de *PIN2-GFP* en la vacuola.

3.2 Estudio del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 en la colección de mutantes, con defectos en la formación de raíces laterales y defectos en el sistema de endomembranas, que presentan distinta sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2.

En nuestro laboratorio, se han realizado diferentes *screenings* de mutantes para encontrar proteínas relacionadas al sistema de endomembranas y a la formación de raíces laterales que son importantes para que Sortin2 induzca los efectos, tanto en el tráfico endocítico como en la formación de raíces laterales, respectivamente. Con respecto al *screening* de mutantes relacionadas al sistema de endomembranas se evaluó la sensibilidad a Sortin2 de 21 mutantes en las que su producto proteico está descrito por poseer un papel clave en diferentes procesos como la endocitosis, exocitosis y secreción (Cruz-Amaya & Norambuena, resultados no publicados; Anexo I). Se encontraron dos mutantes hipersensibles a Sortin2, Siete parcialmente resistentes y una resistente a la inducción de la formación de raíces laterales por Sortin2 (Cruz-Amaya & Norambuena, resultados no publicados; Anexo I). Por otro lado, en mi Seminario de título para obtener el título profesional de Ingeniería en Biotecnología Molecular realizamos una búsqueda de mutantes que han sido descritas por presentar fenotipos alterados en las diferentes etapas de la formación de raíces laterales (Morales-Herrera, 2015). De esta manera contamos con una colección de 13 mutantes resistentes y 9 hipersensibles a la inducción de raíces laterales por Sortin2 (Morales-Herrera, 2015; ANEXO I).

Las mutantes relacionadas con el sistema de endomembranas nos indican que

la inducción de raíces laterales por Sortin2 requiere del funcionamiento correcto de ciertas rutas de tráfico del sistema de endomembranas, sugiriendo que el efecto morfológico que posee Sortin2 estaría ligado al efecto celular que este compuesto tiene.

Para establecer si el efecto de Sortin2 a nivel endocítico está ligado a lo que gatilla la inducción de raíces laterales es que se utilizaron las diversas mutantes que son resistentes e hipersensibles al efecto de Sortin2 para la inducción de raíces laterales. Además, con este estudio se puede establecer el efecto que provoca la carencia de la función de las proteínas codificados por los correspondientes genes mutados en el evento de *priming* de raíces laterales que gatilla Sortin2.

3.2.1 Evaluación de la endocitosis hacia la vacuola del trazador endocítico FM4-64 en tratamiento con Sortin2 en la colección de mutantes, con defectos en la formación de raíces laterales y mutantes con defectos en el sistema de endomembranas, que presentan distinta sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2.

Para responder la interrogante de si las mutantes que tenían distinta sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2 presentaban la misma sensibilidad a los efectos celulares que tiene Sortin2 y así establecer que estos procesos están ligados, es que se evaluó el tráfico endocítico hacia la vacuola del trazador fluorescente FM4-64 (Bolte y col., 2004) en las diferentes líneas inducido por Sortin2 .

Para fijar los parámetros de inducción de endocitosis de FM4-64 hacia la vacuola en las líneas mutantes en tratamiento con Sortin2, primeramente, se vio el efecto celular en las líneas parentales de estas mutantes. Para esto se estudió la dinámica endocítica de FM4-64 en plántulas de 7 días de los ecotipos silvestres Col-0 y Ws.

En Col-0 se encontró que el trazador endocítico llega a los 120 y 60 minutos a las vacuolas en el tratamiento control y con Sortin2, respectivamente (Figura 26). Además, en el ecotipo silvestre Ws se obtuvo que FM4-64 alcanza las vacuolas a los 60 minutos en la condición control y a los 30 minutos en la condición con Sortin2 (Figura 27). Esta hipersensibilidad a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2 en Ws comparado a Col-0 coincide con la hipersensibilidad a la formación de primordios de raíces laterales inducido por Sortin2 (Morales-Herrera, 2015).

Se determinó el siguiente criterio de clasificación con respecto a la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola del trazador FM4-64 en tratamiento con Sortin2. Según el criterio las distintas mutantes podían clasificarse en silvestres, resistentes e hipersensibles (Figura 13). Se estableció como mutantes silvestres a las líneas en que a los 60 minutos de tratamiento con Sortin2 el FM4-64 se encontraba en la vacuola y en condición control había alcanzado los endosomas. Se denominó resistente a las mutantes en que el FM4-64 se encontraba en los endosomas a los 60 minutos en tratamiento con Sortin2. También se categorizó como resistentes cuando a los 60 minutos en condición

control el FM4-64 se situaba en la vacuola y a los 30 minutos el FM4-64 estaba en los endosomas en tratamiento con Sortin2. Se indicó como hipersensibles a las líneas en que a los 60 minutos de tratamiento control se encontraba en la vacuola y con Sortin2 el FM4-64 a los 30 minutos alcanzaba la vacuola. Cabe mencionar que se evaluó a los 30 minutos de tratamiento con Sortin2 en el caso de *axr4-1*, ya que su parental genético es Ws y FM4-64 alcanza la vacuola a los 30 minutos en condición con Sortin2.

Con respecto a las mutantes relacionadas con la formación de raíces laterales, se analizaron las líneas mutantes resistentes a la inducción de la formación de raíces laterales por Sortin2: *cul1-6*, *slr1-1*, *ceg*, *iaa28-1* y 35S::PIN1, y las líneas hipersensibles *axr4-1*, *aux1-21* *yacr4*, para establecer si la resistencia o hipersensibilidad a la formación de raíces laterales se encuentra ligada a la sensibilidad de esta mutantes a los efectos endocíticos que tiene Sortin2. Este análisis además permitió determinar qué procesos, defectuosos en estas mutantes, son importantes para inducir la formación de las raíces laterales gatilladas por Sortin2.

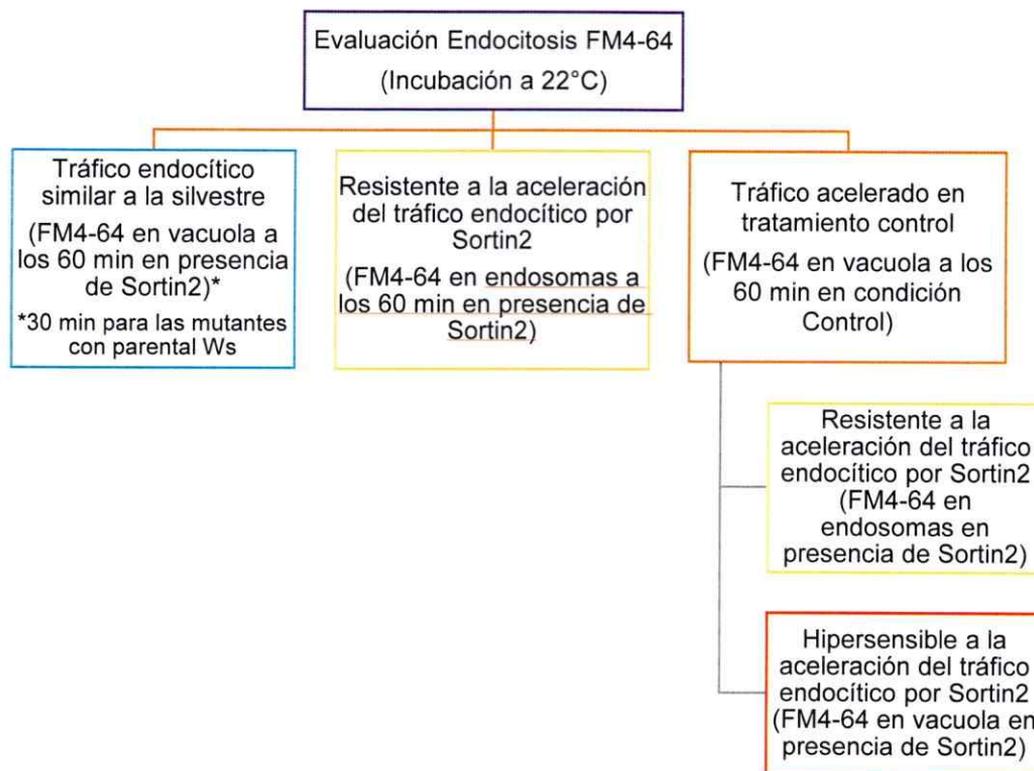


Figura 13: Esquema de la estrategia que se utilizó para la clasificación de la sensibilidad de las mutantes a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2. Se clasificó a las mutantes en silvestres, resistentes e hipersensibles a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2. Se estableció como mutantes silvestres a las líneas en que a los 60 minutos de tratamiento con Sortin2 el FM4-64 se encontraba en la vacuola y en condición control había alcanzado los endosomas. Se denominó resistente a las mutantes en que el FM4-64 se encontraba en los endosomas a los 60 minutos en tratamiento con Sortin2. También se categorizó como resistentes cuando a los 60 minutos en condición control el FM4-64 se situaba en la vacuola y a los 30 minutos el FM4-64 estaba en los endosomas en tratamiento con Sortin2. Se indicó como hipersensibles a las líneas en que a los 60 minutos de tratamiento control se encontraba en la vacuola y con Sortin2 el FM4-64 a los 30 minutos alcanzaba la vacuola. * Se evaluó a los 30 minutos en el caso de *axr4-1*, ya que su parental genético es Ws y FM4-64 alcanza la vacuola a los 30 minutos de tratamiento con Sortin2.

Asimismo, se trabajó con las líneas mutantes relacionadas con las proteínas del sistema de endomembranas parcialmente resistentes al efecto inductor de raíces laterales de Sortin2: *sec15*, *vps53* y *vamp722*, y con la mutante hipersensible a este efecto *vti12-1*. De esta manera se pudo establecer si la sensibilidad a la formación de raíces laterales por Sortin2 está ligada con la sensibilidad a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillada por

Sortin2. Además, con esta estrategia se encontraron rutas de tráfico que serían necesarias para inducir el efecto celular promovido por Sortin2.

Al evaluar la endocitosis de FM4-64 en la línea transgénica sobreexpresora de PIN1 (35S::PIN1; Figura 28) que presenta resistencia a la inducción de primordios de raíces laterales por Sortin2, se evidenció que en el tratamiento control el trazador fluorescente se encuentra en los endosomas a los 60 minutos y alcanza las vacuolas a los 120 minutos. En contraste, FM4-64 llega a la vacuola a los 60 minutos en la condición con Sortin2. Esto nos indica que esta línea presenta un comportamiento silvestre con respecto a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2 al compararla con su parental Col-0. Similares resultados encontramos al estudiar el tráfico endocítico hacia la vacuola de FM4-64 en la línea *vamp722* (Figura 29), la cual es parcialmente resistente a la inducción de la formación de raíces laterales por Sortin2.

Conjuntamente, se estudió la endocitosis de FM4-64 en la mutante *axr4-1* (Figura 30), hipersensible a la inducción de primordios de raíces laterales por Sortin2, encontrándose que el trazador a los 60 minutos en el tratamiento control y con Sortin2 se encuentra en las vacuolas. También al evaluar la dinámica de endocitosis del FM4-64, a los 30 minutos se obtuvo que FM4-64 en condición control se encuentra en los endosomas y en condición con Sortin2 en las vacuolas. Por lo que al comparar la endocitosis de esta mutante con su parental silvestre Ws (Figura 27), se clasificó a *axr4-1* como comportamiento silvestre en la inducción por Sortin2 de la endocitosis hacia la vacuola.

Se encontró en las líneas *iaa28-1* y *slr1-1*, resistentes a la inducción de la formación de raíces laterales por Sortin2, que el trazador fluorescente a los 60 minutos, tanto en el tratamiento control como con Sortin2, alcanzaba los endosomas (Figuras 31 y 32). En estas mutantes el FM4-64 llega a las vacuolas en ambas condiciones a los 120 minutos. Por lo que al compararlos con el ecotipo silvestre Col-0, se clasifican estas dos mutantes como resistentes a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2.

Además, al estudiar al trazador endocítico en *cul1-6* (Figura 33), *sec15* (Figura 34) y *vps53* (Figura 35), se encontró que en el tratamiento control el FM4-64 alcanzaba las vacuolas a los 60 minutos, por lo que en estas líneas el tráfico endocítico hacia la vacuola se encuentra acelerado por Sortin2 al compararlo con su parental Col-0. Por estas razones es que se estudió la dinámica de endocitosis en tiempos menores, encontrándose que a los 30 minutos en el tratamiento control y con Sortin2 el trazador fluorescente alcanzaba los endosomas. Al tener basalmente el tráfico acelerado, *cul1-6*, *sec15* y *vps53* son resistentes a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducida por Sortin2, ya que el tratamiento con Sortin2 no induce una mayor aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola.

Asimismo, al estudiar la endocitosis de la sonda fluorescente FM4-64 en las líneas *aux1-21*, *acr4* y *vti12-1* (Figuras 36-38), mutantes hipersensibles a la formación de raíces laterales gatillada por Sortin2, se encontró que el trazador fluorescente en tratamiento control llegaba a las vacuolas a los 60 minutos, por

lo que su tráfico está acelerado en estas mutantes comparado con su parental Col-0. También se encontró que en tratamiento con Sortin2 el FM4-64 alcanza a las vacuolas a los 30 minutos. Estos resultados obtenidos nos indican que *aux1-21*, *acr4* y *vii12-1* son hipersensibles a Sortin2 en la inducción de la endocitosis hacia la vacuola, lo que nos sugiere que la acción de Sortin2 se ve favorecida por los eventos celulares y/o moleculares que se encuentran perturbados en estas mutantes.

También al estudiar la endocitosis del trazador fluorescente FM4-64, se encontró que en la mutante *ceg*, la cual es resistente a la promoción de raíces laterales por Sortin2, a los 60 minutos de tratamiento control el FM4-64 llega a las vacuolas (Figura 39). Por lo que al tener *ceg* el tráfico endocítico hacia la vacuola acelerado es que se estudiaron tiempos menores como los 30 minutos encontrando así que en ambos tratamientos el FM4-64 también se encuentra en las vacuolas. Este resultado nos indica que para los tiempos estudiados *ceg* es resistente a la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola que produce Sortin2.

Los resultados obtenidos respecto a la sensibilidad del efecto de Sortin2 de las distintas mutantes analizadas están resumidos en las Figuras 14, 15, 16, 18 y Tablas 3 y 4. Éstos nos muestran que la mayoría de las mutantes resistentes o parcialmente resistentes a la inducción de la formación de raíces laterales por Sortin2 son resistentes a la promoción del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillada por Sortin2. Además, estos resultados nos muestran que los procesos

defectuosos en las mutantes *iaa28-1*, *slr1-1*, *cul1-6*, *vps53*, *sec15* y *ceg*, son importantes para el evento de *priming* que induce Sortin2. Sin duda la función molecular de las proteínas respectivas es necesaria para que Sortin2 induzca el tráfico endocítico y la inducción en la formación de raíces laterales.

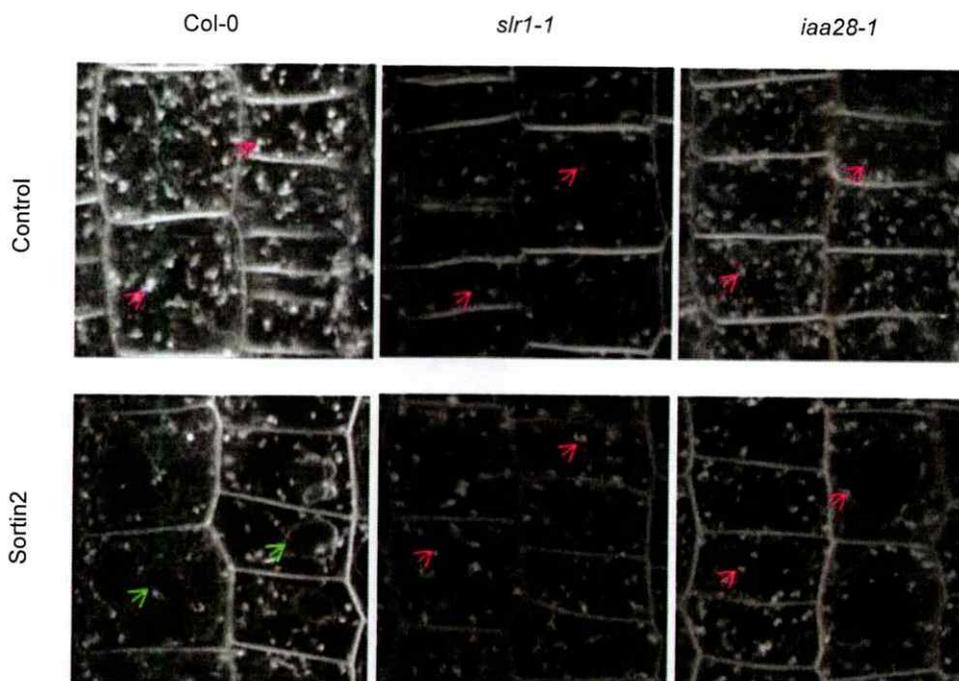


Figura 14: *iaa28-1* y *slr1-1* son resistentes a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea silvestre Col-0 y líneas mutantes *iaa28-1* y *slr1-1* se incubaron por 10 minutos a 4°C con la sonda fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico a los 60 minutos de tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la visualización de la internalización de FM4-64 a 22°C (tiempo 0). En Col-0, a los 60 minutos de tratamiento control se visualiza el FM4-64 en los endosomas (flechas rosadas) y en tratamiento con Sortin2 el FM4-64 alcanzó la vacuola (flechas verdes). En contraste, en *iaa28-1* y *slr1-1* que a los 60 minutos en ambos tratamientos se visualiza la sonda fluorescente en los endosomas. Las imágenes son representativas de 3 réplicas experimentales, en las que se analizaron 3 plántulas en cada tratamiento. Las imágenes fueron tomadas usando un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

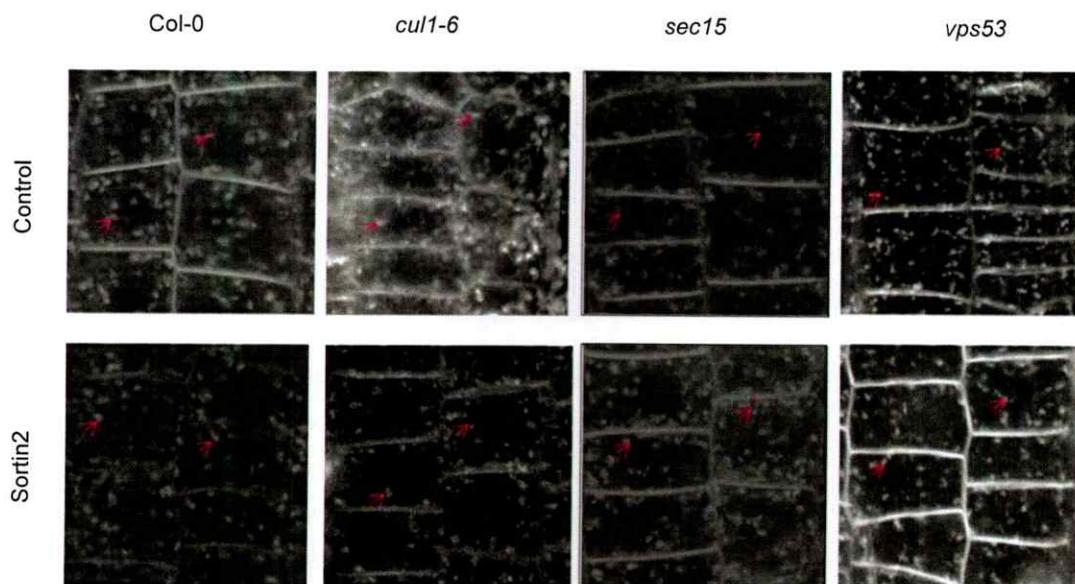


Figura 15: *cul1-6*, *vps53* y *sec15* son resistentes a la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillado por Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea silvestre Col-0 y líneas mutantes *cul1-6*, *vps53* y *sec15* se incubaron por 10 minutos a 4°C con la sonda fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico a los 30 minutos de tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la visualización de la internalización de FM4-64 a 22°C (tiempo 0). En Col-0, a los 30 minutos en ambos tratamientos se observa la sonda fluorescente en los endosomas (flechas rosadas). Asimismo, en las líneas mutantes también se visualiza el FM4-64 en los endosomas (flechas rosadas) tanto en tratamiento control como en tratamiento con Sortin2. Las imágenes son representativas de 3 réplicas experimentales, en las que se analizaron 3 plántulas en cada tratamiento. Las imágenes fueron tomadas usando un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

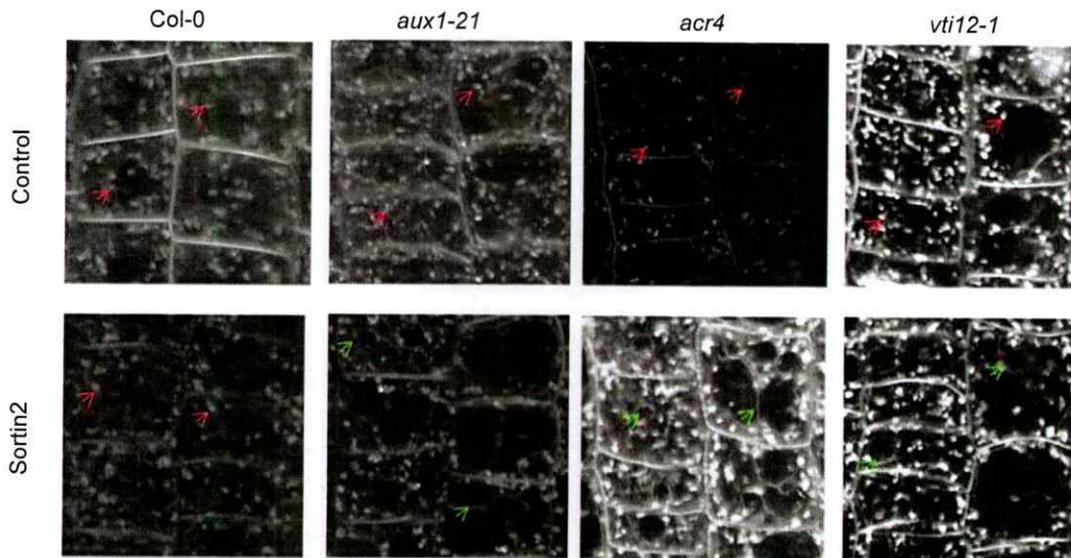


Figura 16: *aux1-21*, *acr4* y *vti12-1* son hipersensibles a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola promovido por Sortin2. Plántulas de 7 días del ecotipo silvestre Col-0 y mutantes *aux1-21*, *acr4* y *vti12-1* se incubaron por 10 minutos a 4°C con la sonda fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico a los 30 minutos de tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la visualización de la internalización de FM4-64 a 22°C (tiempo 0). En Col-0, a los 30 minutos en ambos tratamientos el FM4-64 se visualiza en los endosomas (flechas rosadas). Sin embargo, en las líneas mutantes en tratamiento control la sonda fluorescente alcanza los endosomas (flechas rosadas) y bajo tratamiento con Sortin2 el FM4-64 se observa en la vacuola (flechas verdes). Las imágenes son representativas de 3 réplicas experimentales, en las que se analizaron 3 plántulas en cada tratamiento. Las imágenes fueron tomadas usando un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

