

UCH-FC
Biotecnología
O 834
C 1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“El factor de transcripción bZIP25 de *Arabidopsis thaliana* participa en el desarrollo de raíces laterales mediante la regulación de la endocitosis de manera independiente a la señalización gatillada por la fitohormona auxina.”

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

CLAUDIO JAVIER OSORIO NAVARRO

Director del Seminario de Título: **Dra. Lorena Norambuena Morales**

Co-director del Seminario de Título: **Dra. Lorena Pizarro Arcos**

Junio 2016
Santiago – Chile



ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el

Sr. Claudio Javier Osorio Navarro

“El factor de transcripción bZIP25 de *Arabidopsis thaliana* participa en el desarrollo de raíces laterales mediante la regulación de la endocitosis de manera independiente a la señalización gatillada por la fitohormona auxina.”

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:

Dra. Lorena Norambuena Morales



Co-director Seminario de Título:

Dra. Lorena Pizarro

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

Dra. Liliana Cardemil



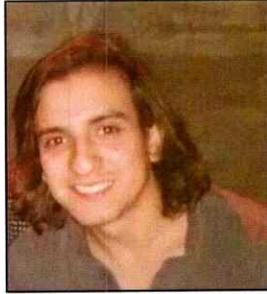
Evaluador:

Alejandro Roth



Santiago de Chile,

Biografía



Mi nombre es Claudio Javier Osorio Navarro, nací el 4 de Enero de 1990 en la ciudad de Bulnes, región de Biobío. Mi familia es numerosa, pero el núcleo familiar lo conforman mis padres Claudio y Jaqueline, mis abuelas Carmen y Oriana, y mis hermanas mayores Carolina y Paula, quienes maravillosamente contribuyeron a aumentar la familia con Lucas (11), Emilia (11), Antonia (7) y Consuelo (3) mis sobrinos. Nuestra familia ha sido tradicionalmente Católica, por lo que fui formado en base a valores cristianos, lo que constituye la columna vertebral de todo lo que hago. Además, nuestra familia siempre ha estado ligada al campo lo que propició el ambiente para la más feliz de las infancias. Mi educación tuvo lugar en la ciudad de Bulnes (educación básica) como en la de Chillán (educación media) lo que indudablemente me permitió crecer, pero más importante aún, me presentó a un grupo de personas maravillosas, una segunda familia, grandes y buenos amigos. El año 2007 ingresé al Programa Académico de Bachillerato de la Universidad de Chile, con lo que migré a Santiago, un acto de locura, pues no son pocos lo que te advierten de la demencial carga académica y exigencia, y las "letras chicas" en el Bachillerato, sin embargo, concluí exitosamente esa etapa y continué en la Universidad, conocí a grandes amigos, personas y personajes, y me topé con el camino hacia la Ciencia. Desde entonces a la fecha por la misma vía, a través de Ingeniería en Biotecnología Molecular, y luego con el Programa de Magister en Ciencias Biológicas.

Dedicada a mis padres, por ser mis mejores modelos y enseñarme a ser feliz.

Con todo el amor del mundo.

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mis padres, por ser la piedra angular y el pilar fundamental en todo lo que construyo. Por acompañarme, apoyarme y darme ánimo sin nunca agotarse o flaquear. Por compartir tantas alegrías y soportar mis locuras. Por traerme al mundo en una familia maravillosa. Por ser además de padres un par de buenos amigos.

Al infinito cariño con el que me recibieron mis primas Jani, Ange y María Cristina en la primera etapa en Santiago para comenzar la etapa universitaria. A Paula y Colla, por ayudarme a cambiar el switch, darme un espacio, cariño y tantos buenos momentos. A la tía Carmen Gloria, mi Manina, por ser siempre incondicional en todas. A la Carola por ser desde que éramos pequeños un modelo y de grande una guía.

A mis grandes amigos que me acompañaron en esta etapa, amigos de la vida, Cristófer, Julito, Vale, Vivi, Sergio Hernán, amigos Bachi/Bachitecs Ceci y Ana, Nico, Anita, Carito, Sergito Itier y la Javi, y Biotecs, especialmente a Salomé, Camilo y Nía María. Con una mención honrosa a Nía por estos años de compañerismo y amistad dentro del laboratorio que sin duda fueron esenciales para sobrellevar el trabajo.

