

UCh-FC
Biotecnología
M 828
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

“Estudio del mecanismo inductor de Sortin2 en la organogénesis de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Stefanía Paula Morales Herrera

Director del Seminario de Título:
Dr. Lorena Beatriz Norambuena Morales

Mayo, 2015
Santiago, Chile.

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Stefania Paula Morales Herrera.

“Estudio del mecanismo inductor de Sortin2 en la organogénesis de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Director Seminario de Título:

Lorena Norambuena Morales



Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Michael Handford



Evaluador:

Gabriel León



Santiago de Chile,

BIOGRAFÍA



Soy Stefania Paula Morales Herrera, pero casi todos me llaman Nía. Nací el 2 de Enero de 1991 en la ciudad de Quillota. Soy la hija menor de Augusto Morales y Sandra Herrera. Tengo cuatro hermanas mayores: Fabiola (39), Carolina (34) e Ingrid (32). Crecí en una familia unida, tradicional y católica, la cual me entregó valores como el respeto y responsabilidad, que me permiten ser la persona que soy ahora. El año 1996 comencé mis estudios en el Colegio San Ignacio de la Ssalle, en el cual estuve hasta terminar mi enseñanza media en el 2008 y en el que aprendí que *"lo que más te gusta no es lo que se te hace más fácil"*. Es por esto que el año 2009 entré a estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile y con ello, cambié mi domicilio a Santiago. En esta carrera me di cuenta que elegí lo que me gusta hacer, que mi familia siempre me apoyará para cumplir mis sueños y que "es lo mío". Además en Biotec conocí amigos que me acompañarán por siempre, y que me han demostrado que los amigos son la familia que se eligen. Actualmente soy tía de 5 sobrinos maravillosos: Augusto (17), Cristóbal (13), Laura (7), Arturo (6) y Pedro (6 meses), y estoy realizando el Magíster en Cs. Biológicas en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en el Centro de Biología Molecular Vegetal, el cual me da más seguridad para poder emigrar y seguir cumpliendo mis metas profesionales.

Dedicado a mi mamá por sacrificar su vida profesional por la de sus cuatro hijas...

También a mi papá por ser un ejemplo a seguir...

A mi hermana Carolina Morales por creer que puedo lograrlo todo y a mi sobrinito Pedrito por

regalarme sus sonrisas día a día...

Por último, pero no menos importante, va dedicado a la estrella más brillante que tengo en el cielo...

que se fue en mi segundo año de Universidad y que todavía pienso que está de viaje...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero que todo a mi Mami y a mi Papá por entregarme valores inigualables y por siempre apoyarme, darme ánimo, amor y dejar que sea yo la que decida mi futuro.

Le doy gracias a mis hermanitas Carolina, Ingrid y Fabiola por ser un apoyo cuando las necesito y siempre darme todo el amor, cariño y comprensión que una hermana pequeña requiere. A mis "hermanos" Augustito y Cristobital, que si bien son mis sobrinos, fuimos criados como hermanitos y, a pesar de que se enojan seguido, sé que siempre podré contar con ellos. También a mis sobrinos Laurita, Tutito y Pedrito, por las sonrisas, besos babosos y abrazos que animan y dan esperanzas.

Agradezco a mis compañeros y amigos Biotec, especialmente al Luisfe, a la Ceci, a la Salo, al Sergio, a la Arantza, a la Vale, a la Kiki, al Camilo, al Floro, al Carlitos, a Mancilla y al Papi, porque han estado en muchos momentos dándome fuerzas para terminar este desafío y entregarme lindos recuerdos de esta entretenida aventura.

Le doy gracias a mi Team LNM por todo lo que me enseñaron y ayudaron para llevar a cabo esta proeza, destacando por sobre todos a las rosadas (Mily, Tía Mirna, Ceci A., Givi y Clau), que me acompañaron y dieron los ánimos y empuje necesario para terminar esto. También destaco a Claudín, el cual ha sido un gran compañero-amigo en este camino.

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 este Seminario de Título.

Además agradezco a mis amigas del alma Kissy, Vale y Jeka, quizás no estamos siempre en contacto, pero las pocas veces que las veo y me dan su amistad, me llenan de energías para seguir.

Obvio que le agradezco a la Profe Lore por aceptarme en su laboratorio... aunque todos sabemos que me aceptó a la fuerza jajaja, gracias por las discusiones, los temas misceláneos que tocamos en su oficina y por ayudarme a crecer como científica. También al Pato P., que fue mi tutor cuando llegué al laboratorio y me instruyó en este camino de raíces laterales y me presentó al "gordo" Sortin2...

Se agradece a los investigadores que nos enviaron semillas de las líneas mutantes para poder llevar a cabo este Seminario de Título: Stephanie Roberts, Jude Callins, Juan Carlos del Pozo y Yongbiao Xue.

FINANCIAMIENTO

Para la realización de este Seminario de Título se contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT 1120289 que tiene como Jefe de Proyecto a la Dra. Lorena Beatriz Norambuena Morales.

Para la asistencia a Congresos en que se expuso los resultados de este Seminario de Título se contó con el apoyo de las Becas para estudiantes de pregrado otorgadas por la Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular de Chile el año 2013 y 2014. Además se contó con la Beca de ayuda estudiantil que otorga la Dirección de Asuntos Estudiantiles de la Facultad de Ciencias de La Universidad de Chile el año 2013.

ÍNDICE

BIOGRAFÍA.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
FINANCIAMIENTO.....	vi
ÍNDICE.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xv
ABREVIATURAS.....	xvi
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xx
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Sistema radicular en <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
1.2 Auxinas, hormonas reguladoras de la formación de raíces laterales.....	7
1.3 Herramientas para la detección de la formación de raíces laterales.....	10
1.4 Efectos fisiológicos de Sortin2 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	11
1.5 Planteamiento del Problema.....	13
1.6 Hipótesis.....	15
1.7 Objetivo General.....	15
1.8 Objetivos Específicos.....	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
2.1 Líneas de semillas.....	16
2.2 Estratificación y esterilización de semillas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
2.3 Crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	17

2.4 Análisis de la formación de raíces laterales en distintas mutantes en la organogénesis de raíces laterales bajo tratamiento con Sortin2.....	18
2.4.1 Tratamientos con Sortin2 en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.4.2 Análisis de la formación de raíces laterales en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.5 Evaluación de la iniciación de raíces laterales utilizando las líneas pDR5::GUS y pCycB1;1::GUS.....	20
2.5.1 Ensayo histoquímico de la actividad GUS.....	21
2.6 Análisis del efecto de Sortin2 sobre las células del periciclo de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2.6.1 Análisis del efecto de Sortin2 sobre la inducción de primordios en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
2.6.2 Análisis del efecto de Sortin2 sobre la inducción de primordios de novo en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.6.3 Análisis del efecto de Sortin2 sobre la inducción de la diferenciación de células del periciclo a células fundadoras en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
2.7 Análisis Estadístico.....	24
3: RESULTADOS.....	26
3.1 Efecto de la inducción de raíces laterales por Sortin2 en mutantes de las distintas etapas de la organogénesis de las raíces laterales.....	26
3.1.1 Búsqueda bibliográfica de genes involucrados en la formación de raíces laterales.....	26

3.1.2. Evaluación del efecto inductor de raíces laterales que posee Sortin2 en ecotipos de la línea silvestre.....	29
3.1.3. Evaluación del efecto inductor de primordios de raíces laterales que posee Sortin2 en mutantes con defectos en la etapa de iniciación de la formación de raíces laterales.....	32
3.1.4. Evaluación del efecto inductor de raíces laterales que posee Sortin2 en mutantes con defectos en la etapa del desarrollo de la formación de raíces laterales.....	36
3.1.5. Evaluación del efecto inductor de raíces laterales que posee Sortin2 en mutantes con defectos en la emergencia de la formación de raíces laterales.....	39
3.2 Evaluación de la inducción de eventos moleculares claves para la inducción de raíces laterales por Sortin2.....	42
3.2.1 Evaluación del efecto de Sortin2 en la inducción de eventos mitóticos tempranos asociados a la iniciación de raíces laterales en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
3.2.2 Evaluación del efecto de Sortin2 en la inducción de máximos de auxina en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
3.2.3 Evaluación de los eventos de diferenciación de células del periciclo a células fundadoras por Sortin2.....	50
3.3 Evaluación de la inducción de la diferenciación de las células del periciclo por el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2.....	52
3.3.1 Análisis del efecto local de Sortin2 sobre la inducción de raíces laterales.....	52

3.3.2. Evaluación del efecto local de Sortin2 sobre la inducción de eventos de formación de raíces laterales.....	60
4. DISCUSIÓN.....	63
4.1 Mutantes con defectos en la etapa de iniciación de la formación de las raíces laterales son resistentes al efecto de Sortin2.....	64
4.2 Sortin2 induce eventos mitóticos tempranos asociados a la iniciación de raíces laterales en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	67
4.3 El mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 promueve la diferenciación de las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales.....	72
4.4 Sortin2 ejercería un efecto hormonal que provoca la iniciación de raíces laterales.....	77
5. CONCLUSIONES.....	80
6. PROYECCIONES.....	81
7. PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	83
8. BIBLIOGRAFÍA.....	84
9. ANEXOS.....	95
I. Lista de mutantes y líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que presentan defectos en la formación de raíces laterales.....	95
II. Sensibilidad a Sortin2 de mutantes con defectos en la etapa de desarrollo de formación de raíces laterales.....	100
III. Sensibilidad a Sortin2 de mutantes con defectos en la etapa de emergencia de raíces laterales.....	101

IV. Plántulas de la línea pDR5::GUS germinadas en MS-agar, en tratamiento control y Sortin2 por 24, 48 y 72 horas.....	102
V. Plántulas de la línea pCycB1;1::GUS germinadas en MS-agar, en tratamiento control y Sortin2 por 24, 48 y 72 horas.....	103
VI. Plántulas de la línea pDR5::GUS germinadas en NPA en tratamiento control y Sortin2 por 24, 48 y 72 horas.....	105
VII. Plántulas de la línea pCycB1;1::GUS germinadas en NPA en tratamiento control y Sortin2 por 24, 48 y 72 horas.....	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Raíz Primaria de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	3
Figura 2: Zonas de desarrollo de la raíz primaria en <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	3
Figura 3: Estados del desarrollo de primordio de raíz lateral.....	5
Figura 4: Etapas de formación de raíces laterales.....	6
Figura 5: Estructura química del compuesto Sortin2.....	12
Figura 6: Esquema general de la metodología utilizada en este Seminario de Título.....	25
Figura 7: Búsqueda bibliográfica de genes involucrados en la formación de raíces laterales y de sus mutantes con defectos en las raíces laterales.....	28
Figura 8: Los ecotipos silvestres Col-0 y Ws son sensibles a la formación de primordios de raíces laterales y raíces laterales emergidas inducidas por tratamientos con Sortin2.....	31
Figura 9: Mutantes con defectos en la etapa de iniciación de la formación de las raíces laterales son resistentes al efecto de Sortin2.....	34
Figura 10: Mutantes con defectos en la etapa de desarrollo de formación de raíces laterales son resistentes a Sortin2.....	38
Figura 11: <i>lox5-1</i>, mutante con defecto en la etapa de emergencia de la formación de raíces laterales, sería parcialmente resistente a Sortin2.....	41

Figura 12: Sortin2 induce eventos mitóticos tempranos asociados a la iniciación de raíces laterales en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>.....	45
Figura 13: Sortin2 induce eventos máximos de auxina <i>de novo</i>.....	48
Figura 14: Sortin2 induce la actividad del promotor del factor de transcripción GATA23.....	51
Figura 15: Sortin2 induce la formación de raíces laterales localmente.....	55
Figura 16: Sortin2 induce la formación de raíces laterales independiente de su presencia en el meristema basal de la raíz principal.....	58
Figura 17: Sortin2 induce la diferenciación de las células del periciclo.....	62
Figura 18: Modelo propuesto para el mecanismo de formación de raíces laterales promovido por Sortin2.....	67
Figura 19: Sortin2 induce más eventos de proliferación celular que eventos máximos de auxina.....	71
Figura 20: Modelo propuesto para el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 es capaz de diferenciar las células del periciclo a células fundadoras independiente del complejo receptor SCF^{TIR1/AFBs}.....	74
Figura 21: Mutantes con defectos en la etapa de desarrollo de formación de raíces laterales son resistentes a la inducción de raíces laterales emergidas por Sortin2.....	100

Figura 22: <i>lax3</i>, mutante con defecto en la etapa de emergencia de la formación de raíces laterales, es hipersensible a Sortin2.....	101
Figura 23: Morfología de plántulas de la línea pDR5::GUS en tratamientos controles y con Sortin2.....	102
Figura 24: Actividad del promotor CycB1;1 en tratamientos controles y con Sortin2.....	103
Figura 25: Actividad del promotor DR5 en plántulas que luego de ser germinadas y crecidas en NPA fueron sometidas a tratamientos controles y con Sortin2.....	105
Figura 26: Actividad del promotor CycB1;1 en plántulas que luego de ser germinadas y crecidas en NPA fueron sometidas a tratamientos controles y con Sortin2.....	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Lista de mutantes y líneas transgénicas de <i>Arabidopsis</i> que presentan defectos en la formación de raíces laterales.....	95
---	-----------

ABREVIATURAS

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GFP	Green fluorescent protein o proteína fluorescente verde
GUS	Enzima β -glucuronidasa
G1	Fase del ciclo celular denominada Growth 1
G2	Fase del ciclo celular denominada Growth 2
LR/RL	Lateral roots o raíces laterales
LRIS	Lateral root-inducible system o sistema inducible de raíces laterales
M	Fase de ciclo celular denominada Mitosis
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NPA	ácido N-1-naftilalámico
pCycB1;1	Promotor endógeno del gen CycB1;1
pDR5	Promotor sintético inducible por auxina
RFP	Red fluorescent protein o proteína fluorescente roja
S	Fase del ciclo celular denominada Síntesis
SAP	Segregated agar plates o placas de agar segmentado

SCF	Complejo contenedor de las proteínas Skp, Cullin y F-box
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
WT	Wildtype o silvestre
X-gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic acid, cyclohexylammonium salt
35S	Promotor constitutivo 35S del virus mosaico de la coliflor

RESUMEN

Las plantas son plásticas y modulan su desarrollo postembrionariamente en respuesta a las condiciones ambientales. Las raíces constituyen un órgano fundamental para la fisiología de la planta, el que pueden modular y desarrollar diferentes arquitecturas radiculares. Las células del periciclo de la raíz principal se diferencian a células fundadoras de raíces laterales (RL), las que siguen un programa de división celular estrictamente organizado para originar un primordio de RL. Recientemente, por medio del compuesto sintético Sortin2, se publicó que la inducción de la endocitosis promueve la formación de RL por un mecanismo independiente del receptor canónico de auxina. Evidencias preliminares sugerían que Sortin2 afecta etapas tempranas en la formación de RL. Por lo que este seminario de título propuso que *el mecanismo de formación de RL gatillado por Sortin2 induce un evento previo a la etapa de iniciación de RL, provocando el cambio en el destino de las células del periciclo en Arabidopsis thaliana.* Se utilizaron estrategias genéticas y moleculares. El análisis de mutantes con defectos conocidos en la formación de las RL, mostró que mutantes en la iniciación de RL eran resistentes al efecto inductor de RL de Sortin2. Además, utilizando líneas transgénicas reporteras, se evidenció que Sortin2 induce eventos moleculares claves para la iniciación de RL, específicamente la expresión del factor de transcripción que controla la identidad de células fundadoras, GATA23, de la ciclina dependiente de quinasa que marca división celular, CycB1;1 y promueve la actividad GUS comandada por el promotor sintético que responde a auxina, DR5. Consistentemente, el tratamiento local con Sortin2 promueve *de novo* la diferenciación de las células del periciclo a células fundadoras de RL. En general, nuestros resultados sugieren fuertemente la existencia de un programa distinto de formación de RL, que gatillaría Sortin2 a través de un evento

río arriba de la iniciación de RL, promoviendo la especificación de células fundadoras de RL, lo que culminaría en la remodelación de la arquitectura radicular en *A. thaliana*.

ABSTRACT

Plants are plastic modulating their development postembryonically in response to changes in environmental conditions. Roots constitute a fundamental organ for plant physiology which can modulate the development of root architecture. Main root pericycle cells become lateral root (LR) founder cells that follow a strictly organized cell division program to originate a LR primordium. Recently, by means of the synthetic compound Sortin2, it was reported that induction of endocytosis promotes the formation of LR by a mechanism independent of canonical auxin receptor. Preliminary evidence suggested that Sortin2 affects early stages in LR formation. Therefore this work proposes that the mechanism of LR formation triggered by Sortin2 induces a pre-initiation stage of LR formation, causing the change of cell fate in root pericycle cell in *Arabidopsis thaliana*. Genetic and molecular strategies were taken. The analysis of known mutants with defects in different stages of LR formation showed that mutants with defects on LR initiation are resistant to Sortin2. Furthermore, using transgenic reporter lines evidenced that Sortin2 induces key molecular events in LR initiation, specifically expression of transcription factor GATA23, which control lateral root founder cell specification; cyclin-dependent protein kinase CycB1;1, that marks cellular divisions and the activity of the auxin-responsive synthetic promoter DR5. Consistently the local treatment with Sortin2 promotes *de novo* differentiation of root pericycle cells to LR founder cells. Overall, our results strongly suggest the existence of a distinctive program of LR formation that would trigger Sortin2 through an event upstream of the initiation of LR, promoting founder cell specification which culminate on root architecture remodeling in *A. thaliana*.

INTRODUCCIÓN

A diferencia de los animales, las plantas son organismos sésiles y plásticos. Esta última característica les ofrece una amplia gama de ventajas, ya que son capaces de modificar su estructura post-embriónariamente para responder a cambios en las condiciones ambientales a las que se enfrentan (Laplaze y col., 2007; Malamy, 2005). Vale decir, se propone que las plantas son capaces de desarrollar sus estructuras en la posición en que puedan aprovechar eficazmente la disponibilidad de agua, nutrientes y luz solar (Giehl y col., 2012; Lima y col., 2010; Linkohr y col., 2002; Remans y col., 2006; Zhang y Forde-1998).

Arabidopsis thaliana es una planta dicotiledónea miembro de la familia *Brassicaceae* y es utilizada como organismo modelo en biología vegetal, puesto que posee atributos naturales como el que es una planta pequeña, fácil de manipular, su ciclo de vida es corto, se autopoliniza y produce un alto número de progenie (>1000 semillas por planta). Su genoma está secuenciado (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) y con ello se dispone de un extensivo mapa genético y físico de los 5 cromosomas que posee. Las plantas de *A.thaliana* pueden transformarse eficientemente utilizando *Agrobacterium tumefaciens* y un amplio número de líneas mutantes y recursos genómicos se han generado. La base de recursos de *Arabidopsis* que se ha producido, se organiza y presenta en la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org>), y los stocks de semillas y clones de DNA se distribuyen en el *Arabidopsis* Biological Resource Center (<http://abrc.osu.edu>) y en el European *Arabidopsis* Stock Center (<http://arabidopsis.info>) (Haughn y Kunst, 2010).

El estado embrionario de las plantas dicotiledóneas está compuesto por una radícula, hipocotilo y dos cotiledones (Mayer y *col.*, 1993). La radícula es la raíz embrionaria (Berg, 2007). El hipocotilo corresponde a la porción de vástago del embrión por debajo del punto de unión pero por encima de la radícula (Berg, 2007). Los cotiledones se describen como hojas primordiales que almacenan almidón y proteínas para el embrión (Berg, 2007).

1.1 Sistema radicular en *Arabidopsis thaliana*

La radícula una vez que emerge comienza a desarrollar la raíz primaria (Berg, 2007). Ésta última consiste en un haz vascular rodeado por la primera capa de la estela llamada periciclo. La corteza rodea al cilindro central y está compuesta por la exodermis, el parénquima cortical y la endodermis (Figura 1). La epidermis recubre toda la raíz. La caliptra es una capa de células que recubre la endodermis en el ápice de la raíz (Taiz & Zeiger, 2002).

A lo largo de la raíz primaria se han descrito tres zonas de desarrollo (Ishikawa & Evans, 1995; Figura 2), la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de maduración (Taiz & Zeiger, 2002). La zona meristemática se divide en meristema apical, en donde las células que surgen cerca del centro quiescente sufren rondas adicionales de división (Taiz & Zeiger, 2002), y en meristema basal, donde la tasa de división celular es menor y predomina la expansión de las células (De Smet y *col.*, 2007). La zona de elongación implica la parte en donde las células crecen rápido y en extenso (Taiz & Zeiger, 2002). La zona de maduración es la región en que las células se diferencian, por lo que estas células han detenido su división y elongación (Taiz & Zeiger, 2002).

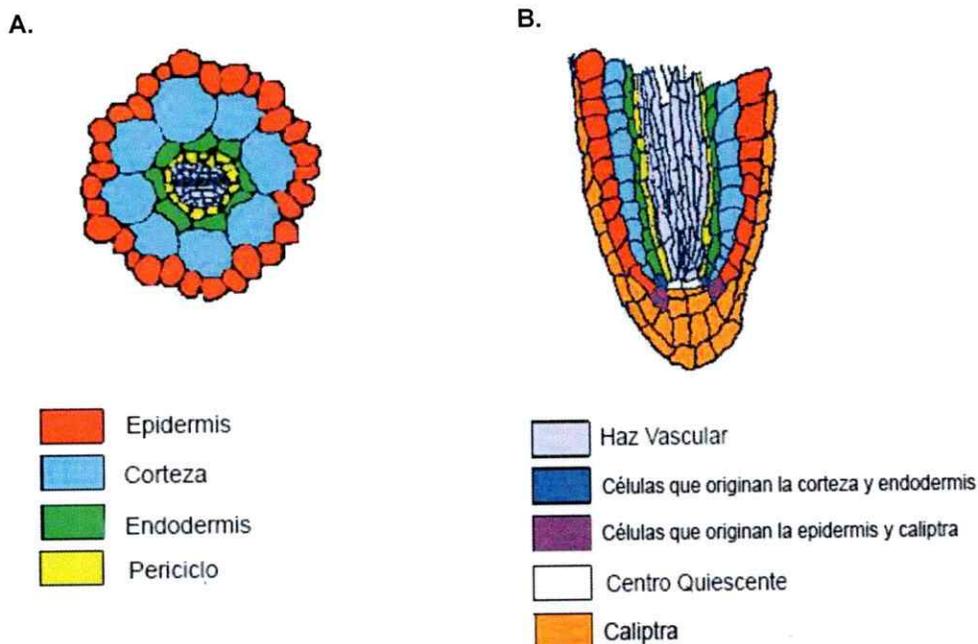


Figura 1: Raíz Primaria de *Arabidopsis thaliana*. Representación esquemática de la sección transversal (A) y sección longitudinal (B) de la raíz primaria. Se distinguen los tipos celulares que conforman la raíz primaria: epidermis (rojo), corteza (celeste), endodermis (verde), periciclo (amarillo), haz vascular (gris), células que dan origen a la corteza y endodermis (azul), células que dan origen a la epidermis y a la caliptra (morado), centro quiescente (blanco) y la caliptra (anaranjado). (Figura modificada desde Malamy & Benfey, 1997)



Figura 2: Zonas de desarrollo de la raíz primaria en *Arabidopsis thaliana*. A lo largo de la raíz primaria se pueden distinguir tres zonas de desarrollo en que ocurren procesos determinados de división, elongación y diferenciación celular: la zona meristemática, que se subdivide en meristema apical y meristema basal, la zona de elongación y la zona de maduración. La imagen representa la raíz principal de una plántula de 5 días post-germinación. Barra de escala indica 1 mm. QC: Centro quiescente (Figura modificada desde Bargmann y col., 2013).

Las raíces laterales son órganos post-embriónicos que se originan a partir de las células fundadoras del periciclo *adyacentes a los polos del xilema* (Beeckman y col., 2001; Dubrovsky & Doerner, 2000; Laskowski, 2013). Estos órganos 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. *Las raíces laterales*, junto a la raíz principal y pelos radiculares, constituyen el sistema radicular de las plantas (Lynch, 1995). La disponibilidad de nutrientes puede producir un impacto en la arquitectura del sistema radicular, alterando el número, largo, ángulo y diámetro de raíces y pelos radiculares (Forde, 2002; López-Bucio y col., 2003; Malamy, 2005; Osmont y col., 2007). Se ha propuesto que las plantas desarrollan sus raíces dependiendo de las condiciones ambientales para favorecer su supervivencia y de esta manera pueden responder a disponibilidades heterogéneas de recursos (Giehl y col., 2012; Lima y col., 2010; Linkohr y col., 2002; Remans y col., 2006; Zhang y Forde, 1998). Por ejemplo, en condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno, la planta estimula el largo de la raíz principal y la elongación de las raíces laterales (Linkohr y col., 2002; López-Bucio y col., 2003).

Las raíces laterales se inician cuando células fundadoras del periciclo sufren varias rondas de divisiones anticlinales para crear un primordio de raíz lateral compuesto por diez células de igual longitud (estado I). A continuación, las células del primordio de raíz lateral se dividen periclinalmente, formando una capa interior y una capa exterior (estado II). Sucesivas divisiones anticlinales y periclinales crean un primordio en forma de cúpula (estados III-VII) el que finalmente emerge (estado VIII) de la raíz primaria, lo que se conoce como raíz lateral emergida (Figura 3) (Malamy & Benfey 1997).

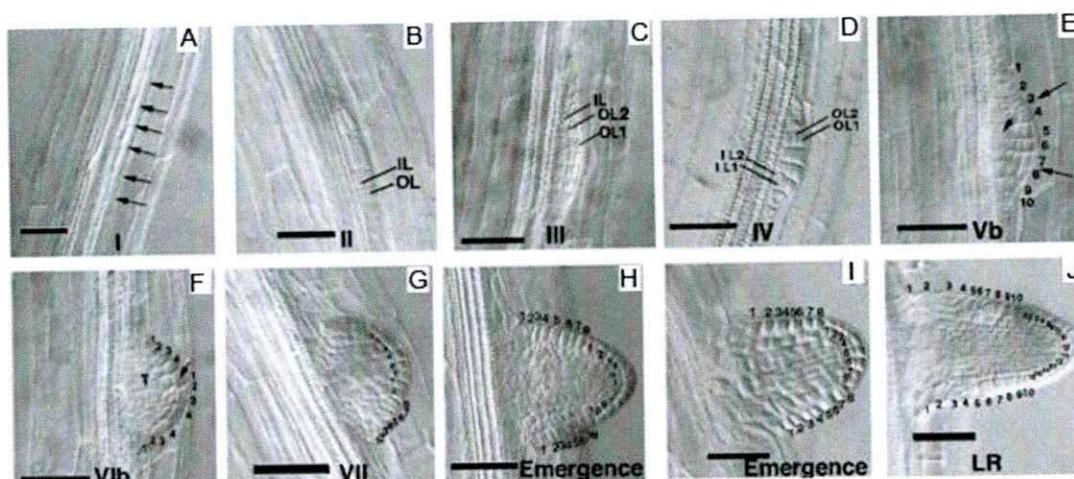


Figura 3: Estados del desarrollo de primordio de raíz lateral. (A) Estado I. Las flechas indican la pared celular de nuevas células que se dividen anticlinalmente en el periciclo. (B) Estado II. La primera división periclinal divide al primordio de raíz lateral en dos capas, capa interna (IL) y capa externa (OL). (C) Estado III. La división periclinal en la capa externa crea tres capas celulares. (D) Estado IV. La división periclinal en la capa interna da paso a la formación de cuatro capas celulares. (E) Estado Vb. Las flechas indican dos divisiones adicionales en las capas externas 1 (OL1) y 2 (OL2). La flecha corta indica la región en donde la capa interna 2 (IL2) comienza a expandir y dividir sus células. Los números indican a las células en la capa más externa, demostrando que existe una organización constante en este estado. (F) Estado Vlb. Cuatro células centrales en la capa externa 1 se dividen periclinamente generando otra fila de células (flecha). La numeración muestra que hay cuatro células en la capa externa 1 a cada lado de cuatro células centrales. La capa externa 1 se considera como el interior de estas dos capas de células centrales en división. Las puntas de flecha indican a las células elongadas reminiscentes de los elementos vasculares. (G) Estado VII. Todas las células en la capa externa 1 se han dividido anticlinalmente, como se evidencia por la forma de la célula y el aumento en el número de células en esta capa. Esto da el patrón característico de 8-8-8 células. (H, I) Raíz lateral emergida o Estado VIII. Se denota que las células en la capa externa 1 son alargadas. El número de células cercanas al ápice se ha incrementado ligeramente, indicando potencialmente las primeras divisiones de las células iniciales meristemáticas. (J) Raíz Lateral. Las células basales tienen un mayor tamaño en la capa externa 1. La numeración de la célula indica el número de células en esta capa cerca de la punta de la raíz, esto es consistente con la presencia del meristema activo de la raíz lateral. Barras de tamaño indican 50 μm (Adaptado desde Malamy & Benfey, 1997).

La formación de raíces laterales presenta a nivel molecular las siguientes etapas de desarrollo (Figura 4): **Priming**, en donde las células del periciclo adyacentes a los polos del xilema entran en una serie de eventos en que determinadas células adquieren la identidad de células fundadoras de raíces laterales, antes del estado I en la Figura 3 (De

Smet y col., 2007). **Iniciación**, es el inicio del proceso de señalización inducido por auxina en las células fundadoras. Este paso incluye la primera división anticlinal y asimétrica de estas células (Péret y col., 2009). **Desarrollo de primordios de raíces laterales**, la primera división anticlinal y asimétrica crea dos células hijas pequeñas que continúan con sucesivas y ordenadas divisiones periclinales y anticlinales, dando lugar un primordio de raíz lateral flanqueado por dos células que son más largas (Estado I en Figura 3, Malamy & Benfey, 1997; Casimiro y col., 2001). **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 (Estado VIII o "emergence", Figura 3). Esta etapa incluye la activación inducida por auxina de la actividad de remodelamiento de la pared celular de las células de la raíz principal con el fin de facilitar el proceso de emergencia (Swarup y col., 2008).

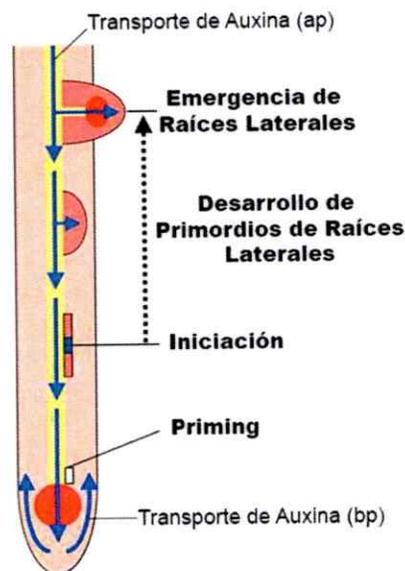


Figura 4: Etapas de formación de raíces laterales. 1. Las células del periciclo se ven sometidas a un "priming" en el que son destinadas a células fundadoras de raíces laterales en el meristema basal. 2. Iniciación del primordio de raíz lateral, en donde ocurre la primera división anticlinal de las células fundadoras. 3. Desarrollo del primordio de raíz lateral. 4. Emergencia del primordio de

raíz lateral. Tanto el transporte de auxina basipétalo (bp) como el acropétalo (ap) son requeridos para la formación de raíces laterales. Los meristemas apicales de la raíz primaria y de las raíces laterales son representados como óvalos rojos. (Modificada desde Fukaki & Tasaka, 2009)

En *Arabidopsis*, los primordios de raíces laterales se inician siempre acropetalmente, es decir, nuevos eventos de iniciación tienen lugar en la dirección del ápice de la raíz (Fahn, 1974).