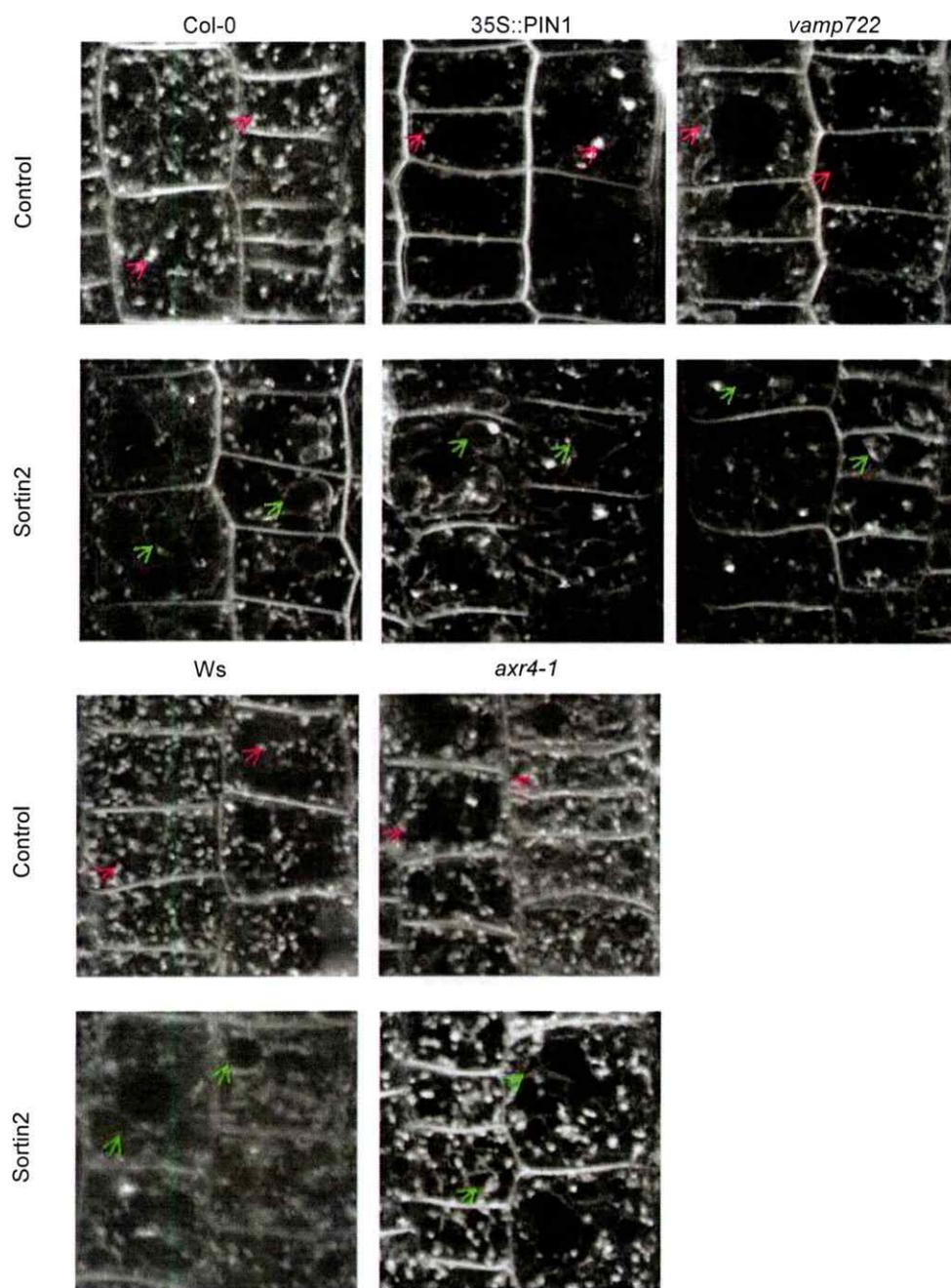


Figura 17: 35S::PIN1, *vamp722* y *axr4-1* presentan un comportamiento similar al parental silvestre a la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillado por Sortin2. Plántulas de 7 días de los ecotipos silvestres Col-0 y Ws y de las líneas transgénicas 35S::PIN1, *vamp722* y *axr4-1* se incubaron por 10 minutos a 4°C con el trazador fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico en tratamiento con MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Subsiguientemente se visualizó la internalización del trazador endocítico a 22°C (tiempo 0). Con respecto al ecotipo Col-0 y las líneas 35S::PIN1 y *vamp722*, el FM4-64 alcanza los endosomas (flechas rosadas) en tratamiento control a los 60 minutos y en tratamiento con Sortin2 se visualiza en la vacuola (flechas verdes). Por otra parte, en plántulas del ecotipo Ws y de la mutante *axr4-1* la sonda fluorescente se visualiza en los endosomas (flechas rosadas) en tratamiento control y en la vacuola (flechas rosadas) en tratamiento con Sortin2 a los 30 minutos. Las imágenes corresponden a 1 réplica experimental, en la que se analizaron 3 plántulas por réplica. Las imágenes se tomaron con un aumento de 400X. La barra de tamaño corresponde a 10 µm.

Además, los resultados que se obtuvieron nos indican que la mayoría de las mutantes estudiadas que fueron clasificadas como hipersensibles a la promoción de raíces laterales por Sortin2 en los estudios anteriores (Morales-Herrera, 2015; Cruz-Amaya & Norambuena, resultados no publicados; Anexo I) son hipersensibles a la inducción de la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2. Pudiendo además establecer que el efecto de Sortin2 requiere de procesos que intersectan con la función de VTI12, AUX1 y ACR4.

Tabla 3: Localización de FM4-64 en la ruta endocítica durante la dinámica de endocitosis y sensibilidad de los efectos inducidos por Sortin2. En esta tabla se enlistan las mutantes utilizadas, la sensibilidad a las inducción de raíces laterales que presentan en tratamiento con Sortin2 (Morales-Herrera, 2015; Cruz-Amaya & Norambuena, resultados no publicados), el detalle de la localización subcelular en que se encontraba el FM4-64 (gris: tratamiento control, amarillo: tratamiento con Sortin2) durante la temporalidad de la dinámica endocítica. En base a los resultados obtenidos las mutantes fueron clasificadas por la sensibilidad a la aceleración de la endocitosis de FM4-64 promovida por Sortin2.

Genotipo	Sensibilidad en el efecto de Sortin2 en la inducción de RL	Localización FM4-64 en células de la raíz			Sensibilidad en el efecto de Sortin2 en el tráfico endocítico
		30 min	60 min	120 min	
<i>Col-0</i>		endosomas	endosomas	vacuola	
		endosomas	vacuola	vacuola	
<i>Ws</i>		endosomas	vacuola	vacuola	
		vacuola	vacuola	vacuola	
<i>35S::PIN1</i>	Resistente	endosomas	endosomas	vacuola	Silvestre
		endosomas	vacuola	vacuola	
<i>vamp722</i>	Parcialmente resistente	endosomas	endosomas	vacuola	Silvestre
		endosomas	vacuola	vacuola	
<i>axr4-1</i>	Hipersensible	endosomas	vacuola	vacuola	Silvestre
		vacuola	vacuola	vacuola	
<i>iaa28-1</i>	Resistente	endosomas	endosomas	vacuola	Resistente
		endosomas	endosomas	vacuola	
<i>slr1-1</i>	Resistente	endosomas	endosomas	vacuola	Resistente
		endosomas	endosomas	vacuola	
<i>cul1-6</i>	Resistente	endosomas	vacuola	vacuola	Resistente
		endosomas	vacuola	vacuola	
<i>aux1-21</i>	Hipersensible	endosomas	vacuola	vacuola	Hipersensible
		vacuola	vacuola	vacuola	
<i>acr4</i>	Hipersensible	endosomas	vacuola	vacuola	Hipersensible
		vacuola	vacuola	vacuola	
<i>vti12-1</i>	Hipersensible	endosomas	vacuola	vacuola	Hipersensible
		vacuola	vacuola	vacuola	
<i>ceg</i>	Resistente	vacuola	vacuola	vacuola	Resistente
		vacuola	vacuola	vacuola	

En conjunto los resultados nos permiten proponer una relación directa entre la sensibilidad a la inducción de la organogénesis de raíces laterales por Sortin2 y la sensibilidad a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillado por Sortin2, ya que en el 75% de las mutantes estudiadas presentan la misma sensibilidad ante estos efectos inducidos por este compuesto. Lo que sugiere fuertemente que el efecto morfológico inducido por Sortin2 y el efecto celular que tiene este compuesto se correlacionan.

Tabla 4: Resumen de la sensibilidad a la endocitosis de FM4-64 de las mutantes estudiadas. En esta tabla se enlistan las mutantes utilizadas, el *screening* por el que fueron seleccionadas (Morales-Herrera, 2015; Cruz-Amaya & Norambuena, resultados no publicados), la sensibilidad a las inducción de raíces laterales que presentan en tratamiento con Sortin2, la sensibilidad a la aceleración de la endocitosis de FM4-64 promovida por Sortin2 y la correlación entre el efecto morfológico y el efecto celular gatillados por Sortin2

Genotipo	Screening donde se identificó la mutante con diferente sensibilidad a Sortin2	Sensibilidad a la inducción de raíces laterales por Sortin2	Sensibilidad a la inducción de la endocitosis de FM4-64 por Sortin2	Correlación de la sensibilidad del efecto en RL y en el tráfico endocítico inducidos por Sortin2
<i>iaa28-1</i>	Raíces laterales	Resistente	Resistente	Positiva
<i>sir1-1</i>	Raíces laterales	Resistente	Resistente	Positiva
<i>cul1-6</i>	Raíces laterales	Resistente	Resistente	Positiva
<i>ceg</i>	Raíces laterales	Resistente	Resistente	Positiva
<i>aux1-21</i>	Raíces laterales	Hipersensible	Hipersensible	Positiva
<i>acr4</i>	Raíces laterales	Hipersensible	Hipersensible	Positiva
<i>35S::PIN1</i>	Raíces laterales	Resistente	Silvestre	Positiva
<i>axr4-1</i>	Raíces laterales	Hipersensible	Silvestre	No correlación
<i>sec15</i>	Sistema de endomembranas	Parcialmente resistente	Resistente	Positiva
<i>vps53</i>	Sistema de endomembranas	Parcialmente resistente	Resistente	Positiva
<i>vti12-1</i>	Sistema de endomembranas	Hipersensible	Hipersensible	Positiva
<i>vamp722</i>	Sistema de endomembranas	Parcialmente resistente	Silvestre	No correlación

3.2.2 Análisis de la población de MVB/PVC/LE ARA7-positivos mediante inmunofluorescencia bajo tratamiento con Sortin2.

El tratamiento con Sortin2 presenta, además de la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola, efectos en la abundancia de compartimentos endosomales MVB/PVC/LE que son positivos al marcador ARA7 (Ueda y col., 2001), puesto que en Pérez-Henríquez y col., 2012 al utilizar la línea reportera pARA7::ARA7-GFP (Jaillais y col., 2006) se encontró que esta proteína reportera cambia su distribución puntuada formando agregados con mayor intensidad de fluorescencia en las células de raíces en tratamiento con Sortin2. Por lo que nos surgió la interrogante si Sortin2 podría ejercer este efecto celular en las mutantes que eran resistentes tanto a la sensibilidad de raíces laterales promovida por Sortin2 como a la aceleración de la endocitosis hacia la vacuola de FM4-64. Para responder esta pregunta se evaluó la abundancia y morfología de los compartimentos ARA7 positivos realizando una inmunofluorescencia indirecta de ARA7. Para ello raíces de plántulas de 7 días crecidas en MS-agar del ecotipo silvestre Col-0 y de las líneas mutantes *iaa28-1*, *slr1-1*, *cul1-6*, *sec15* y *vps53* se sometieron a tratamiento Control y con Sortin2 por 4 horas, ya que es el tiempo al que se ve una inducción de la acumulación a la vacuola de PIN2-GFP en condición con Sortin2 (Figura 7).

Plántulas del ecotipo silvestre Col-0 en tratamiento control presentan una distribución del anticuerpo que reconoce ARA7 en múltiples cuerpos que se distribuyen en toda la célula (Figura 28, panel superior). Este patrón puntuado

es característico para los compartimentos MVB/PVC/LE-ARA7 en las células de la epidermis de la raíz primaria (Ueda y col., 2001). En contraste, en tratamiento con Sortin2 hay un mayor número de cuerpos positivos a ARA7 (Figura 18, panel inferior). También se observa un aumento en la población de compartimentos MVB/PVC/LE-ARA7 positivos en estas células (Figura 18, panel inferior), lo que indica un mayor reclutamiento de esta maquinaria.

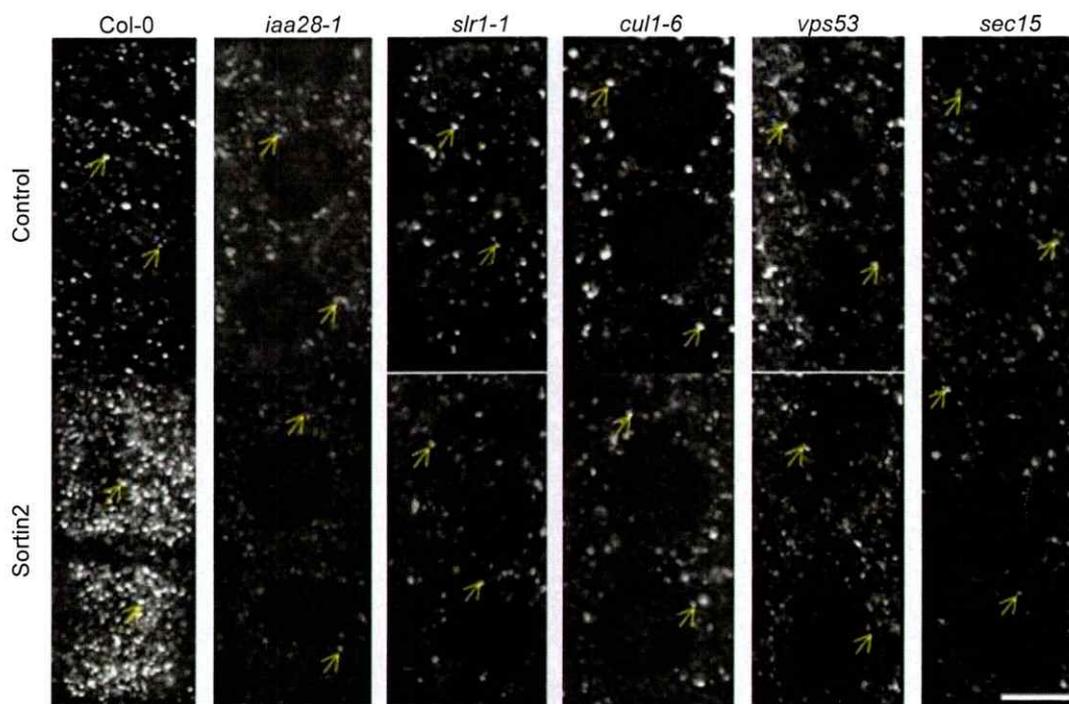


Figura 18: Sortin2 es incapaz de modificar el patrón de distribución del marcador de MVB/PVC/LE ARA7 en las raíces de las mutantes que son resistentes a Sortin2. Plántulas de 7 días de las líneas mutantes *iaa28-1*, *slr1-1*, *cul1-6*, *sec15* y *vps53* y del ecotipo silvestre Col-0 crecidas en MS-agar fueron traspasadas a MS-líquido suplementado con DMSO1% (Control) y con Sortin2 25µg/mL por 4 horas. Luego se efectuó la inmunofluorescencia indirecta utilizando el anticuerpo primario que reconoce a ARA7 y el anticuerpo secundario que reconoce las IgG (H+L) de conejo (producido por cabra) conjugado al fluorocromo Cy3 (KPL). ARA7 es un marcador de PVC/MVB/LE en plantas y posee un patrón punteado en condición control. En tratamiento con Sortin2 se ve un aumento de la cantidad de cuerpos punteados y por ende un aumento de la fluorescencia. En las mutantes se puede observar un patrón punteado en ambos tratamientos y no se observa una diferencia evidente en la cantidad de puntos ni en la intensidad de la fluorescencia en los tratamientos con Sortin2. Flechas amarillas indican los PVC/MVB/LE-positivos a ARA7. Las imágenes son representativas de 3 réplicas experimentales, en las que se analizaron 5 plántulas por tratamiento. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

Al evaluar el patrón de los compartimentos MVB/PVC/LE-ARA7 positivos en raíces de plántulas de las mutantes tratadas con DMSO 1% (Control), se encontró que la población de estos compartimentos en *iaa28-1*, *slr1-1*, *cul1-6*, *vps53* y *sec15*, es menor al presentado en las raíces de plántulas Col-0 (Figura 18, panel superior), lo que indica que hay un menor reclutamiento de la maquinaria que permite el tráfico de componentes desde y hacia este tipo de compartimento.

Por otra parte, en las células de la epidermis de raíces de plántulas de 7 días tratadas con Sortin2 de las líneas *iaa28-1*, *slr1-1*, *cul1-6*, *vps53* y *sec15*, se encontró que Sortin2 no es capaz de promover un aumento en la población de estos compartimentos como lo hace en las raíces de plántulas silvestres (Figura 18, panel inferior). Estos resultados sugieren que la resistencia a la inducción de la formación de raíces laterales por Sortin2 está fuertemente ligada a la resistencia a los fenotipos celulares que Sortin2 promueve, puesto que este compuesto es incapaz de promover el aumento del tráfico endocítico a la vacuola como tampoco el aumento de la población de compartimentos MVB/PVC/LE-ARA7 positivos en mutantes resistentes al efecto de la formación de raíces laterales por Sortin2. Es decir, se sustenta aún más la co-segregación y/o correlación del efecto morfológico de Sortin2 y los efectos celulares que este compuesto induce.

3.3 Evaluación de la inducción de los eventos de priming de raíces laterales por Sortin2 en las mutantes resistentes a las alteraciones del tráfico endocítico y a la inducción de raíces laterales por Sortin2.

Como se ha mencionado anteriormente, se han definido diversos eventos como eventos de *priming* de raíces laterales los que ocurren antes de la etapa de iniciación de las raíces laterales: la migración de los núcleos de las LRFCs; la activación de la expresión del factor de transcripción *GATA23* en las LRFCs; la remodelación de las células de la endodermis contiguas a los primordios de raíces laterales; y la acumulación de *MAKR4* en la membrana plasmática de las LRFCs (Casero y col., 1995; De Rybel y col., 2010, 2012; Vermeer y col., 2014; Xuan y col., 2015).

Los resultados del objetivo 2 nos permitieron seleccionar diversas mutantes que evidencian una correlación entre el efecto celular a nivel del tráfico endocítico y a nivel de la formación de raíces laterales por Sortin2. Por lo que otra forma de estudiar si el efecto celular que tiene Sortin2 está ligado con la inducción de los eventos de *priming* de raíces laterales es testear si el tratamiento con Sortin2 es capaz de inducir los eventos de activación de las LRFCs en las mutantes resistentes *iaa28*, *slr1-1*, *vps53* y *sec15*. Además, de esta manera podemos determinar si los procesos celulares o moleculares, defectuosos en las mutantes resistentes, son necesarios para que Sortin2 pueda inducir los eventos de activación como se mostró en el objetivo 1.

Los resultados del objetivo 1 nos indican que mediante el uso de las líneas

reporteras, el tratamiento con Sortin2 induce la expresión de *GATA23* y *MAKR4* en las LRFs, por lo que para cuantificar los niveles de inducción de los transcritos de *GATA23* y *MAKR4*, se midieron los niveles de transcritos de estos genes en raíces de plántulas de 7 días del ecotipo silvestre Col-0 y de las mutantes resistentes a los efectos gatillados por Sortin2: *iaa28-1*, *slr1-1*, *vps53* y *sec15*, sometidas a 24 horas de tratamiento con DMSO 1% (Control) y Sortin2. Se utilizó la auxina exógena NAA como control positivo, puesto que en De Rybel y col., 2012 caracterizaron que tanto en Col-0 como en las líneas *iaa28-1* y *slr1-1*, el tratamiento con esta auxina promueve la expresión de *GATA23*. Además, se ha reportado en Xuan y col., 2015 que el tratamiento con auxinas promueve una mayor expresión de *MAKR4* en las raíces. Entonces el tratamiento con NAA se utilizó como control positivo de inducción de la expresión de ambos genes.

3.3.1 Evaluación de los niveles de transcrito de los genes *GATA23* y *MAKR4* bajo tratamiento con Sortin2 en las mutantes resistentes a Sortin2.

Para analizar los niveles de transcritos de los genes *GATA23* y *MAKR4* mediante RT-qPCR se obtuvo ADNc mediante la retrotranscripción de ARN. El ARN se preparó desde raíces de plántulas de 7 días sometidas a los tratamientos por 24 horas. Se hicieron las pruebas de calidad correspondientes para enseguida realizar la determinación de los niveles de transcritos de los genes de interés.

Primeramente, se corroboró que el ARN con que trabajamos se encontraba

libre de ADNg (Figura 19A) y luego se comprobó que el ADNc presenta la calidad suficiente para amplificar diversos ORFs (Figura 19B). Después se evaluó la cantidad de ADNc necesaria y suficiente para cuantificar los niveles de transcrito mediante RT-qPCR. Se evaluó la linealidad que debe existir entre la cantidad de templado a utilizar y la variable Ct que corresponde al ciclo en el punto de inflexión de la curva de amplificación de PCR obtenidos en cada determinación (Nolan y *col.*, 2006). En la Figura 20 se grafica la masa de ADNc utilizado como templado y el Ct obtenido al amplificar diversos genes. Los datos muestran un coeficiente de Pearson (R^2) mayor a 0.8, lo que indica una alta correlación positiva (Hurtado & Domínguez-Sánchez, 2009) en el rango de ADNc entre 10 ng y 1 ng. Por estos resultados, se decidió cuantificar los transcritos de interés utilizando una masa de 5 ng de ADNc en las reacciones de RT-qPCR.

Posteriormente, se seleccionó el gen normalizador a utilizar en la reacción de RT-qPCR para así trabajar con un gen que no varíe significativamente sus niveles de transcritos en los tratamientos realizados. Se partió teniendo como candidatos a los genes: *AP2M* (AT5G46630), *TIP41-like* (AT4G34270) y *UNKNOWN1* (AT4G16100) que han sido caracterizados por no variar de manera significativa sus transcritos en tratamientos con Sortin2 respecto a nuestras condiciones experimentales controles (Pérez-Henríquez, 2016). La elección del gen normalizador en estos tratamientos y en las mutantes con que se trabajó, se realizó mediante la herramienta NormFinder (Andersen y *col.*, 2004), eligiendo al gen *AP2M* como el gen cuyos valores de transcritos varían en

menor proporción entre las condiciones experimentales.