A Sara por acompañarme en el cierre de esta etapa y hacer de mi mundo un lugar aún más feliz.

A la Profe y al team LNM, por recibirme y por la integra formación, particularmente, a PatoP, la Carola (en su calidad de primera dama), a la tía Mirna, a Ceci Araya, a Milagros, a Carlitos, a Analía, por la ayuda de primer nivel, por los buenos momentos y todo el compañerismo. Al Centro de Biología Molecular Vegetal, por participar del proceso formativo y por ser muchas veces una fusión entre *Neverland* y *Wonderland* (aunque con serios matices a *Mordor* en ocasiones).

Como último punto, y uno de los más importantes en el desarrollo de este Seminario de Título, agradecer a mi co-directora, Lorena Pizarro, a Lorelia, Lorelilla, LoreP, por darme un espacio en el desarrollo de su tesis doctoral, pues desde el trabajo en conjunto en el mesón aprendí cómo se desarrolla y desenvuelve la ciencia. Por toda la paciencia y las ganas de enseñar, por acompañar mi proceso formativo sin imponer y dar rienda suelta a toda la ñoñería interna. Por la firme consecuencia, tantas veces necesaria en esta área fluctuante. Por ser una gran amiga, la mejor partner. Por acompañarme y apoyarme en tantas y tantas oportunidades. Muchas gracias.

Financiamiento

Este Seminario de Título se realizó con financiamiento del Proyecto FONDECT 1120289 que tiene como Jefe de Proyecto a la Dra. Lorena Beatriz Norambuena Morales.

Resultados de este Seminario de Título fueron presentados en congresos con apoyo financiero de la Sociedad de Bioquímica de Chile y de la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, a través de la Dirección de Asuntos Estudiantiles.

Índice

Listado de Figuras	v
Listado de Tablas	vii
Abreviaturas utilizadas	viii
Resumen	ix
Abstract	xi
INTRODUCCION	1
1.1.- Sistema Radicular de Plantas Dicotiledóneas	1
1.2.- Desarrollo de Raíces Laterales en <i>Arabidopsis thaliana</i>	2
1.3.- Auxina y el Desarrollo de Raíces Laterales	4
1.4.- La Modulación del Sistema de Endomembranas participa en el Desarrollo de Raíces Laterales	6
1.4.1.-Generalidades del Sistema de Endomembranas	6
1.4.2.- Auxina modula la internalización de Membrana Plasmática	8
1.5.- bZIP25 es un regulador negativo de la Vía de tráfico endocítico y del desarrollo de Raíces Laterales.	9
HIPOTESIS	13
OBJETIVOS	13
3.1.- Objetivo general	13
3.2.- Objetivos específicos	13
MATERIALES Y METODOS	14
4.1.- Líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizadas	14
4.2.- Esterilización de semillas	14
4.3.- Estratificación de semillas	15
4.4.- Condiciones de cultivo y crecimiento	15
4.5.- Estudio del tráfico endocítico	15
4.6.- Evaluación de la densidad de raíces laterales	18
4.6.1.- Tratamiento de plántulas	18
4.6.2.- Tratamiento para aclaramiento de plantas	18
4.6.3.- Condiciones de observación	18
4.6.4.- Registro y medición del largo de raíz principal	19
4.7.- Tratamientos con auxinas	19
4.8.- Tratamientos con el inhibidor del tráfico polar de auxina NPA	20
4.9.- Tratamientos con moduladores de tráfico endocítico	21
4.9.1.- Stocks de droga	21
4.9.2.- Tratamientos para evaluar la densidad de raíces laterales	22
4.9.3.- Estudio del tráfico endocítico	22
4.10.- Estudio del tráfico a la vacuola desde EE/TGN	22
4.11.- Genotipificación de plantas de <i>Arabidopsis</i>	24
4.11.1.- Extracción de DNA	24
4.11.2.- Amplificación de DNA mediante PCR	25
4.11.3.- Electroforesis en gel de agarosa	26