1.2 Auxinas, hormonas reguladoras de la formación de raíces laterales

Las auxinas son hormonas vegetales que regulan muchos aspectos del desarrollo y crecimiento de plantas (Reinhardt y col., 2000; Reinhardt y col., 2003; Tanaka y col., 2006). La auxina predominante en las plantas es el ácido indolacético (Frankenberger & Arshad, 1995). Se ha descrito que esta hormona es 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; Laskowski y col., 1995). Se ha reportado que la aplicación exógena o sobreproducción endógena de auxinas induce el desarrollo de primordios de raíces laterales (Dubrovsky y col., 2008). Se ha reportado que la biosíntesis de IAA se lleva a cabo en todos los tejidos vegetales, sin embargo la síntesis de IAA se encuentra asociada principalmente a los tejidos en rápido crecimiento y división, como lo son los meristemas apicales, las hojas jóvenes, los frutos, las semillas y las raíces (Taiz & Zeiger, 2002). La auxina es transportada por los tejidos a través del floema o del transporte célula a célula. Los efectos en distintos procesos del desarrollo se han relacionado principalmente a un gradiente de concentración de auxina (Forestan & Varotto, 2012). Inhibidores del transporte de auxina causan la acumulación de ésta en el ápice de la raíz, deteniendo el desarrollo de raíces laterales en etapas muy tempranas, bloqueando la división celular (Casimiro y col., 2001).

La vía canónica de señalización de auxina activa la familia de factores de transcripción denominados factores de respuesta a auxinas (ARF), los que se unen al promotor de genes que responden ante la presencia de auxina (Ulmasov y *col.*, 1997). Los ARF 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^{TIR}, que induce la ubiquitinación y degradación de proteínas AUX/IAA mediante el proteosoma 26S y, por ende, la desinhibición de los ARF, permitiendo de este modo la expresión de genes regulados por auxina, para así establecer un programa particular de desarrollo (Gray y *col.*, 2001).

Se ha reportado que la auxina derivada desde la parte aérea que se transporta al ápice de la raíz a través del floema y, siguiendo el modelo de fuente invertida, es retornada a la zona del meristema basal, siendo ésta la que determina parte del *priming* de las células fundadoras de raíces laterales (Lucas y *col.*, 2008). Además se ha evidenciado que existen diversos módulos de auxina a lo largo de la raíz principal que determinan diferentes procesos involucrados en la formación de raíces laterales. Un módulo consiste en un represor Aux/IAA que regula la respuesta a auxina interactuando con los factores de respuesta a auxina ARFs (De Rybel y *col.*, 2010). El módulo de auxina IAA28-ARFs activa al factor de transcripción GATA23 (De Smet y *col.*, 2007), el cual se ha propuesto como el factor clave que especifica la identidad de las células del periciclo a células fundadoras (De Rybel y *col.*, 2010).

En la iniciación de raíces laterales se ha descrito que la auxina induce la expresión de genes del ciclo celular, incluyendo ciclinas y ciclinas dependiente de quinasas (Boniotto & Gutiérrez, 2002) y al mismo tiempo, reprime a los represores que inhiben la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular en los primordios de raíces laterales emergidas

(Fukaki y *col.*, 2007). La regulación coordinada de genes que codifican para facilitadores de influjo y eflujo de auxinas (AUX1 y PINs) en el primordio de raíz lateral y en tejidos que lo rodean han mostrado que optimizan los requerimientos de auxinas para inducir la iniciación de raíces laterales (Laskowski y *col.*, 2008; Lewis y *col.*, 2007; Marhavy y *col.*, 2013). Además se ha demostrado que al inhibir el transporte polar de auxina con ácido naftiltalámico (NPA) es suficiente para reprimir la iniciación de raíces laterales (Casimiro y *col.*, 2001).

Se ha reportado que en la etapa de desarrollo de las raíces laterales, las auxinas se transportan y acumulan en las células centrales del primordio y luego en el ápice de los primordios de raíces laterales (Benková y *col.*, 2003), activando al módulo de auxina IAA14-ARF7/ARF19, que consecutivamente induce la transcripción de factores de transcripción Lateral Organ Boundaries Domain (LBD), como LBD16 y LBD29 (Goh y *col.*, 2012; Lee y *col.*, 2009; Okushima y *col.*, 2005).

Para emerger desde la raíz primaria, los primordios de raíces laterales deben atravesar tres capas celulares de la raíz primaria: endodermis, corteza y epidermis (Swarup y *col.*, 2008). Este proceso es finamente regulado por la auxina que se produce en la parte aérea y es transportada a la raíz a través del floema (Marchant y *col.*, 2002; Swarup y *col.*, 2008). También, participa en esta etapa la auxina sintetizada por el desarrollo de primordios de raíces laterales, induciendo la cascada de señalización basada en SHY2/IAA3 en la endodermis y la cascada de señalización IAA14-ARF7/ARF19 en la corteza y la epidermis (Swarup y *col.*, 2008). ARF7 y ARF19 inducen la expresión de un gen que codifica para el facilitador de influjo de auxina LIKE-AUX1 (LAX3) (Swarup y *col.*, 2008), creando un bucle de retroalimentación positivo reforzando el influjo de auxina en las células más cercanas a la emergencia del primordios de raíces laterales (Swarup

y *col.*, 2008). Además, una serie de genes que codifican para enzimas remodeladoras de pared celular son inducidas por auxina de una manera dependiente de LAX3, promoviendo la separación de las células (Laskowski y *col.*, 2006; Lee y *col.*, 2012). Por otra parte, se provocan cambios en las propiedades hidráulicas, inducidos por auxina, para facilitar la emergencia de primordios de raíces laterales (Péret y *col.*, 2012).

1.3 Herramientas para la detección de la formación de raíces laterales

Para poder detectar las distintas etapas de la formación de raíces laterales se utilizan diversas líneas reporteras. Entre éstas, la línea transgénica pDR5::GUS que expresa el gen de la proteína GUS bajo el control del promotor sintético DR5, el cual responde a auxina (Ulmasov y *col.*, 1997). Se ha demostrado que la actividad de esta línea reportera se correlaciona con el contenido de auxina en la raíz primaria (Casimiro y *col.*, 2001). Además se ha visualizado la actividad DR5 en la formación de raíces laterales, encontrándose que en el estado anterior al estado I del desarrollo del primordio de raíz lateral (Fig.3), la actividad DR5 sólo se detectó en las células que darán origen al primordio de raíz lateral en el periciclo (Benková y *col.*, 2003). Después de la primera división anticlinal (estado I, Fig.3), se detectó actividad del promotor DR5 en todas las células que se dividieron. Cuando las capas exterior e interior se establecieron por divisiones periclinales (estado II, Fig. 3), la actividad del promotor sin embargo, se limita a las células centrales derivadas de ambas capas. Durante la progresión del primordio a estados posteriores (III al VIII, Fig. 3), un gradiente en la actividad DR5 se estableció gradualmente con un máximo en el ápice del primordio (Benková y *col.*, 2003). Por lo que, la activación del promotor de respuesta a auxina DR5 en las células fundadoras de la raíz lateral es uno de los marcadores más tempranos para la iniciación de primordios de raíces laterales, precediendo la primera división anticlinal (Benková y *col.*, 2003). En

tanto, la línea transgénica pCycB1;1::GUS expresa GUS bajo el promotor de CycB1;1, el cual es promotor del gen que codifica para una ciclina dependiente de quinasa y funciona como un efector en el control del ciclo celular en la transición de la fase G2 a la fase M (Ferreira y col., 1994). Se ha reportado que las células fundadoras del periciclo mantienen una activa división celular en la zona de iniciación y desarrollo de primordios de raíces laterales (Himanen y col., 2002). Por lo que, la activación de este promotor de actividad mitótica puede visualizarse desde la primera división anticlinal en las células fundadoras del periciclo (De Smet y col., 2007).

1.4 Efectos fisiológicos de Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*

Sortin2 (Figura 5) es un compuesto químico de bajo peso molecular que se identificó en un screening de genómica química, por interferir en la destinación a la vacuola de la proteína carboxipeptidasa Y en *Saccharomyces cerevisiae* y *Arabidopsis thaliana* (Zouhar y col., 2004).

En *Arabidopsis* también se ha visto que Sortin2 afecta el desarrollo de la raíz principal (Zouhar y col., 2004). Además Sortin2 incrementa el número de raíces laterales a través de un proceso que es independiente del complejo receptor de auxina SCF^{TIR} (Pérez-Henríquez y col., 2012). Se ha demostrado que mutantes defectuosas en componentes intracelulares de la vía de señalización canónica de auxina muestran un incremento en la densidad de raíces laterales bajo tratamiento con Sortin2 semejantes al incremento provocado en plántulas de la línea silvestre (Pérez-Henríquez y col., 2012). Sortin2 no modifica la señal del reportero de respuesta transcripcional de auxina pDR5::GUS, por lo que se sugiere que este compuesto bioactivo no modificaría los niveles de auxina presentes en la planta (Pérez-Henríquez y col., 2012). Estas evidencias indican que el

mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 es independiente de la activación transcripcional inducida por auxina y de la señalización intracelular de esta fitohormona (Pérez-Henríquez y *col.*, 2012).

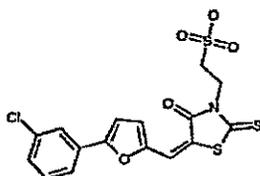


Figura 5: Estructura química del compuesto Sortin2. Sortin2 es un compuesto químico sintético de baja masa molecular que fue identificado desde una librería química de 4.800 compuestos. La estructura de este compuesto que consta de una región polar dada por el grupo sulfito, y una región apolar dada principalmente por el cloro-benceno (Norambuena y *col.*, 2008).

En nuestro laboratorio se ha estudiado la progresión temporal de la inducción de raíces laterales por Sortin2 utilizando la línea reportera pCycB1;1::GUS, evidenciado que el tratamiento con Sortin2 25 µg/mL por 24 horas es capaz de inducir un aumento en la densidad de primordios CycB1;1 positivos. Además se ve que en tratamientos más largos con Sortin2 la densidad de raíces laterales emergidas CycB1;1 positivas incrementa (Pérez-Henríquez y *col.*, 2013). En esa condición se encontró además que el número de primordios decae al aumentar las horas de tratamiento lo que se correlaciona con que las raíces laterales emergidas incrementan. Esto estaría dando cuenta de un desarrollo de estos primordios que evoluciona a raíces laterales emergidas por efecto del compuesto Sortin2. Esta evidencia sugiere fuertemente que Sortin2 estaría afectando etapas tempranas de la formación de raíces laterales, ya que se ha descrito que el promotor de CycB1;1 puede visualizarse desde la etapa de iniciación de la formación de raíces laterales (De Smet y *col.*, 2007).



1.5 Planteamiento del Problema

En contraste con el propuesto rol de auxina como señal de especificación de células fundadoras de raíces laterales, se ha propuesto que auxina actúa como una señal de activación de la división de las células fundadoras de raíces laterales, ya que en la mutante *alf4*, las células fundadoras de raíces laterales están especificadas y reciben la señal de activación, sin embargo, debido a defectos mitóticos, no son capaces de dividirse coordinadamente. Adicionalmente, la expresión y localización de la proteína ALF4 parecen ser independientes de la señalización de auxina (DiDonato y col., 2004), sugiriendo que existen señales de activación adicionales a las de la vía de señalización canónica de auxina.

Por otra parte y como se comentó anteriormente, el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 es independiente del complejo receptor de auxina SCF^{TIR} (Pérez-Henríquez y col., 2012). Tratamientos con Sortin2 por 24 horas inducen un aumento en la densidad de primordios CycB1;1 positivos sin cambiar el patrón de distribución de auxina (Pérez-Henríquez y col., 2013). Esto hace suponer que lo que podría estar haciendo este compuesto es inducir eventos más tempranos que la acumulación de auxina en el sitio de *priming*.

En base a lo que se conoce de la formación de raíces laterales se puede proponer un diseño experimental que permita identificar cuál es el paso de la formación de raíces laterales que estaría alterando el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2. Además, si este compuesto químico está induciendo tempranamente la formación de raíces laterales, este mecanismo nos puede entregar información acerca de la inducción de eventos previos a la etapa de iniciación de raíces laterales.

En este trabajo proponemos 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 *Arabidopsis thaliana*. Para poder comprobar esta hipótesis se presenta la siguiente estrategia experimental: se evaluará el efecto de Sortin2 en las distintas etapas de la organogénesis de las raíces laterales utilizando una herramienta genética como lo es el uso de mutantes con defectos conocidos en la formación de las raíces laterales. Además, se estudiará la inducción de eventos moleculares claves para el mecanismo de formación de raíces laterales promovido por Sortin2, como la expresión de GATA23, CycB1;1 y DR5. Por último, se evaluará la capacidad del mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 para promover la diferenciación de las células del periciclo de manera de evaluar si el tratamiento local con Sortin2 induce raíces laterales.

1.6 Hipótesis

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 *Arabidopsis thaliana*.

1.7 Objetivo General

Determinar el efecto de Sortin2 en las distintas etapas de la organogénesis de raíces laterales y en la diferenciación de células del periciclo.

1.8 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto de Sortin2 en las distintas etapas de la organogénesis de las raíces laterales.
2. Estudiar la inducción de eventos moleculares claves para el mecanismo de formación de raíces laterales promovido por Sortin2.
3. Evaluar la capacidad de Sortin2 para promover la diferenciación de las células del periciclo.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Líneas de semillas

Se utilizaron líneas de semillas de *Arabidopsis thaliana* de tipo silvestre ecotipo Columbia-0 (Col-0) y Wassilewskija (Ws). Además se usaron las líneas transgénicas pDR5::GUS (Ulmasov y col., 1997), pCycB1;1::GUS (Ferreira y col., 1994), 35S::PID21 (Benjamins y col., 2001), 35S::PIN1 (Benková y col., 2003), 35S::KRP2 (Himanen y col., 2002), 35S::NAC2 (He y col., 2005), pRBR::RBR-RFP (Ingouff y col., 2006) y las líneas mutantes *axr1-30* (Hotton y col., 2011), *cul1-2* (Alonso y col., 2003), *cul1-6* (Moon y col., 2007), *axr4-1* (Hobbie y Estelle, 1995), *axr4-2* (Hobbie y Estelle, 1995), *aux1-21* (Swarup y col., 2004), *lax3* (Swarup y col., 2008), *pin1-201* (Alonso y col., 2003), *pin3pin7* (Benková y col., 2003), *pin3-4* (Benková y col., 2003), *pin3pin4* (Benková y col., 2003), *pin3-5* (Benková y col., 2003), *pin4-1* (Benková y col., 2003), *pin4pin7* (Benková y col., 2003), *pin7-2* (Benková y col., 2003), *pid14* (Alonso y col., 2003), *pid14wag1wag2* (Alonso y col., 2003), *acr4* (De Smet y col., 2008), *rcn1* (Deruere y col., 1999), *CA-rop2* (Li y col., 2001), *DN-rop2* (Li y col., 2001), *skp2a* (Rosso y col., 2003), *skp2b* (Alonso y col., 2003), *ceg* (Dong y col., 2006), *big* (Gil y col., 2001), *ntl8-1* (Kim y col., 2008), *axr5-1* (Yang y col., 2004), *agg-1c* (Alonso y col., 2003), *arr3arr4arr5arr6arr8arr9* (Alonso y col., 2003), *atpgp1-101* (Alonso y col., 2003), *rty1-1* (Alonso y col., 2003), *glip2-1* (Alonso y col., 2003), *lox5-1* (Alonso y col., 2003), *jdk-4* (Alonso y col., 2003), *sac9-3* (Alonso y col., 2003), *iaa12-1* (Alonso y col., 2003), *max2-2* (Alonso y col., 2003), *max2-1* (Alonso y col., 2003) y *coi1-16* (Alonso y col., 2003).

2.2 Estratificación y esterilización de semillas de *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de las líneas de *A.thaliana* utilizadas se esterilizaron mediante protocolo estándar. El protocolo consiste en: 1) Se lavaron las semillas con 1 mL de etanol 95% v/v (calidad analítica) y se agitaron durante 5 minutos a 7.245 g a 23°C. 2) Se incubaron las semillas con 1 mL de solución etanol 70% v/v Tritón 100x 0,1% v/v en el Tubes Shaker Vibrating durante 15 minutos a 7.245 g a 23°C. 3) Se lavaron con 1 mL de agua estéril 5 veces, agitando brevemente en cada lavado. 4) Se guardaron las semillas en 1 mL de agua estéril a 4°C en oscuridad durante al menos 24 horas antes de usar. El último paso se realizó con el fin de estratificar las semillas antes de ser sometidas a los tratamientos. Para asegurar la correcta esterilización de las semillas se trabajó en la cámara de flujo laminar LAMINAIRE que mantiene un ambiente estéril.

2.3 Crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Se sembraron semillas esterilizadas y estratificadas de *A.thaliana* de las líneas indicadas en la sección 2.1 en placas que contenían medio de cultivo de planta MS-agar 0,5X (Medio de cultivo Murashige y Skoog 0,22% p/v, sacarosa 1% p/v, fitoagar 0,7% p/v, mioinositol 0,01% p/v, MES 0,05% p/v, pH 5,7).

Las placas se dispusieron verticalmente para que las plántulas crecieran en la superficie del medio de cultivo. Esta metodología es recomendada cuando las plántulas van a ser manipuladas durante los tratamientos, debido a que permite traspasar la plántula de un medio a otro sin provocar mayor daño o deterioro. Todas las plántulas se cultivaron en 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 Análisis de la formación de raíces laterales en distintas mutantes en la organogénesis de raíces laterales bajo tratamiento con Sortin2

2.4.1 Tratamientos con Sortin2 en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Los tratamientos con Sortin2 se efectuaron a concentraciones de 25 µg/mL, la que se preparó a partir de una solución de stock de 20 mg/mL diluyéndola en Medio Sólido de Cultivo (MS-agar) o en Medio Líquido de Cultivo (MS-líquido). Este último tiene los mismos componentes del MS-agar excepto el gelificante fitoagar. Los medios de cultivo contienen una concentración final 1% v/v de dimetil sulfóxido (DMSO) usada como condición control para los análisis de los efectos de Sortin2. Se ha reportado que la concentración de DMSO que se utilizó no afecta el desarrollo de las plantas (Zouhar y col., 2004). Todas las soluciones con Sortin2 y DMSO 1% fueron preincubadas por 96 horas en condiciones de fotoperíodo de 16 horas luz a 22°C y 8 horas oscuridad a 16°C, con intensidad lumínica de 6.000 lux.

2.4.2 Análisis de la formación de raíces laterales en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Se trabajaron con las distintas líneas de *Arabidopsis* descritas en la sección 2.1 para indagar qué etapa de la formación de raíces laterales está afectando Sortin2 al ejercer su efecto inductor de raíces laterales. Las líneas que presentan defectos en la etapa de iniciación, cuyo parental es Columbia-0 (Col-0), son: 35S::KRP2, *axr1-30*, *cul1-2*, *cul1-6*, *axr4-2*, *aux1-21*, *max2-1*, *max2-2*, *jkd-4*, *coi1-16*, *skp2a*, *skp2b* y *ceg*. Además se analizaron las mutantes en iniciación de raíces laterales que su parental es Wassilewskija (Ws), *axr4-1* y *axr4-2*. Las líneas que poseen defectos en la etapa de desarrollo cuyo fondo genético es Col-0 son: 35S::PID21, 35S::PIN1, 35S::NAC2,

pRBR::RBR-RFP, *pin1-201*, *pin3pin7*, *pin3-4*, *pin3pin4*, *pin3-5*, *pin4-1*, *pin4pin7*, *pin7-2*, *pid14*, *pid14wag1wag2*, *acr4*, *rcn1*, *CA-rop2*, *DN-rop2*, *big*, *ntl8-1*, *axr5-1*, *agg-1c*, *arr3arr4arr5arr6arr8arr9*, *atpgp1-101*, *rty1-1*, *glip2-1*, *iaa12-1* y *sac9-3*. También se evaluaron las mutantes en emergencia de raíces laterales, *lox5-1* y *lax3*, cuyo parental es Col-0.

Plántulas de 7 días se traspasaron durante 72 horas a placas con tratamientos de MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control) y Sortin2 25 µg/mL. Luego de este tiempo las plántulas se montaron en ácido láctico para aclarar el tejido y permitir una mejor visualización de los primordios de raíces laterales. La cuantificación de primordios de raíces laterales y de raíces laterales emergidas se realizó bajo microscopio óptico binocular (Nikon) utilizando el aumento 400X. La densidad de raíces laterales se obtiene normalizando el número de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas por el largo de la raíz principal, el cual se mide utilizando el software tpsDIG2 2.15 (<http://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-dataacq.html>)

Cabe señalar que para evaluar la sensibilidad a Sortin2, en las líneas modificadas genéticamente con defectos en la iniciación de raíces laterales, se tomó como parámetro la densidad de primordios. Por otra parte, para las líneas modificadas genéticamente con defectos en el desarrollo de raíces laterales, se tomaron como parámetros la densidad de primordios y la densidad de raíces laterales emergidas. Para las líneas modificadas genéticamente defectuosas en la emergencia de raíces laterales, se usó como parámetro solamente la densidad de raíces laterales emergidas.

2.5 Evaluación de la iniciación de raíces laterales utilizando las líneas pDR5::GUS y pCycB1;1::GUS

Para determinar el comportamiento de los eventos de iniciación de raíces laterales reportados por máximo de auxina se utilizó la línea reportera pDR5::GUS. Además se usaron plántulas de la línea pCycB1;1::GUS para comparar los eventos DR5 positivos con los que reportan una alta actividad de división celular, eventos CycB1;1 positivos. Plántulas de 7 días de ambas líneas transgénicas cultivadas como se describe en la sección 2.3 se traspasaron durante un período de 24, 48 o 72 horas a placas con tratamientos.

Además, para asegurar que la inducción en la formación de raíces laterales estuviera dada por el tratamiento con Sortin2, se germinaron y cultivaron en placas con MS-agar suplementado con 10 μ M de ácido naftiltalámico (NPA), inhibidor del transporte polar de auxina, semillas de ambas líneas transgénicas, ya que se ha reportado que a esa concentración de NPA la raíz primaria carece de primordios y raíces laterales emergidas (Casimiro y *col.*, 2001). Plántulas de 7 días se traspasaron durante un período de 24, 48 o 72 horas a las placas con los tratamientos indicados. Luego del respectivo tratamiento, la actividad de las plántulas de las líneas transgénicas pDR5::GUS y pCycB1;1::GUS se revela como se indica en sección 2.5.1.

Las plántulas reveladas se montaron en ácido láctico y se cuantificaron las raíces laterales emergidas y primordios de raíces laterales que contienen el precipitado azul bajo microscopio óptico binocular (Nikon) con los aumentos 100X y 400X.

Se normalizó el número de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas por el largo de la raíz principal usando el software tpsDIG2 2.15, para obtener así la densidad de primordios y/o la densidad de raíces laterales.

2.5.1 Ensayo histoquímico de la actividad GUS

El gen reportero *gusA* codifica para la enzima β -glucoronidasa (GUS). Esta enzima tiene la capacidad de catalizar la reacción que tiene como reactivo a X-Gluc y como productos al ácido glucurónico incoloro y cloro-bromoíndigo. Al llevarse a cabo la dimerización de este último se produce 5,5 dibromo 4,4- dicloro-índigo que es un precipitado azul (Vitha, 1995).

Las plántulas de las líneas transgénicas pDR5::GUS y pCycB1;1::GUS luego de ser tratadas se trasladaron a placas con 3 mL de solución reveladora que contiene el sustrato X-gluc (X-gluc 1mg/mL disuelto en N,N-Dimetilformamida, búffer fosfato de sodio pH 7 0,1M, Ácido etilendiaminotetraacético pH 8 10 M, Tx100 0,1% v/v, K-Ferricianida 2 mM y K-Ferrocianida 2 mM) (Gallagher y col., 1992) para poder visualizar los primordios de raíces laterales GUS positivos y/o raíces laterales emergidas GUS positivas. Se incubaron las plantas durante 24 horas a 37°C en oscuridad. Se detuvo la reacción retirando la solución reveladora y reemplazándola por etanol 70%, dejando las plantas en agitación para así remover la clorofila.

2.6 Análisis del efecto de Sortin2 sobre las células del periciclo de plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Para evaluar si Sortin2 es capaz de ejercer su efecto inductor de raíces laterales localmente y por consiguiente poder diferenciar las células del periciclo, se utilizó la

metodología de placas de agar segmentado (SAP) (Zhang y Forde, 1998). Ésta consiste en utilizar placas de cultivo que contengan MS-agar suplementado con DMSO 1% en los extremos y en la porción central medio suplementado con Sortin2 25 µg/mL. Para evitar la difusión de Sortin2 y de los componentes del medio de cultivo se deja un espacio de 3 mm de aire entre las bandas, generando 3 secciones en las placas SAP: I, II y III (Fig. 6). Las placas SAP se dejaron fotoactivar por 96 horas en las condiciones estándares de cultivo. Las plántulas silvestres ecotipo Col-0 de 7 días crecidas en MS-agar son traspasadas a las placas SAP, dejando la parte aérea y la parte de la raíz principal cercana al hipocotilo en la sección I, la parte central de la raíz principal en la sección II y la parte de la punta de la raíz principal en la sección III. Como control se usó una placa segmentada con MS-agar con DMSO 1%. Las placas SAP se dispusieron horizontalmente para que las plántulas crecieran en la superficie del medio de cultivo. Luego de 3, 6 y 9 días de ser tratadas las plántulas en placas SAP, bajo microscopio óptico binocular (Nikon), se cuantificaron las raíces laterales emergidas usando un aumento 100X. Con el propósito de obtener la densidad de primordios y/o de raíces laterales emergidas, se realizó lo indicado en la sección 2.4.2.

2.6.1 Análisis del efecto de Sortin2 sobre la inducción de primordios en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Se usó la metodología de placas de agar segmentado (SAP) descrita en la sección 2.6. En este experimento, se traspasaron plántulas de 7 días de la línea transgénica pCycB1;1::GUS a las placas SAP. Luego de 6 días de tratamiento, para determinar la actividad GUS descrita en la sección 2.5.1 se les asperjó la solución reveladora e incubó en oscuridad a 37°C por 24 horas. Se marcaron con partículas de tóner las partes de la raíz principal de las plantas que se dispusieron en las secciones de las placas SAP (Fig.

6) y se montaron en ácido láctico para permitir que los primordios de raíces laterales se visualizaran de mejor manera. Se cuantificaron los primordios GUS positivos y las raíces laterales emergidas GUS positivas con el microscopio óptico binocular (Nikon) usando un aumento de 400X. Para obtener las densidades de raíces laterales se siguió lo indicado en la sección 2.4.2.

2.6.2 Análisis del efecto de Sortin2 sobre la inducción de primordios *de novo* en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

La metodología SAP (sección 2.6.1) se utilizó con plántulas de la línea transgénica pCycB1;1::GUS de 7 días que se germinaron y crecieron en MS-agar suplementado con NPA 10 μ M. Las placas SAP contenían en su sección central (II) medio de cultivo suplementado con: DMSO 1% (Control), Sortin2 25 μ g/mL, NPA 10 μ M, NAA 10 μ M ó NPA 10 μ M con Sortin2 25 μ g/mL. Luego de 3, 6, 9 o 12 días de tratamiento se reveló la actividad GUS y se montaron las plántulas como se indica en la sección 2.6.1. Bajo microscopio óptico binocular (Nikon) con aumento 400X, se cuantificaron los primordios GUS positivos y las raíces laterales emergidas GUS positivas. Se calcularon las densidades de raíces laterales emergidas y/o de primordios según lo descrito en la sección 2.4.2.

2.6.3 Análisis del efecto de Sortin2 sobre la inducción de la diferenciación de células del periciclo a células fundadoras en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Para determinar si el tratamiento local con Sortin2 era capaz de inducir la transcripción del factor de transcripción GATA23, se usó la metodología SAP explicada en la sección 2.6 utilizando plántulas de la línea transgénica pGATA23::GUS de 7 días que crecieron en MS-agar suplementado con NPA 10 μ M. Se dispusieron las plántulas como se indica

en la sección 2.6 y se utilizaron placas SAP como se describe en la sección 2.6.2. Después de 1, 3, 6, 9 o 12 días de tratamiento se reveló la actividad GUS y se montaron las plántulas como se indica en la sección 2.6.1. Los primordios GUS positivos y las raíces laterales emergidas GUS positivas se cuantificaron bajo microscopio óptico binocular (Nikon) con aumento 400X. Las densidades de raíces laterales se obtuvieron como se indica en la sección 2.4.2.

2.7 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos se graficaron y analizaron estadísticamente usando el programa computacional Graphpad Prism 5.0®. Para determinar si existía una diferencia significativa entre los respectivos tratamientos se aplicaron las pruebas t-Student de dos colas y la no paramétrica de Wilcoxon de dos colas. Para las pruebas estadísticas se consideraron cuatro niveles de significancia: $p > 0,05$, $p < 0,05$, $p < 0,01$ y $p < 0,001$.