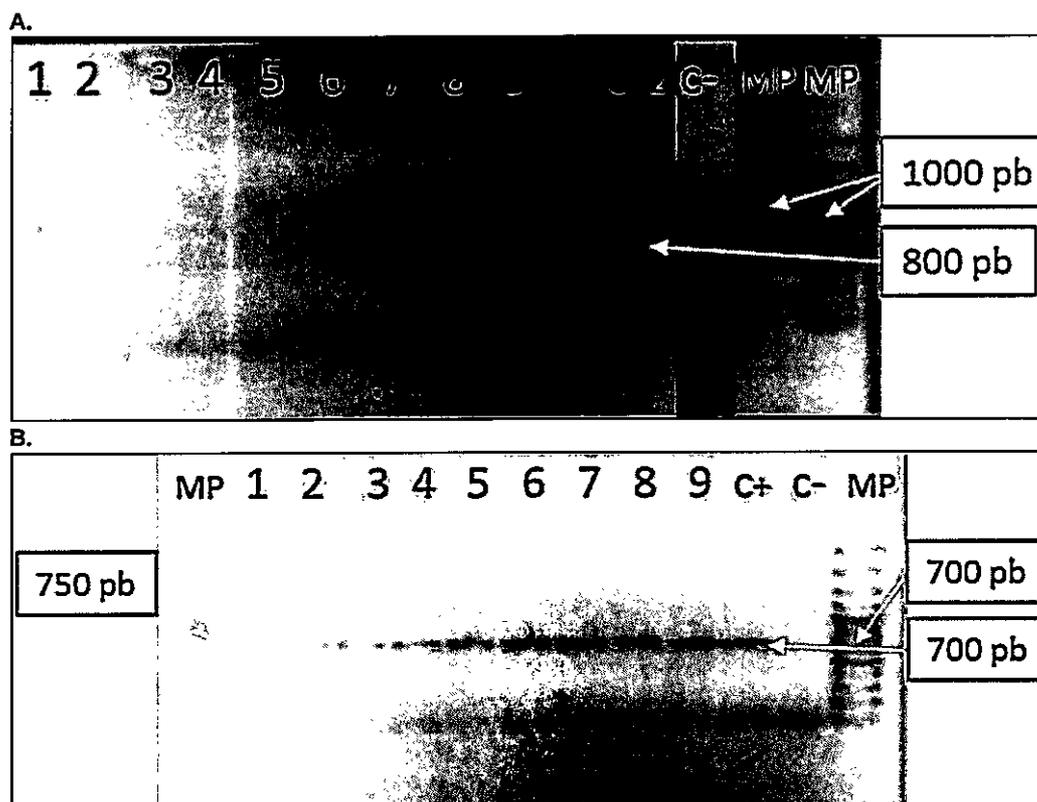


Figura 19: Los ARNs aislados de raíces de plántulas Col-0 y de las mutantes *iaa28-1* y *slr1-1* están libres de ADNg y permiten producir ADNc de los cuales se pueden amplificar ORFs. Productos de PCR de la reacción realizada para amplificar el gen de *ACTINA11* de *A. thaliana*. (A) Las diversas muestras de ARN fueron sometidas a una reacción de PCR para corroborar que estaban libres de ADN. El templado de cada reacción es el siguiente: 1: ARN Col-0 DMSO1%; 2: ARN Col-0 Sortin2 25µg/mL; 3: ARN Col-0 NAA 10µM; 4: ARN *iaa28-1* DMSO1%; 5: ARN *iaa28-1* Sortin2 25µg/mL; 6: ARN *iaa28-1* NAA 10µM; 7: ARN *slr1-1* DMSO1%; 8: ARN *slr1-1* Sortin2 25µg/mL; 9: ARN *slr1-1* NAA 10µM; c+: ADNg Col-0; c-2: ADNg Col-0; c-: H₂O tratada con DEPC; MP: Marcador de peso ADN 1000 pb plus (ThermoScientific); MP: Marcador de peso ADN 1kb (ThermoScientific). El control positivo amplifica una banda de 800 pb como es esperado. Sin embargo, no se detecta ADN en los ARN de las raíces de las plántulas. (B) Se verificó la calidad de los ADNc obtenidos realizando una reacción de PCR para amplificar el ORF de *ACTINA11* de *Arabidopsis*. En este caso el fragmento amplificado de aproximadamente 700 pb se detecta en las raíces de todas las plántulas, como se ve en la figura en donde MP: Marcador de peso ADN 1kb (ThermoScientific); 1: ADNc Col-0 DMSO1%; 2: ADNc Col-0 Sortin2 25µg/mL; 3: ADNc Col-0 NAA 10µM; 4: ADNc *iaa28-1* DMSO1%; 5: ADNc *iaa28-1* Sortin2 25µg/mL; 6: ADNc *iaa28-1* NAA 10µM; 7: ADNc *slr1-1* DMSO1%; 8: ADNc *slr1-1* Sortin2 25µg/mL; 9: ADNc *slr1-1* NAA 10µM; c+: ADNc Col-0; c-: H₂O tratada con DEPC. MP: Marcador de peso ADN 1000 pb plus (ThermoScientific).

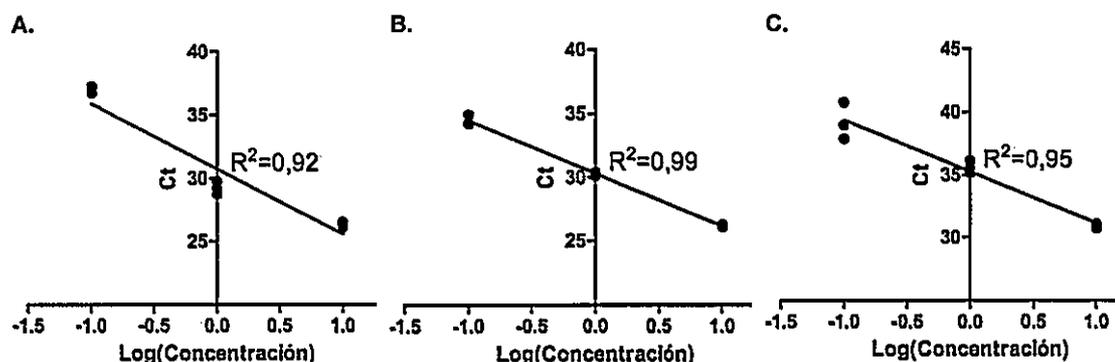


Figura 20: Existe una correlación directa entre la masa de ADNc utilizado en la reacción de RT-qPCR y el Ct determinado mediante RT-qPCR. Se grafica el Ct obtenido en reacciones de RT-qPCR en función del logaritmo de la masa de ADNc utilizado. Se utilizó 10 ng, 1 ng y 0,1 ng de ADNc de las raíces de Col-0 en condición control (tratamiento con DMSO1%), en (A) se amplificó el ORF de *AP2M*, en (B) *TIP41* y en (C) *UNKNOW1*. Como indica el parámetro R^2 en los 3 gráficos se obtuvo una relación lineal para la amplificación de los tres genes, la cual es inversamente proporcional entre ambos parámetros. Cada determinación se realizó en triplicado.

Para amplificar los genes *GATA23* y *MAKR4* se diseñaron partidores considerando que tengan entre 18-25 nucleótidos, una $T_m = 55^\circ\text{C} \pm 1$ y un %GC entre un 40% y 60%. Además, se corroboró la especificidad que tenían éstos para la amplificación de los genes específicos con que se debía trabajar. Por análisis *in silico* se encontró que los partidores qGATA23-F1 y qGATA23-R1 (Tabla 2) pueden amplificar específicamente un fragmento de 127 pb del ORF de *GATA23*. Además, por este mismo análisis se obtuvo que los partidores qMAKR4-F y qMAKR4-R (Tabla 2) sólo amplifican un fragmento de 102 pb del ORF de *MAKR4*. Además, se observó la curva de disociación del producto amplificado (ver materiales y métodos, Figura 6). Se obtuvo que tanto los partidores qGATA23-F1 y qGATA23-R1, como qMAKR4-F y qMAKR4-R sólo generan un máximo de amplificación en la curva de disociación lo que sugiere fuertemente que sólo un producto está siendo amplificado (Figura 6, Materiales

y Métodos). Estos resultados indican que ambos pares de partidores son capaces de amplificar específicamente a los genes de interés.

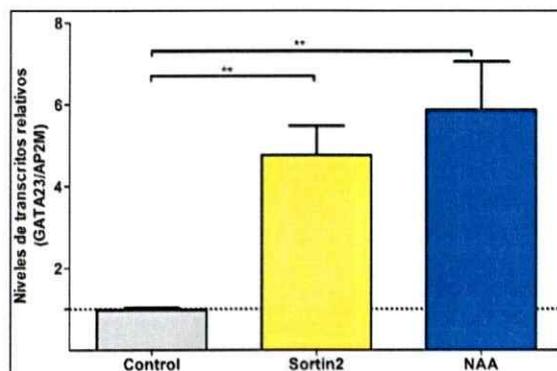
Con todos los pasos anteriores se procedió a estudiar los niveles de transcritos de *GATA23* y *MAKR4* en las raíces de plántulas del ecotipo silvestre Col-0. La presencia de Sortin2 durante 24 horas induce 5 veces los niveles de transcrito de *GATA23* con respecto al normalizador *AP2M* comparado con el control (Figura 21A). Este efecto es similar a lo que produce el tratamiento con NAA (7 veces, Figura 21A). También se evidenció que el tratamiento con Sortin2 aumentaba 5 veces los niveles de transcritos de *MAKR4* en las raíces de plántulas Col-0 (Figura 21B). El tratamiento con NAA, es capaz de inducir 10 veces los niveles al compararlo con el tratamiento control (Figura 21B). Estos resultados sustentan la evidencia presentada en el objetivo 1, en que se indica que el tratamiento con Sortin2 es capaz de inducir los niveles de transcritos de *GATA23* y *MAKR4* en raíces de plántulas Col-0.

Para determinar si el efecto endocítico está ligado con el efecto morfológico que induce Sortin2 se evaluaron los niveles de transcritos de *GATA23* y *MAKR4* en las mutantes resistentes relacionadas con la iniciación de raíces laterales, *iaa28-1* y *slr1-1*. De esta manera también podemos determinar que los procesos celulares o moleculares mediados por las proteínas correspondientes son importantes para que Sortin2 pueda inducir su efecto de raíces laterales y así poder posicionar estos procesos río arriba o río abajo de la inducción por Sortin2. Se encontró que el tratamiento con Sortin2 es incapaz de promover los

niveles de transcritos de *GATA23* (Figura 22A) ni de *MAKR4* en *iaa28-1* y *slr1-1* (Figura 22B). Sin embargo, el tratamiento con NAA induce los niveles de transcritos relativos de estos genes, como está descrito en la literatura (De Rybel y col., 2010; Xuan y col., 2015; Figura 22A y 22C). Estos resultados nos sugieren que Sortin2 requiere de la degradación de ambas Aux/IAAs, IAA28 e IAA14, para poder inducir los eventos de *priming* de raíces laterales, y que esta degradación está río arriba del efecto celular que tiene Sortin2.

También se estudiaron los niveles de transcritos de *GATA23* y *MAKR4* en las mutantes relacionadas al sistema de endomembranas que son resistentes a la inducción de raíces laterales y a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2: *sec15* y *vps53*. De esta manera se pudo establecer si la aceleración de la endocitosis hacia la vacuola y la inducción del *priming* de raíces laterales son dependientes. Además, permitió establecer si las vías de tráfico mediadas por SEC15 y VPS53 son importantes para que se lleve a cabo el evento de *priming* de raíces laterales inducido por Sortin2. Se encontró que los niveles de transcritos de *GATA23* no son inducidos significativamente en tratamiento con Sortin2 en *sec15* y *vps53* (Figura 22C). En cambio, los niveles de transcritos relativos de *MAKR4* sí pueden inducirse significativamente en la mutante *sec15*, no así en *vps53* (Figura 22D).

A.



B.

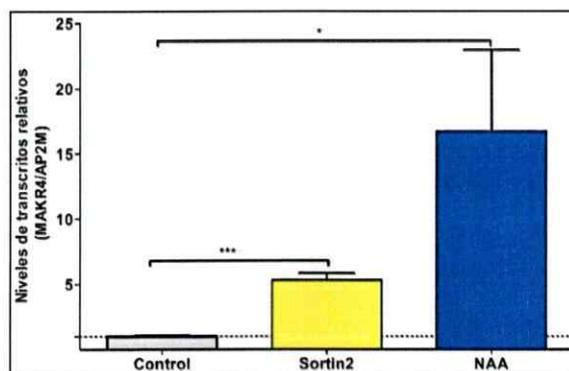


Figura 21: GATA23 y MAKR4 aumentan sus niveles de transcritos en las raíces de *A. thaliana* bajo tratamiento con Sortin2. Plántulas de 7 días del ecotipo silvestre Col-0 se traspasaron a tratamientos en MS-sólido suplementado con DMSO 1%(barras grises), Sortin2 25 μ g/mL (barras amarillas) y NAA (barras azules) 10 μ M por 24 horas. Los resultados de los niveles de transcritos en las raíces de plántulas tratadas se expresan como *niveles de transcritos relativos*. El valor 1 representa los niveles de transcritos de GATA23(A) o MAKR4 (B) en tratamiento control relativizado a los niveles de transcritos de AP2M en tratamiento control. Las barras de error corresponden al error estándar. Estos análisis corresponden a tres réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas, en donde se utilizó la prueba de t-student para el análisis estadístico: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$.

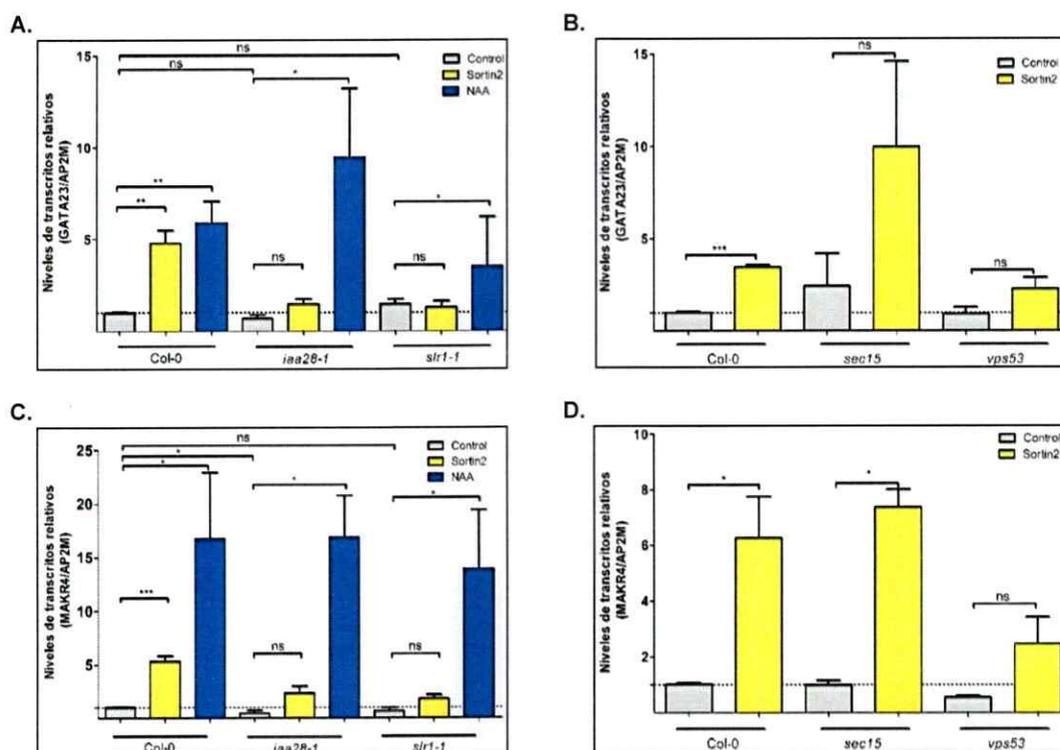


Figura 22: El tratamiento con Sortin2 no modifica los niveles de transcrito de *GATA23* y *MAKR4* en las raíces de las mutantes resistentes a los efectos de Sortin2. Plántulas de 7 días del ecotipo silvestre Col-0 y de las líneas resistentes a los efectos de Sortin2 que presentan defectos en la formación de raíces laterales: *iaa28-1* y *slr1-1* (A y C) o defectos en el sistema de endomembranas: *sec15* y *vps53* (B y D), se transfirieron a tratamientos en MS-sólido suplementado con DMSO 1% (barras grises), Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (barras amarillas) y NAA 10 μM (barras azules) por 24 horas. Los resultados de los niveles de transcrito en las raíces de plántulas tratadas se expresan como *niveles de transcritos relativos*. El valor 1 representa los niveles de transcritos de *GATA23* (A y B) o *MAKR4* (C y D) en tratamiento control relativizado a los niveles de transcritos de *AP2M* en tratamiento control en Col-0. Las barras de error corresponden al error estándar. Estos análisis corresponden a tres réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas, en donde se utilizó la prueba de t-student para el análisis estadístico: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ns= no significativo.

Estos resultados nos indican que para la inducción de la transcripción de *GATA23* por Sortin2 necesita del tráfico de TGN/EE a MP dependiente de SEC15 (Hála y col., 2008) y del transporte retrógrado entre LE/MVB/PVC y TGN/EE mediado por VPS53 (Wang y col., 2011). También nos sugiere que la inducción de la transcripción de *MAKR4* por Sortin2 sólo necesita del correcto funcionamiento de las vías de tráfico en que participa VPS53, no en las que participa SEC15. De esta manera las vías de tráfico en que participan VPS53 y SEC15 son necesarias y se encuentran río arriba del efecto celular endocítico gatillado por Sortin2 que induce el *priming* de raíces laterales.

A partir de los resultados obtenidos se propone que la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducida por Sortin2 podría promover la especificación de las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales.

DISCUSIÓN

La organogénesis es un proceso que comienza con la especificación de las células fundadoras que prosigue con la activación de estas células para dar lugar a la división celular y la generación de un primordio (Chandler, 2011). En el caso de la formación de las raíces laterales la fase en donde se define el cambio del destino de las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales (LRFCs) se conoce como *priming* y está dividida en especificación y activación de las LRFCs (Van Norman y col., 2013). En el caso del organismo modelo *Arabidopsis* existen diversos eventos de activación descritos, sin embargo eventos de especificación de las LRFCs aún no han sido caracterizados (Van Norman y col., 2013).

Se ha descrito que las auxinas comandan distintas fases de la organogénesis de las raíces laterales (Casimiro y col., 2001; De Rybel y col., 2010; De Smet y col., 2007; Péret y col., 2009; Swarup y col., 2008). La activación de las LRFCs puede ser inducida por esta hormona (De Rybel y col., 2010; Van Norman y col., 2013; Vermeer y col., 2014; Xuan y col., 2015), sin embargo, se ha reportado que las LRFCs se especificarían independientemente de la señalización de auxinas (Bao y col., 2014; Chandler, 2011; DiDonato y col.,

2004; Ditengou y col., 2008; Kircher & Schopfer, 2016; Van Norman y col., 2013), puesto que diversos estímulos mecánicos inducen la formación de raíces laterales por mecanismos independientes de la señalización canónica de auxina (Ditengou y col., 2008; Kircher & Schopfer, 2016; Ortíz-Castro y col., 2008). Además se ha demostrado que existe una oscilación periódica de genes en la zona de oscilación de la raíz primaria que participan en el *priming* de las LRFCs y la manipulación de los niveles de auxinas, o su señalización, son insuficientes para modificar esas oscilaciones (Moreno-Risueño y col., 2010; Xuan y col., 2015).

Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos evidenciado que el mecanismo de formación de raíces laterales gatillado por Sortin2 induce un evento previo a la etapa de iniciación de raíces laterales, provocando el cambio en el destino de las células del periciclo en *A. thaliana* (Morales-Herrera, 2015). Además, este mecanismo de organogénesis de raíces laterales es independiente del complejo receptor de auxina SCF^{TIR1/AFB1,2,3} y depende de la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola (Pérez-Henríquez y col., 2012). En esta tesis de Magíster se evidenció que la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 diferencia a las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales promoviendo la organogénesis de raíces laterales en *A. thaliana*. Esto se obtuvo al estudiar la relación que existe entre la inducción de raíces laterales por Sortin2 y el efecto endocítico gatillado por Sortin2 en un grupo de mutantes con distinta sensibilidad a la inducción de raíces laterales

por Sortin2. Se encontró que existe una correlación entre la sensibilidad a la inducción de raíces laterales y la aceleración del tráfico endocítico por Sortin2. Además, se encontró evidencia que sustenta la correlación del efecto endocítico y morfológico gatillados por Sortin2, ya que, al bloquear la función de proteínas importantes para el tráfico de proteínas, la promoción de raíces laterales por Sortin2 no ocurre. Por otro lado, mutantes defectuosas en la formación de raíces laterales, el efecto en el tráfico endocítico gatillado por Sortin2 no se lleva a cabo. También, mediante el uso de líneas reporteras de los eventos moleculares y celulares de *priming* de raíces laterales, se encontró que la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola promovido por Sortin2 ocurre previo a la inducción de los eventos de activación de las LRFCs descritos en la literatura. Consistentemente, Sortin2 es incapaz de promover los eventos de activación de LRFCs en mutantes resistentes a los efectos de Sortin2 en tráfico endocítico y formación de raíces laterales sugiriendo que la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2 podría ser la causa de la promoción de los eventos de activación de las LRFCs.

4.1 Existe una correlación entre la sensibilidad a la inducción de las raíces laterales por Sortin2 y la promoción del efecto endocítico gatillado por este compuesto.

En nuestro laboratorio hemos realizado diferentes *screenings* de mutantes de *Arabidopsis* con el fin de encontrar las proteínas claves que participen en el mecanismo de formación de raíces laterales gatillado por Sortin2 (Anexo I;

Cruz-Amaya & Norambuena, resultados no publicados; Morales-Herrera, 2015). Específicamente, se han identificado mutantes que presentan defectos en genes que codifican para proteínas que participan en el sistema de endomembranas y/o en la formación de raíces laterales. Las diversas mutantes presentan distintas sensibilidades a la inducción de raíces laterales por Sortin2. El evaluar la sensibilidad del efecto endocítico gatillado por Sortin2 nos permitió determinar la existencia de una correlación entre la sensibilidad a la inducción de raíces laterales y la sensibilidad a la promoción del tráfico endocítico hacia la vacuola. Específicamente, los resultados obtenidos nos indican la existencia de un 75% de correlación entre el efecto morfológico y el efecto celular gatillado por Sortin2, puesto que en la mayoría de los casos la sensibilidad respecto a la inducción de raíces laterales coincide con la sensibilidad de la promoción del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2.

Por otra parte, resultados obtenidos en el laboratorio indican que el tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 que finaliza en la formación de primordios de raíces laterales es inhibido por la aplicación de Wortmanina, es decir, el efecto endocítico es vital para la inducción del efecto morfológico por Sortin2 (Anexo IV). Además, hemos evidenciado el incremento del reclutamiento de la GTPasa monomérica Rab5, ARA7, en tratamiento con Sortin2. Esta inducción sería importante para el evento de *priming* de raíces laterales relacionado con el tráfico endocítico hacia la vacuola que promueve Sortin2, puesto que tratamientos con Wortmanina alteran la integridad

estructural de este tipo de endosomas (Zhang y col., 2010). Además, hemos encontrado que en mutantes resistentes a la formación de raíces laterales promovida por Sortin2, la población de MVB/PVC/LE-ARA7 reclutada en las membranas endosomales se mantiene constante. Esto nos indica que el tráfico hacia la vacuola en el que participan los MVB/PVC/LE-ARA7 sería esencial para la promoción del efecto celular de Sortin2 involucrado en el *priming* de las raíces laterales.

El hecho de que Sortin2 es incapaz de promover los efectos endocíticos en las mutantes en que no induce la formación de raíces laterales y además, de que mutantes en genes que codifican a proteínas importantes para el funcionamiento del sistema de endomembranas presentan resistencia a la inducción de raíces laterales gatillada por Sortin2 (Cruz-Amaya & Norambuena, resultados no publicados) apoyan aún más la correlación entre el efecto endocítico promovido por Sortin2 y el efecto inductor de raíces laterales, ya que al interferir con el tráfico de proteínas, se bloquea la formación de raíces laterales, y viceversa.

Además, el tráfico endocítico hacia la vacuola promovido por Sortin2 sería un evento de *priming* de raíces laterales que requiere que determinadas proteínas funcionen de manera correcta, ya que el efecto de Sortin2 está situado río arriba del tráfico hacia la vacuola que involucra la función de las proteínas SEC15 y VPS53, ya que sin ellas Sortin2 no puede llevar a cabo su efecto inductor del tráfico endocítico ni su efecto inductor de raíces laterales. Además,

la vía que induce Sortin2 involucra una vía que incluye, o interseca con la vía en que la función de la proteína VTI12 es importante. Conjuntamente, los resultados nos señalan que la función de VAMP722 está río abajo de la aceleración del tráfico endocítico gatillado por Sortin2, pero río arriba de la iniciación de las raíces laterales inducida por este compuesto.

Con respecto a las mutantes de genes que codifican a proteínas relacionadas con la formación de raíces laterales, el efecto de Sortin2 involucra la función de las proteínas IAA28, IAA14, CUL1 y CEG, ya que sin ellas Sortin2 no puede llevar a cabo su efecto morfológico y celular. La vía que induce Sortin2 involucra una vía que incluye, o interseca con la vía en que es importante la función de las proteínas AUX1 y ACR4. Asimismo, se evidenció que la función de PIN1 y AXR4 está río abajo de la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola promovida por Sortin2 y río arriba de la formación de raíces laterales gatillada por Sortin2.

Por ende, con estos resultados podemos indicar que el efecto endocítico y el efecto morfológico inducido por Sortin2 correlacionan, ya que para que Sortin2 pueda inducir el evento de *priming* de raíces laterales es necesario que ocurra la aceleración de la endocitosis hacia la vacuola.