4.12.- Transformación estable de líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> mediante el protocolo de inmersión floral	27
4.13.- Extracción de RNA	27
4.14.- Síntesis de cDNA	28
4.15.- Cuantificación de transcritos mediante RT-PCR semicuantitativo	29
4.16.- Identificación de localización subcelular mediante InmunoFluorescencia (IF)	30
RESULTADOS	31
5.1.- Amplificación y genotipificación de las líneas insercionales de bZIP25: <i>bzip25-1</i> y <i>bzip25-2</i>	31
5.2.- bZIP25 impacta el Sistema Radicular (SR) de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	34
5.3.- La línea mutante <i>bzip25-2</i> es igualmente sensible que el tipo silvestre a la inducción de raíces laterales gatillada por la aplicación exógena de auxina	37
5.4.- La alteración del tráfico polar de auxina conduce a la inhibición del desarrollo de raíces laterales de forma equivalente en plantas silvestre y en mutantes de pérdida de función de bZIP25.	41
5.5.- La línea <i>bzip25-2</i> es menos sensible a la inhibición de la endocitosis mediada por auxina.	43
5.6.- La aceleración de la endocitosis en <i>bzip25-2</i> es independiente de la señalización de auxina a través de ABP1.	50
5.7.- El desarrollo de raíces laterales en la línea <i>bzip25-2</i> depende de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC).	53
5.8.- La internalización del trazador endocítico FM4-64 en la línea pérdida de función de bZIP25 es inhibida por Tirfostina A23 a concentraciones más altas que en la línea silvestre.	55
5.9.- La mayor densidad de raíces laterales reportada ante la pérdida de función de bZIP25 involucra la aceleración del tráfico endocítico a la Vacuola.	59
5.10.- La aceleración del tráfico a la Vacuola ejerce una acción sinérgica en la inducción de la densidad de raíces laterales en la línea pérdida de función de bZIP25	70
5.11.- El tráfico entre los Endosomas Tardíos o Compartimientos Prevacuolares y la Vacuola está involucrado en el desarrollo de raíces laterales dependiente de bZIP25.	76
5.12.- Generación de líneas sobre-expresoras de bZIP25	79
5.13.- bZIP25.1 presenta una localización subcelular nuclear en <i>Arabidopsis</i>	82
5.14.- bZIP25.1 rescata el fenotipo de densidad de raíces laterales de la línea de pérdida de función de bZIP25.	85
5.15.- Plántulas pérdida de función de bZIP25 expresando bZIP25.1-GFP presentan una internalización de Membrana Plasmática (MP) equivalente a plántulas silvestres.	87
5.16.- La expresión de bZIP25.1-GFP en la línea de pérdida de función de bZIP25 no altera la sensibilidad a la inducción de raíces laterales por aplicación de auxina.	90
5.17.- El desarrollo de raíces laterales en plántulas de la línea bZIP25.1-GFP es más sensibles a la inhibición de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) respecto a la línea silvestre o <i>bzip25-2</i> .	91

DISCUSION	94
6.1.- La pérdida de función de bZIP25 impacta positivamente sobre el desarrollo del SR de manera independiente de auxina	94
6.1.1.- Crecimiento de la Raíz Principal y crecimiento de raíces laterales	94
6.1.2.- Densidad de raíces laterales	97
6.2.- La línea <i>bzip25-2</i> no presenta defectos en la percepción de auxina	98
6.3.- La aceleración del tráfico endocítico en dirección a la Vacuola determina los cambios en el Sistema Radicular observados en <i>bzip25-2</i>	100
6.3.1.- La Endocitosis Mediada por Clatrina participa en el desarrollo de raíces laterales.	100
6.3.2.- El tráfico a la Vacuola es requerido para el desarrollo de raíces laterales en <i>bzip25-2</i>	104
6.4.- La expresión de bZIP25.1-GFP en la línea <i>bzip25-2</i> rescata el comportamiento de la línea silvestre	107
CONCLUSIONES	109
PROYECCIONES	110
BIBLIOGRAFIA	111