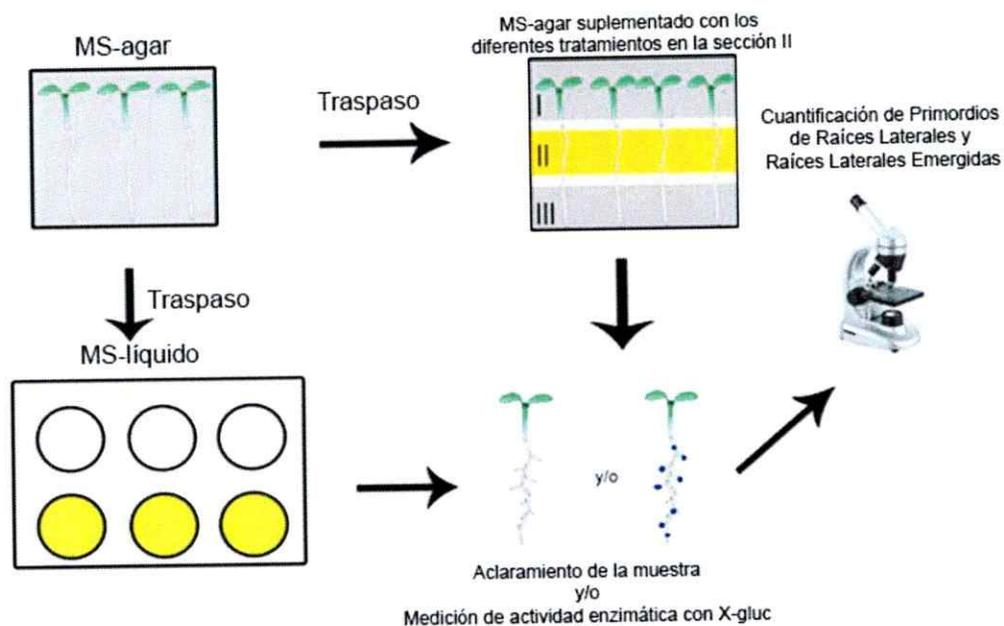


Figura 6: Esquema general de la metodología utilizada en este Seminario de Título. Líneas de *A.thaliana* en MS-agar o MS-agar suplementado con NPA 10µM. Las plántulas de 7 días son traspasadas a tratamiento en medio líquido el cual posee distintas drogas o bien a placas de agar segmentado (SAP). Luego se evalúan las raíces laterales y primordios. En el caso de las líneas reporteras que contienen el gen *gusA*, las plantas se incuban en la solución reveladora en donde se cuentan los eventos GUS positivos. En ambos casos las plantas se someten a un proceso de aclaramiento de la muestra (ácido láctico). Por último se cuantifican los parámetros de raíces laterales emergidas, primordios de raíces laterales y se mide el largo de la raíz principal.

RESULTADOS

3.1 Efecto de la inducción de raíces laterales por Sortin2 en mutantes de las distintas etapas de la organogénesis de las raíces laterales

3.1.1 Búsqueda bibliográfica de genes involucrados en la formación de raíces laterales

Se ha caracterizado en nuestro laboratorio al compuesto Sortin2 que induce la formación de raíces laterales independiente del complejo receptor de auxina SCF^{TIR} en *Arabidopsis thaliana* (Pérez-Henríquez y col., 2012). Sin embargo, aún se desconoce en qué etapa de la formación de raíces laterales Sortin2 estaría actuando. Se ha visto que Sortin2 induce una mayor densidad de primordios de raíces laterales a las 24 horas y una mayor densidad de raíces laterales emergidas a las 72 horas (Pérez-Henríquez y col., 2013). Para evaluar sobre qué paso de la organogénesis de las raíces laterales está actuando Sortin2 se decidió utilizar una herramienta genética como lo es, el uso de diferentes mutantes defectuosas en los pasos de la formación de raíces laterales y estudiar el efecto que posee el tratamiento con Sortin2 en estas mutantes (Fig.7). Primeramente se realizó una búsqueda bibliográfica de genes relacionados con la formación de raíces laterales (Casimiro y col., 2003; Péret y col., 2009; De Smet y col., 2006), encontrándose 113 genes. Luego, se buscaron mutantes en estos genes que estuvieran descritas en la literatura por presentar algún defecto en las etapas de la formación de raíces laterales. Se clasificaron las mutantes identificadas de acuerdo al fenotipo descrito y a la etapa de formación de raíces laterales que estaba alterada: *priming*, iniciación, desarrollo o emergencia. Se recopiló información acerca de los autores que describieron a estas mutantes y se solicitaron semillas de cada línea para poder trabajar en este Seminario

de Título. Logramos coleccionar 67 líneas de *Arabidopsis* a las que se les evaluó su germinación y crecimiento. 47 de las líneas presentaron buena germinación y el fenotipo descrito en la literatura. Por esta razón se decidió proseguir con ellas para evaluar la sensibilidad a Sortin2 con respecto a la formación de raíces laterales. Para esto, en plántulas de 7 días, se cuantificó la densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas. La inducción de la densidad de eventos inducidos bajo tratamientos con Sortin2 en las líneas mutantes con que se trabajó, se comparó con la inducción de Sortin2 en las respectivas líneas silvestres (WT, del inglés *wildtype*). Los resultados de las densidades de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas se utilizaron para obtener el parámetro que llamamos "*veces de inducción por Sortin2 relativa a la WT*" y que abreviamos como "*veces de inducción relativa*". Este parámetro hace referencia al cociente entre las veces de inducción de densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas que tiene el tratamiento con Sortin2 para cada línea y las veces de inducción de densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas en el tratamiento con Sortin2 de la línea silvestre (Fig. 8). De acuerdo a estos parámetros, se les clasificó como líneas hipersensibles a Sortin2 a las mutantes, en que el tratamiento con Sortin2 induce un aumento significativo en la densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas comparado al tratamiento control y que además sus *veces de inducción relativa* presentaron valores mayores a 1,2. Por otra parte, se catalogó como líneas parcialmente resistentes a Sortin2 a las mutantes que presentaron un incremento significativo de la densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas por Sortin2 contrastado con las condición control, y sus *veces de inducción relativa* son menores que 0,9. También se estableció que las líneas de *Arabidopsis* en que Sortin2, indujo de manera significativa la densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas y que sus

veces de inducción relativa están entre 0,9 y 1,2 veces, se les denominó líneas "silvestre". Además, se consideró como líneas resistentes a Sortin2 a las mutantes que no aumentaban significativamente su densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas en tratamiento con Sortin2 al comparar con el tratamiento control y cuyas *veces de inducción relativa* fueron menores a 0,8.

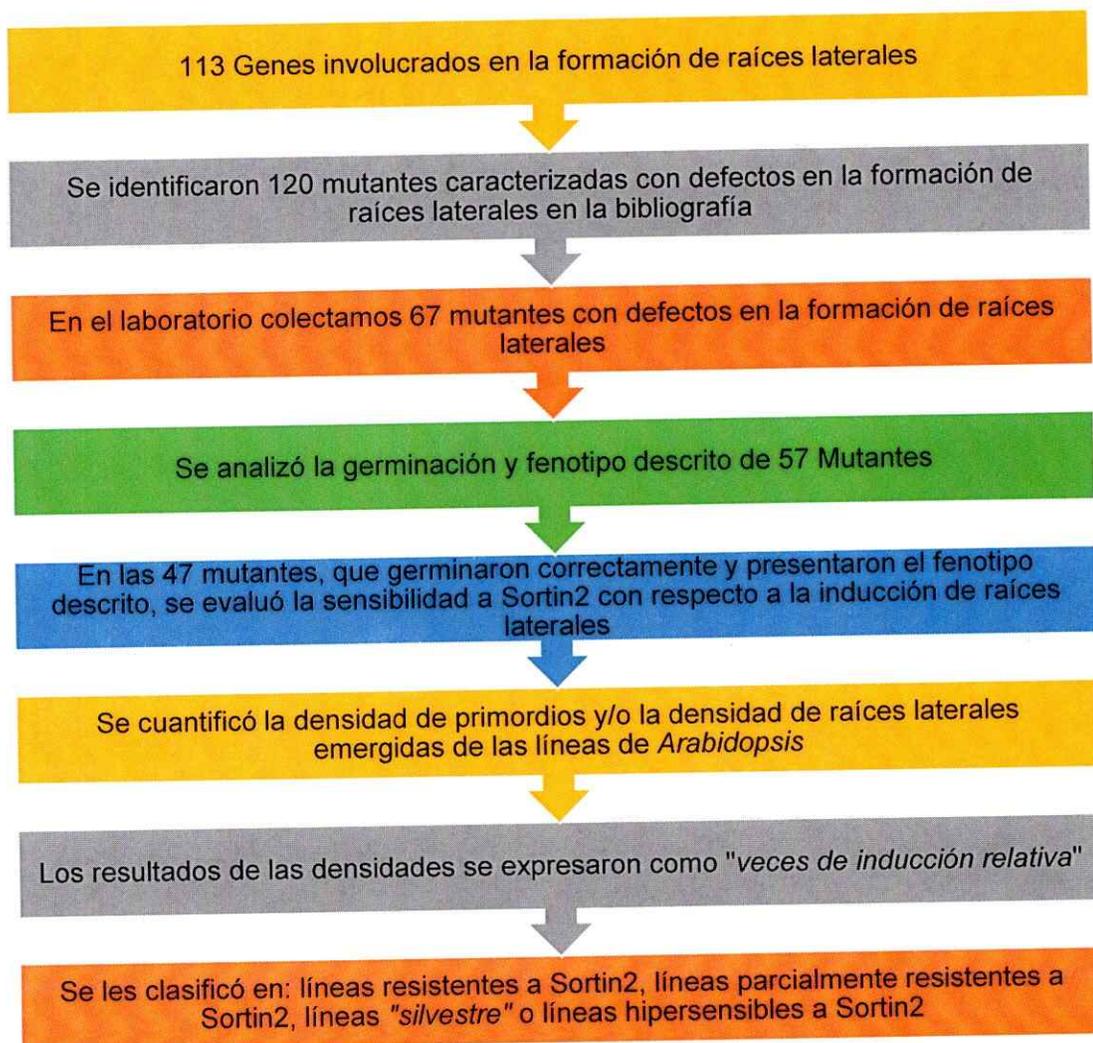


Figura 7: Búsqueda bibliográfica de genes involucrados en la formación de raíces laterales y de sus mutantes con defectos en las raíces laterales. Para evaluar en qué etapa(s) de la formación de raíces laterales Sortin2 está actuando, se realizó una búsqueda bibliográfica en donde se encontraron 113 genes involucrados en la formación de raíces laterales. Se hallaron 120 mutantes caracterizadas con defectos en estos genes. Se encargaron las mutantes a los respectivos autores y al banco de semillas de *Arabidopsis* Biological Resource Center. Se colectaron 67 mutantes, de las cuales en este Seminario de Título se

evaluaron 47 mutantes respecto a la inducción de raíces laterales por tratamiento con Sortin2. Se clasificaron las mutantes de acuerdo a los parámetros: densidad de primordios de raíces laterales y/o densidad de raíces laterales emergidas y *veces de inducción relativa*. Se denominaron resistentes a las líneas en que el tratamiento con Sortin2 no provoca un aumento significativo en la densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas y sus *veces de inducción relativa* son menores que 0,8. Parcialmente resistentes se les catalogó a las líneas en que el tratamiento con Sortin2 induce un aumento significativo de la densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas y sus *veces de inducción relativa* son menores a 0,9. Hipersensible se les definió las líneas que cumplieran que en tratamiento con Sortin2 aumenta significativamente la densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales emergidas y sus *veces de inducción relativa* eran mayores que 1,2. Se clasificaron como líneas "silvestre", a las líneas en que el tratamiento con Sortin2 induce significativamente la densidad de primordios de raíces laterales y/o raíces laterales y sus *veces de inducción relativa* son entre 0,9 y 1,2.

3.1.2. Evaluación del efecto inductor de raíces laterales que posee Sortin2 en ecotipos de la línea silvestre

Para fijar los parámetros de crecimiento e inducción de raíces laterales que se evaluaron en las líneas con defectos en la formación de raíces laterales en tratamiento con Sortin2, primeramente se vieron los efectos de este compuesto en las líneas silvestres. Para esto se trataron con Sortin2 por 72 horas plántulas de 7 días de los ecotipos silvestres, ya que según se describió en Pérez-Henríquez y col., 2012, el tratamiento con Sortin2 induce el número y reduce el largo de raíces laterales, aumenta el número de pelos radiculares y disminuye el largo de la raíz principal.

Los valores de la densidad de primordios de raíces laterales en las líneas silvestres Col-0 y Ws (Fig. 8a) aumentan significativamente bajo tratamiento con Sortin2 25 µg/mL. Al expresar los resultados como veces de inducción por Sortin2 (Fig. 8b), se obtiene que en plántulas Col-0 Sortin2 induce 3,8 veces la densidad de primordios de raíces laterales, acorde a lo reportado previamente por Pérez-Henríquez y col., 2012. Es interesante que el efecto de Sortin2 en plántulas Col-0 crecidas con una menor concentración de azúcar en el medio (0,5%) sólo alcanza las 2,5 veces de inducción por Sortin2. Además se evaluó el efecto de Sortin2 en el ecotipo silvestre Ws, encontrándose que éste es más

sensible que el ecotipo Col-0, ya que la inducción de la densidad de primordios de raíces laterales por Sortin2 es de 6,1 veces.

Por otra parte, la densidad de las raíces laterales emergidas en Col-0 y Ws (Fig. 8c) aumentan significativamente bajo tratamiento con Sortin2. Los resultados expresados como veces de inducción por Sortin2 (Fig. 8d) dan cuenta que en plántulas Col-0, Sortin2 induce 4,3 veces la densidad de raíces laterales emergidas, consistente con la literatura (Pérez-Henríquez y *col.*, 2012). También se observa una disminución en la inducción de Sortin2 en menor concentración de sacarosa (0,5%), en donde sólo se alcanzan las 3 veces de inducción de raíces laterales emergidas por Sortin2. Por su parte, el tratamiento con Sortin2 en plántulas del ecotipo silvestre Ws induce 2,2 veces la densidad de raíces laterales emergidas, lo que es menor que en Col-0.

Esta diferencia en las veces de inducción tanto de primordios de raíces laterales como de raíces laterales emergidas inducidos por Sortin2 en las distintas condiciones de sacarosa, puede deberse a que se ha reportado que la sacarosa captada por los tejidos aéreos de la planta promueve la emergencia de los primordios de raíces laterales (MacGregor y *col.*, 2008).

En la Fig. 8e se visualiza el efecto inductor de raíces laterales que tiene el tratamiento por 7 días con Sortin2 25 µg/mL en plántulas de 7 días de los ecotipos silvestres Col-0 y Ws. En éstas el número de raíces laterales aumenta, el largo de las raíces laterales se reduce, aumentan los pelos radiculares y el largo de la raíz principal disminuye. Estos efectos visualizados son acordes a lo reportado en Pérez-Henríquez y *col.*, 2012.

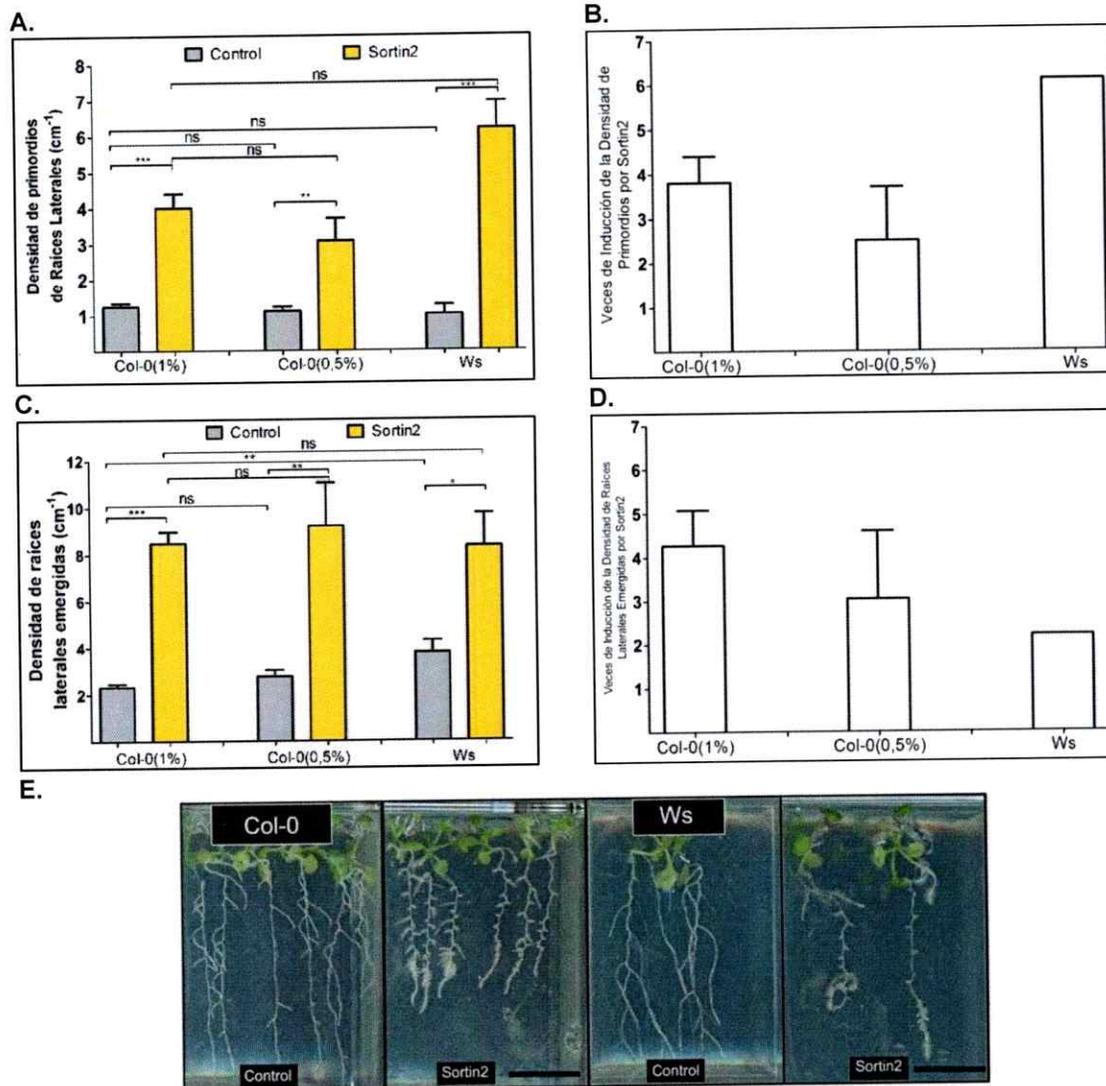


Figura 8: Los ecotipos silvestres Col-0 y Ws son sensibles a la formación de primordios de raíces laterales y raíces laterales emergidas inducidas por tratamientos con Sortin2. Plántulas de 7 días de las líneas Col-0 y Ws se trataron en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control, barras grises) y con Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (barras amarillas) por 72 horas. **(A)** Densidad de primordios de raíces laterales y **(C)** Densidad de raíces laterales emergidas en los tratamientos en Col-0 y Ws. El tratamiento con Sortin2 induce una mayor densidad de primordios de raíces laterales en los ecotipos silvestres. Los resultados obtenidos en **A** y en **C** se expresan en **(B)** y en **(D)** como veces de inducción por Sortin2. Los datos son el promedio de 3 réplicas experimentales, excepto en el ecotipo Ws que se realizó sólo una réplica experimental. Las barras corresponden al error estándar. Se evaluaron estadísticamente los datos con la prueba de t-student, $*=p<0,05$; $**=p<0,01$; $***=p<0,001$; ns=no significancia. **(E)** Visualización de plántulas Col-0 y Ws de 7 días que se trataron por 7 días en MS-agar (1% sacarosa) con DMSO 1% (Control) y con Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se denota un aumento del número de raíces laterales, disminución del largo de las raíces laterales y reducción del largo de la raíz principal bajo tratamiento con Sortin2. Las barras de tamaño corresponden a 1 cm.

3.1.3. Evaluación del efecto inductor de primordios de raíces laterales que posee Sortin2 en mutantes con defectos en la etapa de iniciación de la formación de raíces laterales

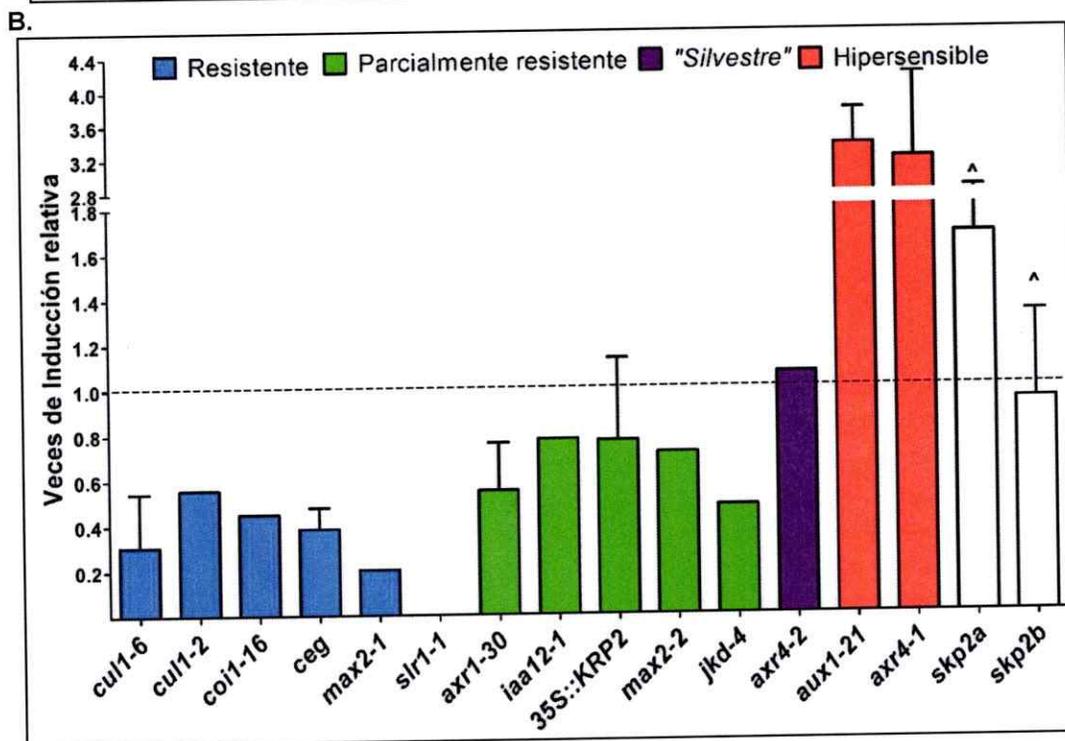
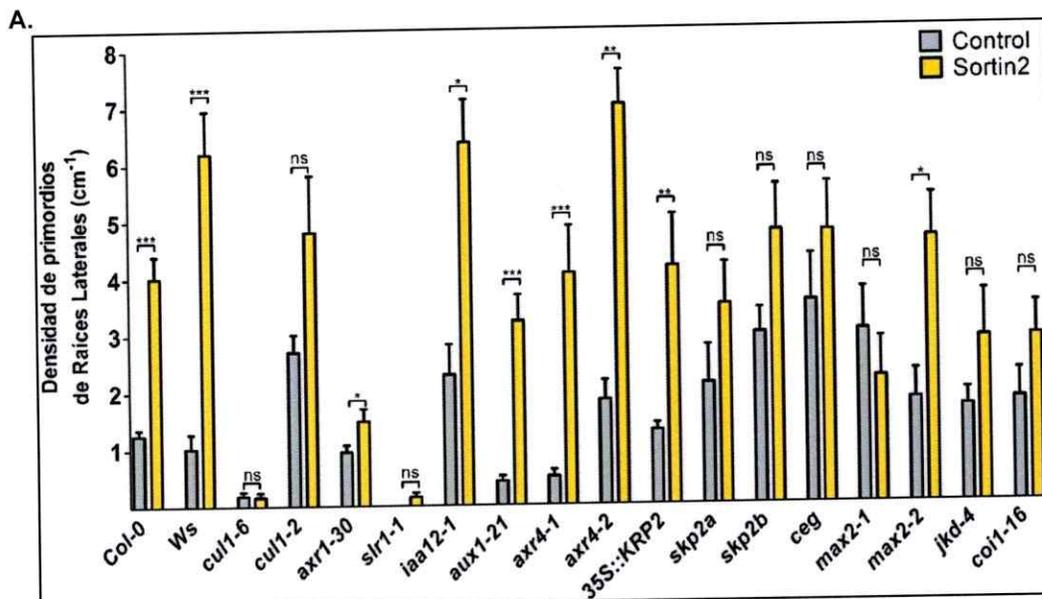
Para evaluar si la inducción de raíces laterales producidas por Sortin2 es anterior o posterior a la etapa de iniciación y si requiere que las proteínas involucradas en esta etapa funcionen de manera correcta, se evaluaron las líneas mutantes: *axr1-30*, *cul1-2*, *cul1-6*, *slr1-1*, *axr4-1*, *axr4-2*, *aux1-21*, *skp2a*, *skp2b*, *ceg*, *max2-2*, *max2-1*, *jdk-4*, *coi1-16* y *35S::KRP2*, las que han sido caracterizadas por poseer defectos en la etapa de iniciación de raíces laterales (Dong y col., 2006; Fukaki y col., 2002; Gilkerson y col., 2009; Hellmann y col., 2003; Himanen y col., 2002; Hobbie y Estelle, 1995; Manzano y col., 2012; Moon y col., 2007; del Pozo y col., 2006; Raya-González, 2012; Stirnberg y col., 2002; Swarup y col., 2004; Welch y col., 2007).

Se cuantificó la densidad de primordios de raíces laterales de plántulas de 7 días de las diversas líneas que se trataron con MS-líquido que contenía DMSO 1% (Control) o Sortin2 25 µg/mL por 72 horas. La densidad de primordios de raíces laterales en *axr1-30*, *iaa12-1*, *aux1-21*, *axr4-1*, *axr4-2*, *max2-2* y *35S::KRP2* (Fig. 9a) aumenta significativamente bajo tratamiento con Sortin2 lo que estaría indicando que estas mutantes son hipersensibles, "silvestres" o bien parcialmente resistentes al tratamiento con Sortin2, comparado con WT. De hecho, al expresar los resultados como *veces de inducción relativa* (Fig. 9b), las líneas *35S::KRP2*, *iaa12-1* y *axr1-30* se clasifican como parcialmente resistentes a Sortin2, porque el tratamiento con Sortin2 induce menos de 0,9 veces la densidad de primordios de raíces laterales. *axr4-2* es catalogada como línea "silvestre", ya que sus *veces de inducción relativa* son menores a 1,2. *aux1-21* y *axr4-1*

son catalogadas como mutantes hipersensibles a Sortin2, puesto que sus *veces de inducción relativa* al menos triplican las veces de inducción que sufre la línea silvestre.

En cambio, en las mutantes *cul1-6*, *cul1-2*, *slr1-1*, *skp2a*, *skp2b*, *max2-1*, *jdk-4* y *coi1-16* la densidad de primordios de raíces laterales no varía significativamente bajo tratamiento con Sortin2, lo que indica que estas mutantes serían resistentes al tratamiento con Sortin2. Cuando los resultados se expresan como *veces de inducción relativa* (Fig. 9b), se visualiza mejor que *cul1-6*, *cul1-2*, *slr1-1*, *max2-1*, *jdk-4* y *coi1-16* son resistentes al efecto de Sortin2 en la inducción de los primordios de raíces laterales, ya que sus *veces de inducción relativa* son inferiores a 0,8.

En la Fig. 9c, se ve el efecto inductor de raíces laterales que tiene el tratamiento por 7 días con Sortin2 algunas de las mutantes analizadas. Las mutantes *aux1-21* y *axr4-1* poseen pocas o carecen de raíces laterales según lo publicado por Swarup y col., 2004 y por Hobbie y Estelle, 1995, respectivamente, lo que es consistente bajo condiciones controles. Sin embargo, Sortin2 induce una gran cantidad de raíces laterales, reduce el tamaño de las raíces laterales, produce un mayor número de pelos radiculares y disminuye la longitud de la raíz principal. También se ve que las líneas *cul1-6* y *slr1-1* son resistentes al efecto inductor de raíces laterales de Sortin2 (Fig. 9c), además se observa que el largo de la raíz principal se ve disminuido en ambas mutantes.



C.



Figura 9: Mutantes con defectos en la etapa de iniciación de la formación de las raíces laterales son resistentes al efecto de Sortin2. Plántulas de 7 días de las líneas indicadas se traspasaron a tratamientos en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control, barras grises) y Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (barras amarillas) por 72 horas. **(A)** Densidad de primordios de raíces laterales en los tratamientos en las distintas líneas. El tratamiento con Sortin2 induce la densidad de primordios de raíces laterales en la mayoría de las líneas. Los datos son el promedio de 3 réplicas experimentales ($n=12-26$), excepto para las líneas *cul1-2*, *iaa12-1*, *aux4-2*, *max2-1*, *max2-2*, *jdk-4* y *coi1-16* que se realizó 1 réplica experimental ($n=3-6$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los datos se evaluaron usando la prueba de t-student y la prueba de Wilcoxon: $*=p<0,05$; $**=p<0,01$; $***=p<0,001$; ns=no significancia. **(B)** Los resultados obtenidos en **A** se expresan como *veces de inducción relativa*. 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 primordios de raíces laterales y en las que las veces de inducción relativa presentan valores mayores que 1,2. Las líneas "silvestres" (barras moradas) son las que presentaron un comportamiento similar al silvestre en cuanto a la inducción de primordios de raíces laterales por Sortin2, ya que la inducción fue significativa y sus *veces de inducción relativa* están entre 0,9 y 1,2. Parcialmente resistentes (barras verdes) corresponden a las líneas en que el tratamiento con Sortin2 induce una mayor densidad de primordios 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 primordios de raíces laterales y sus *veces de inducción relativa* son menores a 0,8. Las barras de error corresponden al error estándar. \wedge corresponde a las mutantes que no se pudieron clasificar en las categorías designadas. **(C)** Imagen representativa del crecimiento en MS-agar con DMSO 1% (Control) o Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de algunas de las líneas con defectos en la iniciación de raíces laterales. Mutantes *aux1-21* y *aux4-1*, hipersensibles a Sortin2. Las líneas mutantes *slr1-1* y *cul1-6* son resistentes a la inducción de la densidad de primordios de raíces laterales por Sortin2. Las barras de tamaño corresponden a 1 cm.