4.2 Existe una relación de causa-efecto entre la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillada por Sortin2 y la inducción de los eventos de activación de LRFCs.

En la literatura se han caracterizado diversos eventos de activación de LRFCs. Secuencialmente ocurre la activación transcripcional del factor de transcripción *GATA23* en las LRFCs (De Rybel y col., 2010), la acumulación de *MAKR4* en la membrana plasmática de las LRFCs (Xuan y col., 2015), la pérdida de volumen de las células de la endodermis contiguas a las LRFCs (Vermeer y col., 2014) y la migración de los núcleos de las LRFCs hacia la pared celular común (De Rybel y col., 2010). La promoción del tráfico hacia la vacuola por Sortin2 está ríto arriba del aumento de la actividad transcripcional de *GATA23* y acumulación de *MAKR4* en las LRFCs, ya que a las 5 horas de tratamiento el estímulo gatillado por Sortin2 es capaz de inducir un incremento en la población de LRFCs que expresan estos marcadores. Por lo que en la línea de tiempo podemos situar a la inducción de la activación transcripcional de *GATA23* en las LRFCs por Sortin2 a las 5 horas (Figura 23). *MAKR4* se acumula en la misma temporalidad (Figura 23). Además, encontramos que *MAKR4* se localiza ectópicamente en las células de la epidermis, corteza y endodermis a las 24 horas con Sortin2. Si bien se ha reportado la acumulación de *MAKR4* en capas adyacentes a las LRFCs (Xuan y col., 2015), en condición con Sortin2 se visualiza que *MAKR4* se acumula en las otras capas celulares independiente si están contiguas a las LRFCs, esto podría ser consecuencia de la mayor diferenciación de células del periciclo y deberse a la comunicación célula-célula

que es vital para la formación de raíces laterales (Van Norman y col., 2011; Yue & Beeckman, 2014).

Los resultados nos indican que Sortin2 podría inducir una señal que estaría gatillando que las células del periciclo sean LRFCs o inhibir una señal que estaría reprimiendo que las células del periciclo se diferencien a LRFCs. Por ejemplo, una propuesta de señal que podría estar siendo reprimida por Sortin2 es el receptor tipo quinasa ACR4 (De Smet y col., 2008). ACR4 se acumula en la membrana plasmática (PM) de las células hijas pequeñas después de la iniciación de raíces laterales y es requerido para coordinar las divisiones de las células del periciclo durante la iniciación de las raíces laterales, donde su función es prevenir que las células que la rodean entren en división, es decir, ACR4 evita que se diferencien a LRFCs (De Smet y col., 2008). De esta manera Sortin2 podría alterar la expresión de ACR4 y/o su acumulación, impidiendo que pueda regular la diferenciación de las LRFCs, alterando así la regulación de la posición de las raíces laterales a lo largo de la raíz primaria conocida como *pre-patterning*.

Por otra parte, se ha reportado que la endodermis juega un papel activo en los eventos previos a la iniciación de raíces laterales, ya que es importante que se acumule el facilitador de flujo de auxinas PIN3 en la endodermis para que ocurra el continuo flujo de auxinas entre las LRFCs y las células de la endodermis que están contiguas (Marhavy y col., 2013). Estas células endodermiales contiguas a las LRFCs cambian su forma, reducen su tamaño y

forman pequeños agujeros en la Banda de Caspary (Vermeer y col., 2014). La mayor acumulación de CASP1 en la endodermis (Figura 11B), según conversaciones con el Dr. Peter Marhavý, indicaría que Sortin2 estimula la síntesis de esta proteína, permitiendo así un desarrollo más rápido de esta capa celular. También encontramos que a las 24 horas con Sortin2 CASP1 se acumula ectópicamente en la epidermis de la raíz primaria y se localiza en un compartimento celular distinto al que se ubica en la endodermis (Figura 11). Esto nos señala que las células de la epidermis estarían acumulando proteínas propias de la endodermis (Fukaki y col., 1998; Roppolo y col., 2011), sin embargo, se conoce que para que las proteínas puedan cumplir su función biológica necesitan de un contexto determinado, por lo que no sería suficiente la acumulación de CASP1 en la epidermis para que esa capa celular adquiriera la identidad de endodermis. Estos resultados obtenidos nos permiten localizar el efecto de Sortin2 en la endodermis a las 2 horas y a las 24 horas en las otras capas de la raíz (Figura 23), sin embargo, aún debemos seguir estudiando el significado de estos dos eventos estimulados por Sortin2 y el impacto que tienen en la formación de raíces laterales. El cambio en el volumen de las células de la endodermis descrito como un evento de *priming* de raíces laterales no pudo ser analizado en este trabajo debido a que no se evidenció notoriamente un cambio en el volumen de estas células en ambos tratamientos, sólo observamos la diferencia en la estructura de las células de la endodermis entre las que rodeaban a las células del periciclo que conformaban a los

primordios de raíces laterales y las que estaban contiguas a células del periciclo.

Además, al proponer que la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2 como un evento de *priming* de raíces laterales, se estudió la acumulación de PIN2-GFP. El resultado obtenido nos indica que Sortin2 induce el tráfico endocítico hacia la vacuola en un tiempo previo a las 4 horas (Figura 23), ya que para observar a PIN2-GFP en el lumen vacuolar se debió, anteriormente, haber estimulado su internalización, puesto que en condición control se localiza en las PMs y endosomas (Xu & Scheres, 2005). Con este resultado, además de los antecedentes de que Sortin2 promueve la internalización de otros componentes de PM (Pérez-Henríquez y col., 2012), postulamos que hay un componente macromolecular que se internaliza para gatillar el evento de *priming* de las raíces laterales. Este ocurre en el meristema basal de la raíz primaria. La conversión de la auxina IBA a IAA ocurre en la caliptra (De Rybel y col., 2012) así como también la muerte celular programada de células de la *lateral root cap* también son importantes para el *priming* de las LRFCs (Xuan y col., 2016), por lo que no es raro que eventos que ocurren en el meristema basal afecten directamente la diferenciación de LRFCs.

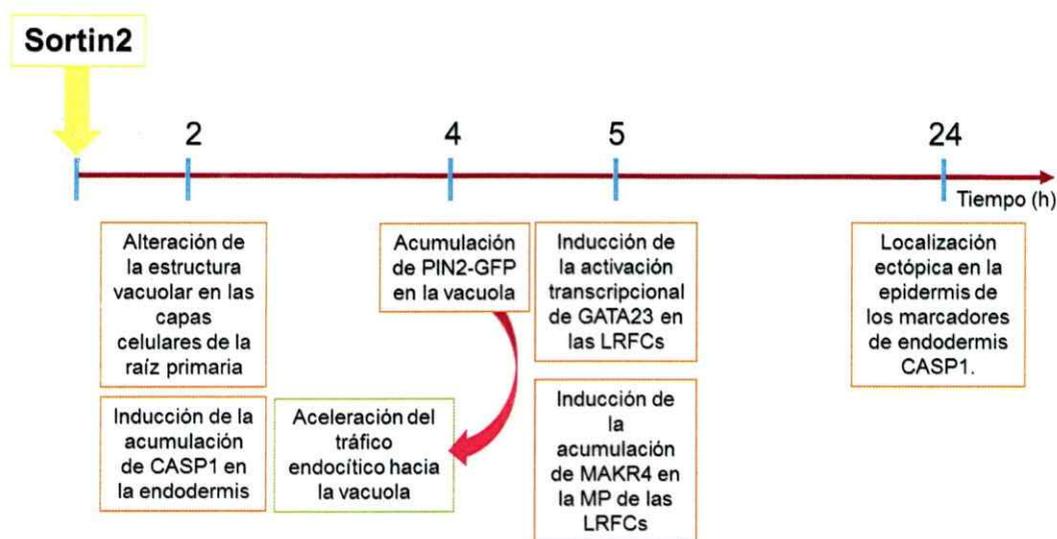


Figura 23: La aceleración del tráfico endocítico a la vacuola inducido por Sortin2 sucede en tiempos previos a la activación transcripcional de *GATA23* y acumulación de *MAKR4* en las LRFCs por Sortin2. Línea de tiempo de los eventos de *priming* inducidos por Sortin2. Se identifican los tiempos en que se detectan los distintos eventos estudiados en presencia de Sortin2: a las 2 horas se induce la acumulación de CASP1 en la endodermis y se altera la estructura vacuolar en las capas celulares de la raíz primaria. A las 4 horas ocurre la acumulación de PIN2-GFP en la vacuola, lo que indica que la aceleración del tráfico hacia la vacuola debió ocurrir en tiempos anteriores. A las 5 horas se promueve la activación transcripcional de *GATA23* y la acumulación de *MAKR4* en las PMs de las LRFCs. A las 24 horas se visualiza la localización ectópica en la epidermis de CASP1.

Estos resultados encontrados nos sugieren fuertemente que un componente debe internalizarse desde la PM hasta la vacuola para gatillar el *priming* de las LRFCs. Además, sabemos que la formación de raíces laterales está fuertemente afectada por el estado nutricional de la planta y la disponibilidad de nutrientes que hay en la rizósfera. Se ha evidenciado que los efectos morfológicos inducidos por excesos de hierro, boro y amonio en la rizósfera son regulados por la relocalización de sus transportadores mediante endocitosis (Barberon y col., 2014; Lima y col., 2010; Takano y col., 2010). En específico, se ha evidenciado que la aplicación de amonio (NH_4^+) promueve la iniciación de primordios de raíces laterales dependiente de la función del *transportador de amonio 1;3* (*AMT1;3*) (Lima y col., 2010) y *AMT1;3* se internaliza mediante

endocitosis cuando las condiciones de NH_4^+ son tóxicas para las plantas (Wang y col., 2013). Por lo que la internalización de AMT1;3 en tratamiento con Sortin2 sería interesante de evaluar.

Otro hecho que ratifica que la promoción del tráfico hacia la vacuola por Sortin2 está río arriba del aumento de la actividad transcripcional de *GATA23* y acumulación de *MAKR4* en las LRFCs es que Sortin2 es incapaz de promover la generación de los eventos de activación de las LRFCs en las mutantes *iaa28-1*, *slr1-1*, *sec15* y *vps53*. Esto apoya que la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2 es la causa de la inducción de las raíces laterales, porque se impide que se desencadenen los eventos de activación de las LRFCs. Por otra parte, los niveles de transcritos de *GATA23* en condición control en las mutantes relacionadas con la formación de raíces laterales son iguales a los de la silvestre (Figura 22 A y B). Estos resultados nos indican que las mutantes no presentan defectos en la transcripción de *GATA23*, por lo que el efecto de *IAA14* e *IAA28* en la formación de raíces laterales, estaría normalmente río abajo de la expresión de *GATA23* en las LRFCs. Esto no es acorde a lo reportado en la literatura para *iaa28-1* en donde se presenta una disminución en los niveles de transcritos de *GATA23* en esta mutante (De Rybel y col., 2010). Sin embargo, las condiciones en que se realizaron los experimentos en nuestro laboratorio son diferentes, lo que podría explicar las diferencias encontradas. Con respecto a la acción de Sortin2 se vio que las

funciones de *IAA14* y de *IAA28* son importantes para inducir la activación transcripcional de *GATA23* en las LRFCs.

Las mutantes del sistema de endomembranas *vps53* y *sec15* no presentan defectos en la transcripción de *GATA23*, por lo que la función de los genes correspondientes en la formación de raíces laterales, estaría río abajo de la expresión de *GATA23* en las LRFCs. Sin embargo, la función de *VPS53* y *SEC15* es vital para promover la activación transcripcional de *GATA23* en las LRFCs mediante el mecanismo de Sortin2.

Asimismo, se encontró que en las mutantes resistentes relacionadas al sistema de endomembranas, los niveles de transcritos de *MAKR4* en la condición control en *sec15* no presentaba variación con respecto a las raíces de plántulas silvestres (Figura 22C y D), por lo que la función de la proteína *SEC15* con respecto a la formación de raíces laterales estaría río abajo de la expresión de *MAKR4* en las LRFCs. Sin embargo, los niveles de transcritos de *MAKR4* en *vps53* son menores que los de las plántulas silvestres en condición control (Figura 22C y D), lo que sugiere que la función de *VPS53* está río arriba de la expresión de *MAKR4* en las LRFCs. Por lo demás, se encontró que el correcto funcionamiento de *VPS53* es necesaria para promover la expresión de *MAKR4* en tratamiento con Sortin2.

Cabe mencionar, que las mutantes estudiadas son resistentes a los efectos endocíticos promovidos por Sortin2, por lo que estos resultados nos permiten

situar al efecto endocítico por Sortin2 río arriba de los eventos de activación de las LRFCs (Figura 24), sugiriendo fuertemente que la inducción del tráfico hacia la vacuola gatillada por Sortin2 es un evento de especificación de LRFCs, porque ocurre antes de los eventos de activación de las LRFCs y si éste no ocurre, no se ve una inducción de la formación de raíces laterales. Además, se apoya fuertemente la conclusión de que el evento morfológico inducido por Sortin2 está correlacionado y depende del evento endocítico que tiene este compuesto.

4.3 Sortin2 estimularía la relocalización de componentes macromoleculares para inducir la especificación de las LRFCs.

Con respecto a la función de los genes cuya mutación produce diferencias en la sensibilidad a los efectos de Sortin2 se encuentran algunas características en común. Las proteínas SLR1/IAA14 e IAA18 están relacionadas con la señalización de la hormona auxina (Hochholdinger y col., 2001; Rogg y col., 2001). Además, CEG es una F-box, proteína receptora de auxina (Dong y col., 2006), CUL1 forma parte de los complejos receptor SCF que se encuentran envueltos en la vía de señalización de las hormonas auxina, ácido jasmónico y estrigolactonas (Hua & Vierstra, 2011). Todas estas proteínas son necesarias para que se lleve a cabo el evento celular de especificación de LRFCs inducido por Sortin2, es decir, Sortin2 necesitaría de un complejo receptor SCF, que promueve una cascada de señalización que degrada a IAA28 e IAA14 (Figura 24).

AUX1 está involucrada en el transporte polar de la hormona auxina, específicamente en el influjo de auxinas (Marchant y col., 2002). Se ha evidenciado que la mayoría del influjo de auxinas está a cargo de AUX1 y que la línea mutante del gen que codifica a esta proteína acumula menos auxina intracelular (Rutschow y col., 2014). Con los resultados obtenidos y resultados preliminares obtenidos en el laboratorio del Dr. Xu (Shanghai Center for Plant Stress Biology, China) en donde el tratamiento con Sortin2 parece disminuir los niveles de IAA en raíces de plántulas de *A.thaliana*, se plantea que la disminución de auxinas en el interior celular provocaría un ambiente beneficioso para la señal que promueve el evento de especificación de LRFCs gatillado por Sortin2 (Figura 24).

Con respecto a la proteína ACR4, se ha descrito que es un receptor-tipo quinasa dependiente de la señalización de auxinas y actúa como un factor clave para la inducción de la división celular en las LRFCs y en la limitación del número de células del periciclo que se diferencian a LRFCs (De Smet y col., 2008). Hemos encontrado que la disminución de la expresión y/o de la acumulación en la MP de ACR4 sería favorable para inducir el evento celular que especifica las LRFCs inducido por Sortin2 (Figura 24). Además, resultados obtenidos en el laboratorio indicarían que el tratamiento con Sortin2 induce la endocitosis hacia la vacuola de ACR4 en células de la columela de la raíz primaria, sugieren fuertemente de que el tratamiento con Sortin2 induciría una mayor diferenciación de LRFCs, ya que el componente represor de la

diferenciación de LRFCs pierde su localización en las MPs de las LRFCs y ahora se encuentra en la vacuola.

VPS53 es una subunidad del complejo de proteínas retrógradas asociadas al Aparato de Golgi (GARP, por sus siglas en inglés), está involucrada en el tráfico retrógrado de MVB/PVC/LE hacia TGN/EE (Wang y col., 2011). Además, la función de VPS53 está relacionada a la adaptación de la PM para tolerar el estrés por calor en plantas (Wang y col., 2011). Los resultados obtenidos en relación a la sensibilidad con Sortin2, nos indica que la función de VPS53 es requerida para que Sortin2 pueda ejercer su efecto en el *priming* de las LRFCs. Esto podría deberse a que un componente macromolecular, después de haber sido internalizado este componente macromolecular u otra macromolécula, deba relocalizarse utilizando la vía de tráfico en donde participa VPS53 (Figura 24). Por otro lado, SEC15 es una proteína que forma parte del complejo exocítico en plantas (Hála y col., 2008), el cual cumple importantes roles en la morfogénesis de las plantas, principalmente en los órganos en donde está involucrado el crecimiento polarizado (Žárský y col., 2013). La función de SEC15 es necesaria para ejercer el evento de *priming* de las LRFCs de Sortin2, por lo que la participación del complejo exocítico podría estar relocalizando a la PM o al espacio apoplástico a algún componente que forme parte de la comunicación célula-célula en la formación de raíces laterales (Figura 24).

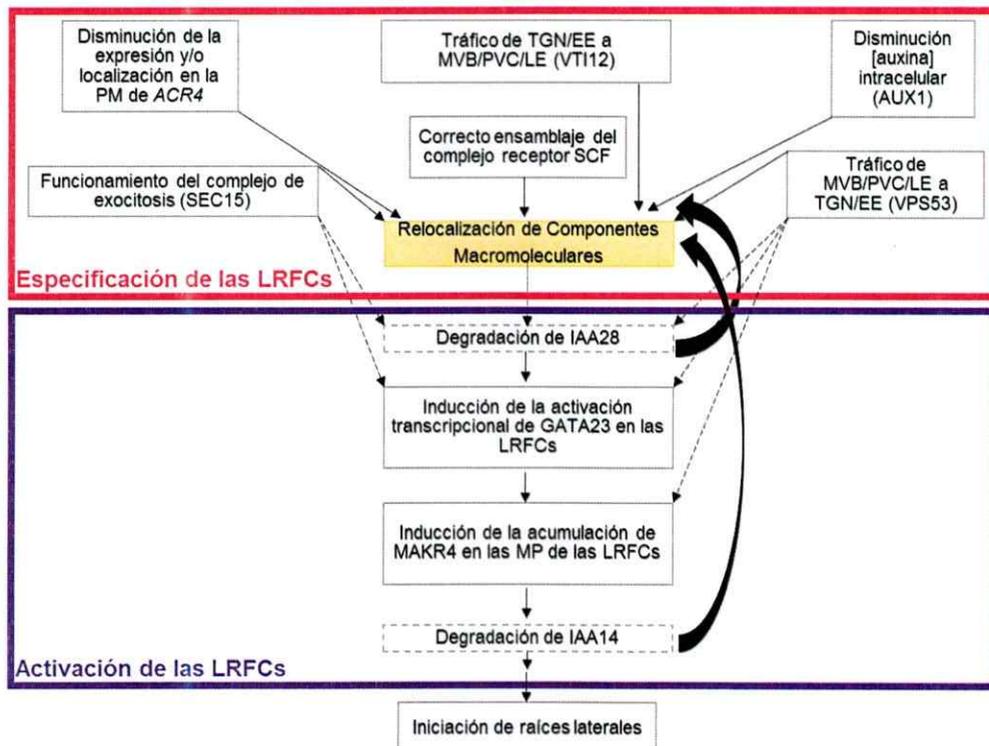
VTI12, es un receptor de proteína de fijación soluble de NSF asociado a vesículas (v-SNARE, por sus siglas en inglés) de los cuales depende el correcto

direccionamiento de las proteínas a la vacuola o hacia otros organelos del sistema de endomembranas (Surpin y col., 2003). Específicamente, VTI12 ha sido caracterizada por direccionar las proteínas a la vacuola y se localiza en TGN/EE, sin embargo igual puede localizarse en MVB/PVC/LE en ausencia de VTI11, y viceversa (Surpin y col., 2003). Con los resultados obtenidos se puede plantear que la falta de VTI12 causa una sobrecompensación de VTI11 en la destinación a la vacuola de una macromolécula específica que es necesaria para el efecto celular que induce el evento de *priming* de las LRFCs desencadenado por Sortin2 (Figura 24).

Nuestros resultados sugieren fuertemente que además de la inducción del tráfico de un componente macromolecular hacia la vacuola, la relocalización también es importante para inducir el evento de *priming* de las LRFCs gatillado por Sortin2. Esto puede relacionarse con diversos estudios recientes que revelan la importancia de las diferentes clases de pequeños péptidos de señalización durante el proceso de organogénesis de raíces laterales (Araya y col., 2014; Czyzewicz y col., 2015; Murphy y col., 2016; Roberts y col., 2016). Los péptidos sirven como moléculas señalizadoras y se liberan, usualmente, mediante la ruta secretoria (Krause y col., 2013). Después de la secreción, los péptidos difunden a células vecinas que se encuentran a corta distancia para unirse a los receptores afines, pero también se ha informado de la señalización de larga distancia desde la raíz hasta el brote (Tabata y col., 2014). Además después de la activación del receptor, los complejos péptido-receptor a menudo

son internalizados al citosol a través de endocitosis, donde el receptor experimenta degradación o reciclaje (Geldner & Robatzek, 2008). Es decir, Sortin2 podría inducir la internalización y/o relocalización de algún péptido y/o de su receptor. Por ejemplo, los péptidos CLEs (CLAVATA3/*EMBRYO SURROUNDING REGION* (ESR)) en conjunto con su receptor CLAVATA1 (CLV1) juegan un papel importante en la formación de raíces laterales en respuesta a los niveles de nitrógeno en la rizósfera (Araya y col., 2014).

A.



B.

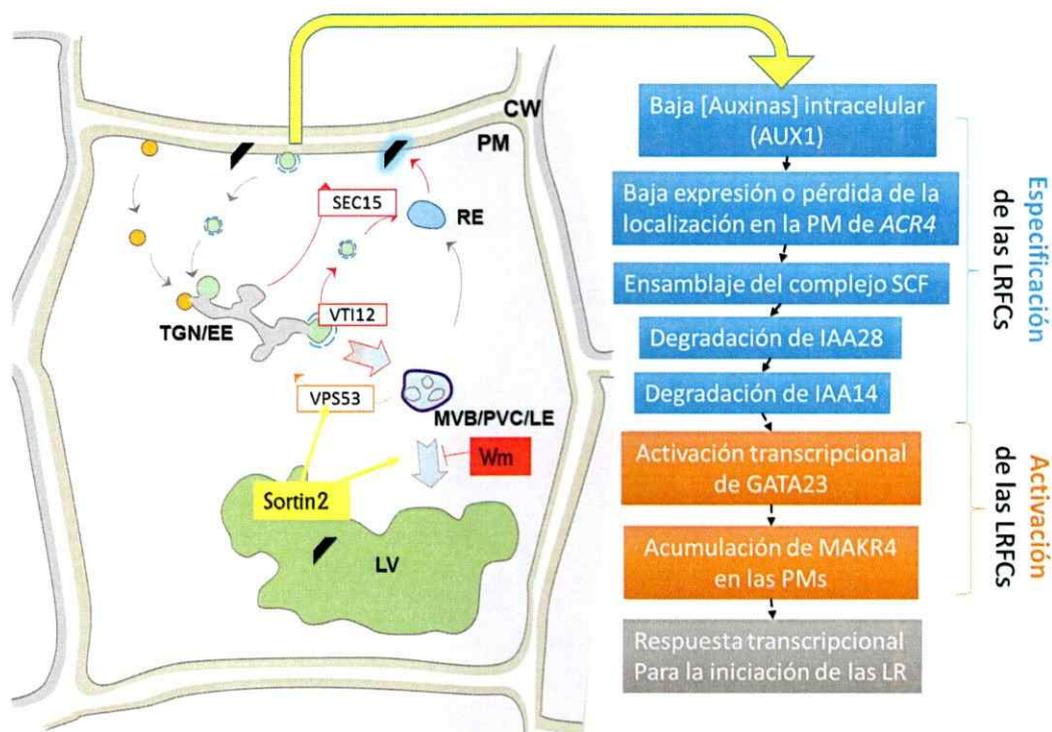


Figura 24: Modelo propuesto del mecanismo utilizado por Sortin2 para promover la relocalización de componentes promoviendo la especificación de las LRFCs. (A) El tratamiento con Sortin2 induce la relocalización de componentes macromoleculares mediante el tráfico funcional de TGN/EE al MVB/PVC/LE dependiente de VT112, del tráfico retrógrado de MVB/PVC/LE a TGN/EE que involucra la participación de VPS53 y la vía endocítica en donde juega un rol SEC15, una proteína del complejo de exocitosis. Además, requeriría de una disminución en la concentración de auxina intracelular, un correcto ensamblaje de algún complejo receptor SCF y una disminución de la expresión de ACR4 o pérdida de la localización de ACR4 en la PM. Sortin2 sería capaz de promover la relocalización de componentes macromoleculares, en que primero deben alcanzar la vacuola para luego posicionarse en la MP, espacio apoplástico o ejercer su acción en otra célula, a través de la comunicación célula-célula para así finalizar en la especificación de las LRFCs. Los resultados también indican que se necesita de la degradación de IAA28 e IAA14 para que se lleve a cabo la relocalización. Además, sabemos que la activación de las LRFCs también necesita de la degradación de estas Aux/IAAs, es por esto que se coloca una flecha que indica que para la especificación y activación de las LRFCs es vital la degradación de IAA28 e IAA14. (B) Imagen en donde se representa el sistema de endomembranas y las distintas proteínas y tráficos que deben estar funcionando correctamente para que Sortin2 pueda inducir la relocalización de algún componente macromolecular. Este suceso desencadenaría una vía de señalización que necesitaría de diversos eventos para poder especificar a las LRFCs. Las flechas negras sólidas indican las relaciones directas entre los eventos y las flechas negras punteadas indican las posibles relaciones directas que podrían existir.