Listado de Figuras

Figura 1. Organogénesis de una Raíz Lateral (RL) en <i>A. thaliana</i> .	4
Figura 2. Sistema de Endomembranas de Célula Vegetal y Rutas de Tráfico.	8
Figura 3. Internalización del trazador FM4-64 en una célula vegetal.	17
Figura 4. Diseño experimental para la evaluación del impacto de hormonas y drogas en la densidad de raíces laterales.	21
Figura 5. Esquema de la estrategia para analizar el tráfico post EE/TGN en dirección a la vacuola.	24
Figura 6.- Modelo génico de bZIP25.	32
Figura 7. Genotipificación de mutantes insercionales de bZIP25.	33
Figura 8. bZIP25 es un regulador negativo del Sistema Radicular.	35
Figura 9. La pérdida de función de bZIP25 no gatilla mayor sensibilidad a la inducción de raíces laterales ante la aplicación de auxina exógena.	39
Figura 10. <i>bzip25-2</i> responde de igual manera que el tipo silvestre a la inhibición del desarrollo de raíces laterales mediada por NPA.	42
Figura 11. IAA es incapaz de inhibir completamente la endocitosis en la línea pérdida de función de bZIP25.	45
Figura 12. La inhibición de la endocitosis producto de la aplicación exógena de NAA es incompleta en la línea pérdida de función de bZIP25.	49
Figura 13. La línea pérdida de función de bZIP25 es insensible a la aceleración endocítica gatillada por la alteración del tráfico polar de auxina.	52
Figura 14. La Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) es relevante en el desarrollo de raíces laterales en <i>bzip25-2</i> .	54
Figura 15. La línea <i>bzip25-2</i> es menos sensible a la inhibición de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) en comparación al tipo silvestre.	58
Figura 16. La línea <i>bzip25-2</i> es menos sensible a la inhibición del desarrollo de raíces laterales gatillada por la alteración del tráfico entre Membrana Plasmática y los Endosomas Tempranos/Red Trans-Golgi.	60
Figura 17. El proceso de formación del cuerpo de BFA está acelerado en la línea <i>bzip25-2</i> .	65
Figura 18. En <i>bzip25-2</i> el tráfico a la Vacuola supera la alteración del tráfico endocítico gatillada por BFA.	68
Figura 19. El acelerador del tráfico a la Vacuola Sortin2 tiene un efecto sinérgico sobre el desarrollo de raíces laterales observado en la línea de pérdida de función de bZIP25.	71
Figura 20. La línea de pérdida de función de bZIP25 es hipersensible a la aceleración del tráfico a la Vacuola inducida por Sortin2.	74
Figura 21. La línea <i>bzip25-2</i> y la línea silvestre incrementan la densidad de raíces laterales ante la alteración del tráfico entre compartimientos prevacuolares y la Vacuola mediado por Wm.	77
Figura 22. Selección y genotipificación de plantas homocigotas <i>35S::bZIP25.1-GFP</i> .	81
Figura 23. La proteína de fusión bZIP25.1-GFP localiza en el núcleo de células de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	84
Figura 24. La línea bZIP25.1-GFP tiene una menor densidad de raíces laterales que la línea de pérdida de función de bZIP25 y la línea silvestre.	86
Figura 25. La internalización de Membrana Plasmática (MP) es homóloga entre la línea bZIP25.1-GFP y la línea silvestre.	89

- Figura 26.** Plántulas expresando bZIP25.1-GFP son igual de sensible a la inducción de la densidad de raíces laterales mediada por la aplicación de auxina exógena que plántulas silvestres o plántulas línea pérdida de función de bZIP25. 91
- Figura 27.** La inhibición de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) inhibe el desarrollo de raíces laterales en la línea bZIP25.1-GFP. 92

Listado de Tablas

Tabla I. Lista de partidores usados durante el trabajo experimental	25
Tabla II. Protocolo de PCR 1: amplificación de fragmentos menores a 1000pb	26
Tabla III. Protocolo de PCR 2: amplificación de fragmentos mayores a 1000pb	26
Tabla IV. Protocolo de síntesis de cDNA mediante retrotranscripción.	29
Tabla V. Protocolo de PCR utilizado para RT-PCR semicuantitativo.	29