3.1.4. Evaluación del efecto inductor de raíces laterales que posee Sortin2 en mutantes con defectos en la etapa del desarrollo de la formación de raíces laterales

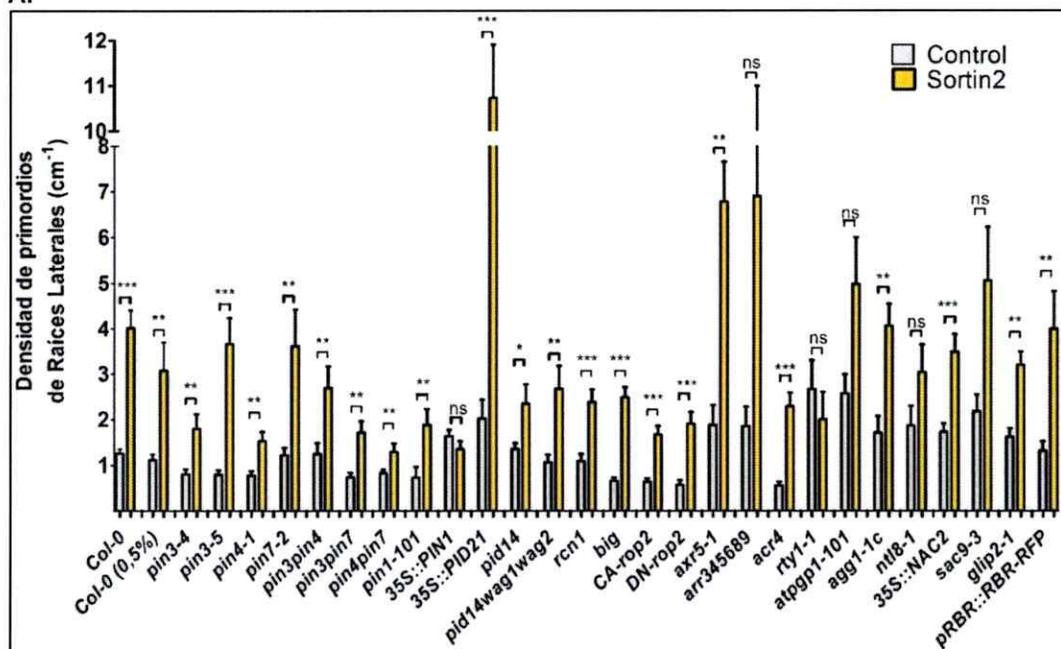
Para determinar si la inducción de raíces laterales producidas por Sortin2 necesita que las proteínas involucradas en la etapa del desarrollo funcionen de manera correcta y mapear si el efecto de Sortin2 está anterior o posterior a la etapa de desarrollo de la formación de raíces laterales, se analizaron las líneas de *Arabidopsis* que han sido descritas en la literatura por poseer defectos en la etapa de desarrollo de raíces laterales: 35S::PID21, 35S::PIN1, 35S::NAC2, pRBR::RBR-RFP, *pin1-201*, *pin3pin7*, *pin3-4*, *pin3pin4*, *pin3-5*, *pin4-1*, *pin3pin4*, *pin4pin7*, *pin7-2*, *pin4pin7*, *pin3pin7*, *pid14*, *pid14wag1wag2*, *acr4*, *rcn1*, *CA-rop2*, *DN-rop2*, *big*, *ntl8-1*, *axr5-1*, *agg-1c*, *arr3arr4arr5arr6arr8arr9*, *atpgp1-101*, *rty1-1*, *glip2-1*, *iaa12-1* y *sac9-3* (Robert y Offringa, 2008; Benková y col., 2003; He y col., 2005; Bakó, 2013; Bennet y col., 1995; Dhonukshe y col., 2010; De Smet y col., 2008; Rashotte y col., 2001; Li y col., 2001; Gil y col., 2001; Kim y col., 2001; Yang y col., 2005; Trusov y col., 2007; Zhang y col., 2011; Lin y Wang, 2005; Seo y col., 1998; Lee y col., 2011; De Smet y col., 2010; Williams y col., 2005).

Se evaluó la sensibilidad al tratamiento con Sortin2 25 µg/mL por 72 horas en plántulas de 7 días de las líneas de *Arabidopsis*, cuantificando tanto la densidad de primordios de raíces laterales y la densidad de raíces laterales emergidas (Fig. 21, anexo II). La densidad de primordios de raíces laterales (Fig. 10a) nos indica que líneas *pin3-4*, *pin3-5*, *pin4-1*, *pin7-2*, *pin3pin4*, *pin3pin7*, *pin4pin7*, *pin1-101*, 35S::PID21, *pid14*, *pid14wag1wag2*, *rcn1*, *big*, *CA-rop2*, *DN-rop2*, *axr5-1*, *acr4*, *agg1-1c*, 35S::NAC2, *glip2-1* y pRBR::RBR-RFP, son hipersensibles, "silvestres" o parcialmente resistentes a Sortin2, puesto que el tratamiento con Sortin2 induce significativamente la densidad de

primordios de raíces laterales comparado con WT. Así que al presentar los resultados como *veces de inducción relativa* (Fig. 10b) nos permiten clasificar a las líneas *pin3-5*, *pin4-1*, 35S::PID21, *pid14wag1wag2*, *big*, DN-*rop2*, *acr4* y pRBR::RBR-RFP como hipersensibles a Sortin2, ya que las *veces de inducción relativa* son mayores a 1,2. También, se encontró que las líneas *pin7-2*, *rcn1*, CA-*rop2* y *axr5-1* son "silvestres", debido a que sus *veces de inducción relativa* van desde 0,9 a 1,2. Se catalogan además como parcialmente resistentes a Sortin2 a las líneas *pin3-4*, *pin3pin4*, *pin3pin7*, *pin4pin7*, *pid14*, *agg1-1c*, 35S::NAC2 y *glip2-1*, puesto que sus *veces de inducción relativa* son menores a 0,9. En contraste, en las líneas 35S::PIN1, *arr3arr4arr5arr6arr8arr9*, *rty1-1*, *atpgp1-101*, *ntl8-1* y *sac9-3* la densidad de primordios de raíces laterales no varía significativamente en tratamientos con Sortin2. Evaluando además las *veces de inducción relativa*, se determinó que las líneas 35S::PIN1, *rty1-1*, *atpgp1-101*, *ntl8-1* y *sac9-3* son resistentes a Sortin2, puesto que sus *veces de inducción relativa* son menores a 0,8.

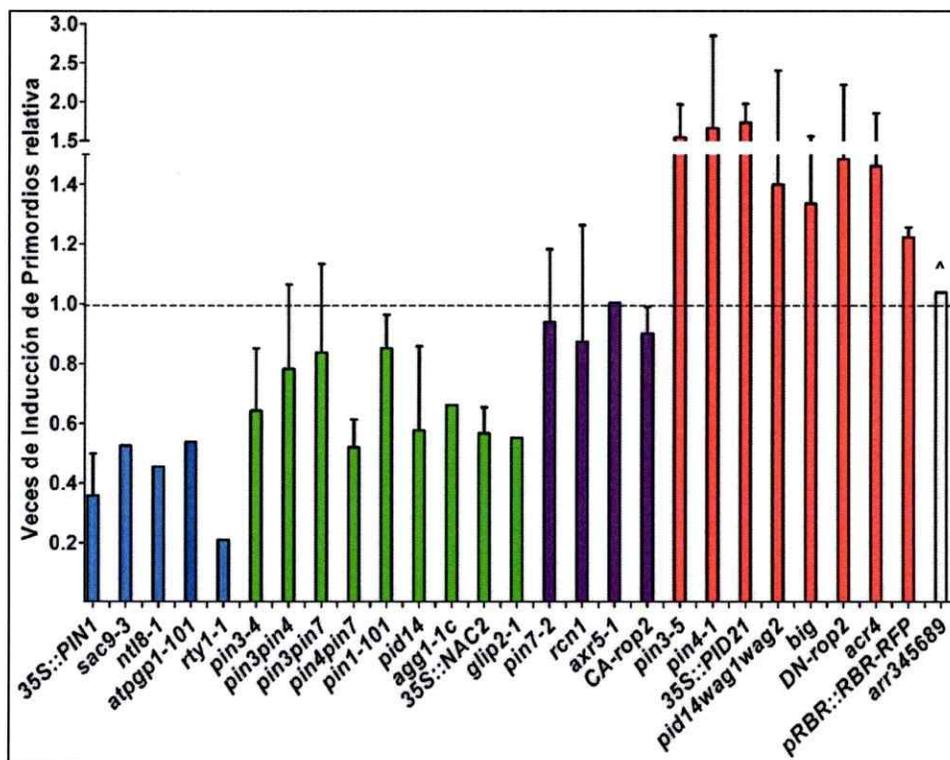
Se puede distinguir en la Fig. 10c el efecto inductor de raíces laterales que tiene el tratamiento con Sortin2 25 µg/mL por 7 días en Col-0, en la línea resistente 35S::PIN1 y en las líneas transgénicas 35S::PID21 y *acr4*, en las que se distingue que Sortin2 induce una gran cantidad de raíces laterales en comparación a la silvestre en las líneas hipersensibles a Sortin2

A.



Resistente (blue), Parcialmente resistente (green), "Silvestre" (purple), Hipersensible (red)

B.



C.



Figura 10: Mutantes con defectos en la etapa de desarrollo de formación de raíces laterales son resistentes a Sortin2. Plántulas de 7 días se traspasaron a tratamientos por 72 horas en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control, barras grises) y Sortin2 25 µg/mL (barras amarillas). **(A)** La densidad de primordios de raíces laterales se ve inducida en la mayoría de las líneas en tratamiento con Sortin2. Los datos son el promedio de 3 réplicas experimentales ($n=14-26$), excepto en *axr5-1*, *arr345689*, *rtv1-1*, *atpgp1-101*, *agg1-1c*, *ntl8-1*, *sac9-3* y *glip2-1* que se efectuó una réplica experimental ($n=3-7$). Las barras corresponden al error estándar. Los datos fueron evaluados utilizando la prueba de t-student. $*=p<0,05$; $**=p<0,01$; $***=p<0,001$; ns=no significancia. ^ corresponde a las mutantes que no se pudieron clasificar en las categorías designadas. Los resultados obtenidos en **A** se expresan como **(B)** veces de inducción de primordios de raíces laterales relativa. **(C)** Visualización de plántulas de algunas de las mutantes tratadas por 7 días en MS-agar con DMSO 1% o Sortin2 25 µg/mL. Líneas catalogadas como silvestre en cuanto a la sensibilidad a Sortin2. Mutantes *acr4* y 35S::PID21, hipersensibles a Sortin2. Línea 35S::PIN1, resistente a la inducción de la densidad de primordios de raíces laterales por Sortin2. Las barras de tamaño corresponden a 1 cm.

3.1.5. Evaluación del efecto inductor de raíces laterales que posee Sortin2 en mutantes con defectos en la emergencia de la formación de raíces laterales

Para evaluar si las proteínas involucradas en la etapa de emergencia de la formación de raíces laterales son necesarias para que Sortin2 pueda ejercer su efecto inductor de raíces laterales y determinar si el efecto de Sortin2 está antes o después de la etapa de

emergencia de la formación de raíces laterales, se analizaron las líneas de *Arabidopsis: lax3* y *lox5-1*. Estas mutantes han sido descritas por tener defectos en la etapa de emergencia de las raíces laterales (Swarup y col., 2008; Vellosillo y col., 2007).

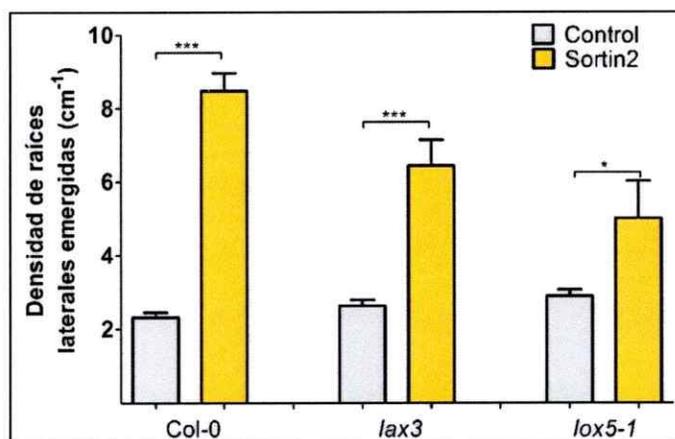
Al evaluar la densidad de raíces laterales emergidas en plántulas de 7 días de las mutantes tratadas con DMSO 1% (Control) o Sortin2 25 µg/mL por 72 horas, se denota que este parámetro aumenta significativamente bajo tratamiento con Sortin2 en ambas líneas (Fig. 11a). Al expresar los resultados como *veces de inducción relativa* (Fig. 11b), dan cuenta que *lax3* presenta un comportamiento "silvestre", debido a que sus *veces de inducción relativa* se encuentra en el rango 0,9-1,2. Con respecto a *lox5-1* se sugiere que se comporta como una mutante parcialmente resistente al tratamiento con Sortin2 según nuestra clasificación, porque sus *veces de inducción relativa* son menores a 0,9. No obstante se deben realizar más réplicas experimentales para poder concluir sobre la sensibilidad a Sortin2 de *lox5-1*.

En la Fig. 11c, se aprecia el efecto inductor de raíces laterales que tiene el tratamiento con Sortin2 25 µg/mL por 7 días en MS-agar en plántulas Col-0 y en *lax3*. En *lax3* y en la línea silvestre aumenta el número y disminuye el largo de raíces laterales, el número de pelos radiculares se incrementa y el largo de la raíz principal se reduce. Lo que estaría indicando que Sortin2 no afecta la emergencia de raíces laterales en la que participa LAX3.

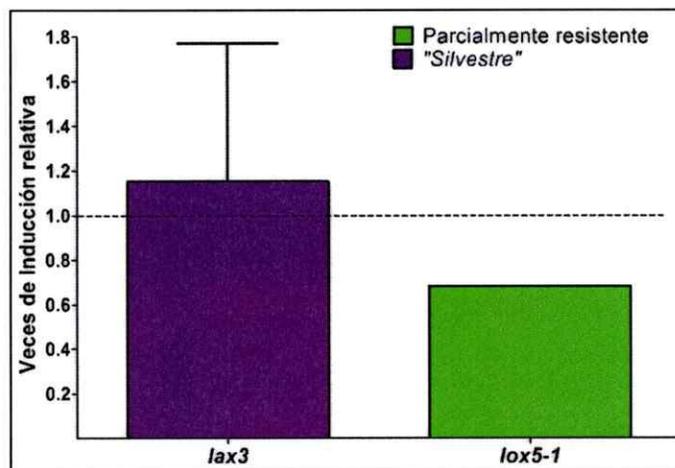
Al analizar los resultados obtenidos para el tratamiento con Sortin2 en las mutantes con defectos en los pasos de la formación de raíces laterales, estos resultados nos indican que Sortin2 está afectando un evento anterior a la etapa de iniciación de la organogénesis de raíces laterales, ya que algunas mutantes con defectos en las etapas

de iniciación, desarrollo y emergencia son resistentes o parcialmente resistentes al tratamiento con Sortin2.

A.



B.



C.



Figura 11: *lox5-1*, mutante con defecto en la etapa de emergencia de la formación de raíces laterales, sería parcialmente resistente a Sortin2. Plántulas de 7 días de las líneas mutantes *lax3* y *lox5-1* se trataron en MS-líquido que contenía DMSO 1% (Control, barras grises) y Sortin2 25 µg/mL (barras amarillas) durante 72 horas. **(A)** El tratamiento con Sortin2 induce la densidad de raíces laterales emergidas en ambas mutantes. Los datos para *lax3* son el promedio de 3 réplicas experimentales (n=22-25) y para *lox5-1* es de 1 réplica experimental (n=3). Las barras de error corresponden al error estándar. Los datos se evaluaron estadísticamente con la prueba de t-student: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ns=no significancia. **(B)** Los resultados obtenidos en A se expresan como veces de inducción relativa. El valor 1 representa las veces de inducción de densidad de raíces laterales emergidas obtenida bajo tratamiento con Sortin2 en Col-0. *lox5-1* se catalogó como parcialmente resistente a Sortin2 (barra verde), ya que el tratamiento con Sortin2 induce significativamente la densidad de raíces laterales emergidas y sus veces de inducción relativa son menores que 0,9. Por otra parte, *lax3* presenta un comportamiento "silvestre" en la sensibilidad a Sortin2 (barra morada), porque el tratamiento con Sortin2 induce significativamente un aumento de la densidad de raíces laterales, y sus veces de inducción relativa se encuentran entre 0,9 y 1,2. **(C)** Visualización de plántulas de 7 días de las líneas Col-0 y *lax3* que se trataron por 7 días en MS-agar con DMSO 1% (Control) y Sortin2 25 µg/mL. Col-0 y *lax3* son sensibles de manera similar a Sortin2, en cuanto a inducción de densidad de raíces laterales emergidas. Las barras de tamaño corresponden a 1 cm.

Por otra parte, los resultados también nos permiten sugerir que Sortin2 induce la organogénesis de raíces laterales por vías alternativas a la vía de señalización canónica de auxina, ya que existen mutantes en iniciación, desarrollo y emergencia que tienen defectos en proteínas importantes para esta vía de señalización que, de igual manera que la silvestre, son sensibles a la inducción de raíces laterales provocada por el tratamiento con Sortin2.

3. 2 Evaluación de la inducción de eventos moleculares claves para la inducción de raíces laterales por Sortin2

3.2.1 Evaluación del efecto de Sortin2 en la inducción de eventos mitóticos tempranos asociados a la iniciación de raíces laterales en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

En nuestro laboratorio utilizando la línea transgénica pCycB1;1::GUS, reportera de eventos mitóticos tempranos asociados a la iniciación de raíces laterales (Beeckman y

col., 2001), se ha evidenciado que el tratamiento con Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas es capaz de inducir un aumento en la densidad de primordios de raíces laterales CycB1;1 positivos y que, por otra parte, la densidad de raíces laterales emergidas CycB1;1 positivas se ve inducida a las 72 horas de tratamiento con Sortin2 (Pérez-Henríquez y *col.*, 2013).

Además, se ha reportado que los eventos de iniciación carecen de sincronía lo que provoca que sea difícil seguir correctamente la formación de raíces laterales (Himanen y *col.*, 2002, 2004). Para superar estos problemas, se ha establecido el sistema inducible de raíces laterales (LRIS, por sus siglas en inglés. Himanen y *col.*, 2002), el cual permite la sincronización del ciclo celular de las células del periciclo. El LRIS consiste en germinar y crecer las plántulas en NPA 10 μM , porque se ha reportado que a esa concentración NPA arresta a las células del xilema del periciclo en la fase G1 del ciclo celular (Himanen y *col.*, 2002).

Para determinar si Sortin2 induce la formación *de novo* de las raíces laterales, provocando así la reactivación del ciclo celular en las células del xilema del periciclo y consecuentemente la activación del promotor de CycB1;1, se evaluó en plántulas de 7 días crecidas y germinadas en MS-agar o MS-agar suplementado con NPA 10 μM , la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos y/o de raíces laterales emergidas GUS positivas que corresponden a eventos de proliferación celular CycB1;1 positivos en la línea reportera pCycB1;1::GUS bajo tratamiento Control (DMSO 1%) y Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24, 48 y 72 horas.

El anexo IV muestra la morfología de las plántulas crecidas en MS-agar de la línea reportera pCycB1;1::GUS en tratamiento con Sortin2 y DMSO 1% a las 24, 48 y 72 horas.

Se ve que los primordios de raíces laterales GUS positivos corresponden a un domo marcado por el 5,5 dibromo 4,4- dicloro-índigo (precipitado azul). En el tratamiento con Sortin2 se visualiza la aparición de primordios de raíces laterales fusionados y opuestos principalmente en la porción de la raíz principal cercana a la punta. Además, la morfología de las raíces laterales emergidas GUS positivas al ser tratadas con Sortin2 son más cortas y se encuentran más cercanas a lo largo de la raíz principal, en comparación con plantas no tratadas.

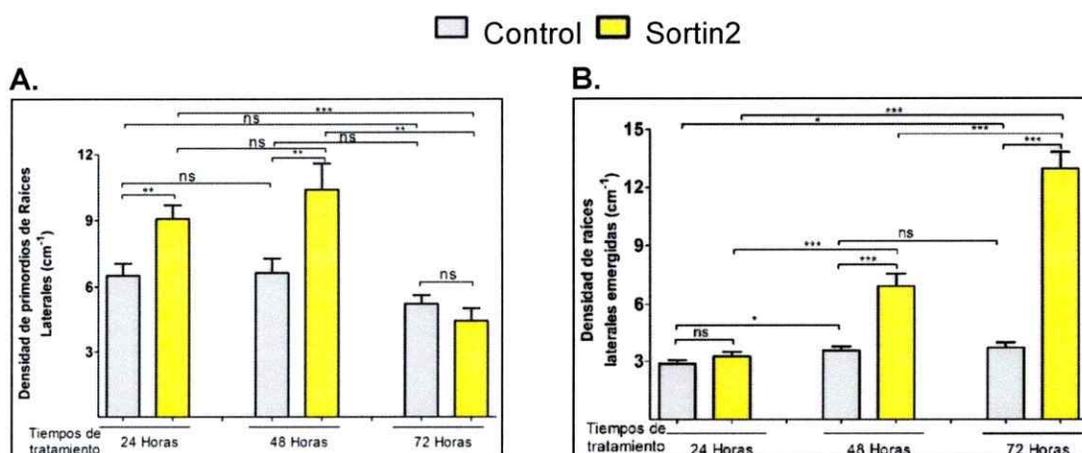
En el anexo VI se observan plántulas de la línea pCycB1;1::GUS que se crecieron en MS-agar suplementado con NPA y se sometieron a los tratamientos indicados. En estas imágenes se aprecia que la morfología tanto de los primordios de raíces laterales GUS positivos como de las raíces laterales emergidas GUS positivas inducidas por Sortin2, se asemejan a las que se indujeron en plántulas de las líneas crecidas en MS-agar. El lugar de la raíz principal en donde se inducen los primordios de raíces laterales por Sortin2 es en una localización aún más cercana a la punta de la raíz principal en comparación en donde se desarrollan los primordios en plantas crecidas en condiciones controles, esto puede deberse a que Sortin2 tenga algún efecto en el desarrollo de las zonas de la raíz principal. Se ve también que a las 24 horas de tratamiento las plántulas carecen de raíces laterales emergidas, esto es acorde a la literatura, ya que se ha reportado que el avance de la formación de un primordio de raíz lateral desde el estado I hasta el estado VII ocurre en el transcurso de aproximadamente 24 horas (Péret *y col.*, 2012).

En plántulas germinadas y crecidas en MS-agar de la línea pCycB1;1::GUS, la densidad de primordios GUS positivos aumenta desde las 24 horas de tratamiento con Sortin2 (Fig. 12a) y a las 72 horas de tratamiento con Sortin2 la densidad de primordios de raíces

laterales CycB1;1 positivos es similar al tratamiento Control (Fig. 12a), lo que coincide con lo reportado por Pérez-Henríquez y *col.*, 2013. Con respecto a la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas, en la línea pCycB1;1::GUS este parámetro aumenta desde las 48 horas de tratamiento con Sortin2 (Fig. 12b), tal como se había descrito previamente (Pérez-Henríquez y *col.*, 2013).

Por otra parte, en plántulas crecidas y germinadas en NPA, la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos en plántulas de la línea pCycB1;1::GUS aumenta significativamente bajo tratamiento con Sortin2, independiente del tiempo de tratamiento (Fig. 12c). Además, Sortin2 induce la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas a las 72 horas de tratamiento en la línea reportera pCycB1;1::GUS (Fig. 12d).

Esta evidencia sugiere que Sortin2 promueve eventos que desencadenan la primera división anticlinal en las células fundadoras de raíces laterales (Himanen y *col.*, 2002), y consecuentemente estos primordios de raíces laterales inducidos por Sortin2 continúan su desarrollo hasta raíces laterales emergidas. Es decir, el tratamiento con Sortin2 induce la formación de raíces laterales *de novo*.



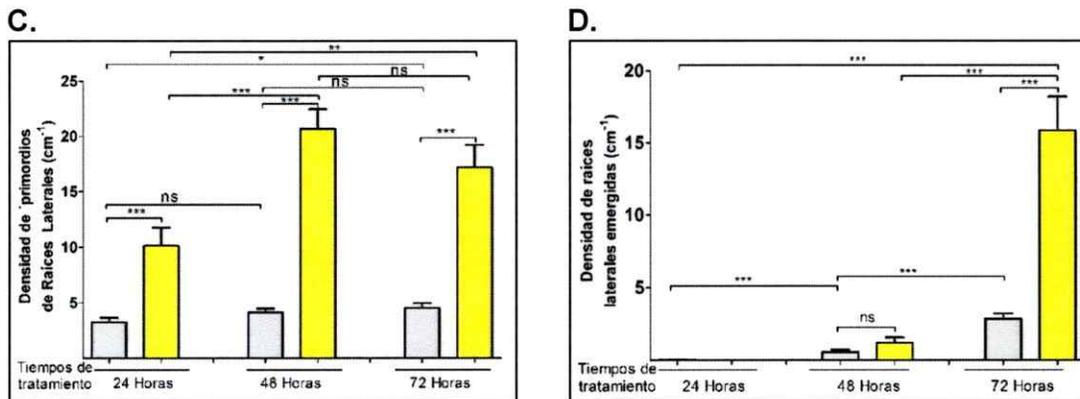


Figura 12: Sortin2 induce eventos mitóticos tempranos asociados a la iniciación de raíces laterales en plántulas de *Arabidopsis thaliana*. Plántulas de 7 días de la línea reportera pCycB1;1::GUS que se germinaron y crecieron en MS-agar (**A** y **B**) o en MS-agar suplementado con NPA 10 µM (**C** y **D**), se trataron por 24, 48 o 72 horas en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control, barras grises) y Sortin2 25 µg/mL (barras amarillas). (**A**) En la línea pCycB1;1::GUS, Sortin2 induce la densidad de primordios positivos para eventos de proliferación celular. (**B**) Los tratamientos con Sortin2 aumentan significativamente la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas desde las 48 horas de tratamiento en la línea pCycB1;1::GUS. (**C**) La densidad de primordios positivos para eventos mitóticos tempranos se induce bajo tratamiento con Sortin2 en plántulas de la línea pCycB1;1::GUS que carecían de primordios iniciados al ser traspasadas a los respectivos tratamientos. (**D**) En la línea pCycB1;1::GUS, la densidad de raíces laterales emergidas positivas para eventos de proliferación celular se incrementa significativamente bajo tratamiento con Sortin2 por 72 horas. Los datos son el promedio de 5 réplicas experimentales (n=26-30). Las barras de error corresponden al error estándar. Los datos se evaluaron estadísticamente con la prueba de t-student: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significancia.

3.2.2 Evaluación del efecto de Sortin2 en la inducción de máximos de auxina en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Se ha descrito que la acumulación local de auxina, denominada "máximos de auxina", en las células del periciclo adyacentes a los polos del xilema que han sido diferenciadas a células fundadoras, activa una cascada de señalización de auxina, lo que induciría las sucesivas divisiones anticlinales y periclinales que dan origen al primordio de la raíz lateral (Péret y col., 2009). Estos antecedentes nos hicieron preguntar si Sortin2 al ejercer su efecto inductor de raíces laterales, induce también la acumulación local de auxina en estos eventos.

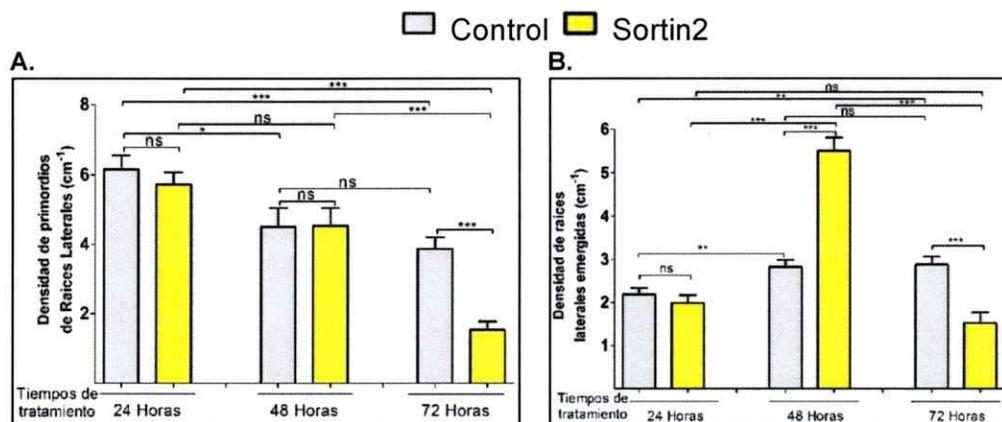
Para responder esta interrogante, se evaluó, en plántulas de 7 días germinadas y crecidas en MS-agar o MS-agar suplementado con NPA 10 μ M, la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos y/o de raíces laterales emergidas GUS positivas que corresponden a eventos máximos de auxina en la línea reportera pDR5::GUS bajo tratamiento Control (DMSO 1%) y Sortin2 25 μ g/mL por 24, 48 y 72 horas.

La morfología de las plántulas germinadas en MS-agar de la línea transgénica pDR5::GUS sometidas a los diversos tratamientos, se muestra en el anexo III. En él se visualizan domos que presentan en su punta actividad enzimática GUS. Estos domos corresponden a primordios de raíces laterales GUS positivos en todos los tratamientos. Se ve que el tratamiento con Sortin2 induce la fusión de primordios de raíces laterales y la formación de primordios de raíces laterales opuestos principalmente en la porción de la raíz principal cercana a la punta de la raíz principal. Además, las raíces laterales GUS positivas inducidas por Sortin2 son más cortas y se encuentran con menos espaciamiento entre ellos a lo largo de la raíz principal.

En el anexo V se presentan plántulas, germinadas en MS-agar suplementado con NPA, de la línea transgénica pDR5::GUS tratadas por 24, 48 y 72 horas con Sortin2 y con DMSO 1%. En estos anexos se ve, al igual que en plántulas germinadas en MS-agar, la formación de domos que presentan en su punta actividad enzimática GUS, los que corresponden a los primordios de raíces laterales GUS positivos. Además, en tratamiento con Sortin2 las plántulas presentan primordios de raíces laterales opuestos y raíces laterales GUS positivas menos espaciadas a lo largo de la raíz principal, al igual como se ha reportado en Pérez-Henríquez y *col.*, 2012.

Plántulas de la línea reportera pDR5::GUS germinadas en MS-agar presentan una inducción en la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas a las 48 horas de tratamiento con Sortin2 (Fig.13b). Interesantemente a las 72 horas de tratamiento con Sortin2, tiempo en que se reportó la existencia de un mecanismo de raíces laterales inducido por Sortin2 (Pérez-Henríquez y *col.*, 2012), tanto la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos como la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas, disminuyen significativamente en la línea pDR5::GUS (Fig.13a y 13b).

Por otra parte, en plántulas germinadas y crecidas en MS-agar suplementado con NPA, el tratamiento con Sortin2 aumenta significativamente la densidad de primordios de raíces laterales DR5 positivos (Fig.13c). Además se obtuvo que el tratamiento por 72 horas con Sortin2 induce la densidad de raíces laterales emergidas DR5 positivas (Fig.13d) en la línea reportera pDR5::GUS.



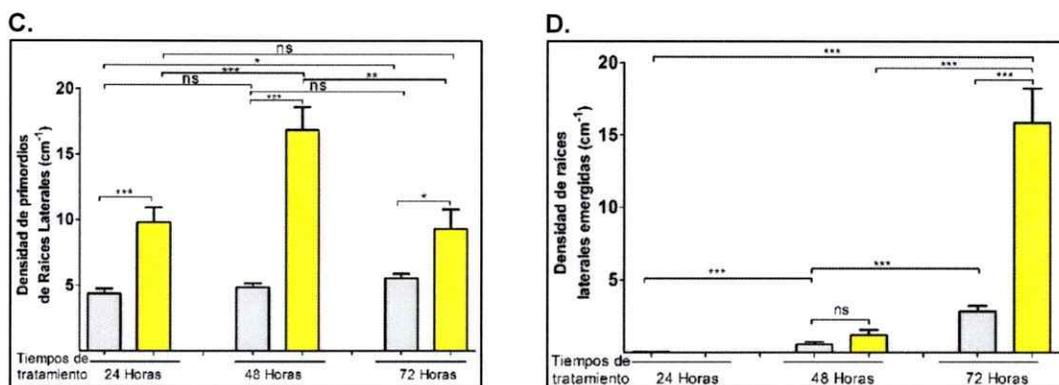


Figura 13: Sortin2 induce eventos máximos de auxina *de novo*. Plántulas de 7 días de la línea reportera pDR5::GUS germinadas y crecidas en MS-agar (A y B) o MS-agar suplementado con NPA10µM (C y D), se traspasaron a tratamientos en MS-líquido con DMSO 1% (Control, barras grises) y Sortin2 25 µg/mL (barras amarillas) por 24, 48 o 72 horas. (A) La densidad de primordios de raíces laterales positivos para eventos máximos de auxina no se ve inducida en tratamientos con Sortin2 en plántulas de la línea pDR5::GUS con eventos de formación de raíces laterales ya iniciados. (B) En la línea pDR5::GUS la densidad de raíces laterales emergidas positivas para eventos máximos de auxina se ve inducida a las 48 horas de tratamiento con Sortin2. (C) Al contabilizar, la inducción de Sortin2 en plántulas de la línea pDR5::GUS que carecen de primordios de raíces laterales iniciados, la densidad de primordios de raíces laterales positivos para eventos máximos de auxina se visualiza que Sortin2 induce significativamente a este parámetro. (D) A las 72 horas de tratamiento, Sortin2 induce la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas en plántulas de la línea reportera pDR5::GUS. Los datos son el promedio de 5 réplicas experimentales (n=34-50). Las barras de error corresponden al error estándar. Los datos se evaluaron estadísticamente con la prueba de t-student: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ns=no significancia.