4.4 El tratamiento con Sortin2 altera la morfología de las vacuolas.

Se ha evidenciado que en los eventos de activación de las LRFCs está involucrado la reducción en el volumen de las vacuolas de las células de la

endodermis adyacentes a las LRFCs (Vermeer y col., 2014). Sin embargo al estudiar la morfología de la vacuola en las células de la endodermis (Figura 11 y Figura 12) se encontró que hay un defecto en la dinámica de formación de la vacuola (Saito y col., 2011) en tratamiento con Sortin2. Estos resultados son homólogos a los encontrados en Zouhar y col., 2004, en donde la morfología vacuolar en los hipocotilos se altera en presencia de Sortin2, pudiendo así situar el cambio en la morfología de la vacuola por Sortin2 a las 2 horas (Figura 23), pero aún falta por determinar si el volumen de este organelo disminuye bajo estas circunstancias y si es un evento que aporta en la diferenciación de las células del periciclo a LRFCs. Por lo demás, no pudimos determinar el volumen de la vacuola, ya que la morfología de este organelo cambia completamente en presencia de Sortin2 apareciendo estructuras muy complejas que son muy difíciles de resolver.

Al observar la morfología de las vacuolas en cada mutante con la que trabajamos se encontraron diversos fenotipos producidos por Sortin2 (Anexo III). En raíces de plántulas silvestres Col-0, encontramos que el tratamiento con Sortin2 provoca la conformación de vacuolas más complejas (Figura 26, panel inferior). Este mismo fenómeno ocurre en las mutantes hipersensibles a los efectos de Sortin2: *aux1-21* y *acr4* (Figuras 36 y 37). Además, provoca la formación de vacuolas más complejas en la mutante resistente a los efectos de Sortin2: *ceg* (Figura 39).

Otro efecto que tiene Sortin2 en el fenotipo vacuolar es la conformación de vacuolas más grandes, lo que se evidenció en las líneas que responden como silvestre a la inducción del tráfico endocítico por Sortin2.

Al comparar los diferentes fenotipos en las mutantes con diferente sensibilidad a Sortin2 estos cambios no correlacionan con la sensibilidad que presentan las mutantes con respecto al efecto endocítico y morfológico de Sortin2. Estos cambios en la estructura de la vacuola podrían deberse a otros efectos que gatilla el tratamiento con Sortin2 que no estarían relacionados con el impacto en la estructura radicular, por lo que se descarta que este efecto sea el evento que Sortin2 gatilla para diferenciar las células del periciclo a LRFCs (Figura 23).

Cabe mencionar que Sortin2 no interfiere con la aparición de autofagosomas en las vacuolas (Viotti y col., 2013), debido a que el tratamiento con Sortin2 no provoca la formación de autofagosomas y sería una condición provocada por la condición de mutantes de las plántulas.

Por último, en esta Tesis de Magíster se pudo evidenciar mediante distintas estrategias de que *la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 diferencia las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales promoviendo la organogénesis de raíces laterales en A. thaliana*. Por lo que se comprueba la hipótesis propuesta en esta Tesis de Magíster. Además, se propone que Sortin2 podría estar provocando la relocalización de componentes macromoleculares que responden bajo un estímulo ambiental que la planta percibe lo que desencadena un aumento en la especificación de

LRFCs para poder modificar la arquitectura del sistema radicular y así captar una mayor cantidad de nutrientes y agua. Este evento necesitaría de la participación de proteínas relacionadas con la exocitosis, tráfico endocítico hacia la vacuola y tráfico endocítico retrógrado.

CONCLUSIONES

- 1- Existe una correlación positiva entre el efecto celular endocítico que promueve Sortin2 y su efecto en la formación de raíces laterales.
- 2- Al bloquear la formación de raíces laterales gatillada por Sortin2 también se bloquea su efecto en el tráfico endocítico y viceversa.
- 3- La aceleración del tráfico endocítico a la vacuola inducido por Sortin2 promovería un evento de la fase de *priming* de raíces laterales que antecede temporalmente a la activación de LRFCs determinado por la activación transcripcional de *GATA23* y a la acumulación de *MAKR4*.
- 4- La aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillado por Sortin2 podría ser la causa de la inducción de los eventos de activación de las LRFCs.
- 5- En base a la función descrita de las proteínas que codifican los genes mutados en las mutantes relacionadas al sistema de endomembranas con distinta sensibilidad a Sortin2, se pudo inferir que la relocalización de algún componente macromolecular es importante para el evento de *priming* de las LRFCs inducido por Sortin2.
- 6- En base a la función de las proteínas que codifican los genes mutados en las mutantes relacionadas a la formación de raíces laterales, con

distinta sensibilidad a Sortin2, se puede sugerir fuertemente de que se requiere un correcto ensamblaje del complejo receptor SCF y una disminución de la función de ACR4 para que Sortin2 gatille el evento de *priming* de las LRFCs.

- 7- En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se comprobó la hipótesis que plantea que la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 diferencia a las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales promoviendo la organogénesis de raíces laterales en *A. thaliana*.

BIBLIOGRAFÍA

- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, *64*(15), 5245–5250.
- Araya, T., von Wirén, N., & Takahashi, H. (2014). CLE peptides regulate lateral root development in response to nitrogen nutritional status of plants. *Plant Signaling & Behavior*, *9*(7), e29302.
- Ávila, E., Zouhar, J., Agee, A. E., Carter, D. G., Chary, S. N., & Raikhel, N. (2003). Tools to Study Plant Organelle Biogenesis. Point Mutation Lines with Disrupted Vacuoles and High-Speed Confocal Screening of Green Fluorescent Protein-Tagged Organelles. *Plant Physiology*, *133*(4), 1673–1676.
- Bao, Y., Aggarwal, P., Robbins, N. E., Sturrock, C. J., Thompson, M. C., Tan, H. Q., Tham, C., Duan, L., Rodriguez, P., Vernoux, T., Mooney, S., Bennett, M., & Dinneny, J. R. (2014). Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(25), 9319–9324.
- Barberon, M., Dubeaux, G., Kolb, C., Isono, E., Zelazny, E., & Vert, G. (2014). Polarization of IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) to the plant-soil interface plays crucial role in metal homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(22), 8293–8298.
- Beeckman, T., Burssens, S., & Inzé, D. (2001). The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, *52*, 403–11.
- Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., & Pflanz, M. (2003). Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell*, *115*, 591–602.

- Berg, L., (2007). *Introductory Botany: Plants, People, and the Environment* (2a Ed. p. 621)
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N. D., & Satiat-Jeunemaitre, B. (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of Microscopy*, 214(2), 159–173.
- Casero, P. J., Casimiro, I., & Lloret, P. G. (1995). Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in four plant species: *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, and *Daucus carota*. *Protoplasma*, 188(1-2), 49–58.
- Casimiro, I., Marchant, a, Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P., & Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell*, 13(4), 843–52.
- Cederholm, H. M., Iyer-Pascuzzi, A. S., & Benfey, P. N. (2012). Patterning the primary root in Arabidopsis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(5), 675–691.
- Celenza, J. L., Grisafi, P. L., & Fink, G. R. (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, 9(17), 2131–2142.
- Chandler, J. W. (2011). Founder cell specification. *Trends in Plant Science*, 16(11), 607–613.
- Czyzewicz, N., Shi, C. L., Vu, L. D., Van De Cotte, B., Hodgman, C., Butenko, M. a., & Smet, I. De. (2015). Modulation of Arabidopsis and monocot root architecture by CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION 26 peptide. *Journal of Experimental Botany*, 66(17), 5229–5243.
- De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., Möller, B., Wilson, M., Holman, T., Van Isterdael, G., Brunoud, G., Vuylsteke, M., Vernoux, T., De Veylder, L., Inzé, D., Weijers, D., Bennett, M., & Beeckman, T. (2010). A novel Aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Current Biology*, 20(19), 1697–706.
- De Rybel, B., Audenaert, D., Xuan, W., Overvoorde, P., Strader, L. C., Kepinski, S., Hoye, R., Brisbois, R., Parizot, B., Vanneste, S., Liu, X., Gilday, A., Graham, I., Nguyen, L., Jansen, L., Njo, M., Inzé, D., Bartel, B.,

- &Beeckman, T. (2012). A role for the root cap in root branching revealed by the non-auxin probe naxillin. *Nature Chemical Biology*, 8(9), 798–805.
- 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., &Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, 134(4), 681–90.
- De Smet, I., Vassileva, V., De Rybel, B., Levesque, M. P., Grunewald, W., Van Damme, D., Van Noorden, G., Naudts, M., Van Isterdael, G., De Clercq, R., Wang, J., Meuli, N., Vanneste, S., Friml, J., Hilson, P., Jürgens, G., Ingram, G., Inzé, D., Benfey, P., &Beeckman, T. (2008). Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science*, 322, 594–597.
- DiDonato, R. J., Arbuckle, E., Buker, S., Sheets, J., Tobar, J., Totong, R., Grisafi, P., Fink, G., &Celenza, J. L. (2004). *Arabidopsis* ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *The Plant Journal*, 37(3), 340–353.
- Ditengou, F. A., Teale, W. D., Kochersperger, P., Flittner, K. A., Kneuper, I., van der Graaff, E., Nziengui, H., Pinosa, F., Li, X., Nitschke, R., Laux, T., &Palme, K. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(48), 18818–23.
- Dong, L., Wang, L., Zhang, Y., Zhang, Y., Deng, X., & Xue, Y. (2006). An auxin-inducible F-box protein CEGENDUO negatively regulates auxin-mediated lateral root formation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 60, 599–615.
- Drakakaki, G., Robert, S., Raikhel, N. V, & Hicks, G. R. (2009). Chemical dissection of endosomal pathways. *Plant signaling & behavior*, 4(1), 57–62.
- Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucialy-mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Shishkova, S., Celenza, J., & Benkova, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 8790–8794.
- E-Zereen, J., & Ingram, G. (2012). A possible involvement of ACR4, a receptor like kinase, in plant defence mechanism. *Bangladesh Pharmaceutical Journal*, 15(2), 127–130.

- Friml J., Vieten A., Sauer M., Weijers D., Schwarz H., Hamann T., Offringa R., Jürgens G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, *426*, 147-153.
- Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Kato, T., Fujisawa, H., Benfey, P. N., & Tasaka, M. (1998). Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *14*(4), 425-430.
- Fukaki, H., Tameda, S., Masuda, H., & Tasaka, M. (2002). Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT / IAA14 gene of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *29*, 153-168.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y. D., Jürgens, G., & Palme, K. (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, *413*(6854), 425-428.
- Geldner, N., & Robatzek, S. (2008). Plant Receptors Go Endosomal: A Moving View on Signal Transduction. *Plant Physiology*, *147*(4), 1565-1574.
- Geldner, N. (2013). The endodermis. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 531-58.
- Giehl, R. F. H., Lima, J. E., von Wirén, N. (2012). Localized iron supply triggers lateral root elongation in *Arabidopsis* by altering the AUX1-mediated auxin distribution. *The Plant Cell*, *24*, 33-49.
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., & Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development*, *893*, 883-893.
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., & Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCF^{TIR1}-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature*, *414*, 271-276.
- Grunewald, W., & Friml, J. (2010). The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *The EMBO Journal*, *29*(16), 2700-2714.
- Hála, M., Cole, R., Synek, L., Drdová, E., Pečenková, T., Nordheim, A., Lamkemeyer, T., Madlung, J., Hochholdinger, F., Fowler, J., & Žárský, V. (2008). An Exocyst Complex Functions in Plant Cell Growth in *Arabidopsis* and Tobacco. *The Plant Cell*, *20*(5), 1330-1345.

- Hobbie, L., & Estelle, M. (1995). The *axr4* auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *The Plant Journal*, 7, 211–220.
- Hua, Z., & Vierstra, R. D. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 299–334.
- Hurtado, A. N., & Domínguez Sánchez, F. C. (2009). Análisis de correlación y regresión. *Probabilidad y estadística para ingeniería: Un enfoque moderno*, 1–88.
- Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miège, C., Rollin, C., & Gaude, T. (2006). AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. *Nature*, 443, 106–109.
- Jaillais, Y., Hothorn, M., Belkhadir, Y., Dabi, T., Nimchuk, Z.L., Meyerowitz, E.M., & Chory, J. (2011). Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes & Development*, 25, 232–237.
- Jürgens, G. (2004). Membrane Trafficking in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 481–504.
- Kircher, S., & Schopfer, P. (2016). Priming and positioning of lateral roots in *Arabidopsis*. An approach for an integrating concept. *Journal of Experimental Botany*, 67(5), 1411–1420.
- Kong, X., Nir, E., Hamadani, K., & Weiss, S. (2007). Photobleaching Pathways in Single Molecule FRET Experiments. *Journal of the American Chemical Society*, 129(15), 4643–4654.
- Krause, C., Richter, S., Knöll, C., & Jürgens, G. (2013). Plant secretome — From cellular process to biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 11, 2429–2441.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M., Offringa, R., Graham, N., Doumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T., & Bennett, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *The Plant Cell*, 19(12), 3889–900.
- Laskowski, M. (2013). Lateral root initiation is a probabilistic event whose frequency is set by fluctuating levels of auxin response. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2609–17.

- Laskowski, M. J., Williams, M. E., Nusbaum, H. C., & Sussex, I. M. (1995). Formation of lateral root meristems is a two-stage process. *Development*, 121(10), 3303–10.
- Lavenus, J., Goh, T., Guyomarc'h, S., Hill, K., Lucas, M., Voss, U., Kenobi, K., Wilson, M., Farcot, E., Hagen, G., Guilfoyle, T., Fukaki, H., Laplaze, L., & Bennett, M. J. (2015). Inference of the Arabidopsis lateral root gene regulatory network suggests a bifurcation mechanism that defines primordia flanking and central zones. *The Plant Cell*, 27(5), 1368–1388.
- Lima, J. E., Kojima, S., Takahashi, H., & von Wirén, N. (2010). Ammonium triggers lateral root branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. *The Plant Cell*, 22(11), 3621–33.
- Linkohr, B. I., Williamson, L. C., Fitter, A. H., Leyser, H. M. O. (2002). Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of Arabidopsis. *The Plant Journal*, 29, 751–760.
- Loque, D., Ludewig, U., Yuan, L., & Wire, N. Von. (2005). Tonoplast Intrinsic Proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 Facilitate NH₃ Transport into the Vacuole. *Plant Physiology*, 137, 671–680.
- Low, P. S., & Chandra, S. (1994). Endocytosis in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45(1), 609–631.
- Ludevid, D., Höfte, H., Himmelblau, E., & Chrispeels, M. J. (1992). The Expression Pattern of the Tonoplast Intrinsic Protein gamma-TIP in *Arabidopsis thaliana* Is Correlated with Cell Enlargement. *Plant Physiology*, 100(4), 1633–1639.
- Lynch, J. (1995). Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology*, 109, 7–13.
- Malamy, J. E. (2005). Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant, Cell and Environment*, 28, 67–77.
- Malamy, J. E., & Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 44, 33–44.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, 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. *The Plant Cell*, 14, 589–597.

- Marhavy, P., Vanstraelen, M., Rybel, B. De, Zhaojun, D., Bennett, M. J., Beeckman, T., & Benkova, E. (2013). Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *The EMBO Journal*, 32, 149–158.
- Mauseth, J. D. (1988). *Plant Anatomy*. Addison Wesley/Benjamin Cummings. San Francisco, California.
- Moon, J., Zhao, Y., Dai, X., Zhang, W., Gray, W. M., Huq, E., & Estelle, M. (2007). A New CULLIN 1 Mutant Has Altered Responses to Hormones and Light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143, 684–696.
- Morales-Herrera, S. (2015) Estudio del mecanismo inductor de Sortin2 en la organogénesis de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de título para obtener el título de Ingeniera en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Tutor: Lorena Norambuena.
- Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C., Pérez-Henríquez, P. & Norambuena, L. (en revisión) Endocytic trafficking induces lateral root founder cell specification distinctively from the endogenous program in *Arabidopsis thaliana*
- Moreno-Risueno, M. A., Norman, J. M. Van, Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., & Benfey, P. N. (2010). Oscillating Gene Expression Determines Competence for Periodic *Arabidopsis* Root Branching. *Science*, 306, 1306–1311.
- Murphy, E., Vu, L. D., Van Den Broeck, L., Lin, Z., Ramakrishna, P., Van De Cotte, B., Ramakrishna, P., van de Cotte, B., Gaudinier, A., Goh, T., Slane, D., Beeckman, T., Inzé, D., Brady, S., Fukaki, H., & De Smet, I. (2016). RALFL34 regulates formative cell divisions in *Arabidopsis* pericycle during lateral root initiation. *Journal of Experimental Botany*, 67(16), 4863–4875.
- Nolan, T., Hands, R. E., & Bustin, S. a. (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols*, 1(3), 1559–82.
- Norambuena, L., Zouhar, J., Hicks, G. R., & Raikhel, N. V. (2008). Identification of cellular pathways affected by Sortin2 , a synthetic compound that affects protein targeting to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Chemical Biology*, 8, 1–8.
- Ortíz-Castro, R., Martínez-trujillo, M., & López-bucio, J. (2008). N -acyl-L-homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter

- post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, 31, 1497–1509.
- Paciorek, T., Sauer, M., Balla, J., Wiśniewska, J. & Friml, J. (2006) Immunocytochemical technique for protein localization in sections of plant tissues. *Nature Protocols*, 1, 104–107.
- Paciorek, T., & Bergmann, D. C. (2010). The secret to life is being different: Asymmetric divisions in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(6), 661–669.
- Péret, B., Larrieu, A., & Bennett, M. J. (2009). Lateral root emergence: a difficult birth. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3637–43.
- Pérez-Henríquez, P., Raikhel, N. V, & Norambuena, L. (2012). Endocytic Trafficking towards the Vacuole Plays a Key Role in the Auxin Receptor SCF^{TIR}-Independent Mechanism of Lateral Root Formation in *A. thaliana*. *Molecular Plant*, 5, 1195–1209.
- Pérez-Henríquez, P. (2016) Tesis "Desarrollo de raíces laterales: Identificación de componentes moleculares que median la respuesta a Sortin2" para obtener el grado de Doctor en Biología Molecular, Celular y Neurociencias. Universidad de Chile. Tutor: Lorena Norambuena. Co-tutor: Tom Beeckman.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Pizarro, L., & Norambuena, L. (2014). Regulation of protein trafficking: posttranslational mechanisms and the unexplored transcriptional control. *Plant Science*, 225, 24–33.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Lekanne Deprez, R. H., & Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62–66.
- Reinhardt, D., Mandel, T., & Kuhlemeier, C. (2000). Auxin Regulates the Initiation and Radial Position of Plant Lateral Organs. *The Plant Cell*, 12, 507–518.
- Reinhardt, D., Pesce, E.-R., Stieger, P., Mandel, T., Baltensperger, K., Bennett, M., Traas, J., Friml, J., Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426(6964), 255–60.

- Roberts, I., Smith, S., Stes, E., De Rybel, B., Staes, A., Van De Cotte, B., Njo, M. F., Dedeyne, L., Demol, H., Lavenus, J., Audenaert, D., Gevaert, K., Beeckman, T. & De Smet, I. (2016). CEP5 and XIP1/CEPR1 regulate lateral root initiation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 67, 4889–4899.
- Robinson, D. G., Jiang, L., & Schumacher, K. (2008). The Endosomal System of Plants: Charting New and Familiar Territories. *Plant Physiology*, 147(4), 1482–1492.
- Rogg, L. E., Lasswell, J., & Bartel, B. (2001). A Gain-of-Function Mutation in IAA28 Suppresses Lateral Root Development. *The Plant Cell*, 13, 465–480.
- Roberts, I., Smith, S., Stes, E., De Rybel, B., Staes, A., Van De Cotte, B., Njo, M., Dedeyne, L., Demol, H., Lavenus, J., Audenaert, D., Gevaert, K., Beeckman, T., De Smet, I., & Raines, C. (2016). CEP5 and XIP1/CEPR1 regulate lateral root initiation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 67 (16), 4889–4899.
- Roppolo, D., De Rybel, B., Dénervaud Tendon, V., Pfister, A., Alassimone, J., Vermeer, J. E. M., Yamazaki, M., Stierhof, Y., Beeckman, T., & Geldner, N. (2011). A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature*, 473(7347), 380–3.
- Rutschow, H. L., Baskin, T. I., & Kramer, E. M. (2014). The carrier AUXIN RESISTANT (AUX1) dominates auxin flux into Arabidopsis protoplasts. *New Phytologist*, 204(3), 536–544.
- 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(5), 463–472.
- Saito, C., Uemura, T., Awai, C., Ueda, T., Abe, H., & Nakano, A. (2011). Qualitative difference between “bulb” membranes and other vacuolar membranes. *Plant Signaling & Behavior*, 6(12), 1914–1917.
- Šamaj, J., Read, N. D., Volkmann, D., Menzel, D., & Baluška, F. (2005). The endocytic network in plants. *Trends in Cell Biology*, 15(8), 425–433.
- Surpin, M., & Raikhel, N. (2004). Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 100–109.
- Surpin, M., Zheng, H., Morita, M. T., Saito, C., Avila, E., Blakeslee, J., Bandyopadhyay, A., Kovaleva, V., Carter, D., Murphy, A., Tasaka, M.,

- &Raikhel, N. (2003). The VTI Family of SNARE Proteins Is Necessary for Plant Viability and Mediates Different Protein Transport Pathways. *The Plant Cell*, 15, 2885–2899.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M., Carrier, D., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J., Taylor, C., Schachtman, D., 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, 946–954.
- Swarup, R., Kargul, J., Marchant, A., Zadik, D., Rahman, A., Mills, R., Yemm, A., May, S., Williams, L., Millner, P., Tsurumi, S., Moore, I., Napier, R., Kerr, I., & Bennett, M. J. (2004). Structure-Function Analysis of the Presumptive Arabidopsis Auxin Permease AUX1. *The Plant Cell*, 16, 3069–3083.
- Tabata, R., Sumida, K., Yoshii, T., Ohyama, K., Shinohara, H., & Matsubayashi, Y. (2014). Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science*, 346(6207), 343–346.
- Takano, J., Tanaka, M., Toyoda, A., Miwa, K., Kasai, K., Fuji, K., Onouchi, H., Naito, S., & Fujiwara, T. (2010). Polar localization and degradation of Arabidopsis boron transporters through distinct trafficking pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(11), 5220–5225.
- Tanaka, H., Dhonukshe, P., Brewer, P. B., & Friml, J. (2006). Spatiotemporal asymmetric auxin distribution: a means to coordinate plant development. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(23), 2738–54.
- ThermoScientific. (2011). NanoDrop: Assessment of Nucleic Acid Purity. *Protocols and Product Manuals*, 1–2.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796–815.
- Tiwari, S. B., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (2004). Aux / IAA Proteins Contain a Potent Transcriptional Repression Domain. *The Plant Cell*, 16, 533–543.
- Ueda, T., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., & Nakano, A. (2001). Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *The EMBO Journal*, 20(17), 4730–4741.

- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., & Guilfoyle, T. J. (1997). Creation of a Highly Active Synthetic AuxRE. *The Plant Cell*, 9, 1963–1971.
- Van Norman, J. M., Breakfield, N. W., & Benfey, P. N. (2011). Intercellular communication during plant development. *The Plant Cell*, 23(3), 855–864.
- Van Norman, J. M., Xuan, W., Beeckman, T., & Benfey, P. N. (2013). To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation. *Development*, 140(21), 4301–4310.
- Vermeer, J. E. M., von Wangenheim, D., Barberon, M., Lee, Y., Stelzer, E. H. K., Maizel, A., & Geldner, N. (2014). A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in Arabidopsis. *Science*, 343(6167), 178–83.
- Viotti, C., Kruger, F., Krebs, M., Neubert, C., Fink, F., Lupanga, U., Scheuring, D., Boutte, Y., Frescatada-Rosa, M., Wolfenstetter, S., Sauer, N., Hillmer, S., Grebe, M., & Schumacher, K. (2013). The Endoplasmic Reticulum Is the Main Membrane Source for Biogenesis of the Lytic Vacuole in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(9), 3434–3439.
- Wang, L.-C., Tsai, M.-C., Chang, K.-Y., Fan, Y.-S., Yeh, C.-H., & Wu, S.-J. (2011). Involvement of the ArabidopsisHIT1/AtVPS53 tethering protein homologue in the acclimation of the plasma membrane to heat stress. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3609–3620.
- Wang, Q., Zhao, Y., Luo, W., Li, R., He, Q., Fang, X., Michele, R., DeAst, C., von Wirén, N., Lin, J. (2013). Single-particle analysis reveals shutoff control of the Arabidopsis ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(32), 13204–13209.
- Xu, J., & Scheres, B. (2005). Dissection of ArabidopsisADP-RIBOSYLATION FACTOR 1 Function in Epidermal Cell Polarity. *The Plant Cell*, 17, 525–536.
- Xuan, W., Audenaert, D., Parizot, B., Müller, B. K., Njo, M. F., De Rybel, B., De Rop, G., Van Isterdael, G., Mähönen, A., Vanneste, S., & Beeckman, T. (2015). Root cap-derived auxin pre-patterns the longitudinal axis of the Arabidopsisroot. *Current Biology*, 25(10), 1381–1388.
- Xuan, W., Band, L. R., Kumpf, R. P., Van Damme, D., Parizot, B., De Rop, G., Opdenacker, D., Moller, B., Skorzinski, N., Njo, M., De Rybel, B., Audenaert, D., Nowack, M., Vanneste, S., & Beeckman, T. (2016). Cyclic

- programmed cell death stimulates hormone signaling and root development in *Arabidopsis*. *Science*, 351(6271), 384–387.
- Yue, K., & Beeckman, T. (2014). Cell-to-cell communication during lateral root development. *Molecular Plant*, 7(5), 758–760.
- Žárský, V., Kulich, I., Fendrych, M., & Pečenková, T. (2013). Exocyst complexes multiple functions in plant cells secretory pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 16(6), 726–733.
- Zhang, Y., He, J., Lee, D., & McCormick, S. (2010). Interdependence of endomembrane trafficking and actin dynamics during polarized growth of *Arabidopsis* pollen tubes. *Plant Physiology*, 152, 2200–2210.
- Zhang, L., Zhang, H., Liu, P., Hao, H., Jin, J. B., & Lin, J. (2011). *Arabidopsis*R-SNARE Proteins VAMP721 and VAMP722 Are Required for Cell Plate Formation. *PLoS ONE*, 6(10), e26129.
- Zouhar, J., Hicks, G. R., & Raikhel, N. V. (2004). Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(25), 9497–501.

ANEXOS

ANEXO I: Mutantes que han sido descritas por presentar defectos en el tráfico de proteínas o en la formación de raíces laterales presentan distinta sensibilidad, a la de su parental silvestre, al efecto de Sortin2 en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.

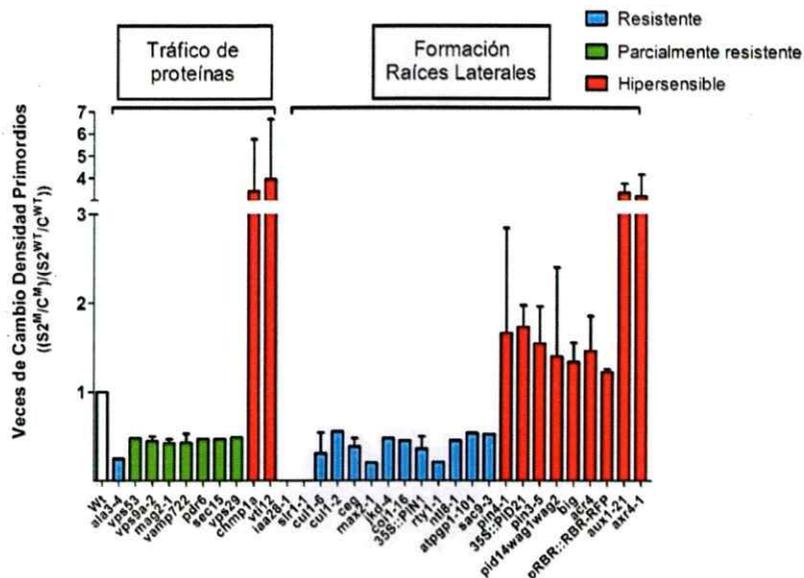


Figura 25: Mutantes con defectos en el sistema de endomembranas y en diversas etapas de la formación de las raíces laterales presentan distinta sensibilidad al tratamiento con Sortin2. Plántulas de 7 días de las líneas indicadas se traspasaron a tratamientos en MS-líquido suplementado con DMSO 1% y Sortin2 25 µg/mL por 72 horas. Los resultados de densidad de raíces laterales obtenidos se expresan como *veces de inducción relativa* (Morales-Herrera, 2015). El valor 1 representa las veces de inducción por Sortin2 en la línea silvestre. Líneas hipersensibles a Sortin2 (barras rojas) corresponden a las que el tratamiento con Sortin2 es capaz de inducir un aumento significativo en la densidad de raíces laterales y en las que las veces de inducción relativa presentan valores mayores que 1,2. Parcialmente resistentes (barras verdes) corresponden a las líneas en que el tratamiento con Sortin2 induce una mayor densidad de raíces laterales y las *veces de inducción relativa* son menores a 0,9. Líneas resistentes a Sortin2 (barras azules) se denominan a las líneas en que el tratamiento con Sortin2 no induce un aumento significativo en la densidad de raíces laterales y sus *veces de inducción relativa* son menores a 0,8. Las barras de error corresponden al error estándar.

ANEXO II: Sensibilidad al efecto de Sortin2 en el tráfico endocítico a la vacuola de las mutantes estudiadas

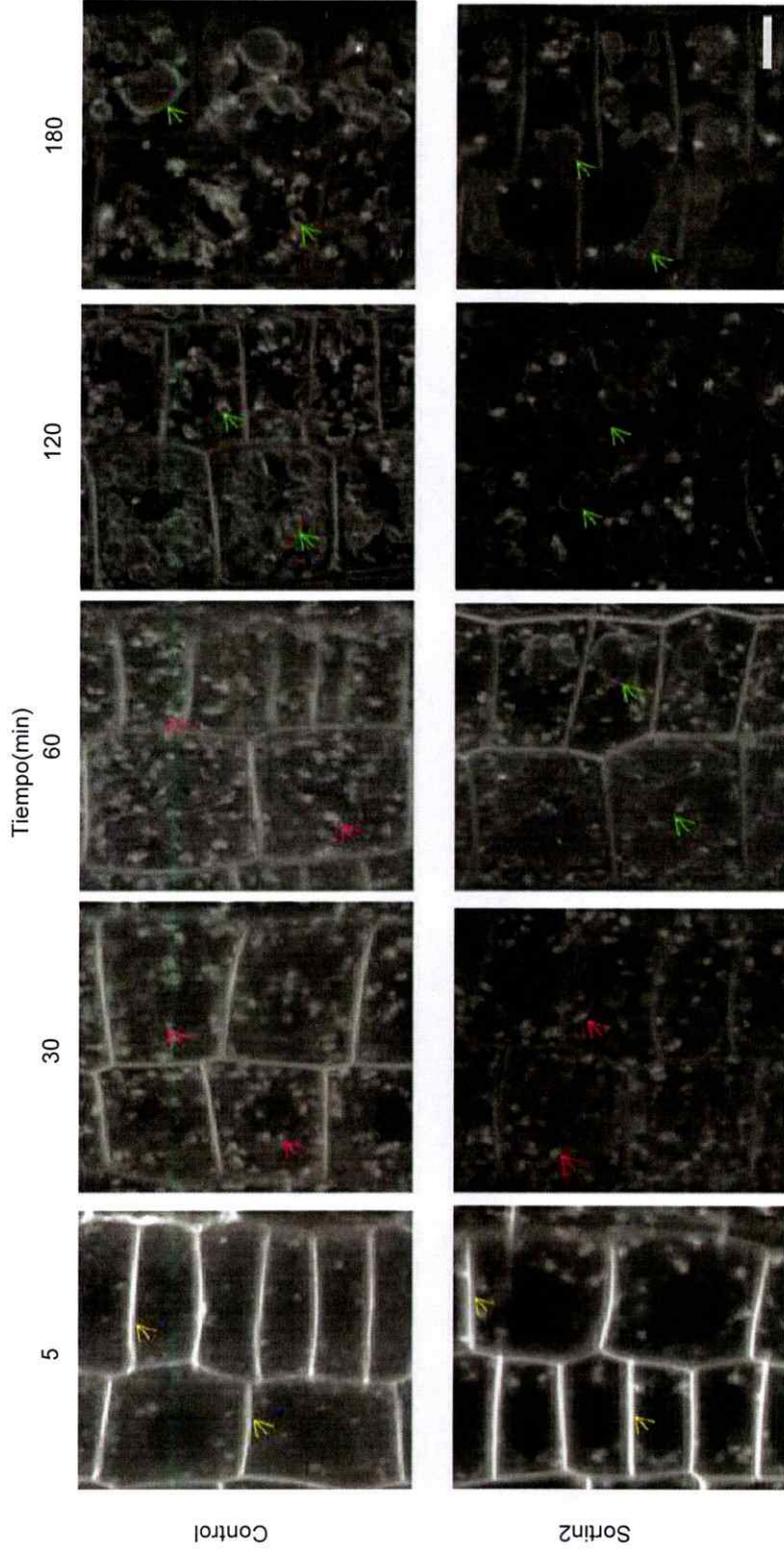


Figura 26. Sortin2 acelera la internalización del trazador endocítico FM4-64 hacia la vacuola en el ecotipo silvestre Col-0. Plántulas de 7 días del ecotipo silvestre Col-0 se incubaron por 10 minutos a 4°C en oscuridad con la sonda fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico hacia la vacuola a distintos tiempos de tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la visualización de la internalización de FM4-64 a 22°C (tiempo 0) en la cual, tal como está reportado en Pérez-Henríquez y col., 2012, a los 5 minutos en ambos tratamientos se visualiza el FM4-64 en la membrana plasmática (flechas amarillas), a los 30 minutos el FM4-64 alcanza los endosomas (flechas rosadas) en las dos condiciones. La sonda fluorescente llega a la membrana de la vacuola (flechas verdes) a los 120 minutos en condiciones control. Sin embargo, en tratamiento con Sortin2 sólo demora 60 minutos. Las imágenes son representativas de 3 réplicas experimentales, en las que se analizaron 3 plántulas por tratamiento. Las imágenes se tomaron con un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

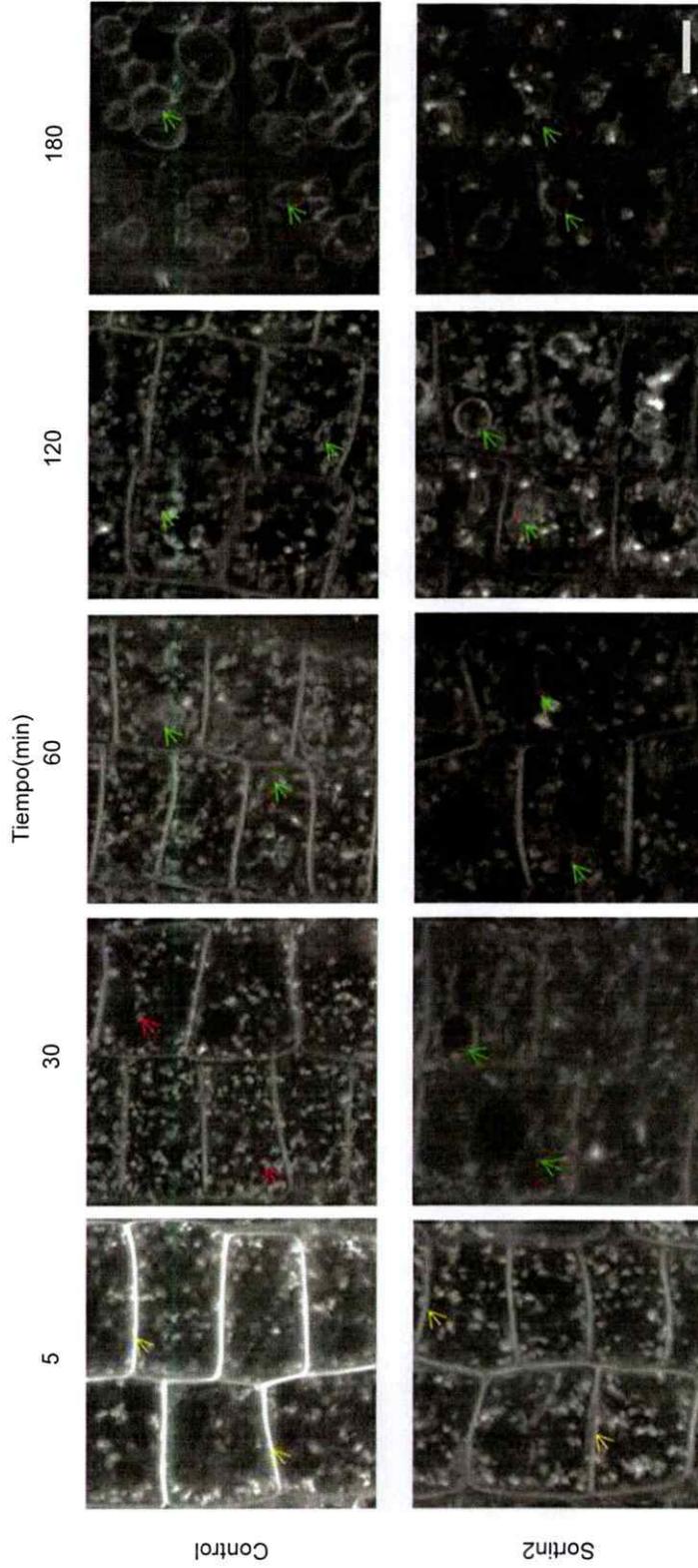


Figura 27: Sortin2 acelera el tráfico desde la membrana plasmática a la vacuola del trazador endocítico FM4-64 en el ecotipo silvestre Ws. Plántulas de 7 días del ecotipo silvestre Ws fueron incubadas por 10 minutos a 4°C en oscuridad con el trazador fluorescente FM4-64 para estudiar el tráfico endocítico hacia la vacuola a distintos tiempos de tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). A continuación se visualizó la internalización del trazador endocítico a 22°C (tiempo 0), en ambas condiciones se visualiza a los 5 minutos el trazador endocítico en la membrana plasmática (flechas amarillas), a los 30 minutos la sonda fluorescente se observa en los endosomas (flechas rosadas) en tratamiento control y en el tonoplasto (flechas verdes). A los 60 minutos en condición control el FM4-64 alcanza la membrana de la vacuola (flechas verdes). Se efectuaron 3 réplicas experimentales con 3 plántulas cada una. Las imágenes se capturaron utilizando un aumento de 400X. La barra de tamaño corresponde a 10 µm.

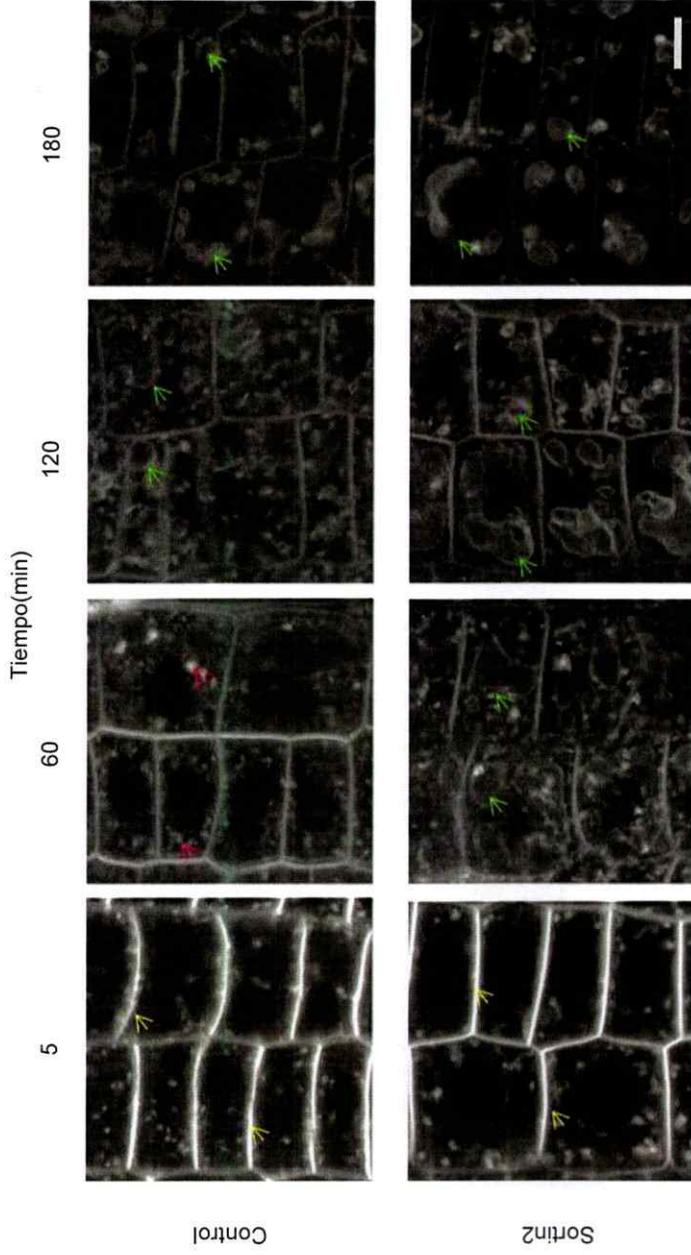


Figura 28: El tráfico endocítico hacia la vacuola de la línea sobreexpresora del facilitador de eflujo PIN1, se comporta como su parental Col-0 en tratamientos con Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea transgénica 35S::PIN1 se incubaron por 10 minutos a 4°C con la sonda fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico en los tiempos indicados de tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la visualización de la internalización de FM4-64 a 22°C (tiempo 0). El trazador endocítico se sitúa en la membrana plasmática (flechas amarillas) desde los 5 minutos en ambas condiciones. A los 60 minutos de tratamiento control se visualiza el FM4-64 en los endosomas (flechas rosadas), en cambio, a los 60 minutos de tratamiento con Sortin2 el FM4-64 alcanzó la vacuola (flechas verdes). Las imágenes son representativas de 1 réplica experimental, en las que se analizaron 3 plántulas en cada tratamiento. Las imágenes fueron tomadas usando un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

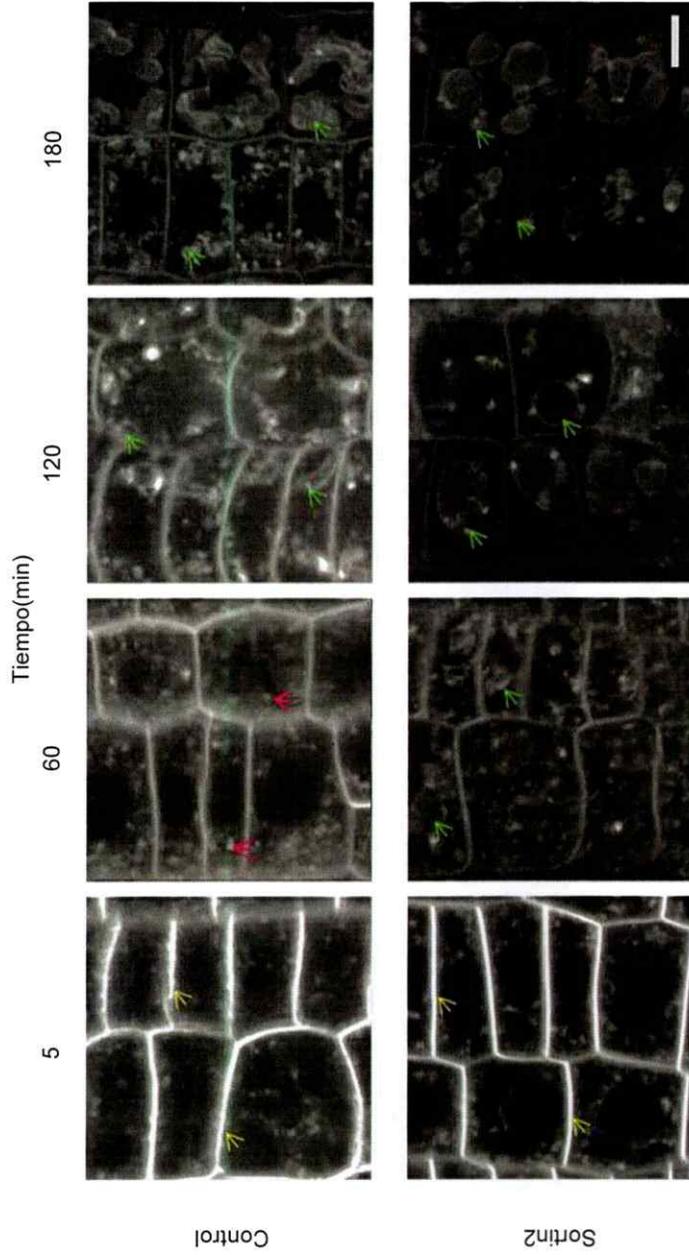


Figura 29: El tráfico endocítico de la mutante del gen que codifica a la proteína de membrana asociada a vesículas: **VAMP722**, presenta un comportamiento similar al de su parental Col-0 frente a tratamiento con **Sortin2**. Plántulas de 7 días de la línea mutante *vamp722* se incubaron por 10 minutos a 4°C con el trazador fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico a distintos tiempos de tratamiento en MS-liquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Subsiguientemente se visualizó la internalización del trazador endocítico a 22°C (tiempo 0). A los 5 minutos en ambas condiciones el trazador endocítico alcanza la membrana plasmática (flechas amarillas). En tratamiento control a los 60 minutos el FM4-64 se encuentra en los endosomas (flechas rosadas) y en tratamiento con Sortin2 se visualiza en la vacuola (flechas verdes). Las imágenes corresponden a 1 réplica experimental, en la que se analizaron 3 plántulas por réplica. Las imágenes se tomaron con un aumento de 400X. La barra de tamaño corresponde a 10 µm.