Abreviaturas utilizadas

Ácido 1-naftaleno acético			NAA
Ácido 1-N-naftilf talámico			NPA
Ácido 3-indol acético			IAA
Ácido desociribonucleico			DNA
Ácido ribonucleico			RNA
Aparato de Golgi			GA
<i>Arabidopsis thaliana</i>			<i>Arabidopsis</i>
Arquitectura del Sistema Radicular			ASR
AUXIN BINDING PROTEIN 1			ABP1
Brefeldina A			BFA
Compartimiento multivesicular	Prevacuolar/Endosoma	Tardío/Cuerpo	PVC/LE/MVB
Dimetilsulfóxido			DMSO
DNA complementario			cDNA
Endocitosis Mediada por Clatrina			EMC
Endosomas Tempranos/Red Trans-Golgi			EE/TGN
Etanol absoluto			EtOH
Grados Celcius			°C
Medio de cultivo líquido			MCL
Medio de cultivo sólido			MCS
Membrana Plasmática			MP
Pares de bases			pb
Raíz Principal			RP
Reacción en cadena de la polimerasa			PCR
Retículo Endoplasmático			ER
Tirfostina A23			TyrA23
Sistema Radicular			SR
Vacuola			V
Línea silvestre (ecotipo Col-0)			Wt
Wortmanina			Wm

RESUMEN

El desarrollo del Sistema Radicular de una planta ocurre post embrionariamente y está dirigido por un programa endógeno y por la integración de señales ambientales, lo que permite al individuo explorar de manera continua el medio circundante en busca de nutrientes y le permite anclarse a la matriz. La organogénesis de raíces laterales es el principal determinante para el establecimiento de nuevas configuraciones del Sistema Radicular. El factor de transcripción bZIP25 de *Arabidopsis thaliana* se reportó como regulador negativo de la ruta de tráfico endocítico a nivel celular, tanto como del desarrollo de raíces laterales. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales bZIP25 participa del desarrollo de raíces era desconocido. En esta investigación se utilizó la línea pérdida de función de bZIP25, *bzip25-2*, y se generó una línea sobre expresora de bZIP25 fusionada a GFP para estudiar el desarrollo de raíces laterales dependiente de este factor de transcripción. Los resultados aquí presentados entregan evidencia que indica a la regulación del desarrollo de raíces laterales dependiente de bZIP25 no se relaciona con un desbalance de auxina, hormona que dirige los principales procesos de desarrollo de una raíz lateral. Observamos que la aceleración del tráfico vesicular entre la Membrana Plasmática y la Vacuola se relaciona directamente con la mayor densidad de raíces laterales detectadas en la línea *bzip25-2*. Particularmente, nuestros datos indican que bZIP25 regula negativamente la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC). En concordancia, el desarrollo de raíces laterales se ve más inhibido en la línea sobre expresora de bZIP25 respecto a la línea silvestre en presencia del inhibidor de la EMC TyrA23, de manera inversa a lo observado para *bzip25-2*, la cual es menos sensible. La sobre-expresión de bZIP25 en la línea *bzip25-2* muestra que bZIP25-GFP presenta una localización subcelular

ABSTRACT

The plant radicular system has a post-embryonic developing and it is driven through an endogenic system and by environmental signal integrations, allowing to the plant to explore the surrounding environment looking for nutrients and anchoring on a matrix. The lateral root organogenesis is the main determinant to the new configurations of the Radicular System. The transcription factor bZIP25 of *Arabidopsis thaliana* is described as a negative regulator of the endocytic trafficking at cellular level and also of the lateral root development. However, the mechanisms through bZIP25 in involved on root development was unknown. This research used the bZIP25 loss of function line, *bzip25-2*, and it was generated an over-expressor line of bZIP25-GFP on the *bzip25-2* background to study the dependence of lateral root development on this transcription factor. Our results give evidence that indicate that lateral root development depends on bZIP25 through a mechanism not related to auxin, a hormone that drives the main lateral root development processes. In addition, the accelerated vesicular trafficking through the plasma membrane and the vacuole is directly related to the higher lateral root density in *bzip25-2* line. Particularly, our data shows that bZIP25 regulates negatively the Clathrin Mediated Endocytosis (CME). Accordantly, the lateral root development is more inhibited under Tyr23A, a CME inhibitor, in the bZIP25 over-expressor line than in the wild-type line, inversely *bzip25-2* is less sensitive. bZIP25 over-expression on the *bzip25-2* background shows a nuclear subcellular localization and rescue all the phenotypes associated to the bZIP25 loss of function, verifying the regulatory function of bZIP25 over these phenotypes.