Estos resultados nos indican que Sortin2 induce eventos máximos de auxina *de novo* en plántulas a las que se les sincronizó el ciclo celular de las células del periciclo, sugiriendo fuertemente que el tratamiento con Sortin2 puede inducir eventos previos a la etapa de iniciación de la formación de raíces laterales. Los resultados obtenidos también indican que Sortin2 no induce eventos máximos de auxina en plántulas con eventos de formación de raíces laterales ya iniciados. Esto puede deberse a que en las plántulas que fueron germinadas y crecidas en medio MS-agar, los eventos máximos de auxina DR5 positivos están saturados a lo largo de la raíz principal, por lo que Sortin2 estaría promoviendo la formación de primordios de raíces laterales independiente de la expresión del promotor DR5.

3.2.3 Evaluación de los eventos de diferenciación de células del periciclo a células fundadoras por Sortin2

Se ha identificado al factor de transcripción GATA23 como el factor clave que especifica la identidad de las células del periciclo a células fundadoras (De Rybel y *col.*, 2010). Además se ha propuesto, en resultados previos en este Seminario de Título, que Sortin2 induce un evento previo a la iniciación de la formación de raíces laterales. Es por eso que con el objetivo de evaluar el efecto del tratamiento local de Sortin2 sobre la expresión del factor de transcripción GATA23, se trataron por 1, 3, 6, 9 y 12 días en placas de agar segmentado (SAP), plántulas de 7 días de la línea reportera pGATA23::GUS, crecidas en MS-agar suplementado con NPA 10 μ M. Las placas SAP contenían en su sección central (II) DMSO 1% (Control), Sortin2, NPA 10 μ M o Sortin2 más NPA 10 μ M.

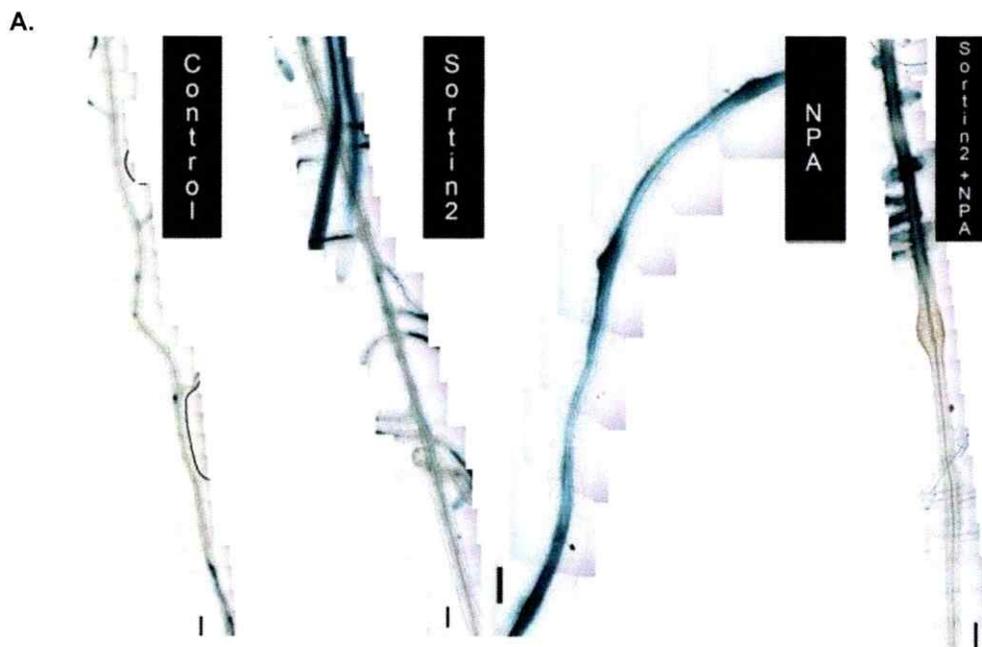
Al evaluar la actividad de la proteína GUS comandada por el promotor de GATA23 en la porción de la raíz principal que coincide con la sección II de las placas SAP en plántulas que se trataron por 9 días (Fig. 14a), se encontró que Sortin2 induce la actividad de GUS en esta porción. Además, el co-tratamiento con Sortin2 y NPA en la misma sección, la actividad del promotor GATA23 de igual manera se induce. Esto significa que el evento inducido por Sortin2 para la formación de raíces laterales es independiente del transporte polar de auxina.

La densidad de primordios de raíces laterales positivos para la actividad del promotor GATA23 en la región de la raíz principal que corresponde a la sección central de las placas SAP (Fig. 14b), nos indica que a los 3 días de tratamiento localizado con Sortin2 y en el co-tratamiento de Sortin2 y NPA existe una tendencia de inducir la densidad de

primordios de raíces laterales, sin embargo esta tendencia no es estadísticamente significativa (Fig. 14b).

Por otra parte, la densidad de raíces laterales emergidas positivas para la actividad del promotor de GATA23 (Fig. 14c), nos revela que el tratamiento localizado de Sortin2 produce la inducción de raíces laterales emergidas a los 9 días de tratamiento. Esta inducción producida por Sortin2 es independiente del transporte de auxina, ya que NPA no es capaz de inhibir esta inducción al estar presente en la misma sección.

Los resultados obtenidos nos indican que Sortin2 induce la actividad del promotor del factor de transcripción GATA23, lo que nos sugiere que Sortin2 estaría provocando la diferenciación de las células del periciclo, es decir, este compuesto está induciendo un paso previo a la etapa de iniciación de la formación de raíces laterales.



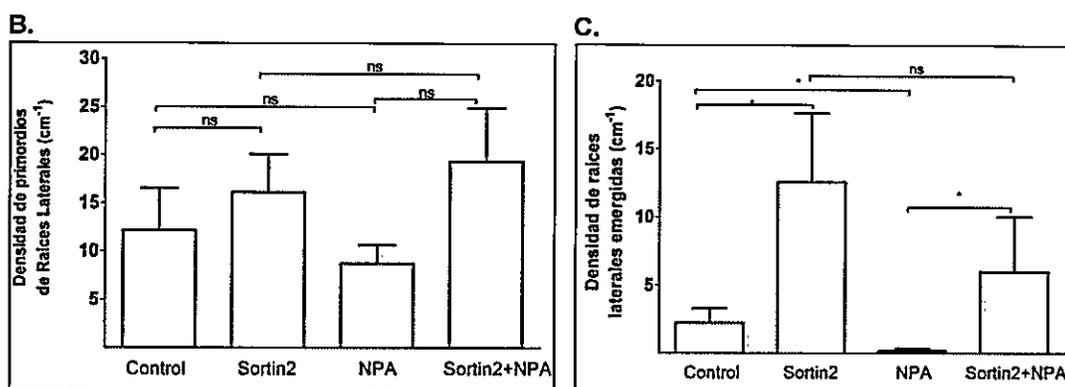


Figura 14: Sortin2 induce la actividad del promotor del factor de transcripción GATA23. Plántulas pGATA23::GUS de 7 días crecidas en MS-agar suplementado con NPA 10 μ M se transfirieron a placas de agar segmentado (SAP) que contienen DMSO 1% (Control), Sortin2 25 μ g/mL, NPA 10 μ M o Sortin2 μ g/mL más NPA 10 μ M en la porción central de la placa SAP. (A) Plántulas de la línea pGATA23::GUS de 7 días que se trasladaron a placas SAP por 9 días, en ellas se ve que la presencia de Sortin2 provoca la inducción de raíces laterales emergidas GUS positivas. La barra de tamaño corresponde a 1 mm. (B) Densidad de primordios de raíces laterales positivos para la actividad del promotor de GATA23 en la sección II de las placas SAP no varía significativamente en los tratamientos indicados. (C) La densidad de raíces laterales emergidas positivas para la actividad del promotor de GATA23 en la sección II de las placas SAP a los 9 días de tratamiento. Sortin2 aumenta significativamente la inducción de raíces laterales emergidas, incluso en presencia de NPA. Los datos son el promedio de 3 réplicas experimentales (n= 5-9). Las barras de error corresponden al error estándar. Los datos son analizados estadísticamente con la prueba de t-student: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ns=no significancia.

3.3 Evaluación de la inducción de la diferenciación de las células del periciclo por el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2

3.3.1 Análisis del efecto local de Sortin2 sobre la inducción de raíces laterales

Arabidopsis thaliana es una planta dicotiledónea que posee un sistema radicular pivotante, el cual consta de una raíz principal a partir de la cual se desarrollan las raíces laterales (Taiz y Zeiger, 2002). El patrón que presentan las raíces laterales a lo largo de la raíz principal en el sistema pivotante consta de que los primordios de raíces laterales y las raíces laterales emergidas más jóvenes se encuentran cerca de la punta de la raíz, mientras que las raíces laterales más desarrolladas se localizan en las partes más maduras de la raíz principal (Fahn y col., 1974). Se ha evidenciado que existen acontecimientos que tienen lugar en el meristema basal de la raíz principal que

determinan el posicionamiento de las raíces laterales, es decir, en el meristema basal determinadas células del periciclo adyacentes a los polos del xilema adquirirían la identidad de células fundadoras (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 que se correlaciona con el espaciamiento regular de las raíces laterales (De Smet y col., 2007).

Frente a estos antecedentes se evaluó el efecto del tratamiento con Sortin2 en las diferentes zonas de la raíz principal. Para esto se utilizó la metodología placas de agar segmentado (SAP), trabajo que se realizó en nuestro laboratorio en colaboración con el estudiante de Doctorado Patricio Pérez-Henríquez.

Con el fin de determinar si el tratamiento con Sortin2 en las regiones de la raíz principal correspondientes a la porción cercana al hipocotilo (sección I) y a la que incluye el ápice de la raíz principal (sección III), inducía la formación de raíces laterales, se evaluó la densidad de raíces laterales en plántulas de 7 días del ecotipo silvestre Col-0 al traspasarlas por 3, 6 ó 9 días a la placa SAP que contenía MS-agar suplementado con Sortin2 25 µg/mL en las secciones I y III, y DMSO 1% en la sección II. Por su parte la placa SAP control que poseía en todas sus secciones MS-agar con DMSO 1% (Fig. 15a).

Como resultado se obtuvo que en las secciones en las que está presente Sortin2 en la porción superior y en el ápice de la planta, existe una inducción mayor del número de raíces laterales en la raíz principal. Además de que las raíces laterales en esa zona son más cortas que en la porción de la raíz principal que está en la sección que no posee Sortin2 (Fig. 15b) y que las que están incubadas en la placa SAP control. Las placas

SAP se dispusieron de manera horizontal. En la placa SAP control las raíces laterales y la raíz principal se curvan en favor de la gravedad, en cambio las raíces laterales y la raíz principal en la placa SAP que contiene Sortin2 en los extremos de la planta presentan un comportamiento agravitrópico (Fig. 15b).

La densidad de raíces laterales (Fig. 15c) revela que la presencia de Sortin2 en las regiones de la raíz principal, que incluyen la zona cercana al hipocotilo y el meristema basal, es suficiente para inducir la densidad de raíces laterales en plántulas Col-0 desde los 3 días de tratamiento en placas SAP. Al identificar en qué lugar de la placa se situaba la mayor densidad de raíces laterales a los 6 días de tratamiento (Fig. 15d), en donde la inducción de la densidad de raíces laterales es más notoria, se encontró que en las secciones suplementadas con Sortin2 se induce una mayor densidad de raíces laterales en comparación a las mismas secciones en la placa control. Además, la densidad de raíces laterales en la sección II de la placa que posee Sortin2 en los extremos es mayor que en la misma sección de la placa control, sugiriendo que el efecto de Sortin2 podría estar movilizándose a través de la planta, o bien que su acción es propagada a esas regiones.

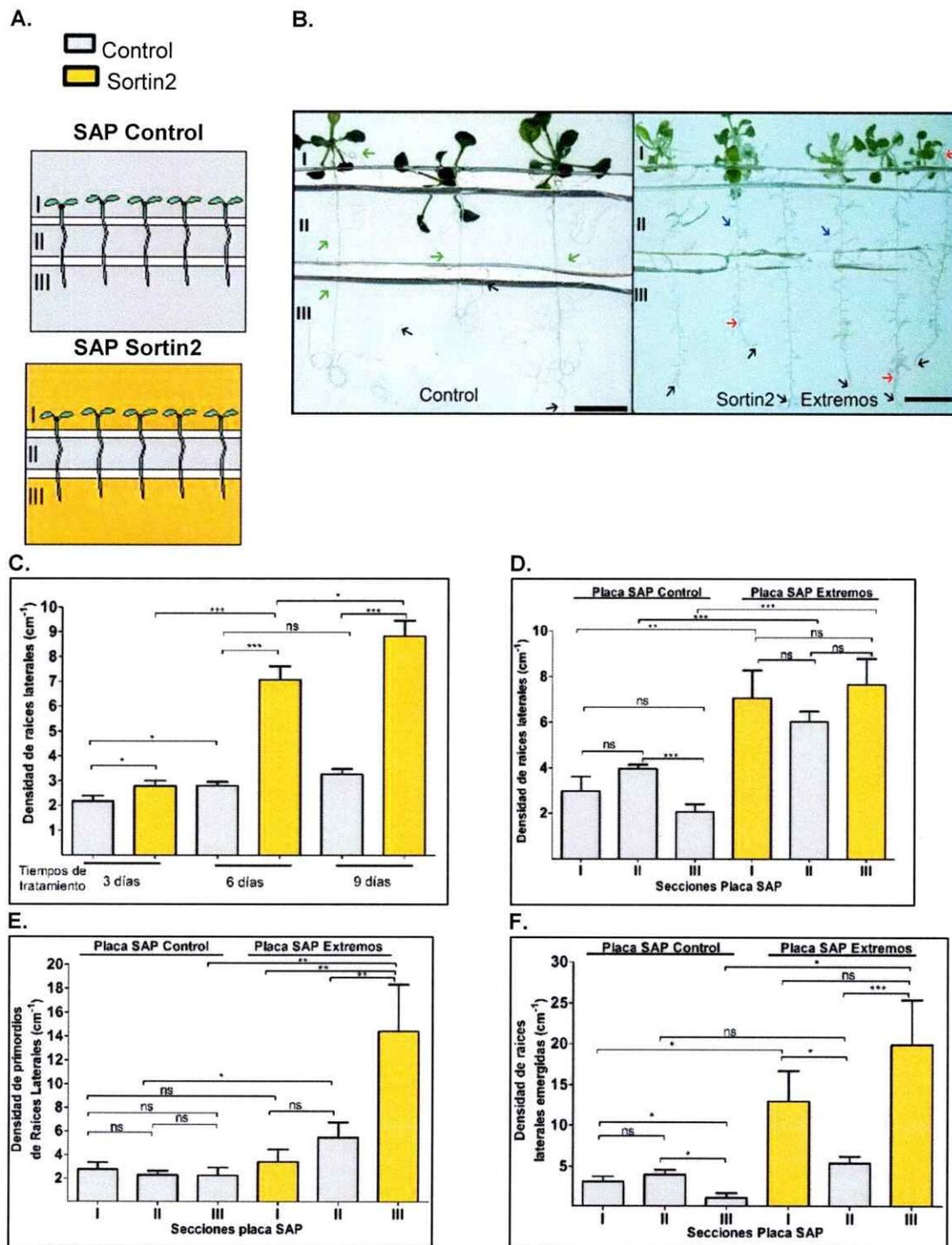


Figura 15: Sortin2 induce la formación de raíces laterales localmente. (A) Plántulas de 7 días del ecotipo silvestre Col-0 se transfirieron a placas de agar segmentado (SAP) Control o Sortin2, conteniendo MS-agar suplementado con DMSO 1% en las secciones de la placa SAP I, II y III, y Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en las secciones I y III y DMSO 1% en la sección II, respectivamente. Cada sección es separada por espacios de aire libres

de MS-agar como se ve en los esquemas. **(B)** Crecimiento de plantas Col-0 de 7 días que se trataron por 6 días en placa SAP control y Sortin2. En flechas negras se marca el crecimiento de la raíz principal. En flechas rojas se marcan las raíces laterales en las secciones I y III de la placa que contienen Sortin2. En flechas azules se ve que las raíces laterales que están en la sección DMSO 1% se asemejan a las raíces laterales de la placa control (flechas verdes). Las barras de tamaño corresponden a 1 cm. **(C)** Densidad de raíces laterales. El tratamiento localizado de Sortin2 en la porción de la raíz principal cercana al hipocotilo y en la porción de la raíz principal que incluye al meristema basal, induce un aumento en la densidad de raíces laterales en plantas Col-0 después de 3 días de ser transferidas. **(D)** La densidad de raíces laterales en las secciones de las placas SAP indica que las regiones de la raíz principal en donde se induce la mayor densidad de raíces laterales coincide con la sección de la placa SAP que contiene Sortin2. Se cuantificaron la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos **(E)** y la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas **(F)** en plántulas de la línea pCycB1;1::GUS de 7 días que se traspasaron a placas SAP control o Sortin2. Sortin2 es capaz de inducir la formación de primordios de raíces laterales y raíces laterales emergidas en la sección en que está presente. Los datos son el promedio de 3 réplicas experimentales (n=31-45). Las barras corresponden al error estándar. Los datos se evaluaron estadísticamente con la prueba de t-student: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significancia.

Además, se utilizó la línea pCycB1;1::GUS para determinar si el tratamiento localizado con Sortin2 en las regiones de la raíz principal induce una mayor densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos y/o de raíces laterales emergidas GUS positivas. La densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos (Fig. 15e) y de raíces laterales emergidas GUS positivas (Fig. 15f) revelan que en las regiones de la raíz principal que se trataron con Sortin2, hay una inducción de la densidad de raíces laterales emergidas. Se obtuvo también que la densidad de primordios de raíces laterales sólo se induce en la región de la raíz principal que incluye al meristema basal. Esto puede indicar que Sortin2 provoca la emergencia de primordios de raíces laterales arrestados en la región de la raíz principal que se encuentra cercana al hipocotilo y la formación de primordios de raíces laterales en la porción de la raíz principal que incluye al ápice de ésta.

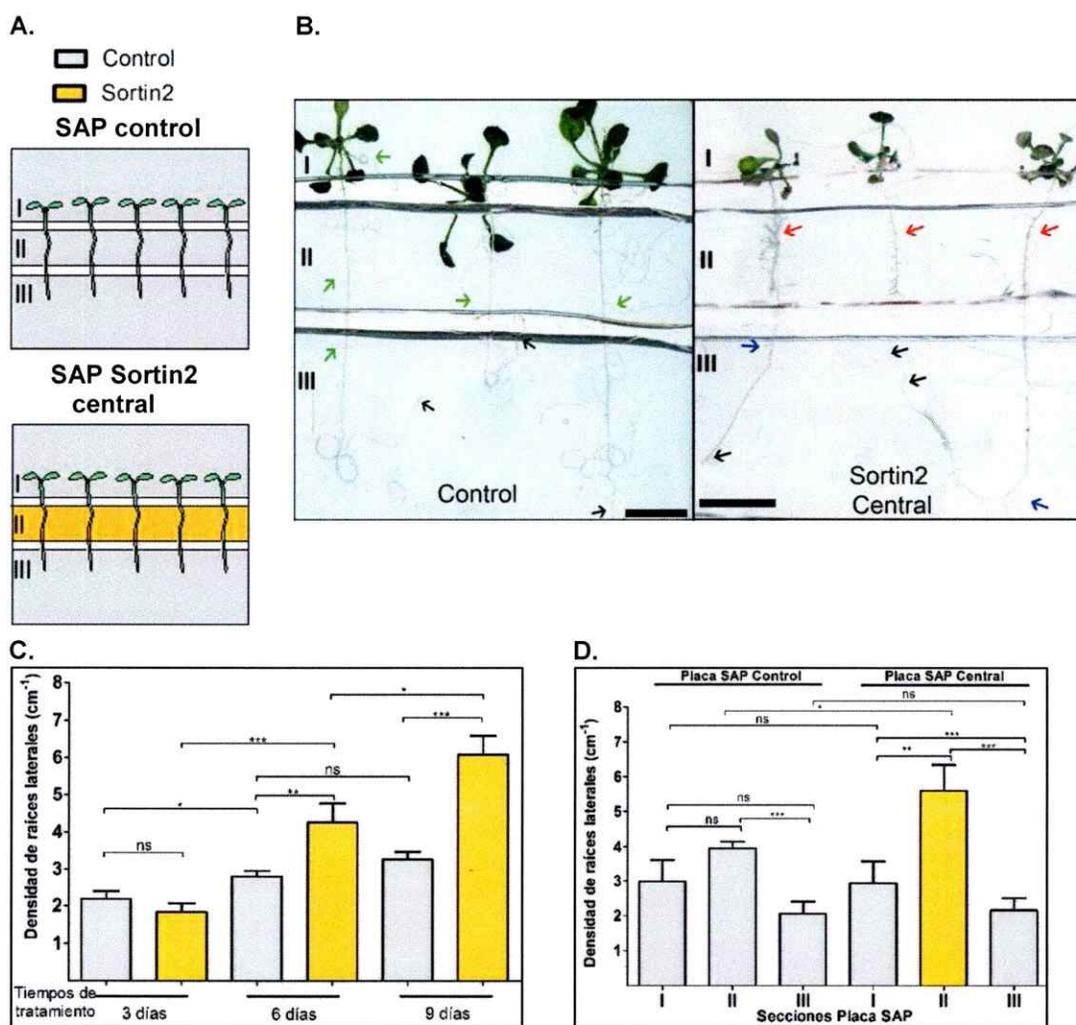
Entonces el tratamiento con Sortin2 en la zona cercana al hipocotilo y en la zona que incluye a la punta de la raíz principal, induce la densidad de raíces laterales. Sin embargo, surgió la interrogante acerca de qué es lo que sucede si Sortin2 es suplementado sólo en la sección II, coincidiendo así con la zona de la raíz principal que se encuentra lejana al meristema basal. Para esto plántulas de 7 días del ecotipo

silvestre Col-0 que se traspasaron durante 3, 6 ó 9 días a placas que poseían MS-agar suplementado con Sortin2 25 µg/mL en la sección II y DMSO 1% en las secciones I y III (Fig. 16a) y a la placa Control que contiene DMSO 1% en todas las secciones. En la Fig. 16b se visualiza el resultado obtenido a los 6 días después de que las plantas fueran traspasadas a las placas SAP. En esta figura es evidente que Sortin2 induce un mayor número de raíces laterales emergidas en la sección en que está presente (sección II). Estas raíces laterales inducidas son de menor tamaño que las que se encuentran en las otras secciones de la raíz principal de la misma placa y en la placa control, sugiriendo que Sortin2 no tiene efecto en las otras secciones. También se observa que el tratamiento con Sortin2 sólo en la sección II provoca que las plántulas sean parcialmente agravitrópicas, ya que la orientación que presenta su raíz principal con el vector de gravedad es menor que en las plántulas tratadas en la placa control.

Al estar Sortin2 en contacto sólo con la región central de la raíz principal, lejos del meristema basal de la raíz principal, la densidad de raíces laterales se induce desde los 6 días de tratamiento (Fig. 16c). Incluso, al evaluar en qué sección de las raíces se inducía la mayor densidad de raíces laterales, se obtuvo que la inducción de la densidad de raíces laterales es específicamente en la región de la raíz principal que está en tratamiento con la sección de la placa suplementada con Sortin2 (Fig. 16d), esto quiere decir, que el efecto de Sortin2 es local.

Con el fin de determinar si el tratamiento localizado con Sortin2 en la porción central de la raíz principal inducía una mayor densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos y/o de raíces laterales emergidas GUS positivas, se evaluó el tratamiento localizado con Sortin2 en plántulas de 7 días de la línea pCycB1;1::GUS por 6 días en la

placa SAP control y SAP Sortin2 central. La densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos (Fig. 16e) y de raíces laterales emergidas GUS positivas (Fig. 16f) indican que la presencia de Sortin2 en la porción central de la raíz induce localmente la densidad de primordios de raíces laterales y raíces laterales emergidas positivas para GUS. Esto sugiere que Sortin2 induce la diferenciación de las células del periciclo, provocando la inducción de primordios de raíces laterales que se desarrollan como raíces laterales emergidas.



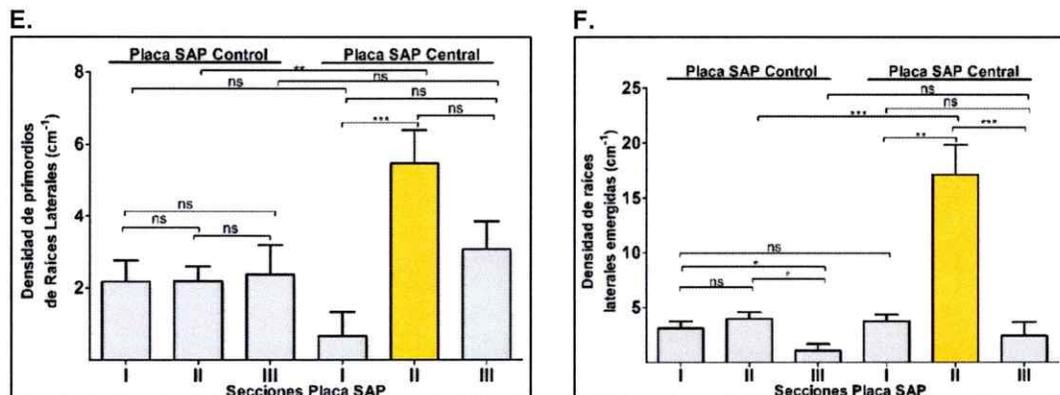


Figura 16: Sortin2 induce la formación de raíces laterales independiente de su presencia en el meristema basal de la raíz principal. (A) Plántulas de 7 días del ecotipo silvestre Col-0 se transfirieron a placas de agar segmentado (SAP) control o Sortin2 central, que poseían MS-agar suplementado con DMSO 1% en las secciones de la placa SAP I, II y III, y Sortin2 25 μ g/mL en la sección II y DMSO 1% en las secciones I y III, respectivamente. Cada sección es separada por espacios de aire libres de MS-agar como se ve en los esquemas. **(B)** Crecimiento de plantas Col-0 de 7 días que se trataron por 6 días en placa SAP control y Sortin2 central. En flechas negras se marcan las raíces laterales en la sección II de la placa que contiene Sortin2. En flechas rojas se ve que las raíces laterales que están en las secciones que contienen DMSO 1% se asemejan en ambas placas. En flechas amarillas se marca el crecimiento de la raíz principal. Las barras de tamaño corresponden a 5 mm. **(C)** Densidad de raíces laterales. El tratamiento localizado de Sortin2 en la porción central de la raíz principal, induce un aumento en la densidad de raíces laterales en plantas Col-0 después de 6 días de ser transferidas. **(D)** La densidad de raíces laterales en las secciones de las placas SAP indica que la sección en donde se induce la mayor densidad de raíces laterales coincide con la sección que contiene Sortin2. Se cuantificaron la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos **(E)** y la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas **(F)** en plántulas de la línea pCycB1;1::GUS de 7 días que se traspasaron a placas SAP control o Sortin2 central. Ambas cuantificaciones dan cuenta que Sortin2 es capaz de inducir la formación de primordios de raíces laterales y raíces laterales emergidas en la sección en que está presente. Los datos son el promedio de 3 réplicas experimentales (n=29-43). Las barras de error corresponden al error estándar. Los datos se evaluaron estadísticamente con la prueba de t-student: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns=no significancia.

En resumen, con estos resultados se propone que Sortin2 puede inducir raíces laterales de manera local sobre la raíz principal, sugiriendo fuertemente que Sortin2 promueve la diferenciación de las células del periciclo irrumpiendo de manera independiente de las señales que se llevan a cabo en el meristema basal de la raíz principal. Además, se propone que el efecto provocado por el tratamiento local con Sortin2 se movilizaría, ya que en las regiones de la raíz principal que no están en contacto con Sortin2, de igual manera presentan efectos típicos del tratamiento con Sortin2, mayor número de raíces

laterales, alteración en la respuesta gravitrópica y disminución del largo de las raíces laterales.

3.3.2. Evaluación del efecto local de Sortin2 sobre la inducción de eventos de formación de raíces laterales

Se ha mostrado que Sortin2 induce la densidad de raíces laterales al ser suplementado en secciones acotadas de la raíz principal, sin embargo aún queda la interrogante si está induciendo la formación de eventos de raíces laterales *de novo* o si está promoviendo el desarrollo de primordios de raíces laterales que ya han sido iniciados y se encuentran a lo largo de la raíz primaria (Dubrovsky y Forde, 2012; Moreno-Risueno y Benfey, 2011). Para determinar cuál de estas alternativas es lo que está sucediendo, se utilizó plántulas de 7 días de la línea pCycB1;1::GUS que se crecieron en MS-agar suplementado con NPA 10 μ M. Mediante esta estrategia se ha controlado la reactivación del ciclo celular sincrónicamente durante las primeras etapas de la formación de raíces laterales (Himanen y *col.*, 2002), bloqueando el ciclo celular en la fase G1 en las células del periciclo (Himanen y *col.*, 2002), por lo que las plantas carecen de primordios. Se traspasaron las plántulas de 7 días a placas SAP que contenían en la sección II de la placa, MS-agar suplementado con DMSO 1% (Control), Sortin2 25 μ g/mL, NPA 10 μ M ó Sortin2 25 μ g/mL más NPA 10 μ M (Fig. 17a). Las secciones I y III de las placas SAP contenían MS-agar suplementado con DMSO 1% (Fig. 17a). Luego de 6, 9 y 12 días de tratamiento en las placas SAP, se cuantificó la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos y de raíces laterales GUS positivas en las secciones de las plantas, encontrándose que 6 días de tratamiento localizado con Sortin2 son suficientes para inducir la densidad de primordios de raíces laterales localmente en la porción de la raíz principal que está en contacto con la sección de la placa que posee Sortin2 (Fig. 17b).