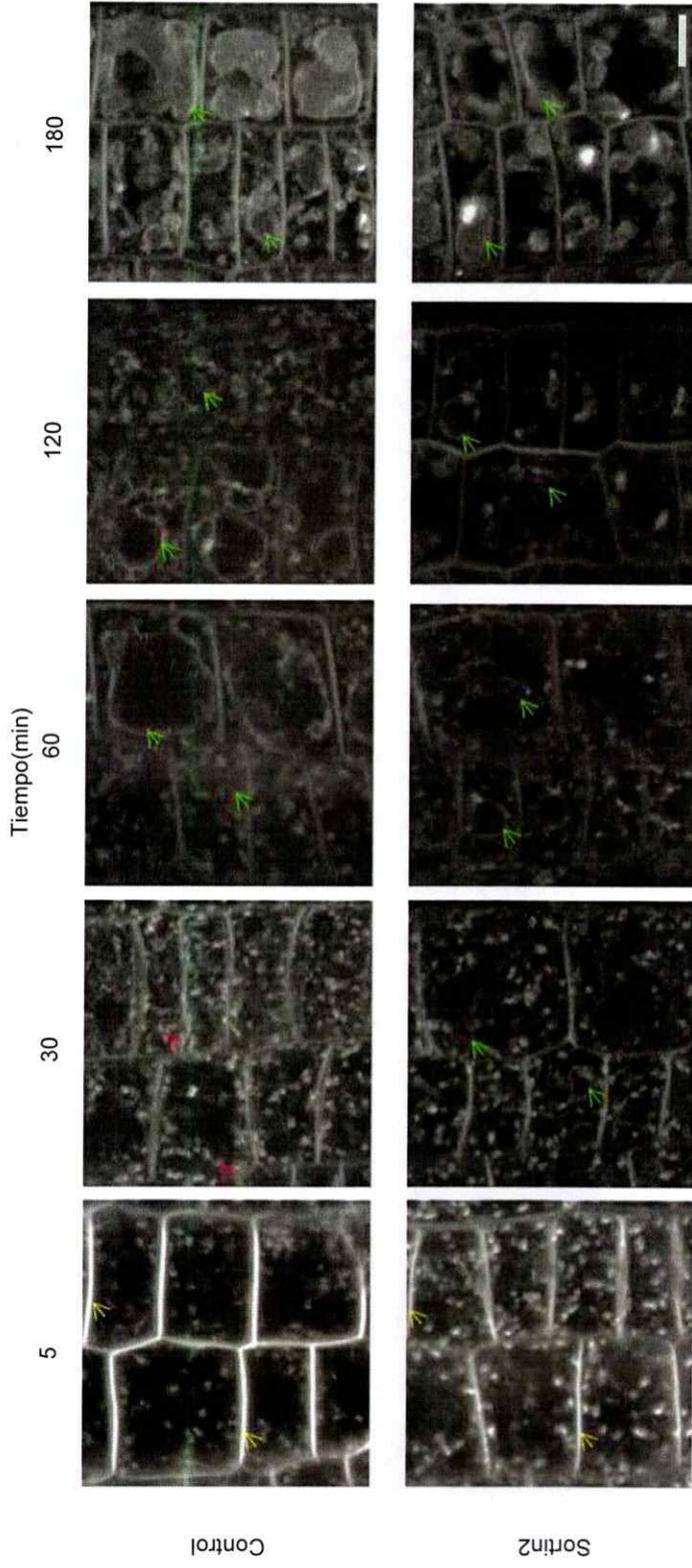


Figura 30: El tráfico endocítico a la vacuola de la mutante en el gen *AXR4*, es sensible como su parental *Ws* a Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea mutante *axr4-1* fueron incubadas por 10 minutos a 4°C con la sonda fluorescente FM4-64 para estudiar el tráfico endocítico hacia la vacuola a los tiempos indicados en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la visualización de la internalización de FM4-64 a 22°C (tiempo 0). A los 5 minutos el FM4-64 se encuentra en la membrana plasmática (flechas amarillas) en ambos tratamientos. A los 30 minutos en condición control la sonda fluorescente se visualiza en los endosomas (flechas rosadas) y en la vacuola (flechas verdes) en tratamiento con Sortin2. Las imágenes son representativas de 3 réplicas experimentales, en las que se analizaron 3 plántulas por tratamiento. Las imágenes fueron capturadas utilizando un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

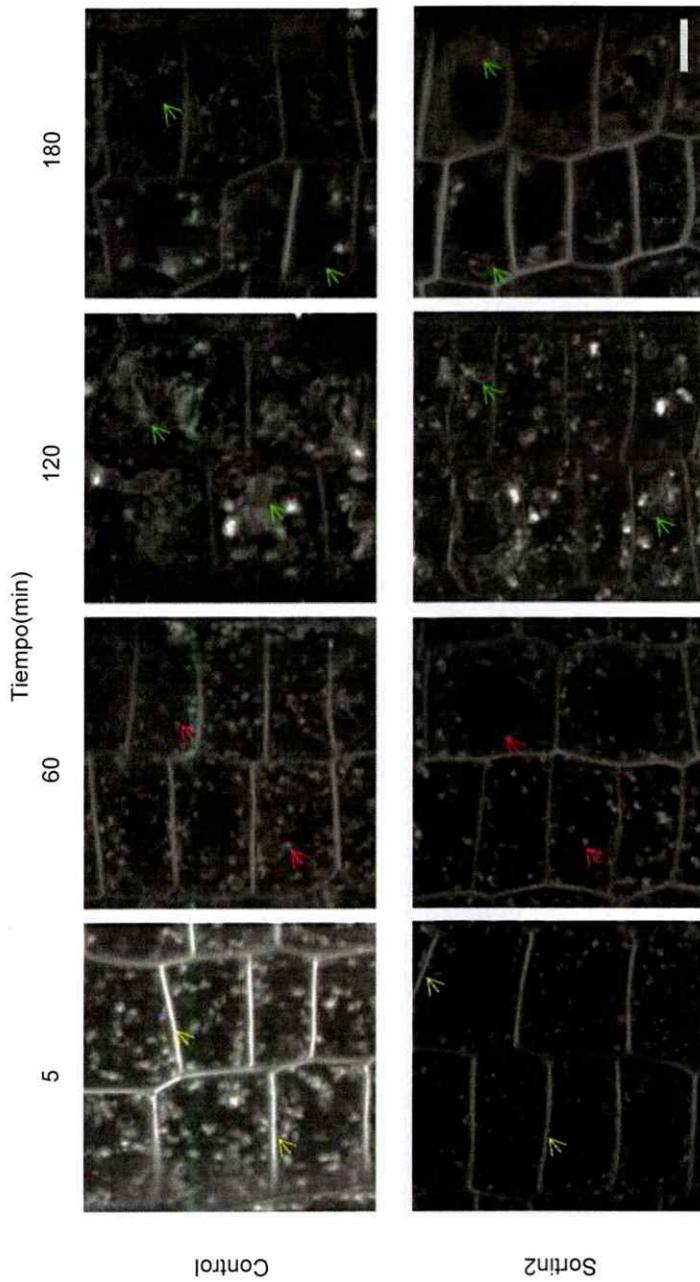


Figura 31: El tráfico endocítico de la mutante ganancia de función de IAA28, es resistente al efecto inductor que produce Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea mutante *iaa28-1* fueron incubadas por 10 minutos a 4°C con el trazador fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico a distintos tiempos de tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). A continuación se visualizó la internalización del trazador endocítico a 22°C (tiempo 0) en la cual a los 5 minutos en ambos tratamientos se observa el FM4-64 en la membrana plasmática (flechas amarillas). Los endosomas (flechas rosadas) se muestran desde los 60 minutos en ambos tratamientos y la vacuola (flechas verdes) se observa desde los 120 minutos en los tratamientos estudiados. Las imágenes son representativas de 3 réplicas experimentales con 3 plántulas cada una. Las imágenes se capturaron usando un aumento de 400X. La barra de tamaño indica 10 µm.

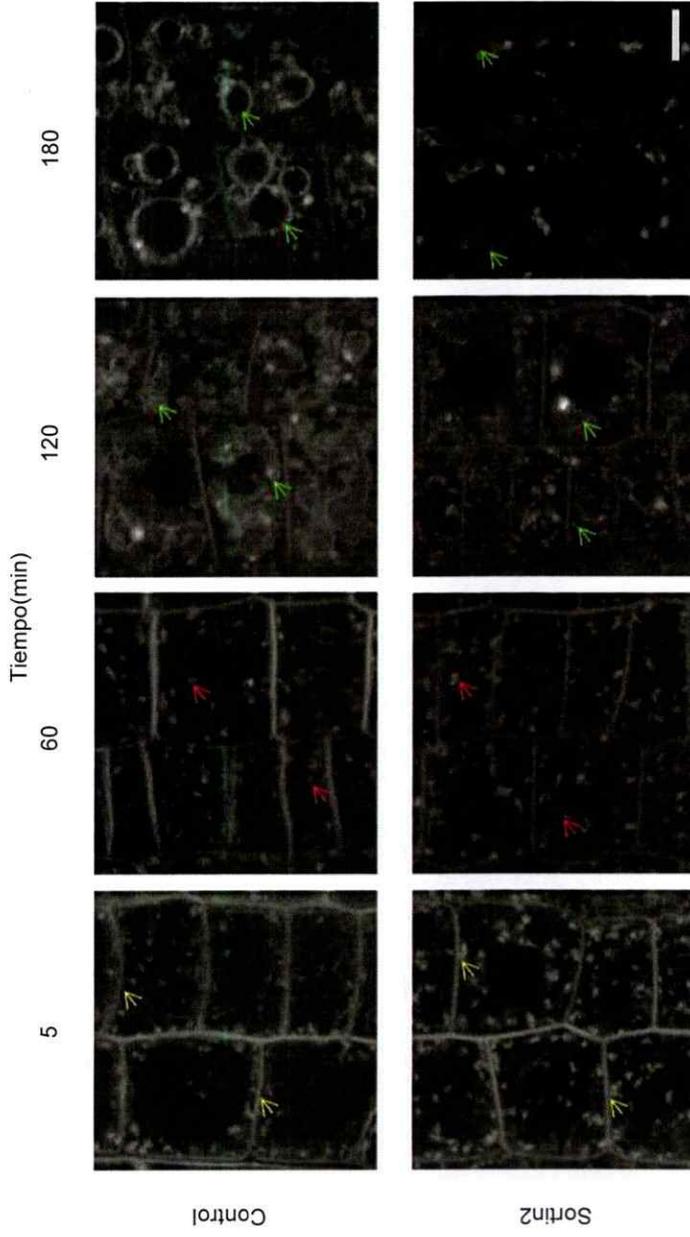


Figura 32: EL tráfico endocítico a la vacuola de la mutante ganancia de función de IAA14 no es acelerado por Sortin2 como lo es en su parental silvestre. Plántulas de 7 días de la línea mutante *slr1-1* se incubaron por 10 minutos a 4°C con la sonda fluorescente FM4-64 para estudiar el tráfico endocítico a distintos tiempos de tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la visualización de la internalización de FM4-64 a 22°C (tiempo 0). En ambas condiciones el FM4-64 se visualiza en la membrana plasmática (flechas amarillas) a los 5 minutos, los endosomas (flechas rosadas) a los 60 minutos y la vacuola (flechas verdes) se observa a los 120 minutos. Las imágenes son de 3 réplicas experimentales con 3 plántulas cada una y capturadas utilizando un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

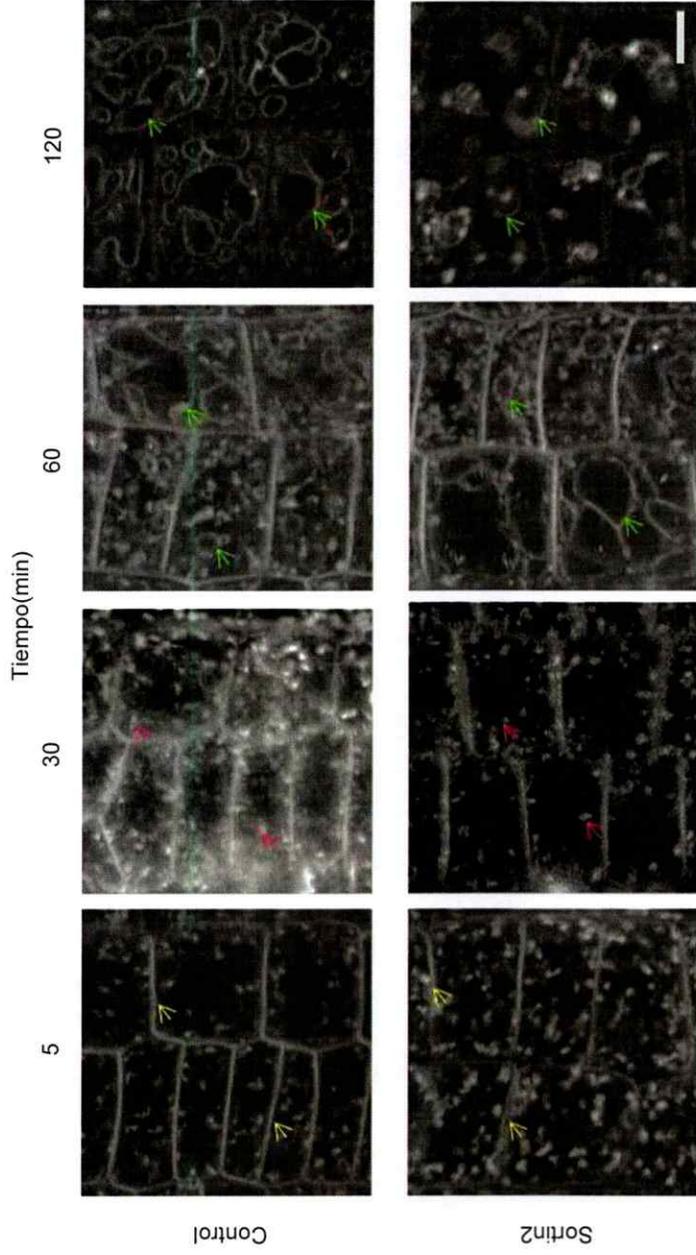


Figura 33: La mutante del gen que codifica la proteína de andamiaje CUL1 del complejo receptor SCF, es resistente a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea mutante *cul1-6* se incubaron por 10 minutos a 4°C con el trazador fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico en los tiempos indicados en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). A continuación se estudió la internalización del trazador endocítico a 22°C (tiempo 0). En ambos tratamientos a los 5 minutos el trazador endocítico se visualiza en la membrana plasmática (flechas amarillas), a los 30 minutos se observan en los endosomas (flechas rosadas) y a los 60 minutos el FM4-64 se encuentra en la vacuola (flechas verdes). Las imágenes se tomaron usando 400X de aumento y son representativas de 3 réplicas experimentales, en las que se analizaron 3 réplicas técnicas por tratamiento. La barra de tamaño corresponde a 10 µm.

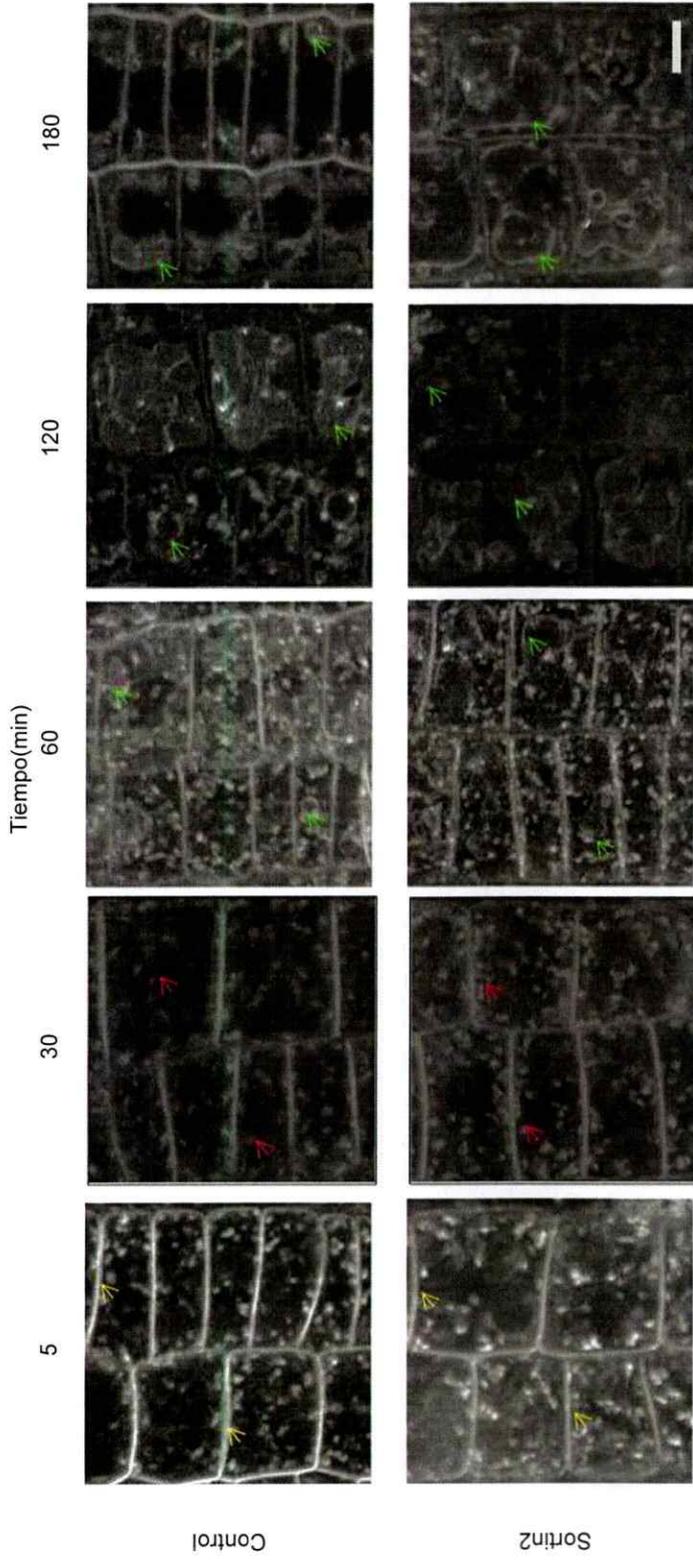


Figura 34: La mutante en el gen que codifica a la proteína SEC15 que conforma parte del complejo exocítico, es resistente a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea mutante *sec15* fueron incubadas por 10 minutos a 4°C con el trazador fluorescente FM4-64 para estudiar el tráfico endocítico a distintos tiempos de tratamiento en MS-liquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la internalización de la vacuola de la membrana plasmática (flechas amarillas) a los 5 minutos en ambas condiciones. A los 30 minutos de tratamiento el trazador endocítico alcanza los endosomas (flechas rosadas) y a los 60 minutos la vacuola (flechas verdes) en ambos tratamientos. Las imágenes representan 3 réplicas experimentales en donde se analizaron 3 plántulas en cada una para cada tratamiento. Las imágenes se tomaron utilizando un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

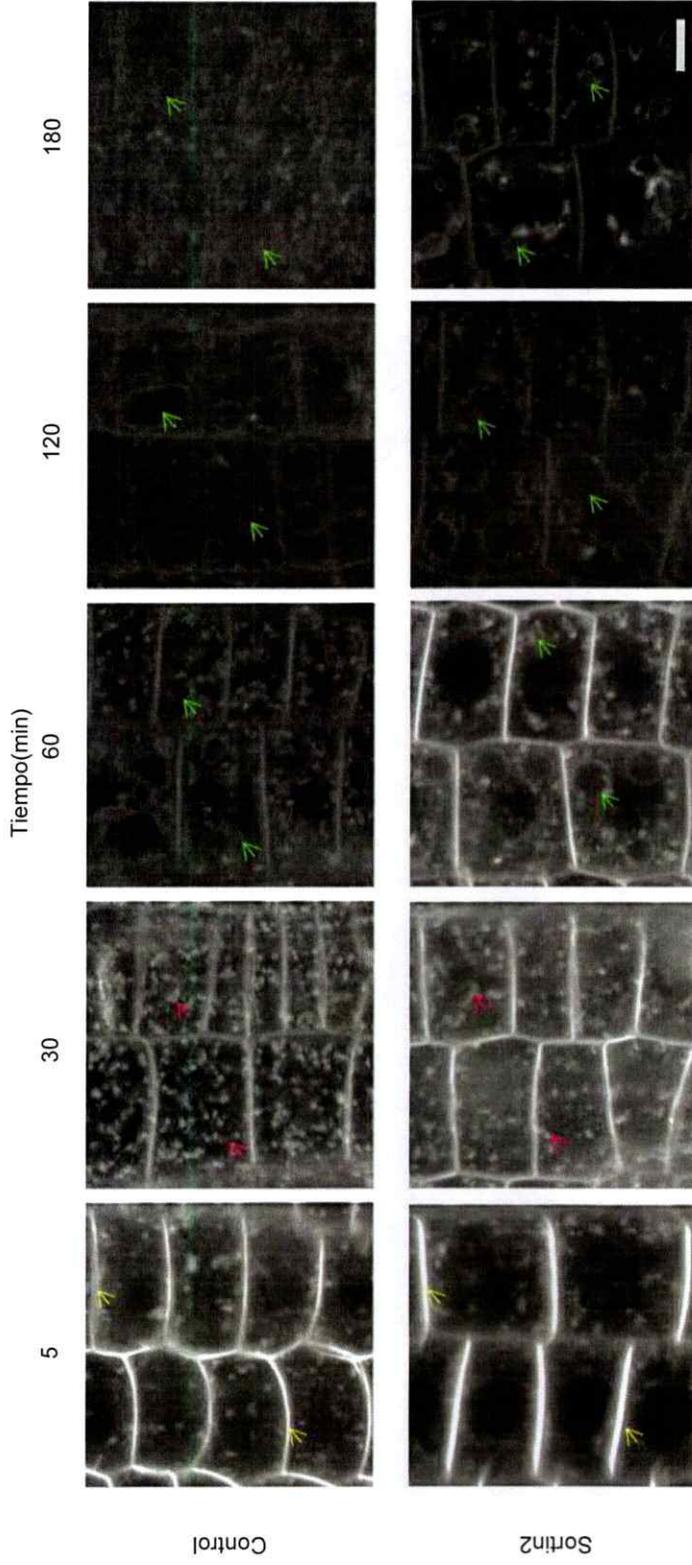


Figura 35: La mutante en el gen que codifica a la proteína **VPS53** la que está asociada al **sorting** de proteínas vacuolares, es resistente a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por **Sortin2**. Plántulas de 7 días de la línea mutante *vps53* se incubaron por 10 minutos a 4°C con la sonda fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico en los tiempos indicados en el tratamiento con MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Consecutivamente se visualizó la internalización del trazador endocítico a 22°C (tiempo 0) encontrándose que en ambos tratamientos a los 5 minutos se visualiza el FM4-64 en la membrana plasmática (flechas amarillas), a los 30 minutos en los endosomas (flechas rosadas) y a los 60 minutos en la membrana de la vacuola (flechas verdes). Las imágenes se capturaron al usar un aumento de 400X y son representativas de 3 réplicas experimentales, en las que se analizaron 3 plántulas por tratamiento. La barra de tamaño corresponde a 10 µm.