INTRODUCCION

Tal como en gran parte de los organismos multicelulares el plan corporal de una planta se establece durante la embriogénesis. Sin embargo, en vegetales, a diferencia de lo reportado para metazoos, la mayoría de los órganos y tejidos propios del organismo adulto surgen post-embriónariamente y su desarrollo se prolonga a lo largo de todo el ciclo de vida del individuo (Jürgens, G., 2003). Esta característica es de vital importancia para las plantas, pues les permite explorar continuamente el medio circundante para asegurar el contacto con fuentes nutricionales esenciales y sobrellevar cambios ambientales abruptos (Ruiz-Herrera, L. y cols., 2015; Li, X. y cols., 2015) constituyendo la principal estrategia evolutiva para sostener un estilo de vida sésil.

En una planta se distinguen dos regiones principales de desarrollo: aérea y subterránea. A nivel subterráneo los órganos predominantes son las raíces, las que en conjunto forman el sistema de raíces o Sistema Radicular (SR). El SR es esencial para la captura de agua y nutrientes, provee de anclaje y soporte mecánico, y puede servir como importante órgano de almacenaje en algunas especies (Malekpoor Mansoorkhani, F. y cols., 2014). La eficiencia en estos parámetros está determinada por la configuración espacial del SR, denominada Arquitectura del Sistema Radicular (ASR), que delimita el volumen de suelo explorado por la planta (Satbhai, S. y cols., 2015) y representa uno de los principales ejemplos de plasticidad morfológica post-embriónaria.

1.1.- Sistema Radicular de Plantas Dicotiledóneas

En plantas dicotiledóneas el eje principal del SR está formado por la Raíz Principal (RP). Este órgano posee un nicho de células troncales en su ápice denominado meristema apical de la raíz que se establece durante la embriogénesis y permite la

progresión de su crecimiento (Dolan, L. y cols., 1993). La raíz de dicotiledóneas presenta múltiples tipos celulares que se organizan como una serie de cilindros concéntricos en torno a un cilindro central formado por el tejido vascular (Cederholm, H. y cols., 2012). Además, la raíz presenta un perfil longitudinal de crecimiento en el que se definen tres regiones: la zona meristemática, donde predomina la proliferación celular sobre la elongación celular; la zona de elongación, donde predomina un rápido crecimiento longitudinal de las células y se inicia su diferenciación; y la zona de diferenciación, donde las células alcanzan completamente la madurez (Ivanov, V. & Dubrovsky, J., 2013).

Desde la RP se desarrollan distintos órdenes de raíces secundarias denominadas raíces laterales, las cuales imitan tanto el patrón de crecimiento como la organización celular de la RP (Péret, B. y cols., 2009). Las raíces laterales constituyen el principal mecanismo de modificación de la ASR y, por lo tanto, constituyen un componente activo de plasticidad del SR y un atractivo blanco para gatillar modificaciones que impacten positivamente en el crecimiento de la planta.

1.2.- Desarrollo de Raíces Laterales en *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana es el organismo modelo por excelencia para la investigación en biología vegetal (Koornneef, M. & Meinke, D., 2010). En consecuencia, los significativos progresos realizados en el campo de la regulación y desarrollo de Raíces Laterales derivan de los estudios realizados en este modelo.

Las Raíces Laterales de *Arabidopsis* se originan a partir de la capa celular interna de la RP denominada periciclo, la cual rodea al cilindro de tejido vascular (Dolan, L. y cols., 1993). Sólo las células del periciclo que limitan con los polos del xilema están

involucradas en la iniciación de la Raíz Lateral (Parizot, B. y cols., 2008). Este subconjunto de células, denominadas células fundadoras, conservan un estado "mitótico competente" tras dejar el meristema apical de la raíz por lo que han sido consideradas como una extensión del meristema (Casimiro, I. y cols., 2003; Atta, R. y cols., 2009). El desarrollo de una Raíz Lateral comienza cuando dos células fundadoras adyacentes sufren una división asimétrica anticlinal¹ dando lugar a dos células cortas y dos células alargadas, entonces las células cortas inician nuevas rondas de divisiones (Casimiro, I. y cols., 2003; Péret, B. y cols., 2009) tras lo cual, las células se dividen periclinalmente² formando una capa de células internas y otra externa. Nuevas divisiones aumentan el número celular y dan lugar a una estructura con forma de domo denominada Primordio de Raíz Lateral, el cual tras sobrepasar distintas etapas de crecimiento emerge atravesando las capas celulares externas de la raíz parental (Vilches-Barro, A. & Maizel, A., 2015) dando lugar a una Raíz Lateral Emergida (Figura 1).