Interesantemente, en presencia del inhibidor del transporte polar de auxina NPA, Sortin2 provoca un aumento significativo de la densidad de primordios de raíces laterales localmente, lo que quiere decir que el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 es independiente del transporte polar de auxina.

Con respecto a la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas la sección II de las plantas (Fig. 17c), se obtuvo que Sortin2 induce la densidad de raíces laterales emergidas localmente a los 12 días de tratamiento. Esta inducción se produce incluso en presencia de NPA.

Estos resultados avalan la propuesta de que Sortin2 promueve un evento anterior a la etapa de iniciación en la formación de raíces laterales, induciendo la diferenciación de las células del periciclo, ya que en plántulas que carecen de primordios de raíces laterales luego del tratamiento local con Sortin2 logra inducir nuevos primordios de raíces laterales. Es importante denotar que el efecto de Sortin2 ocurre incluso en presencia del inhibidor del transporte polar de auxina NPA. Además, se vio que el tratamiento local con Sortin2 por tiempos prolongados no sólo induce primordios de raíces laterales *de novo*, sino que también promueve la inducción de la densidad de raíces laterales emergidas, lo que nos permite proponer que los primordios de raíces laterales inducidos por Sortin2 terminan su desarrollo hasta raíces laterales emergidas, provocando la modificación de la arquitectura radicular.

A partir de los resultados obtenidos se propone que el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 promueve un evento anterior a la iniciación en la organogénesis de raíces laterales, sugiriendo fuertemente que el evento gatillado por Sortin2 es en el que las células del periciclo adquieren la identidad de células

fundadoras. Por esta razón sería que los tratamientos con Sortin2 inducen tanto la densidad de primordios de raíces laterales como la densidad de raíces laterales emergidas.

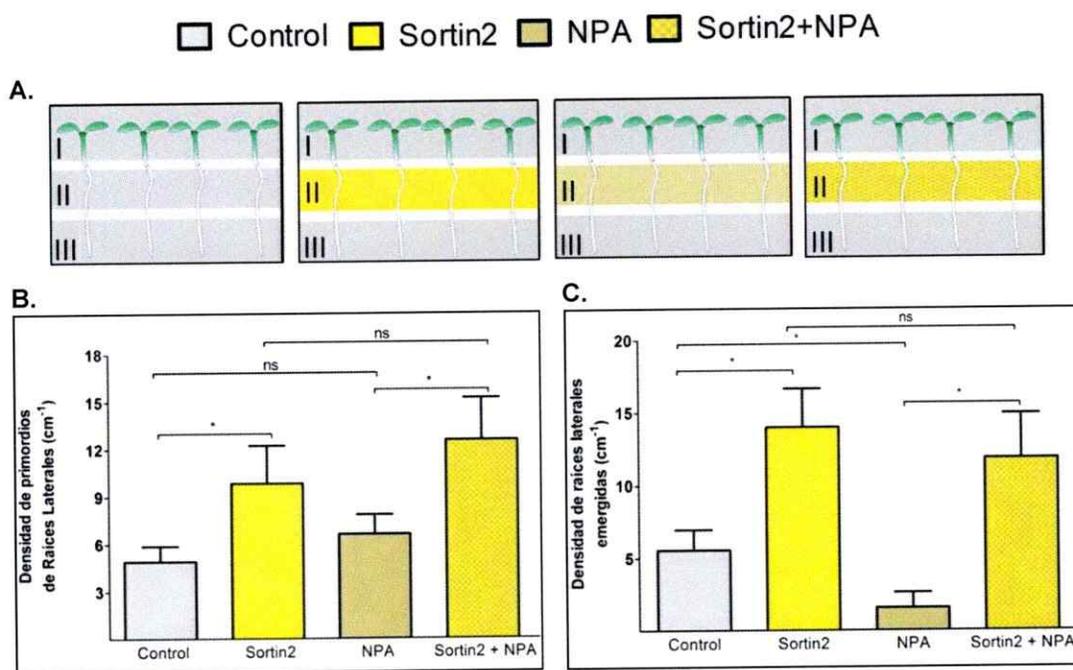


Figura 17: Sortin2 induce la diferenciación de las células del periciclo. Plántulas pCycB1;1::GUS de 7 días crecidas en NPA 10 μ M, y por lo tanto no poseen primordios de raíces laterales iniciados, **(A)** se transfirieron a placas de agar segmentado (SAP) que contienen MS-agar suplementado con DMSO 1% (Control), Sortin2 25 μ g/mL, NPA 10 μ M ó Sortin2 25 μ g/mL más NPA 10 μ M en la sección central de la placa (Sección II). **(B)** Densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos en la sección II de las placas SAP. Sortin2 a los 6 días de tratamiento induce primordios de raíces laterales localmente, incluso en co-tratamiento con NPA. **(C)** Densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas en la sección II de las placas SAP. A los 12 días de tratamiento, Sortin2 provoca la inducción de raíces laterales emergidas en presencia o ausencia de NPA. Los datos son el promedio de 3 réplicas experimentales (n=8-14). Las barras corresponden al error estándar. Los datos se evaluaron con la prueba de t-student: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ns=no significancia.

DISCUSIÓN

Las raíces laterales se desarrollan postembrionariamente y su desarrollo es de vital importancia para la adaptación de las plantas al medio en que se encuentran, ya que las raíces laterales, en conjunto con la raíz principal, determinan el volumen de suelo que la planta es capaz de explorar, por lo que se plantea que la arquitectura del sistema radicular es responsable tanto del anclaje de sustratos como del suplemento de agua y minerales (De Rybel y col., 2012). Por lo que la plasticidad de la arquitectura del sistema radicular es un rasgo importante que le permite a las plantas hacer frente a diferentes tipos de estrés abiótico y es, por lo tanto, determinante en el contexto actual del cambio climático global (Lavenus y col., 2013).

Actualmente se ha planteado la hipótesis de que las células del periciclo pueden ser destinadas a células fundadoras de raíces laterales a través de un estímulo que estaría río arriba de la señalización de auxina (Ditengou y col., 2008). Existen diversas evidencias que respaldan esta hipótesis. Como por ejemplo el hecho que estímulos mecánicos gravitrópicos o curvatura transiente de la raíz principal inducen la formación de raíces laterales por mecanismos independientes de componentes moleculares de la vía de señalización canónica de auxina (Ditengou y col., 2008).

Además, evidencia reciente muestra que la etapa de iniciación de los primordios de raíces laterales requiere de la actividad del facilitador de auxina PIN3 en las células endodermales (Marhavý y col., 2013), sin embargo, las células fundadoras de raíces laterales exhiben la expresión de pDR5:GFP previa a la acumulación de PIN3 en las células endodermales, sugiriendo que el destino de una célula fundadora de raíz lateral ya ha sido especificado (Marhavý y col., 2013).

En este trabajo se evidenció 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 Arabidopsis thaliana*. Esto se obtuvo mediante el uso de una herramienta genética como lo es el uso de mutantes con defectos conocidos en la formación de las raíces laterales. Se encontró que mutantes en la iniciación de raíces laterales eran resistentes al efecto inductor de raíces laterales de Sortin2. Además, utilizando líneas transgénicas reporteras evidenciamos que Sortin2 induce eventos moleculares claves para el mecanismo de formación de raíces laterales, como la expresión de GATA23, CycB1;1 y DR5. Por último, al trabajar con la metodología de placas de agar segmentado, obtuvimos que el tratamiento local con Sortin2 promueve la diferenciación de las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales.

4.1 Mutantes con defectos en la etapa de iniciación de la formación de las raíces laterales son resistentes al efecto de Sortin2

En la literatura se han clasificado distintas mutantes de *Arabidopsis* con defectos en las etapas de la formación de raíces laterales (Casimiro y *col.*, 2003; De Smet y *col.*, 2006; Péret y *col.*, 2009). Se ha caracterizado, en la mayoría de estas mutantes, el gen responsable de la mutación y la función que éste cumple en el contexto de la formación de raíces laterales. La evaluación de la sensibilidad a Sortin2 de estas líneas modificadas genéticamente nos permitió determinar que la inducción de raíces laterales producida por Sortin2 está río arriba de la etapa de iniciación de raíces laterales. Además, encontramos que este mecanismo de formación de raíces laterales requiere que determinadas proteínas involucradas en la iniciación de raíces laterales funcionen de manera correcta.

Con respecto a la sensibilidad a Sortin2 de las líneas silvestres encontramos que en Ws las veces de inducción de primordios de raíces laterales por Sortin2 es mayor que en Col-0 y además las veces de inducción de raíces laterales emergidas por Sortin2 es menor que en Col-0. Esto parece indicar que la organogénesis de raíces laterales pareciera ser más lenta en el ecotipo Ws al compararla con el ecotipo Col-0. Uno de los motivos de estos fenotipos puede ser que en el ecotipo Ws las proteínas que participan en el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 se encuentran en menor cantidad o presentan una actividad más baja que en el ecotipo Col-0.

Las líneas resistentes nos indican que el efecto de Sortin2 está situado río arriba de la iniciación de raíces laterales que involucra la función de las proteínas IAA14, CUL1, CEG, MAX2, JKD Y COI1, ya que sin ellas Sortin2 no puede llevar a cabo su efecto inductor de raíces laterales. Por otra parte, se obtuvo que *axr1-30*, *iaa12-1*, *35S::KRP2* y *max2-2* son parcialmente resistentes al tratamiento con Sortin2. Esto nos indica que parte del efecto de Sortin2 sobre la formación de raíces laterales, puede llevarse a cabo en ausencia de estas proteínas. Sin embargo, el efecto de Sortin2 estaría río arriba de la iniciación de raíces laterales que implica la función de las proteínas AXR1, IAA12, KRP2 y MAX2. Contrastantemente *aux1-21* y *axr4-1* son hipersensibles al tratamiento con Sortin2, esto quiere decir que la vía que induce Sortin2 involucra o intersecta con un proceso en que la función de las proteínas AUX1 y AXR4 es importante.

También se encontró que el efecto de Sortin2, con respecto a la formación de primordios de raíces laterales, está río arriba de la etapa del desarrollo de raíces laterales que involucra la función de las proteínas PIN1, RTY, ATPGP, NTL8 y SAC9. Además se obtuvo que las líneas *pin3-4*, *pin3pin4*, *pin3pin7*, *pin4pin7*, *pin1-101*, *pid14*, *agg1-1c*, *35S::NAC2* y *glip2-1* son parcialmente resistentes al tratamiento con Sortin2, lo que

sugiere que el efecto de Sortin2 se puede llevar a cabo por una vía alternativa o distinta a la que participan las correspondientes proteínas. Muy probablemente, y en base a que Sortin2 estaría río arriba del evento de iniciación, su blanco de acción se encuentra río arriba de la etapa del desarrollo de raíces laterales que involucra la función de las proteínas PIN3, PIN4, PIN7, PIN1, PID14, AGG1, NAC2 y GLIP2. Por otra parte, se encontró que las líneas hipersensibles a Sortin2 son *pin3-5*, *pin4-1*, *pid14wag1wag2*, *big*, *DN-rop2*, *acr4*, *35S::PID21* y *pRBR::RBR-RFP*. Vale decir, la acción de Sortin2 incluye o interseca en una vía de desarrollo de raíces laterales que incluye la función de las proteínas PIN3, PIN4, ROP2, ACR4, WAG1, WAG2, PID14, PID21 y RBR.

Cabe mencionar que tanto *pin3-4* como *pin3-5* son mutantes nulas y presentan una inserción de T-DNA en el primer exón del gen PIN3, sin embargo estas mutantes presentan distintas sensibilidades a Sortin2, esto puede deberse a que la porción de transcritos generados en las mutantes cumplen diferentes funciones que interfieren en el mecanismo de acción de Sortin2 (TAIR).

Al evaluar si el efecto provocado por Sortin2 estaría río arriba o río abajo a la etapa de emergencia de las raíces laterales y si estas proteínas involucradas en la emergencia son necesarias para que Sortin2 pueda ejercer su efecto inductor de raíces laterales, se obtuvo que *lox5-1* es parcialmente resistente al tratamiento con Sortin2 y que *lax3* es igual de sensible a Sortin2 que su línea parental. Esto nos indica que el efecto de Sortin2 está río abajo de la etapa de emergencia de las raíces laterales que involucran a LAX3 y río arriba de la que incluye a LOX5.

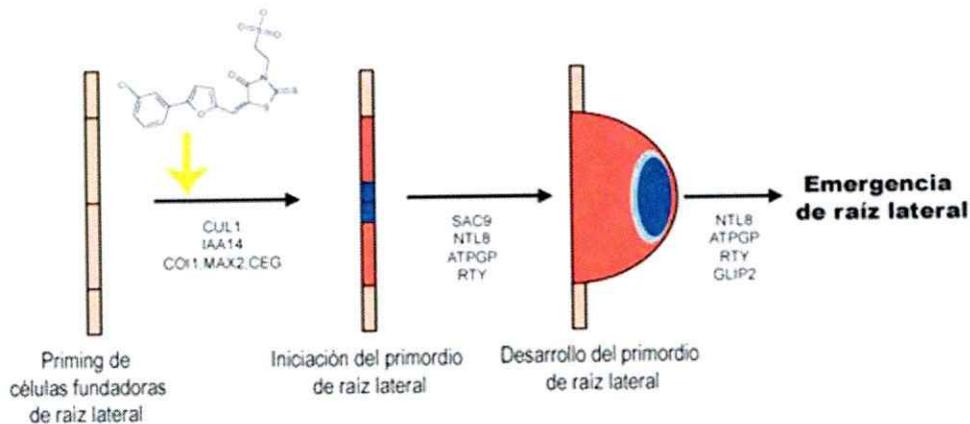


Figura 18: Modelo propuesto para el mecanismo de formación de raíces laterales promovido por Sortin2. Se propone a la acción de Sortin2 río arriba de la iniciación del primordio de raíz lateral y necesaria de CUL1, IAA14, COI1, MAX2 y CEG para poder iniciar una raíz lateral. Además, tomando en cuenta los resultados de los anexos II y III, este mecanismo depende de la correcta función de SAC9, NTL8, ATPGP, RTY y GLIP2 para continuar con el desarrollo y posterior emergencia del primordio de raíz lateral (Figura modificada de Jung & McCouch, 2013). *El modelo se realizó tomando en cuenta las mutantes resistentes al efecto inductor de raíces laterales gatillado por Sortin2.

Esto nos permite plantear un modelo en que Sortin2 actúa río arriba de la etapa de la iniciación de las raíces laterales y que necesita del correcto funcionamiento de las proteínas CUL1, IAA14, CEG, MAX2 y COI1 para poder dar paso a la iniciación de este mecanismo de formación de raíces laterales. Posteriormente, necesita de las proteínas SAC9, NTL8, ATPGP y RTY para que los primordios de raíces laterales puedan desarrollarse (Fig. 18).

4.2 Sortin2 induce eventos mitóticos tempranos asociados a la iniciación de raíces laterales en plántulas de *Arabidopsis thaliana*

Una raíz lateral es definida cuando determinadas células del periciclo adquieren el destino de células fundadoras de raíces laterales (Beveridge y col., 2007). Sortin2 provoca un aumento en la densidad de primordios de raíces laterales CycB1;1 positivos incluso en plántulas que carecen completamente de primordios de raíces laterales (Fig.

12), por lo que se puede afirmar que Sortin2 promueve la formación *de novo* de eventos mitóticos tempranos asociados a la iniciación de raíces laterales. Estos primordios de raíces laterales continúan su desarrollo hasta emerger tiempos posteriores de tratamiento de Sortin2. Esto propone que la potencialidad de la organogénesis de raíces laterales promovida por Sortin2 estaría latente en las raíces y que una señal, inducida en este caso por Sortin2, desencadenaría este mecanismo de diferenciación de células del periciclo a células fundadoras. El hecho que estos eventos continúen el patrón de división característico de un primordio de raíz lateral y sean capaces de emerger desde la raíz primaria, sugiere fuertemente que Sortin2 estaría estimulando eventos fisiológicos. Podría esperarse que el aumento de la densidad de raíces laterales emergidas ayudaría a la planta a adaptarse al medio en que se encuentra, permitiendo una mayor captación de nutrientes y agua. Se ha descrito que la arborización de la raíz promueve el desarrollo de plantas más vitales en carencia de fósforo (Williamson y *col.*, 2001). Muy probablemente esto sería promovido por el mecanismo de formación de raíces laterales gatillado por Sortin2, lo que debería estudiarse en el futuro.

La acumulación de auxina reportada por el promotor DR5 se ha descrito como un evento clave para la formación de raíces laterales, ya que se ha detectado la actividad DR5 en las células del periciclo que se presume que adquirieron su destino como células fundadoras de raíces laterales (Sabatini y *col.*, 1999). Esta acumulación reportada por el promotor DR5 se sitúa como un evento previo a la iniciación de raíces laterales. La inducción de raíces laterales por Sortin2 no va acompañada de la activación de esta línea reportera. De hecho, las plántulas de la línea reportera pDR5::GUS al ser tratadas con Sortin2 disminuyen tanto la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos como la densidad de raíces laterales emergidas GUS positivas (Fig. 7).

Consistentemente con esto, se ha reportado que Sortin2 no actúa como un inductor de la señalización de auxina y no promueve la actividad transcripcional del gen reportero de auxina DR5 (Pérez-Henríquez y *col.*, 2012). Otra explicación podría ser que Sortin2 promueve la formación de primordios de raíces laterales independiente de los eventos reportados en pDR5::GUS, ya que se ha reportado que la actividad del reportero GUS comandado por el promotor DR5 no necesariamente refleja los niveles de auxina en todos los casos, por el propio umbral de sensibilidad y saturación de la vía de señalización de auxina (Benková y *col.*, 2003). Una alternativa sería evaluar la sensibilidad de los eventos inducidos por Sortin2 en líneas reporteras más sensibles a auxina, como la basada en el gen de respuesta a auxina ARABIDOPSIS HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6 (AHP6) que está inducido en las células del protoxilema y en las células de los polos del xilema del periciclo antes que lo evidenciado por líneas reporteras basadas en DR5 (Bishopp y *col.*, 2011). De esta forma podríamos detectar niveles más bajos de concentración de auxina que posiblemente induciría Sortin2.

Por otra parte, se ha descrito que plántulas obtenidas en medios de cultivo en presencia de NPA carecen de eventos de primordios de raíces laterales (Casimiro y *col.*, 2001). Al evaluar el tratamiento con Sortin2 en plántulas de la línea pDR5::GUS obtenidas en medios de cultivo en presencia de NPA, se obtuvo que Sortin2 aumenta significativamente la densidad de primordios de raíces laterales DR5 positivos (Fig.7). Además se ha detectado, mediante espectrometría de masas, un aumento de ácido indol acético en las raíces tratadas con NPA, sin embargo se ha reportado que esta concentración es *subóptima* para iniciar raíces laterales (Casimiro y *col.*, 2001), por lo que esta inducción de eventos tempranos de la formación de raíces laterales por Sortin2,

podría deberse a que la concentración de ácido indol acético reportada como *subóptima* por Casimiro y *col.*, 2012, es suficiente para que Sortin2 induzca la iniciación de raíces laterales (Fig. 20).

En la organogénesis de las raíces laterales se ha descrito que tanto la producción de eventos máximos de auxina como los eventos de proliferación celular, son importantes para completar este proceso (Benková y *col.*, 2003; Himanen y *col.*, 2012). Se dice que cada evento de raíz lateral proviene de un sitio donde hubo un máximo de auxina en las células del periciclo (Benková y *col.*, 2003), por lo que comparación de la inducción de estos eventos por Sortin2 resultó ser interesante. La Fig. 19 compara los resultados de las secciones 4.2.1 y 4.2.2 de este Seminario de Título. Cabe señalar que las plántulas germinadas y crecidas en MS-agar presentaron una diferencia con respecto al valor de la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos entre las líneas reporteras pDR5::GUS y pCycB1;1::GUS tanto en los tratamientos controles como en los tratamientos con Sortin2. Esto puede deberse a que Sortin2 estaría desencadenando un paso previo a la iniciación de raíces laterales que depende de manera distinta de los eventos caracterizados que participan en la formación de raíces laterales, como por ejemplo la acumulación de auxina en las células del periciclo. Esta última hipótesis se sustenta en que el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 es independiente del complejo receptor de auxina SCF^{TIR} (Pérez-Henríquez y *col.*, 2012). Alternativamente, puede ser que las líneas reporteras presentan un número de eventos de formación de raíces laterales diferente al momento de ser traspasadas a los tratamientos. En este sentido, los tratamientos controles en plántulas de las líneas reporteras pDR5::GUS y pCycB1;1::GUS que carecen de eventos de iniciación de primordios de raíces laterales, presentan valores de densidad de los respectivos eventos

de formación de raíces laterales que no varían significativamente, lo que permite descartar esta última opción (Fig. 19b, comparación de resultados de las secciones 4.2.1 y 4.2.2).

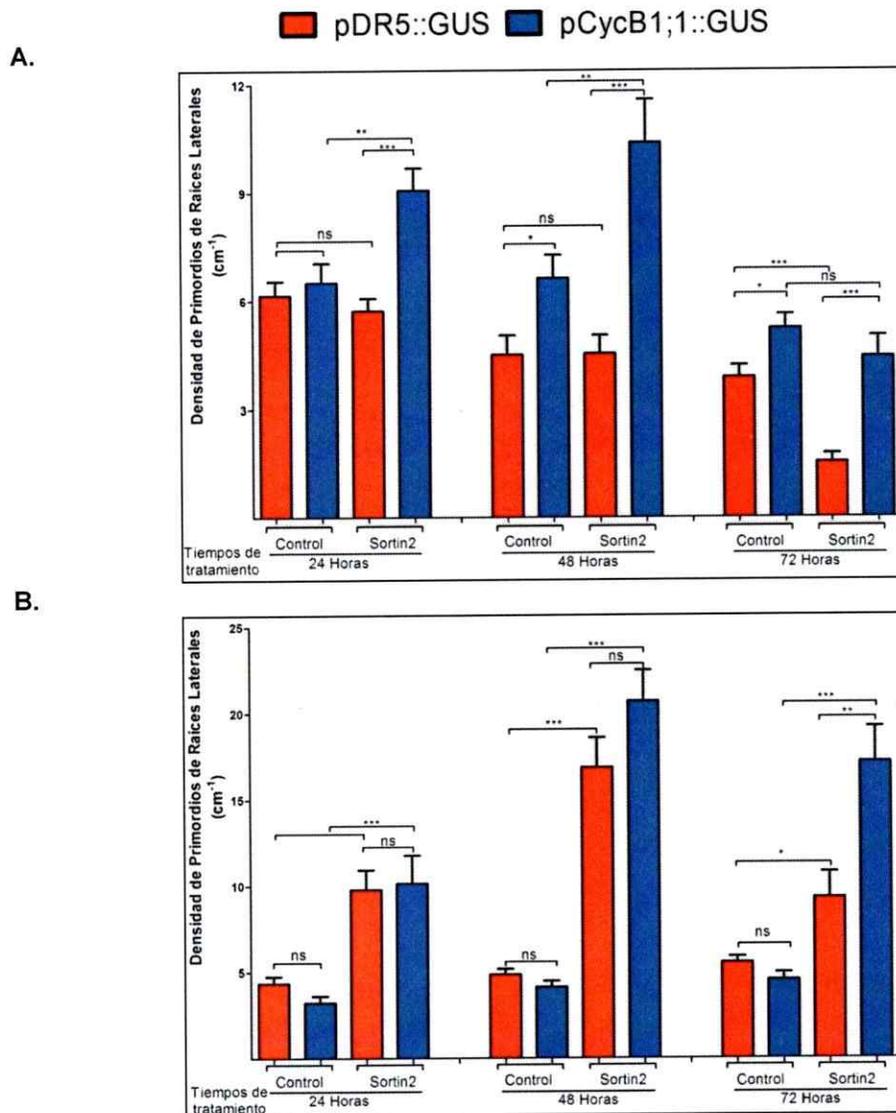


Figura 19: Sortin2 induce más eventos de proliferación celular que eventos máximos de auxina. Plántulas de 7 días de las líneas reporteras pDR5::GUS (barras rojas) y pCycB1;1::GUS (barras azules) germinadas y crecidas en MS-agar (A) o MS-agar suplementado con NPA 10 µM (B), se trataron por 24, 48 o 72 horas en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control) y Sortin2 25 µg/mL. (A) En la línea pCycB1;1::GUS Sortin2 induce la densidad de primordios de raíces laterales positivos para eventos de proliferación celular. En cambio, esta inducción de eventos DR5 positivos bajo tratamiento con Sortin2 no

se presenta en la línea pDR5::GUS. **(B)** La densidad de primordios de raíces laterales positivos para eventos máximos de auxina y eventos de proliferación celular se induce bajo tratamiento con Sortin2 en la línea pDR5::GUS y en la línea pCycB1;1::GUS, respectivamente. Los datos son el promedio de 5 réplicas experimentales (n=26-50). Las barras de error corresponden al error estándar. Los datos se evaluaron estadísticamente con la prueba de t-student: *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001; ns=no significancia.

Por otra parte, al tratar las plántulas con Sortin2 por 72 horas, se obtuvo que la densidad de primordios de raíces laterales GUS positivos en la línea pCycB1;1::GUS es mayor en un 46% que en la línea pDR5::GUS. Esta diferencia puede deberse a que Sortin2 induce eventos previos a la iniciación de raíces laterales, consistente con la evidencia genética presentada en este Seminario de Título, la que propone que Sortin2 está río arriba de la iniciación de raíces laterales. Estos eventos tempranos serían entonces independientes de los eventos de máximo de auxina reportados por la expresión de pDR5::GUS, consistentemente con lo reportado por Pérez-Henríquez y *col.*, 2012. De esta manera puede plantearse que Sortin2 induce un evento previo a la acumulación de auxina que desencadena la señalización de esta hormona en la organogénesis de raíces laterales y por ende, antes de la iniciación de raíces laterales.

4.3 El mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 promueve la diferenciación de las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales

El efecto de Sortin2, a nivel del desarrollo radicular, provocaría el cambio del destino de células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales. Esto se ratifica con el hecho que Sortin2 induce la actividad promotor del gen GATA23 que corresponde al componente molecular más temprano que se ha identificado que controla la identidad de las células fundadoras de raíces laterales en la raíz de *Arabidopsis* (De Rybel y *col.*, 2010). Este gen se expresa específicamente en las células de los polos del xilema del

periciclo antes de la primera división asimétrica (De Rybel y *col.*, 2010). La inducción de la línea reportera se correlaciona con el hecho de que en plántulas silvestres aumenta significativamente los niveles de mRNA de GATA23 bajo 6 horas de tratamiento con Sortin2 (Pérez-Henríquez y *col.*, 2014).

La inducción de la línea reportera pGATA23::GUS que se produce al ser germinadas y crecidas en NPA en condiciones control, se debería a que se provocan cambios en los niveles de auxina que afectarían la expresión comandada por el promotor de GATA23 (comunicación personal Dr. Tom Beeckman). De igual manera, se ve una inducción de la actividad GUS bajo tratamiento con Sortin2 en comparación al control mostrando que Sortin2 puede estimular el proceso de organogénesis incluso al co-tratar localmente con el inhibidor del transporte polar de auxina NPA (Fig. 20).

Los eventos anteriormente analizados avalan la hipótesis de que Sortin2 promueve un factor especificador de raíces laterales, no identificado hasta el momento (Smet y *col.*, 2010; Vanneste y *col.*, 2005). Además, este análisis permite generar un modelo en el que se propone que Sortin2, a una concentración de auxina hipotética que no es reportada por el promotor DR5 pero que sí induce la expresión de GATA23, es capaz de diferenciar las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales (Fig. 20).

Cuando las plantas de *Arabidopsis* son crecidas *in vitro* en condiciones estándares, las raíces laterales se distribuyen a lo largo de la raíz primaria y siguen un patrón alternado a lo largo de la raíz (Mallory y *col.*, 1970; Charlton, 1983). Esta distribución regular es controlada por un mecanismo semejante a un reloj endógeno que genera oscilaciones de la respuesta a auxina en las filas de células del protoxilema en la zona de oscilación de la raíz primaria (Moreno-Risueno y *col.*, 2010). El mecanismo de formación de raíces

laterales inducido por Sortin2 es capaz de actuar localmente, es decir, estando presente en distintas zonas de la raíz principal, en las cuales se incluye o no el meristema basal, podemos encontrar que específicamente en las regiones de la raíz principal que están en contacto con Sortin2 es donde se induce la mayor densidad de raíces laterales (Fig.15 y Fig.16).

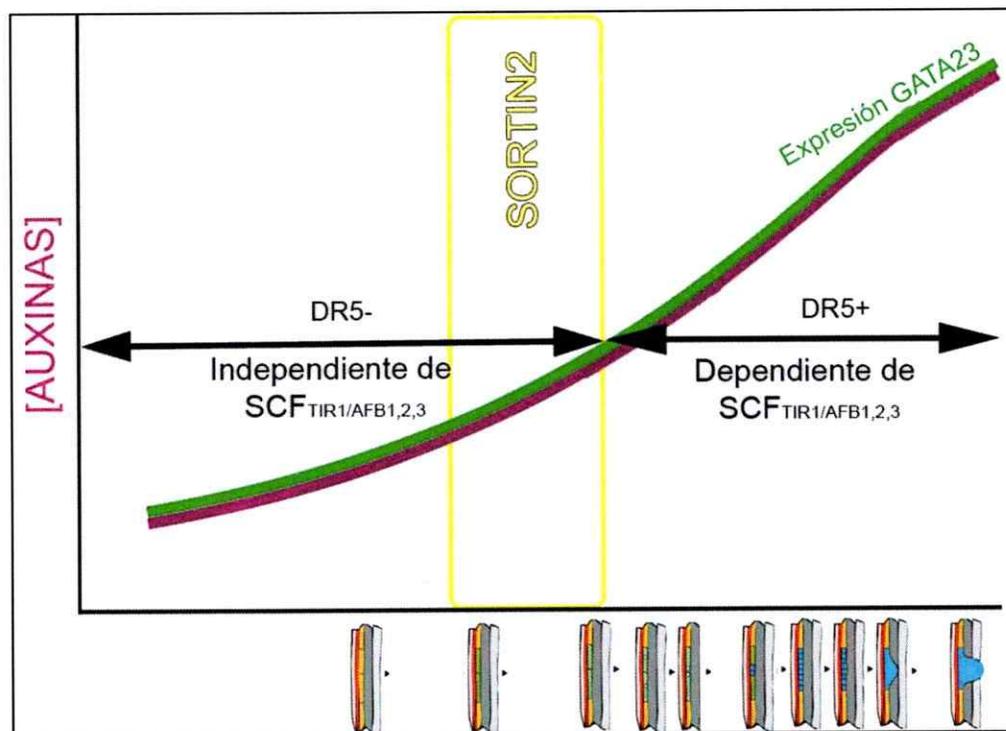


Figura 20: Modelo propuesto para el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 es capaz de diferenciar las células del periciclo a células fundadoras independiente del complejo receptor $SCF^{TIR1/AFBs}$. Se grafica la concentración de auxina hipotética con respecto a los eventos DR5 positivos y DR5 negativos que se pueden detectar. Se sitúa a la acción de Sortin2 como un inductor de la expresión de GATA23 y por ende, un diferenciador del destino de las células del periciclo a células fundadoras. Sortin2 además actúa a concentraciones de auxinas que no son reportadas por el promotor DR5, lo que se correlaciona con su independencia del complejo receptor $SCF^{TIR1/AFBs}$ reportada en Pérez-Henríquez y *col.*, 2012.