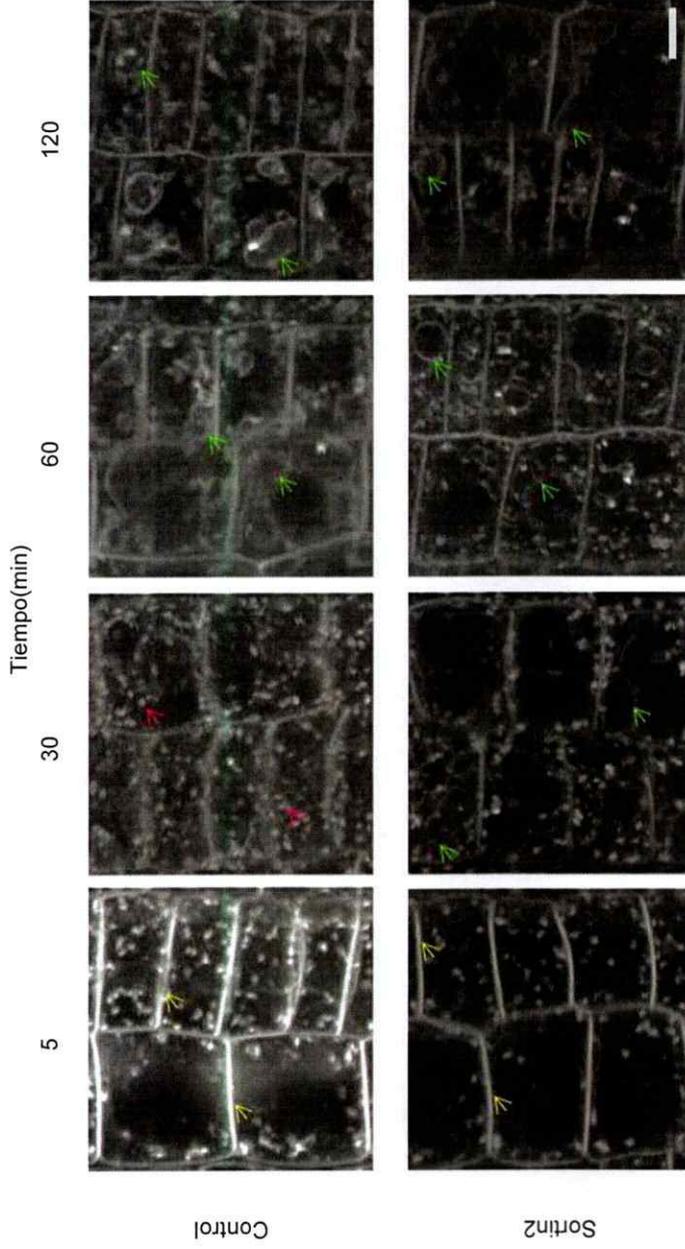


Figura 36: La mutante en el gen que codifica a la proteína del facilitador de influxo de auxinas **AUX1**, es hipersensible a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por **Sortin2**. Plántulas de 7 días de la línea mutante *aux1-21* fueron incubadas durante 10 minutos a 4°C con el trazador fluorescente FM4-64 para estudiar el tráfico endocítico a distintos tiempos de tratamiento en MS-liquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la visualización de la internalización de FM4-64 a 22°C (tiempo 0). En ambos tratamientos a los 5 minutos la sonda fluorescente se visualiza en la membrana plasmática (flechas amarillas), a los 30 minutos en condición control se observa en los endosomas (flechas rosadas) y en tratamiento con Sortin2 el FM4-64 alcanza la vacuola (flechas verdes). A los 60 minutos en ambas condiciones el trazador se visualiza en la membrana de la vacuola (flechas verdes). Se efectuaron 3 réplicas experimentales analizando 3 plántulas en cada experimento por tratamiento. Para la visualización se utilizó un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

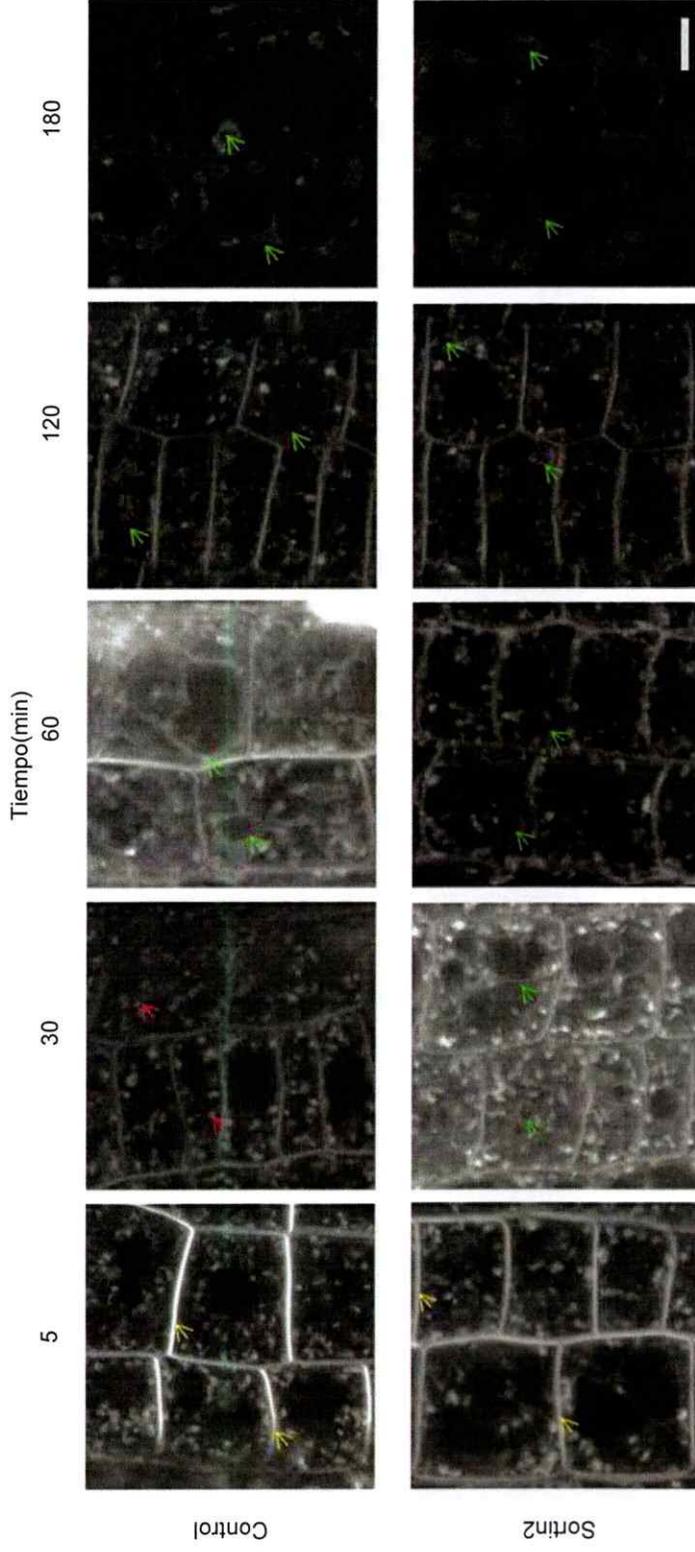


Figura 37: La mutante en el gen que codifica a la proteína tipo serina/treonina quinasa ACR4, es hipersensible a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea mutante *acr4* se incubaron por 10 minutos a 4°C con la sonda fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico en los tiempos indicados en el tratamiento con MS-liquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). A continuación se estudió la internalización de FM4-64 a 22°C en la cual a los 5 minutos el FM4-64 se visualiza en la membrana plasmática (flechas amarillas). A los 30 minutos, en tratamiento control el trazador se encuentra en los endosomas (flechas rosadas) y en tratamiento con Sortin2 la sonda alcanza la membrana vacuolar (flechas verdes). A los 60 minutos en ambas condiciones el FM4-64 se encuentra en la vacuola (flechas verdes). Las imágenes son representativas de 3 réplicas experimentales con 3 plántulas cada una. Las imágenes fueron capturadas utilizando un aumento de 400X. La barra de tamaño corresponde a 10 µm.

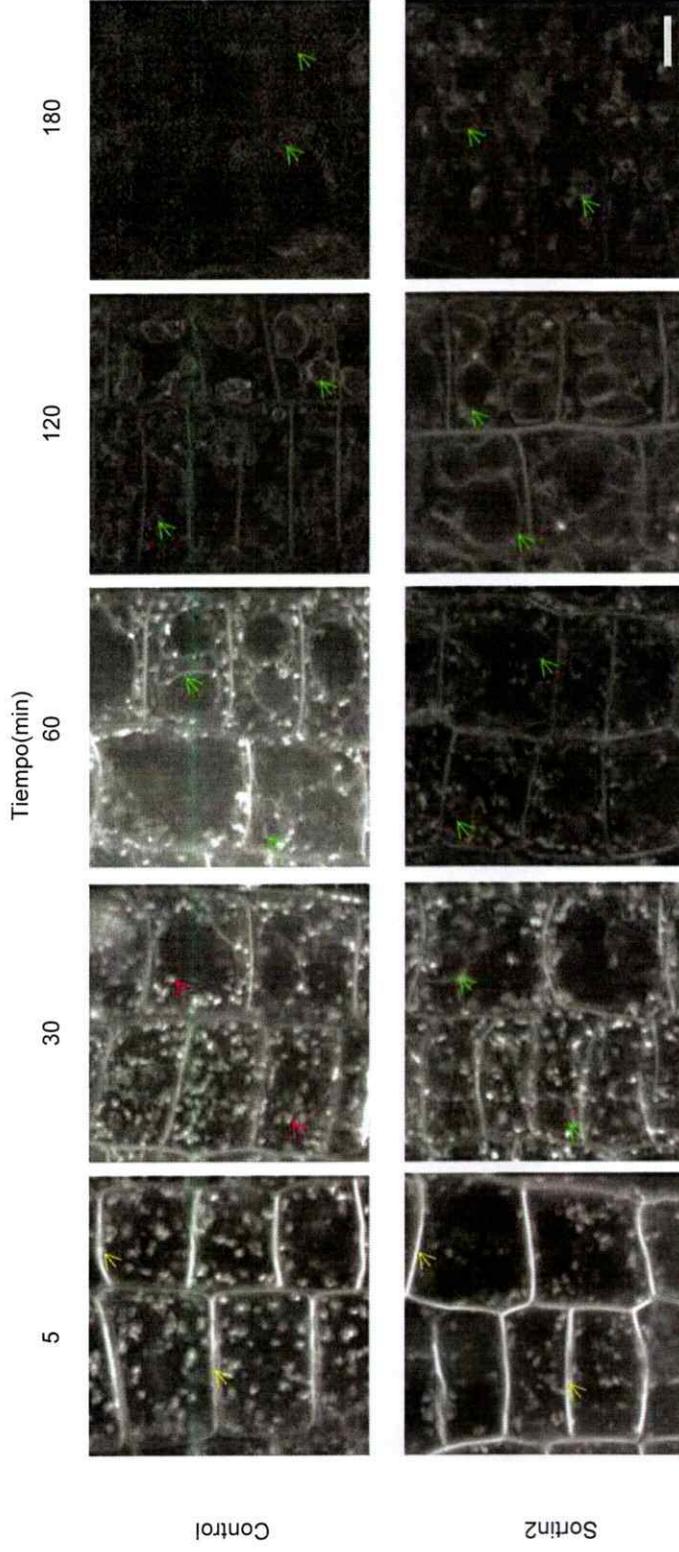


Figura 38: La mutante en el gen que codifica a la proteína VTI12 una v-SNARE asociada al transporte de vesículas, es hipersensible a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea mutante *vti12-1* fueron incubadas durante 10 minutos a 4°C con el trazador fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico a distintos tiempos de tratamiento en MS-liquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). Posteriormente comienza la visualización de la internalización de FM4-64 a 22°C (tiempo 0). A los 5 minutos el FM4-64 marca la membrana plasmática (flechas amarillas) en ambas condiciones. A los 30 minutos se visualiza en los endosomas (flechas rosadas) en el tratamiento control y en la membrana vacuolar (flechas verdes) en tratamiento con Sortin2. Además, en los dos tratamientos el FM4-64 se encuentra en la vacuola (flechas verdes) a los 60 minutos. Se efectuaron 3 réplicas experimentales, en las que se analizaron 3 plántulas por tratamiento. Para obtener las imágenes se trabajó con un aumento de 400X. La barra de tamaño es equivalente a 10 µm.

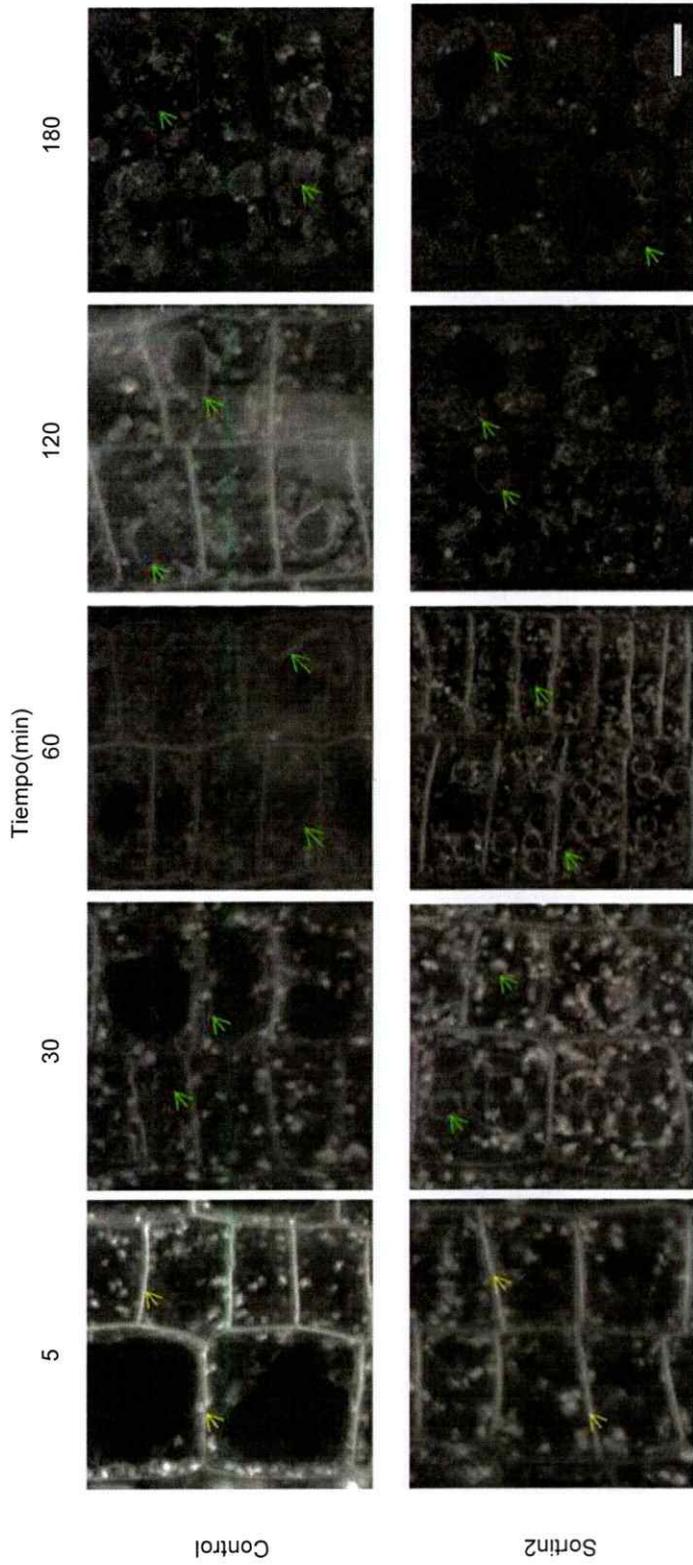


Figura 39: La mutante en el gen que codifica a la proteína F-box CEGENDUO es resistente* a la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola por Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea mutante *ceg* fueron incubadas durante 10 minutos a 4°C con el trazador fluorescente FM4-64 para visualizar el tráfico endocítico a distintos tiempos de tratamiento en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (control, panel superior) y Sortin2 25 µg/mL (panel inferior). A continuación se visualizó la internalización del trazador endocítico FM4-64 a 22°C (tiempo 0). En ambos tratamientos el FM4-64 se encuentra en la membrana plasmática (flechas amarillas) a los 5 minutos y en la vacuola (flechas verdes) a los 30 minutos. * Se clasificó como resistente, a pesar de no calzar en algún criterio de clasificación, puesto que la endocitosis del trazador fluorescente parece no variar en ambos tratamientos. Se efectuaron 3 réplicas experimentales en las que se analizaron 3 plántulas por tratamiento. El aumento utilizado es de 400X. La barra de tamaño indica 10 µm.

ANEXO III: Fenotipo de endosomas y vacuolas en las mutantes que presentan diferente sensibilidad al efecto de Sortin2 a la inducción de raíces laterales por Sortin2 respecto a su parental silvestre.

Tabla 5: Sensibilidad al efecto de Sortin2 en el tráfico endocítico de FM4-64, morfología de los endosomas y de las vacuolas en las líneas mutantes que presentan una sensibilidad diferente, de la de su parental silvestre, a la inducción de raíces laterales inducida por Sortin2.

Línea	Condición	Cinética de endocitosis de FM4-64	Fenotipo Endosomas	Morfología de Vacuolas visualizadas con FM4-64 a los 120 ó 180 minutos de la cinética de endocitosis
Col-0	Control		Patrón puntuado	Simples, pequeñas y múltiples vacuolas
	Sortin2		Patrón puntuado	Complejas y múltiples vacuolas
Ws	Control		Patrón puntuado	Simples y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas)
	Sortin2		Patrón puntuado	Simples y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas)
35S::PIN1	Control	Silvestre	Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Simples, pequeñas y múltiples vacuolas, semejante a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Simples y múltiples vacuolas diferente a Col-0
vamp722	Control	Silvestre	Patrón puntuado con cuerpos de menor tamaño que en Col-0	Complejas, pequeñas y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas) diferente a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de menor tamaño que en Col-0	Simples y múltiples vacuolas de gran tamaño (con cuerpos similares a autofagosomas) diferente a Col-0

<i>axr4-1</i>	Control	Silvestre	Patrón puntuado con cuerpos de menor tamaño que Ws	Simples y múltiples vacuolas de gran tamaño diferente a Ws
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Ws	Simples y múltiples vacuolas similar a Ws
<i>iaa28-1</i>	Control	Silvestre	Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Simples, pequeñas y múltiples vacuolas similar a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de menor tamaño que en Col-0	Simples, pequeñas y múltiples vacuolas diferente a Col-0
<i>iaa14-1/slr1-1</i>	Control	Silvestre	Patrón puntuado con cuerpos de menor tamaño que en Col-0	Simples y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas) diferente a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Simples, pequeñas y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas) diferente a Col-0
<i>cul1-6</i>	Control	Acelerado	Patrón puntuado con cuerpos de menor tamaño que en Col-0	Complejas y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas) similar a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Complejas, pequeñas y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas) diferente a Col-0
<i>sec15</i>	Control	Acelerado	Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Complejas y múltiples vacuolas diferente a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Complejas, múltiples y grandes vacuolas diferente a Col-0
<i>vps53</i>	Control	Acelerado	Patrón puntuado con cuerpos de menor tamaño que en Col-0	Complejas, pequeñas y múltiples vacuolas diferente a Col-0

	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de menor tamaño que en Col-0	Complejas, pequeñas y múltiples vacuolas diferente a Col-0
<i>aux1-21</i>	Control	Acelerado	Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Simples, pequeñas y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas) diferente a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Complejas y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas) diferente a Col-0
<i>acr4</i>	Control	Acelerado	Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Simples, pequeñas y múltiples vacuolas similar a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Complejas y múltiples vacuolas similar a Col-0
<i>vti12</i>	Control	Acelerado	Patrón puntuado con cuerpos de mayor tamaño que Col-0	Simples, pequeñas y múltiples vacuolas similar a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Complejas, pequeñas y múltiples vacuolas diferente a Col-0
<i>ceg</i>	Control	Acelerado	Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Simples, pequeñas y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas) similar a Col-0
	Sortin2		Patrón puntuado con cuerpos de tamaño semejante a Col-0	Complejas y múltiples vacuolas (con cuerpos similares a autofagosomas) similar a Col-0

ANEXO IV: La diferenciación de las células fundadoras de raíces laterales inducida por Sortin2 requiere del tráfico funcional de MVB/PVC/LE hacia la vacuola.

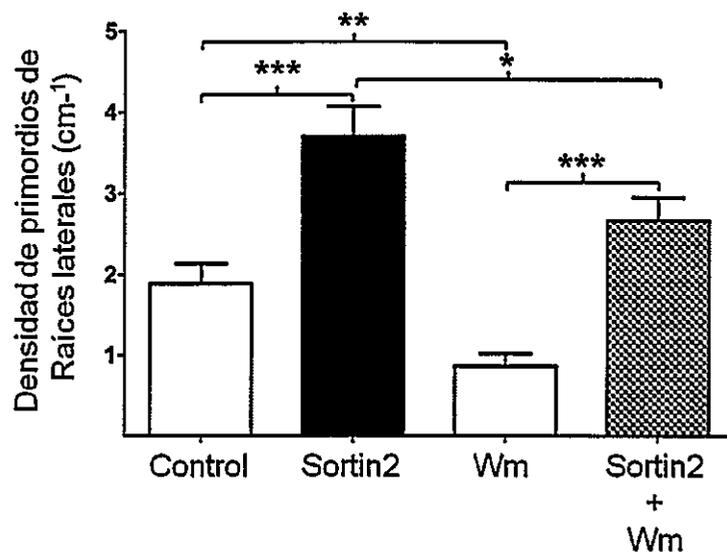


Figura 40: La aceleración del tráfico hacia la vacuola induciría la diferenciación de células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales. Plántulas de 7 días de la línea transgénica pCycB1;1::GUS crecidas en NPA 10 μ M se transfirieron a tratamiento localizado que contienen MS-agar con DMSO 1% (control), Sortin2 25 μ g/mL, Wortmanina33 μ M (Wm) y Sortin2 con Wm en sólo una sección de la placa. Se grafican los primordios de raíces laterales positivos a GUS después de 2 días de tratamiento. Los resultados son de 5 réplicas experimentales (n = 36-54), en donde se utilizó la prueba de t-student para el análisis estadístico: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ns= no significativo.

ANEXO V: Mutantes y líneas transgénicas de *Arabidopsis* que han sido descritas por presentar defectos en el tráfico de proteínas y/o en la formación de raíces laterales.

Tabla 6: Lista de mutantes y líneas transgénicas de *Arabidopsis* que presentan defectos en el tráfico de proteínas y en la formación de raíces laterales.

Mutante / Línea transgénica	Tipo de mutación/ transgénesis	Gen (es)	Proceso Celular en el que participa la proteína	Fenotipo alterado relacionado a raíces laterales	Fenotipo alterado relacionado al tráfico del sistema de endomembranas	Referencias
<i>35S::PIN1</i>	Sobreexpresora	PIN1	Eflujo de auxinas	Desarrollo de primordios de raíces laterales enlentecido		Benková y col., 2003
<i>acr4</i>	Nula	ACR4	Comunicación célula a célula	Número de primordios de raíces laterales aumentado		De Smet y col., 2008
<i>aux1-21</i>	Nula	AUX1	Influjo de auxinas	Número de primordios de raíces laterales reducido		Swarupy col., 2004
<i>axr4-1</i>	Recesiva	AXR4	Influjo de auxinas	Número de raíces laterales disminuido		Hobbie y Estelle, 1995
<i>Ceg</i>	Nula	CEG	Señalización de auxinas	Número de raíces laterales aumentado		Dong y col., 2006
<i>cul1-6</i>	Pérdida de función	CUL1	Señalización de auxinas/ ácido jasmónico/ estrigolactonas	Número de raíces laterales disminuido		Moon y col., 2007

<i>iaa28-1</i>	Ganancia de función	IAA28	Señalización de auxinas	Número de raíces laterales disminuido		Rogg y <i>col.</i> , 2001
<i>slr1-1</i>	Ganancia de función	IAA14	Señalización de auxinas	Número de raíces laterales disminuido		Hochhol dinger y <i>col.</i> , 2001
<i>sec15</i>	Parcial	SEC15	Exocitosis	---	Defectos en el aparato de exocitosis durante la secreción	Hála y <i>col.</i> , 2008
<i>vamp722</i>	Nula	VAMP 722	Tráfico secretorio a PM	---	Defectos en la formación de la placa celular	Zhang y <i>col.</i> , 2011
<i>vps53</i>	Recesiva	VPS53	Tráfico retrógrado de MVB/PVC/LE a TGN/EE	---	Defectos en el tráfico retrógrado entre LE/PVC/MVB y EE/TGN	Wang y <i>col.</i> , 2011
<i>vti12-1</i>	Nula	VT112	Tráfico de MVB/PVC/LE a vacuola	---	Defectos en el tráfico de proteínas hacia la vacuola	Surpin y <i>col.</i> , 2003