Además, el efecto que posee Sortin2 al estar presente en la zona del meristema basal, puede postularse a que este compuesto o una señal, activada o reprimida por Sortin2, interfiere con la oscilación génica característica del meristema basal comandada por

auxina, provocando la formación de nuevos sitios de pre-ramificación. Otra alternativa es que Sortin2 interfiera con la acumulación de auxina, ya que se ha determinado que los sitios de pre-ramificación dependen de la auxina sintetizada localmente, de la auxina derivada desde la parte aérea que se transporta al ápice de la raíz a través del floema y del retorno de auxina, desde la punta de la raíz primaria, a la zona del meristema basal llevado a cabo por los facilitadores de eflujo de auxina PIN (Marhavy y *col.*, 2013).

Además, el tratamiento local con Sortin2 induce la formación de raíces laterales en la zona de la raíz principal lejana al meristema basal y cercana al hipocotilo, lo que estaría sugiriendo que Sortin2 induce el desarrollo de primordios arrestados (Dubrovsky y *col.*, 2006) o que se especifican las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales. Nuestros resultados también nos indican que Sortin2 induce la formación de raíces laterales independiente de cuál zona de la raíz primaria esté en contacto con este compuesto, lo que podría reforzar la propuesta de que Sortin2 provoca un estímulo que desencadena en la especificación de las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales, ya que como hemos visto previamente Sortin2 activa y, al parecer, depende de procesos distintos a los gatillados por auxina. Otra posibilidad es que Sortin2 se puede estar movilizando o movilice a una señal que interfiera con la señalización presente en el meristema basal de la raíz principal, provocando que una mayor población de células del periciclo se destinen a células fundadoras de raíces laterales y en consecuencia, aumente la densidad de raíces laterales en esa zona.

El hecho que en el ensayo de agar segmentado se consideró la presencia de espacios libres de aire como se indica en Zhang & Forde, 1998 hace menos posible que Sortin2 difunda libremente entre las distintas secciones de la placa. Sin embargo el compuesto podría estar movilizándose por la raíz principal y así causar su efecto. Esta última

posibilidad podría ser evaluada midiendo la cantidad de Sortin2 presente en las porciones de la raíz primaria por espectrometría de masas u otra técnica.

Se ha descrito que parte del *priming* es una compleja regulación entre el transporte de auxina, la señalización de auxina y el reloj interno que genera oscilaciones periódicas en la expresión de genes en la región del meristema basal (Van Norman y *col.*, 2013), sin embargo aún existen otros eventos relacionados con la especificación de las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales que no han sido descritos. La aplicación de Sortin2 local a plántulas germinadas y crecidas en NPA, induce localmente la densidad de primordios de raíces laterales en tiempos tempranos de tratamiento con Sortin2 y una inducción local de la densidad de raíces laterales emergidas a tiempos prolongados de tratamiento con Sortin2. Esto refuerza la hipótesis de que Sortin2 está provocando la diferenciación de células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales, es decir, el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 está actuando en un evento previo a la iniciación de raíces laterales. También condice con que estas células fundadoras continúan un patrón de desarrollo hasta raíces laterales emergidas, postulando que Sortin2 estimula la organogénesis *de novo* de las raíces laterales. Esto es consistente con que el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 no es inhibido por NPA (Pérez-Henríquez y *col.*, 2012). Por lo que el evento previo a la iniciación, inducido por Sortin2, sería independiente del transporte de auxina reprimido por NPA.

El tratamiento local con Sortin2 también nos revela que la inhibición del largo de la raíz principal es independiente del lugar en que Sortin2 se disponga, por lo que se avala la propuesta de que este efecto puede tener un blanco distinto al del que induce la organogénesis de raíces laterales, porque independiente de que si Sortin2 promueve la

organogénesis de raíces laterales, igualmente se ve una tasa menor de crecimiento de la raíz principal, aunque esto puede deberse a que las células elonguen menos, por lo que se debe evaluar la longitud de las distintas zonas de desarrollo de la raíz principal.

4.4 Sortin2 ejercería un efecto hormonal que provoca la iniciación de raíces laterales

Entre las funciones de varios de los genes cuya mutación produce diferencias en la sensibilidad al efecto de Sortin2 se encuentran algunas características en común. Las proteínas SLR1/IAA14, IAA12 y CEG están relacionadas con la señalización de la hormona auxina. MAX2 se encuentra implicada en la vía de señalización de las estrigolactonas. COI1 está envuelta en la señalización del ácido jasmónico. AXR1 y CUL1 forman parte de los complejos receptor SCF y se encuentran involucradas en la vía de señalización de las hormonas auxina, ácido jasmónico y estrigolactonas (Hua & Vierstra, 2011), KRP2 está implicada en la regulación del ciclo celular y JKD controla el patrón epidermal. Todas estas proteínas son necesarias para que se lleve a cabo el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2, es decir, Sortin2 activaría o reprimiría una señal que desencadenaría una respuesta hormonal que es reconocida por el complejo receptor SCF^{COI1} o SCF^{MAX2}, que promueve una señalización que necesitaría de la degradación de las AUX/IAA y de un ciclo celular correctamente regulado. Por lo demás, en concordancia con este resultado, se ha evidenciado en nuestro laboratorio utilizando la línea DII-VENUS que el tratamiento con Sortin2 es incapaz de degradar las proteínas AUX/IAA.

Además, AXR4 y AUX1 están involucradas en el transporte polar de la hormona auxina, específicamente en el influjo de auxinas. Con los resultados obtenidos se plantea que la

acumulación de auxinas en el apoplasto provoca un ambiente beneficioso para la señal que induce o reprime el mecanismo de formación de raíces laterales promovido por *Sortin2*, ya que estas mutantes tienen defectos en el influjo de auxinas y el tratamiento con *Sortin2* promueve una mayor inducción de la densidad de primordios de raíces laterales al compararlas con la inducción provocada en la línea silvestre.

Por lo demás, las proteínas PIN1, PIN3, PIN4 y PIN7 están involucradas en el transporte polar de la hormona auxina, específicamente en el eflujo de auxinas. La resistencia a *Sortin2* de las mutantes de estos facilitadores con respecto al desarrollo de primordios, nos sugiere que la acumulación de auxinas en el citoplasma impide que se lleve a cabo la formación de raíces laterales inducida por *Sortin2*, esto se correlaciona con la hipersensibilidad de la mutante del facilitador de influjo AUX1. Sin embargo, la expresión ectópica de PIN1 y la consecuente acumulación de auxinas en el apoplasto en las diversas capas de la raíz principal (Benková y col., 2003), sería un ambiente desfavorable para la promoción de primordios por *Sortin2*, lo que podría deberse a que el eflujo excesivo de auxinas en los diversos tejidos de la raíz posee un rol antagónico en el mecanismo de formación de raíces laterales de *Sortin2*.

Por otra parte, PINOID, RCN1, ROP2, BIG, WAG1 y WAG2 están implicadas en el direccionamiento de las proteínas encargadas del transporte de auxina. La falta de PIN fosforilado por PINOID provoca que sólo una parte del efecto de *Sortin2* en el desarrollo de primordios de raíces laterales emergidas se lleve a cabo y una alta tasa de fosforilación de los PIN por PINOID favorece de sobremanera que la acción de *Sortin2* se lleve a cabo. Cabe mencionar que la proteína LAX3 está involucrada en el transporte polar de la hormona auxina, específicamente en el influjo de auxinas, lo que concuerda con la hipersensibilidad de *aux1-21* y *axr4-1*.

LOX5 participa en la vía de la 9-lipoxigenasa, es decir, está involucrada en la síntesis de jasmonato (Vellosillo y col., 2007), al ser *lox5-1* parcialmente resistente al efecto de Sortin2, se apoya la propuesta de que Sortin2 ejerce un efecto hormonal que desencadena este mecanismo de formación de raíces laterales.

Por último, en este Seminario de Título se pudo evidenciar mediante distintas estrategias de 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 Arabidopsis thaliana*. Por lo que se acepta la hipótesis propuesta en este Seminario de Título. Además se propone que el tratamiento con Sortin2 estaría emulando un evento fisiológico que la planta censa y responde aumentando la densidad de raíces laterales para poder captar una mayor cantidad de nutrientes y agua. Este evento se relacionaría con una vía hormonal que, para desencadenar la diferenciación de las células del periciclo, no estaría relacionada con la vía canónica de señalización de la hormona auxina.

CONCLUSIONES

1. Sortin2 afecta un evento previo a la etapa de iniciación en la organogénesis de las raíces laterales.
2. El correcto funcionamiento de las proteínas CUL1, IAA14, COI1, MAX2, SAC9, GLIP2, RTY, CEG, NTL8 y ATPGP se requiere para que Sortin2 o una señal inducida por Sortin2, desencadene el mecanismo de formación de raíces laterales.
3. Sortin2 induce eventos moleculares claves para la iniciación de raíces laterales, específicamente la expresión del factor de transcripción que controla la identidad de células fundadoras, GATA23, de la ciclina dependiente de quinasa que marca división celular, CycB1;1 y promueve la actividad del promotor sintético que responde a auxina, DR5.
4. Sortin2 induce la formación de eventos de proliferación celular asociados a la iniciación de raíces laterales que serían al menos temporalmente independientes de los eventos de máximos de auxinas.
5. El mecanismo de formación de raíces laterales de Sortin2 promueve los eventos de diferenciación de las células del periciclo a células fundadoras.
6. Sortin2 induce un evento previo a la iniciación de raíces laterales localmente y *de novo*.
7. Se comprueba la hipótesis propuesta en que el mecanismo de formación de raíces laterales de Sortin2 promueve un evento previo a la iniciación de raíces laterales que diferencia a las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales.

PROYECCIONES

El trabajo experimental realizado en este Seminario de Título, abre nuevas interrogantes en el estudio del mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2 que pueden responderse con las siguientes aproximaciones:

- *Determinar si la acción de Sortin2 está río arriba o río abajo de los componentes moleculares afectados en las mutantes resistentes a Sortin2.* Esto puede realizarse mediante la evaluación de la expresión de GATA23 y CycB1;1 mediante qPCR o utilizando líneas reporteras con el *background* mutante de interés. Una inducción de la expresión de GATA23 y/o CycB1;1 por Sortin2 en las mutantes resistentes nos indicaría que la mutante no puede generar raíces laterales porque su mutación bloquea el mecanismo de formación de raíces laterales inducido por Sortin2, no porque Sortin2 no esté induciendo el evento de pre-iniciación de raíces laterales.
- *Evaluar bajo tratamiento con Sortin2 los niveles endógenos de auxina de las mutantes hipersensibles a Sortin2 relacionadas con el transporte de auxinas.* Esto puede evaluarse mediante espectrometría de masas o HPLC. Otra forma puede ser cruzando estas distintas líneas con la línea reportera pIAA2::GUS, esta línea reportera ha sido caracterizada por presentar una alta expresión de GUS en las raíces de *Arabidopsis* (Nadella y col., 2006).
- *Determinar si el tratamiento localizado con Sortin2 en las mutantes hipersensibles a este compuesto puede generar la formación de raíces laterales en estas líneas y si su sensibilidad a Sortin2 se mantiene en estas condiciones.*
- *Evaluar la sensibilidad a Sortin2 de las mutantes en iniciación cuando son germinadas y crecidas en MS-agar suplementado con NPA.* En estas condiciones se bloquearía de

dos maneras la iniciación de raíces laterales de manera de determinar si el evento inducido por Sortin2 se puede llevar a cabo.

- *Realizar las réplicas experimentales faltantes de las mutantes como lox5-1, coi1-16, entre otras.*

- *Efectuar la cuantificación de hormonas en plántulas sometidas a tratamiento con Sortin2 a través de espectrometría de masas.*

PRESENTACIONES A CONGRESOS

1. VII Plant Biology Meeting, Pucón, Chile, 2012. "Endocytic acceleration induces ARF7 ARF19-independent lateral root development," Pérez-Henríquez Patricio, **Morales Stefanía**, Norambuena Lorena. Centro de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
2. XII PABMB Congress, Puerto Varas, Chile, 2013. " Endocytosis dynamics synthetically induced leads lateral root initiation most likely changing cell fate in *Arabidopsis thaliana*". **Morales Stefanía**, Pérez-Henríquez Patricio, Norambuena Lorena. Centro de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
3. XXXVII Reunión Anual Sociedad de Bioquímica y Biología Molecular, Puerto Varas, Chile, 2014. "The endocytosis dynamics inducer Sortin2 triggers founder cell specification involving a distinctive lateral root formation transcriptional program in *Arabidopsis thaliana*". **Morales Stefanía**, Pérez-Henríquez Patricio, Norambuena Lorena. Centro de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

BIBLIOGRAFÍA

ABRC [en línea] <<http://abrc.osu.edu>>

Alonso, J. M., Alonso, M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., ... Crosby, W. L. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301, 653–657.

Bargmann, B. O., Vanneste, S., Krouk, G., Nawy, T., Efroni, I., Shani, E., ... Birnbaum, K. D. (2013). A map of cell type-specific auxin responses. *Molecular Systems Biology*, 9, 1–13.

Beeckman, T., Burssens, S., Inzé, D. (2001). The peri-cell-cycle in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 52, 403–11. Benjamins, R., Quint, A., Weijers, D., Hooykaas, P., Offringa, R. (2001). The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development*, 128, 4057–4067.

Benkova, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Pflanz, M. Der. (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)

Beveridge, C. a, Mathesius, U., Rose, R. J., Gresshoff, P. M. (2007). Common regulatory themes in meristem development and whole-plant homeostasis. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 44–51.

Bishopp, A., Help, H., El-Showk, S., Weijers, D., Scheres, B., Friml, J., ... Helariutta, Y. (2011). A mutually inhibitory interaction between auxin and cytokinin specifies vascular pattern in roots. *Current Biology*, 21(11), 917–26.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., ... Bennett, M. J. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science*, 8(4), 165–71.

Casimiro, I., Marchant, a, Bhalerao, R. P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., ... Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Cell*, 13(4), 843–52. 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.

- Christensen, S.K., Dagenais, N., Chory, J., Weigel, D. (2000). Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell*, 100, 469–478.
- De Rybel, B., Audenaert, D., Xuan, W., Overvoorde, P., Strader, L. C., Kepinski, S., ... 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 Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., ... 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 Smet, I., Lau, S., Voß, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E. H. (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*. *PNAS*, 107, 2705–2710.
- De Smet, I., Tetsumura, T., De Rybel, B., Frei dit Frey, N., Laplaze, L., Casimiro, I., ... Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, 134(4), 681–90.
- De Smet, I., Vanneste, S., Inzé, D., Beeckman, T. (2006). Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology*, 60(6), 871–87.
- De Smet, I., Vassileva, V., De Rybel, B., Levesque, M. P., Grunewald, W., Van Damme, D., ... Beeckman, T. (2008). Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science*, 322(5901), 594–7.
- Del Pozo, J., Boniotti, M. B., Gutierrez, C. (2002). *Arabidopsis* E2Fc Functions in Cell Division and Is Degraded by the Ubiquitin-SCF AtSKP2 Pathway in Response to Light. *The Plant Cell*, 14, 3057–3071.
- Del Pozo, J. C., Diaz-Trivino, S., Cisneros, N., Gutierrez, C. (2006). The balance between cell division and endoreplication depends on E2FC-DPB, transcription factors regulated by the ubiquitin-SCF^{SKP2A} pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 18(9), 2224–35.
- Deruere, J., Jackson, K., Garbers, C., Soll, D., DeLong, A. (1999). The RCN1 -encoded A subunit of protein phosphatase 2A increases phosphatase activity in vivo. *The Plant Journal*, 20, 389–399.
- DiDonato, R. J., Arbuckle, E., Buker, S., Sheets, J., Tobar, J., Totong, R., ... 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., ... Palme, K. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS*, *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.
- Dubrovsky, J. G., & Doerner, P. W. (2000). Pericycle Cell Proliferation and Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *124*, 1648–1657.
- Dubrovsky, J. G., & Forde, B. G. (2012). Quantitative Analysis of Lateral Root Development : Pitfalls and How to Avoid Them. *The Plant Cell*, 1–11.
- Dubrovsky, J. G., Gambetta, G. A., Hernández-Barrera, A., Shishkova, S., & González, I. (2006). Lateral Root Initiation in *Arabidopsis*: Developmental Window , Spatial Patterning , Density and Predictability. *Annals of Botany*, *97*, 903–915.
- Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucially-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. *PNAS*, *105*, 8790-4.
- Ferreira, P. (1994). Developmental Expression of the *Arabidopsis* Cyclin Gene *cyc1At*. *The Plant Cell*, *6*(12), 1763–1774.
- Forde, B. G. (2002). The role of long-distance signalling in plant responses to nitrate and other nutrients. *Journal of Experimental Botany*, *53*(366), 39–43.
- Forestan, C., & Varotto, S. (2012). The role of PIN auxin efflux carriers in polar auxin transport and accumulation and their effect on shaping maize development. *Molecular Plant*, *5*(4), 787–98.
- Frankenberger, W. T., & Arshad, M. (1995). *Phytohormones in soils: Microbial production and function*. (p. 506).
- Friml, J., Benkova, E., Bliilou, I., Wisniewska, J., Hamann, T., Ljung, K., Woody, S., Sandberg, G., Scheres, B., Jurgens, G. (2002). AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, *108*, 661–673.
- 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., 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.

Fukaki, H., Taniguchi, N., Tasaka, M. (2007). PICKLE is required for SOLITARY-ROOT / IAA14-mediated repression of ARF7 and ARF19 activity during *Arabidopsis* lateral root initiation. *The Plant Journal*, 48, 380–389.

Fukaki, H., & Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, 69, 437–449.

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.

Gil, P., Dewey, E., Friml, J., Zhao, Y., Snowden, K. C., Putterill, J., ... Chory, J. (2001). BIG : a calossin-like protein required for polar auxin transport in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 15, 1985–1997.

Gilkerson, J., Hu, J., Brown, J., Jones, A., Sun, T., Callis, J. (2009). Isolation and Characterization of cul1-7 , a Recessive Allele of CULLIN1 That Disrupts SCF Function at the C Terminus of CUL1 in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 181, 945–963.

Goh, T., Kasahara, H., Mimura, T., Kamiya, Y., & Fukaki, H. (2012). Multiple AUX / IAA – ARF modules regulate lateral root formation : the role of auxin signalling. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367, 1461–1468.

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.

Haughn, G., & Kunst, L. (2010). *Arabidopsis Thaliana*, a Model Organism form Molecular Genetic Studies in Plants: How and Why Was *Arabidopsis* Chosen Over Other Plants? In *Biology on the Cutting Edge* (pp. 7–12).

He, X., Mu, R., Cao, W., Zhang, Z., Zhang, J., Chen, S. (2005). AtNAC2 , a transcription factor downstream of ethylene and auxin signaling pathways , is involved in salt stress response and lateral root development. *The Plant Journal*, 44, 903–916.

Hellmann, H., Hobbie, L., Chapman, A., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Pozo, C., ... Estelle, M. (2003). *Arabidopsis* AXR6 encodes CUL1 implicating SCF E3 ligases in auxin regulation of embryogenesis. *The EMBO Journal*, 22, 3314–3325.

- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., Engler, J. D. A., Inzé, D., & Beeckman, T. (2002). Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during Early Lateral Root Initiation, *14*, 2339–2351. *The Plant Cell*, *14*, 2339–2351.
- Himanen, K., Vuylsteke, M., Vanneste, S., Vercruyssen, S., Boucheron, E., Alard, P., ... Inzé, D. (2004). Transcript profiling of early lateral root initiation. *PNAS*, *101*, 5146–5151.
- 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.
- Hochholdinger, F., Park, W.J., Feix, G.H. (2001). Cooperative action of SLR1 and SLR2 is required for lateral root-specific cell elongation in maize. *Plant Physiology*, *125*, 1529–1539.
- Hotton, S. K., Eigenheer, R. A., Callis, J. (2011). AXR1-ECR1 and AXL1-ECR1 heterodimeric RUB-activating enzymes diverge in function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, *8*, 515–526.
- Hua, Z., & Vierstra, R. D. (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 299–334.
- Huang, F., Zago, M.K., Abas, L., van Marion, A., Galván-Ampudia, C.S., Offringa, R. (2010). Phosphorylation of conserved PIN motifs directs Arabidopsis PIN1 polarity and auxin transport. *The Plant Cell*, *22*, 1129–1142.
- Ingouff, M., Jullien, P. E., Berger, F. (2006). The female gametophyte and the endosperm control cell proliferation and differentiation of the seed coat in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *18*(12), 3491–501.
- Ishikawa, H., & Evans, M. L. (1995). Specialized Zones of Development in Roots. *Plant Physiology*, *109*, 725–727.
- Jung, J. K. H., & McCouch, S. (2013). Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 186.
- Kapulnik, Y., Delaux, P.M., Resnick, N., Mayzlish-Gati, E., Wininger, S., Bhattacharya, C., Séjalon-Delmas, N., Combier, J.P., Bécard, G., Belausov, E., Beeckman, T., Dor, E., Hershshorn, J., Koltai, H. (2011). Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, *233*(1), 209–16.

- Kim, S., Lee, A., Yoon, H., Park, C. (2008). A membrane-bound NAC transcription factor NTL8 regulates gibberellic acid-mediated salt signaling in *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal*, 55, 77–88.
- Kim, B.K., Lee, D.S., Kwon, S.J., Jin, H.C., Park, O.K. (2009). *Arabidopsis* GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379, 1038–1042
- Hamann, T., Benková, E., Bäurle, I., Kientz, M., Jürgens, G. (2002). The *Arabidopsis* *BODENLOS* gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROS-mediated embryo patterning. *Genes & Development*, 16, 1610–1615.
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., ... 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., Grieneisen, V. a, Hofhuis, H., Hove, C. a Ten, Hogeweg, P., Marée, A. F. M., Scheres, B. (2008). Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biology*, 6(12), e307.
- 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., Roberts, I., Guyomarc, S., Smet, I. De, Fukaki, H., ... Laplaze, L. (2013). Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science*, 18, 450–458.
- Lee, H. W., Kim, N. Y., Lee, D. J., Kim, J. (2009). LBD18 / ASL20 Regulates Lateral Root Formation in Combination with LBD16 / ASL18 Downstream of ARF7 and ARF19 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151, 1377–1389.
- Lewis, D. R., Miller, N. D., Splitt, B. L., Wu, G., Spalding, E. P. (2007). Separating the roles of acropetal and basipetal auxin transport on gravitropism with mutations in two *Arabidopsis* multidrug resistance-like ABC transporter genes. *The Plant Cell*, 19(6), 1838–50.
- Li, H., Shen, J., Zheng, Z., Lin, Y., Yang, Z. (2001). The Rop GTPase Switch Controls Multiple Developmental Processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126(June), 670–684.

- 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.
- Lin, R. & Wang, H. (2005). Two Homologous ATP-Binding Cassette Transporter Proteins, AtMDR1 and AtPGP1, Regulate *Arabidopsis* Photomorphogenesis and Root Development by Mediating Polar Auxin Transport. *Plant Physiology*, 138, 949–964
- 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.
- López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Herrera-Estrella, L. (2003). The role of nutrient availability in regulating root architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 280–287.
- Lucas, M., Guédon, Y., Jay-Allemand, C., Godin, C., Laplaze, L. (2008). An auxin transport-based model of root branching in *Arabidopsis thaliana*. *PloS One*, 3(11), e3673.
- Lynch, J. (1995). Root Architecture and Plant Productivity. *Plant Physiology*, 109, 7–13.
- MacGregor, D.R., Deak, K.I., Ingram, P.A., Malamy, J.E. (2008). Root System Architecture in *Arabidopsis* Grown in Culture Is Regulated by Sucrose Uptake in the Aerial Tissues. *The Plant Cell*, 20(10), 2643–2660.
- 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*, 124, 33–44.
- Manzano, C., Ramirez-Parra, E., Casimiro, I., Otero, S., Desvoyes, B., Rybel, B. De, ... Pozo, J. C. (2012). Auxin and Epigenetic Regulation of SKP2B , an F-Box That Represses Lateral Root Formation. *Plant Physiology*, 160, 749–762.
- 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.

Mayer, U., Büttner, G., Jürgens, G. (1993). Apical-basal pattern formation in the *Arabidopsis* embryo : studies on the role of the *gnom* gene. *Development*, 162, 149–162.

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.

Moreno-Risueno, M. A., & Benfey, P. N. (2011). Time-based patterning in development. *Transcription*, 2, 124–129.

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*, 1306, 1306– 1311.

Nadella, V., Shipp, M.J., Muday, G.K., Wyatt, S.E. (2006). Evidence for altered polar and lateral auxin transport in the *gravity persistent signal (gps)* mutants of *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environ*, 29, 682-690.

NASC [en línea] <<http://Arabidopsis.info>>

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.

Okushima, Y., Mitina, I., Quach, H. L., Theologis, A. (2005). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *The Plant Journal*, 43(1), 29–46.

Osmont, K. S., Sibout, R., Hardtke, C. S. (2007). Hidden Branches : Developments in Root System Architecture. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 93–113.

Péret, B., Larrieu, A., Bennett, M. J. (2009). Lateral root emergence: a difficult birth. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3637–43.

Péret, B., Li, G., Zhao, J., Band, L. R., Voß, U., Postaire, O., ... Bennett, M. J. (2012). Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 14(10), 991–8.

Pérez-Henríquez, P., Beeckman, T., Norambuena, L. (2013). AVANCE DE TESIS PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS: IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES MOLECULARES QUE MEDIAN LA RESPUESTA A SORTIN2.

Pérez-Henríquez, P., Beeckman, T., Norambuena, L. (2014). *AVANCE DE TESIS PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS: IDENTIFICACIÓN DE COMPONENTES MOLECULARES QUE MEDIAN LA RESPUESTA A SORTIN2*.

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.

Raya-González, J., Pelagio-flores, R., López-bucio, J. (2012). The jasmonate receptor COI1 plays a role in jasmonate-induced lateral root formation and lateral root positioning in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 169(14), 1348–1358.

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., ... Kuhlemeier, C. (2003). Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426(6964), 255–60.

Remans, T., Nacry, P., Pervent, M., Filleur, S., Diatloff, E., Mounier, E., ... Gojon, A. (2006). The *Arabidopsis* NRT1.1 transporter participates in the signaling pathway triggering root colonization of nitrate-rich patches. *PNAS*, 103(50), 19206–11.

Rohlf, J. Ecology & Evolution, SUNY at Stony Brook. [en línea] <<http://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-dataacq.html>>

Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., ... Scheres, B. (1999). An Auxin-Dependent Distal Organizer of Pattern and Polarity in the *Arabidopsis* Root. *Cell*, 99(5), 463–472.

Seo, M., Akaba, S., Oritani, T., Delarue, M., Bellini, C., Caboche, M., Koshiba, T. (1998). Higher Activity of an Aldehyde Oxidase in the Auxin-Overproducing superroot1 Mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 116, 687–693.

Stirnberg, P., Sande, K. V. D., Leyser, H. M. O. (2002). MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development*, 129, 1131–1141.

Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., ... Bennett, M. J. (2008a). 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., ... Bennett, M. J. (2004). Structure-Function Analysis of the Presumptive *Arabidopsis* Auxin Permease AUX1. *The Plant Cell*, 16, 3069–3083.

TAIR [en línea] <<http://www.Arabidopsis.org>>

Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3a Ed., p. 690).

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.

The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796–815.

Thung, L., Chakravorty, D., Trusov, Y., Jones, A.M, Botella, J.R. (2013). Signaling Specificity Provided by the *Arabidopsis thaliana* Heterotrimeric G-Protein γ Subunits AGG1 and AGG2 Is Partially but Not Exclusively Provided through Transcriptional Regulation. *PLoS ONE*, 8(3): e58503.

Tiwari, S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T. J. (2004). Aux / IAA Proteins Contain a Potent Transcriptional Repression Domain. *The Plant Cell*, 16, 533–543.

To, J.P.C, Haberera, G., Ferreira, F.J., Deruèrea F., Masonb, M.G., Schallerb, E., Alonso, J.M., Eckerc, J.R., Kiebera, J.J. (2004) Type-A *Arabidopsis* Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling. *The Plant Cell*, 16, 658–671

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., 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.

Vanneste, S., De Rybel, B., Beemster, G. T. ., Ljung, K., De Smet, I., Van Isterdael, G., ... Beeckman, T. (2005). Cell Cycle Progression in the Pericycle Is Not Sufficient for SOLITARY ROOT / IAA14-Mediated Lateral Root Initiation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 17, 3035–3050.

Vellosillo, T., Martínez, M., López, M. Á., Vicente, J., Cascon, T., Dolan, L., ... Castresana, C. (2007). Oxylipins Produced by the 9-Lipoxygenase Pathway in *Arabidopsis* Regulate Lateral Root Development and Defense Responses through a Specific Signaling Cascade. *The Plant Cell*, 19, 831–846.

Welch, D., Hassan, H., Blilou, I., Immink, R., Heidstra, R., Scheres, B. (2007). SHORT-ROOT action *Arabidopsis* JACKDAW and MAGPIE zinc finger proteins delimit asymmetric cell division and stabilize tissue boundaries by restricting SHORT-ROOT action. *Genes & Development*, *21*, 2196–2204.

Williams, M.E., Torabinejad, J., Cohick, E., Parker, K., Drake, E.J., Thompson, J.E., Hortter, M., DeWald D.E. (2005). Mutations in the *Arabidopsis* Phosphoinositide Phosphatase Gene SAC9 Lead to Overaccumulation of PtdIns (4,5)P₂ and Constitutive Expression of the Stress-Response Pathway. *Plant Physiology*, *138*, 686–700

Williamson, L. C., Ribrioux, S. P. C. P., Fitter, A. H., Leyser, H. M. O. (2001). Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *126*, 875–882.

Yang, X., Lee, S., So, J., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C. (2004). The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate. *The Plant Journal*, *40*, 772–782.

Ye, L., Liu, L., Xing, A., Kang, D., (2013). Characterization of a dwarf mutant allele of *Arabidopsis* MDR-like ABC transporter *AtPGP1* gene. *Biochem Biophys Res Commun*, *441*, 782–786.

Zhang, H., & Forde, B. G. (1998). An *Arabidopsis* MADS box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. *Science*, *279*(5349), 407–9.

Zouhar, J., Hicks, G. R., Raikhel, N. V. (2004). Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in *Arabidopsis*. *PNAS*, *101*(25), 9497–501.

ANEXOS

I. Lista de mutantes y líneas transgénicas de *Arabidopsis* que presentan defectos en la formación de raíces laterales.Tabla 1: Lista de mutantes y líneas transgénicas de *Arabidopsis* que presentan defectos en la formación de raíces laterales.

Mutante/ Línea transgénica	Tipo de mutación	Gen (es)	Proceso Celular Involucrado	Fenotipo relacionado a raíces laterales	Referencias
35S::PID21	Sobreexpresora	PINOID	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Christensen y <i>col.</i> , 2000
35S::PIN1	Sobreexpresora	PIN1	Transporte polar de auxinas	Desarrollo de primordios de raíces laterales enlentecido	Benková y <i>col.</i> , 2003
35S::KRP2	Sobreexpresora	KRP2	Ciclo celular	Número de raíces laterales disminuido	Himanen y <i>col.</i> , 2002
35S::NAC2	Sobreexpresora	NAC6	Respuesta a estímulos ambientales	Número de raíces laterales aumentado	He y <i>col.</i> , 2005
<i>acr4</i>	Nula	ACR4	Comunicación célula a célula	Número de primordios de raíces laterales aumentado	De Smet y <i>col.</i> , 2008
<i>agg-1c</i>	Nula	AGG1	Señalización mediada por receptores ligados a proteínas G	Número de raíces laterales aumentado	Thung y <i>col.</i> , 2013
<i>arr345689</i>	Parcial	ARR3, ARR4, ARR5, ARR6, ARR8, ARR9	Señalización de citoquininas	Número de raíces laterales disminuido	To y <i>col.</i> , 2004

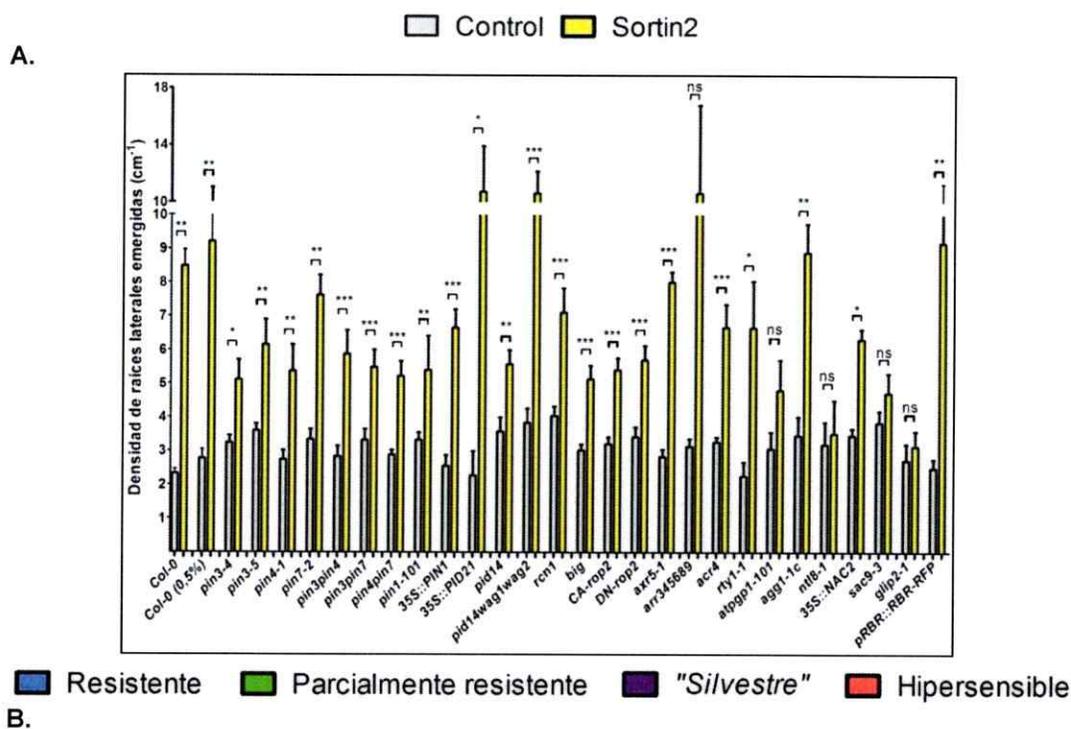
<i>atpgp1-101</i>	Nula	ATPGP1	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales aumentado	Lin & Wang, 2005 Ye y col., 2013
<i>aux1-21</i>	Nula	AUX1	Transporte polar de auxinas	Número de primordios de raíces laterales reducido	Swarup y col., 2004
<i>axr1-30</i>	Nula	AXR1	Señalización de auxinas/ácido jasmónico/ ácido giberélico	Número de raíces laterales disminuido	Hotton y col., 2011
<i>axr4-1</i>	Recesiva	AXR4	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Hobbie y Estelle, 1995
<i>axr4-2</i>	Recesiva	AXR4	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Hobbie y Estelle, 1995
<i>axr5-1</i>	Ganancia de función	AXR5	Señalización de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Yang y col., 2004
<i>big</i>	Pérdida de función	BIG	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Gil y col., 2001
<i>CA-rop2</i>	Ganancia de función	ROP2	Transducción de señales mediadas por GTPasas pequeñas	Número de raíces laterales aumentado	Li y col., 2001
<i>ceg</i>	Nula	CEG	Señalización de auxinas	Número de raíces laterales aumentado	Dong y col., 2006
<i>coi1-16</i>	Pérdida de función	CO1	Señalización de ácido jasmónico	Número de raíces laterales disminuido	Raya-González y col., 2012

<i>cul1-2</i>	Pérdida de función	CUL1	Señalización de auxinas/ácido jasmónico/ ácido giberélico	Número de raíces laterales disminuido	Hellman y col., 2003
<i>cul1-6</i>	Pérdida de función	CUL1	Señalización de auxinas/ácido jasmónico/ ácido giberélico	Número de raíces laterales disminuido	Moon y col., 2007
<i>DN-rop2</i>	Pérdida de función	ROP2	Transducción de señales mediadas por GTPasas pequeñas	Número de raíces laterales disminuido	Li y col., 2001
<i>glip2-1</i>	Nula	GLIP2	Resistencia a patógenos	Número de raíces laterales aumentado	Kim y col., 2009
<i>iaa12-1</i>	Ganancia de función	IAA12	Señalización auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Alonso y col., 2003
<i>jkd-4</i>	Parcial	JKD	Patterning epidemal	Desarrollo de primordios de raíces laterales acelerado	Welch y col., 2007
<i>lax3</i>	Nula	LAX3	Transporte de auxinas	Número de raíces laterales emergidas disminuido	Swarup y col., 2008
<i>lox5-1</i>	Nula	LOX5	Biosíntesis de oxilipinas	Número de raíces laterales emergidas aumentado	Vellosillo y col., 2007
<i>max2-1</i>	Nula	MAX2	Señalización de ácido giberélico	Número de raíces laterales aumentado	Kapulnik y col., 2011
<i>max2-2</i>	Nula	MAX2	Señalización de ácido giberélico	Número de raíces laterales aumentado	Kapulnik y col., 2012

<i>ntl8-1</i>	Nula	NTL8	Señalización de ácido giberélico	Número de raíces laterales disminuido	Kim <i>y col.</i> , 2008
<i>pid14</i>	Nula	PINOID	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Huang <i>y col.</i> , 2010
<i>pid14wag1wag2</i>	Nula	WAG1, WAG2, PINOID	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Huang <i>y col.</i> , 2011
<i>pin1-201</i>	Nula	PIN1	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Benková <i>y col.</i> , 2003
<i>pin3-4</i>	Nula	PIN3	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Benková <i>y col.</i> , 2003 Friml J. <i>y col.</i> , 2003
<i>pin3-5</i>	Nula	PIN3	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Benková <i>y col.</i> , 2003 Friml J. <i>y col.</i> , 2003
<i>pin3pin4</i>	Nula	PIN3, PIN4	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Benková <i>y col.</i> , 2003 Friml J. <i>y col.</i> , 2003
<i>pin3pin7</i>	Nula	PIN3, PIN7	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Benková <i>y col.</i> , 2003 Friml J. <i>y col.</i> , 2003
<i>pin4-1</i>	Nula	PIN4	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Benková <i>y col.</i> , 2003 Friml J. <i>y col.</i> , 2003
<i>pin4pin7</i>	Nula	PIN4, PIN7	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Benková <i>y col.</i> , 2003 Friml J. <i>y col.</i> , 2003

<i>pin7-2</i>	Nula	PIN7	Transporte polar de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Benková y col., 2003 Friml J. y col., 2003
<i>pRBR::RBR-RFP</i>	Sobreexpresora	RBR	Ciclo celular	Número de raíces laterales aumentado	Ingouff y col., 2006
<i>rcn1</i>	Parcial	RCN1	Transporte polar de auxinas	Crecimiento de raíces laterales retardado	Deruere y col., 1999
<i>rty1-1</i>	Nula	RTY	Biosíntesis de glucosinolatos	Número de raíces laterales aumentado	Seo y col., 1998
<i>sac9-3</i>	Nula	SAC9	Señalización mediada por fosfatidilinositolos	Número de raíces laterales disminuido	Williams y col., 2005
<i>skp2a</i>	Parcial	SKP2A	Señalización de auxinas	Número de primordios de raíces laterales aumentado	Rosso y col., 2003
<i>skp2b</i>	Nula	SKP2B	Señalización de auxinas	Número de raíces laterales aumentado	Manzano y col., 2012
<i>slr1-1</i>	Ganancia de función	IAA14	Señalización de auxinas	Número de raíces laterales disminuido	Hochholdinger y col., 2001

II. Sensibilidad a Sortin2 de mutantes con defectos en la etapa de desarrollo de formación de raíces laterales



B.

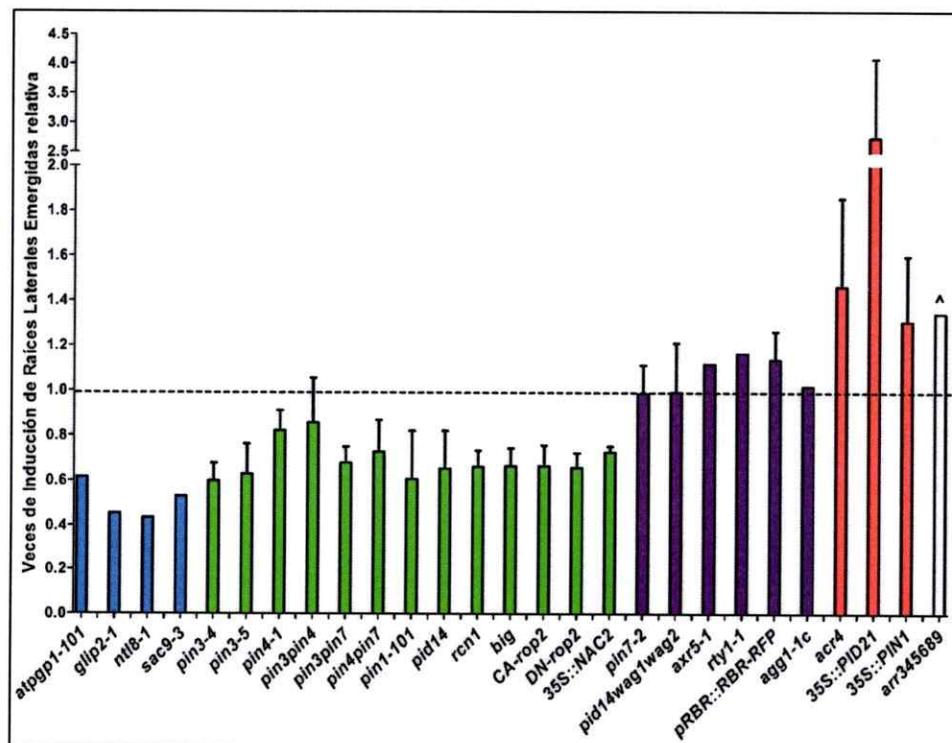
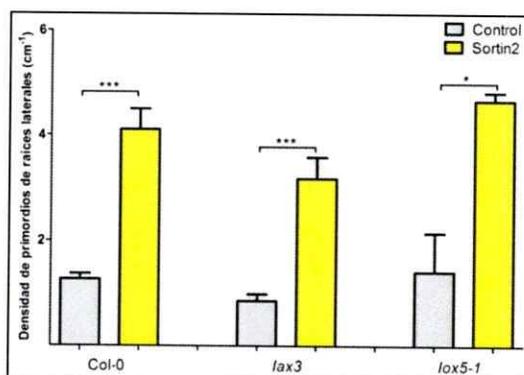


Figura 21: Mutantes con defectos en la etapa de desarrollo de formación de raíces laterales son resistentes a la inducción de raíces laterales emergidas por Sortin2. Plántulas de 7 días se traspasaron a tratamientos por 72 horas en MS-líquido suplementado con DMSO 1% (Control, barras grises) y Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (barras amarillas). **(A)** Densidad de raíces laterales emergidas en los tratamientos en las mutantes con defectos en la etapa del desarrollo de raíces laterales. La densidad de raíces laterales emergidas se ve inducida en la mayoría de las líneas en tratamiento con Sortin2. Los datos son el promedio de 3 réplicas experimentales ($n=14-26$), excepto en *axr5-1*, *arr345689*, *rty1-1*, *atpgp1-101*, *agg1-1c*, *ntl8-1*, *sac9-3* y *glip2-1* que se efectuó una réplica experimental ($n=3-7$). Las barras corresponden al error estándar. Los datos fueron evaluados utilizando la prueba de t-student. *= $p<0,05$; **= $p<0,01$; ***= $p<0,001$; ns=no significancia. ^ corresponde a las mutantes que no se pudieron clasificar en las categorías designadas. Los resultados obtenidos en **A** se expresan como **(B)** veces de inducción de raíces laterales emergidas relativa.

III.Sensibilidad a Sortin2 de mutantes con defectos en la etapa de emergencia de raíces laterales

A.



B.

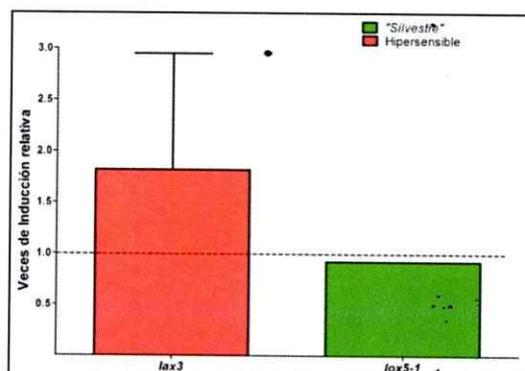
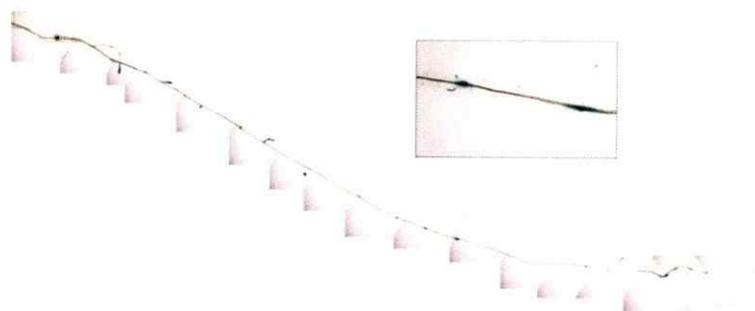


Figura 22: *lax3*, mutante con defecto en la etapa de emergencia de la formación de raíces laterales, es hipersensible a Sortin2. Plántulas de 7 días de las líneas mutantes *lax3* y *lox5-1* se trataron en MS-líquido que contenía DMSO 1% (Control, barras grises) o Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (barras amarillas) durante 72 horas. **(A)** El tratamiento con Sortin2 induce la densidad de primordios de raíces laterales en ambas mutantes. Los datos para *lax3* son el promedio de 3 réplicas experimentales ($n=22-25$) y para *lox5-1* es de 1 réplica experimental ($n=3$). Las barras de error corresponden al error estándar. Los datos se

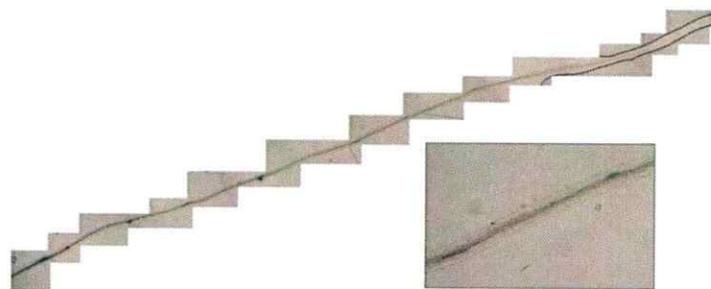
evaluaron estadísticamente con la prueba de t-student: *= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$; ns=no significancia. (B) Los resultados obtenidos en A se expresan como *veces de inducción relativa*. El valor 1 representa las veces de inducción de densidad de primordios de raíces laterales obtenida bajo tratamiento con Sortin2 en Col-0.*lox3* se catalogó como hipersensible a Sortin2 (barra roja), ya que el tratamiento con Sortin2 induce significativamente la densidad de raíces laterales emergidas y las *veces de inducción relativa* son mayores que 1,2. Por otra parte, *lox5-1* presenta un comportamiento "silvestre" en la sensibilidad a Sortin2 (barra morada), porque el tratamiento con Sortin2 induce significativamente un aumento de la densidad de raíces laterales, y las *veces de inducción relativa* se encuentran entre 0,9 y 1,2.

IV. Plántulas de la línea pDR5::GUS germinadas en MS-agar, en tratamiento control y Sortin2 por 24, 48 y 72 horas.

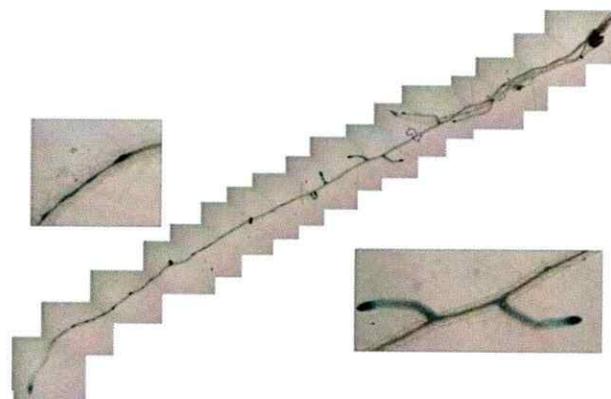
A.



B.



C.



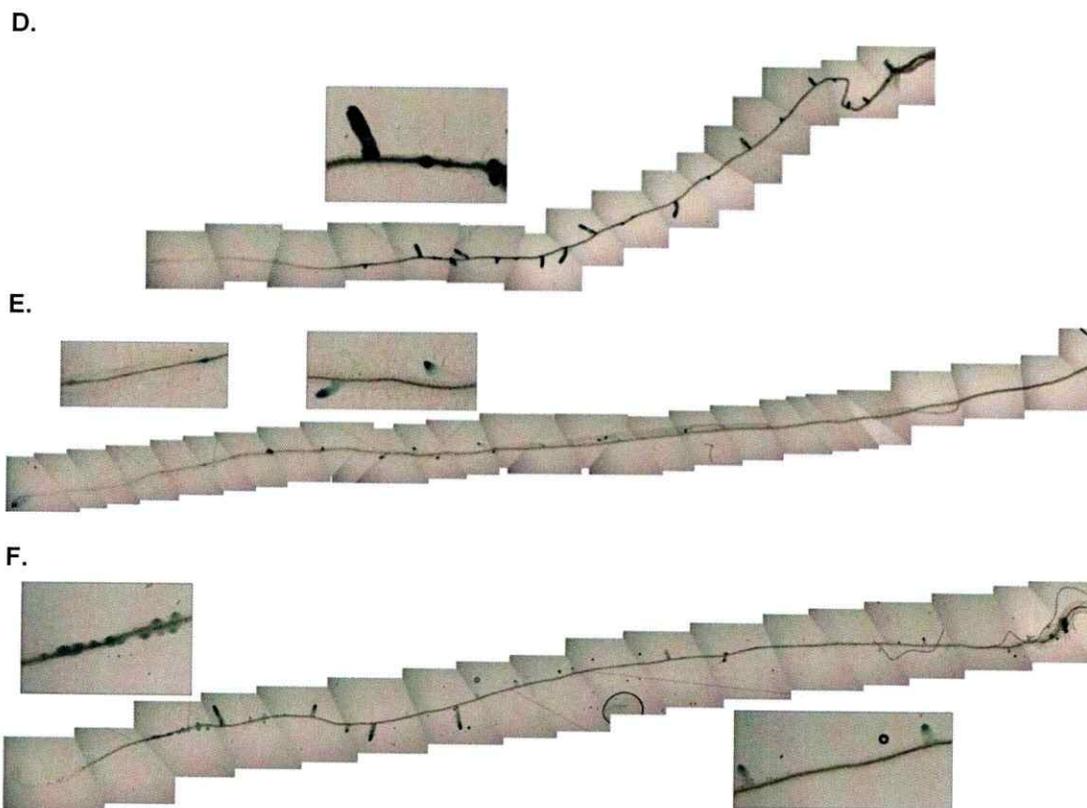
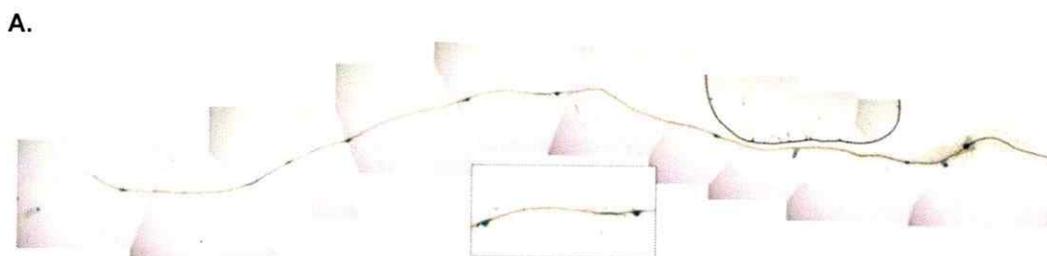
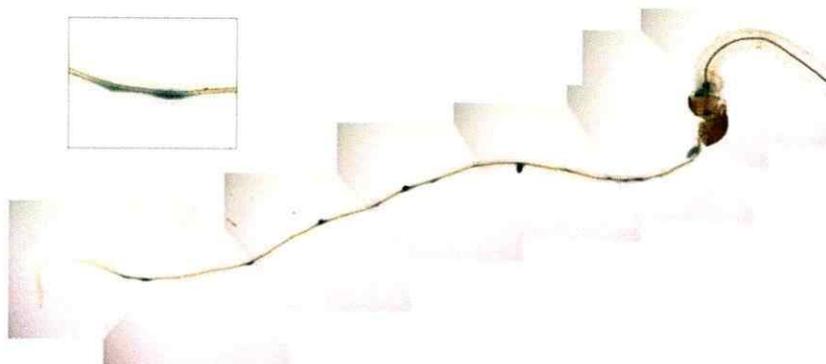


Figura 23: Morfología de plántulas de la línea pDR5::GUS en tratamientos controles y con Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea transgénica pDR5::GUS germinadas y crecidas en MS-agar, se trataron en MS-líquido que contenía DMSO 1% (Control) por 24 (A), 48 (C) y 72 horas (E) y Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 24 (B), 48 (D) y 72 horas (F).

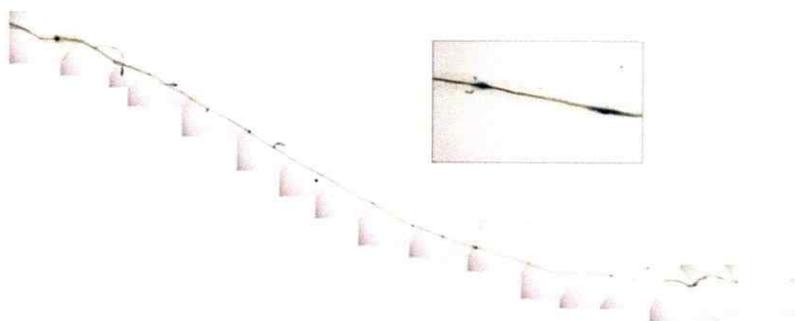
V. Plántulas de la línea pCycB1;1::GUS germinadas en MS-agar, en tratamiento control y Sortin2 por 24, 48 y 72 horas



B.



C.



D.



E.



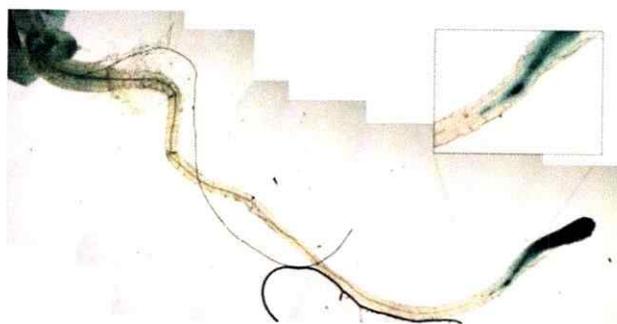
F.



Figura 24: Actividad del promotor CycB1;1 en tratamientos controles y con Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea transgénica pCycB1;1::GUS germinadas y crecidas en MS-agar, se trataron en MS-líquido que contenía DMSO 1% (Control) por 24 (A), 48 (C) y 72 horas (E) y Sortin2 25 µg/mL durante 24 (B), 48 (D) y 72 horas (F).

VI. Plántulas de la línea pDR5::GUS germinadas en NPA en tratamiento control y Sortin2 por 24, 48 y 72 horas

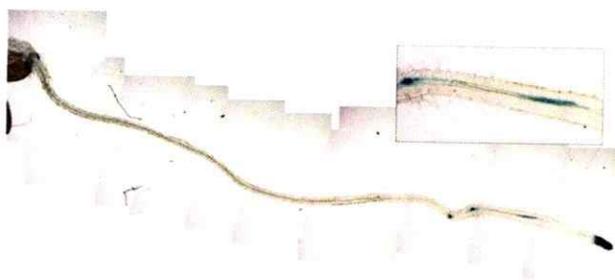
A.



B.



C.

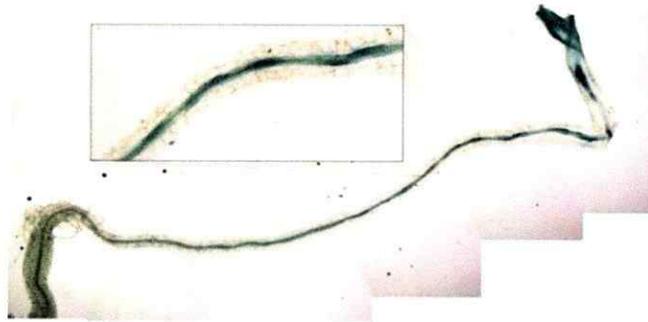


VII. Plántulas de la línea pCycB1;1::GUS germinadas en NPA en tratamiento control y Sortin2 por 24, 48 y 72 horas

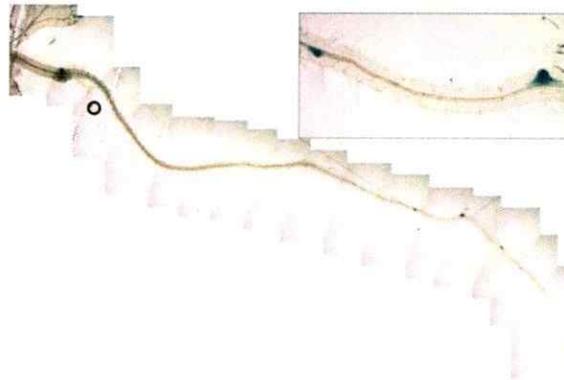
A.



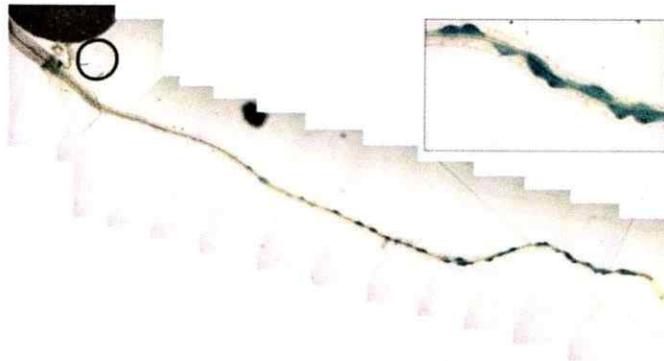
B.



C.



D.



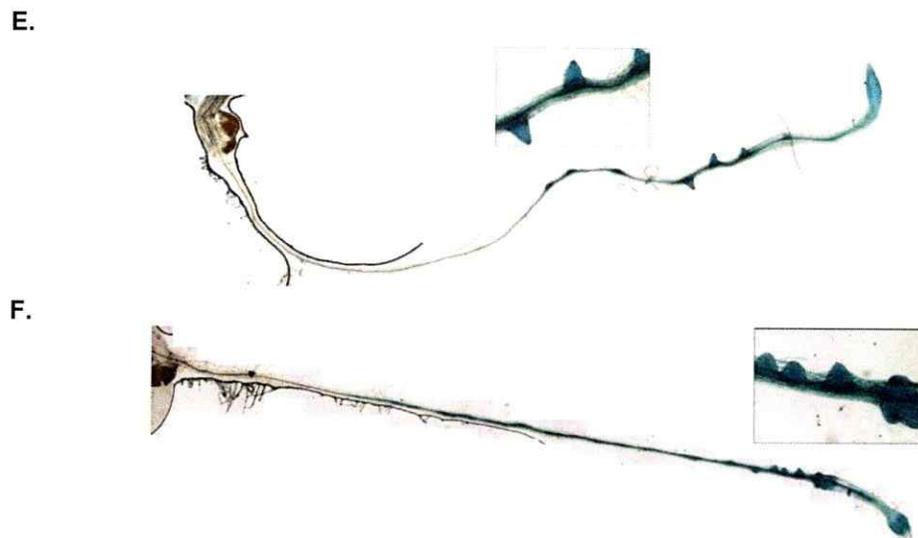


Figura 26: Actividad del promotor CycB1;1 en plántulas que luego de ser germinadas y crecidas en NPA fueron sometidas a tratamientos controles y con Sortin2. Plántulas de 7 días de la línea transgénica pCycB1;1::GUS germinadas y crecidas en MS-agar, se trataron en MS-líquido que contenía DMSO 1% (Control) por 24 (A), 48 (C) y 72 horas (E) y Sortin2 25 µg/mL durante 24 (B), 48 (D) y 72 horas (F).



Mi Sii

Registro de
ContribuyentesImpuestos
MensualesFactura
ElectrónicaBoleta de
Honorarios

Renta

Declaraciones
JuradasBienes
RaícesSituación
TributariaTasación de
VehículosLibros
ContablesInfracciones y
Condonaciones
Usted está en: > Emisor de boleta honorario

Folio N°: 28750140



CERTIFICADO DECLARACIÓN JURADA INTERNET

El Servicio de Impuestos Internos certifica que ha recibido a través de internet la Declaración Jurada Renuncia a Cotizar, correspondiente a las Cotizaciones del año 2014 (Año Tributario 2015), del contribuyente RUT **17948527-3**, con fecha **08/05/2015**.



08 de Mayo de 2015

Servicio de Impuestos Internos