-
- 1.- La deposición de la nueva pared celular es perpendicular al eje longitudinal de la raíz parental.
 - 2.- La deposición de la nueva pared celular es paralela al eje longitudinal de la raíz parental.

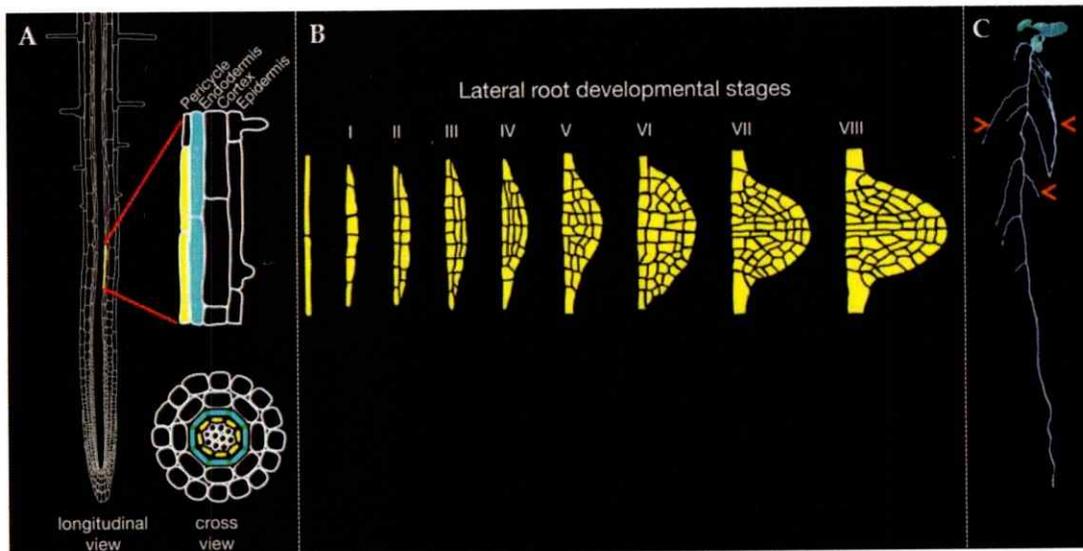


Figura 1. Organogénesis de una Raíz Lateral (RL) en *A. thaliana*. En **A** se muestra el esquema de una Raíz Principal, el corte longitudinal (arriba a la derecha) y la sección transversal (abajo a la derecha). En amarillo se muestra la capa del periciclo desde donde comienza el desarrollo de una RL. En **B** se muestran las distintas etapas de crecimiento de un primordio de raíz lateral. En **C** se muestra una planta de *Arabidopsis* en la que múltiples raíces laterales han emergido desde la Raíz Principal (cabeza de flecha naranjas). Modificado desde: <http://www.botinst.uzh.ch/en/research/cellbiology/vermeer/research.html>.

1.3.- Auxina y el Desarrollo de Raíces Laterales

En *Arabidopsis* la organogénesis de una raíz lateral es regulada coordinadamente por señales ambientales y hormonales (Fukaki & Tasaka, 2009; Mounier, E. y cols., 2014; Ramireddy, E. y cols., 2014). Dentro de estas últimas la hormona auxina cumple un papel crítico, pues la señalización mediada por auxina es fundamental en cada una de las etapas de desarrollo de una raíz lateral (Péret, B. y cols., 2009).

La percepción de auxina ligada al programa de desarrollo de una raíz lateral ocurre en el núcleo de la célula a través de una vía de señalización basada en la degradación de represores transcripcionales. En presencia de bajas concentraciones de auxina miembros de la familia de represores transcripcionales AUX/IAA (AUXIN/INDOLE-3-

ACETIC ACID) forman un heterodímero con factores de transcripción del tipo ARF (AUXIN RESPONSE FACTOR) impidiendo la transcripción de genes específicos de respuesta auxina (Tiwari, S. y cols., 2001; Tiwari y cols., 2004). En contraparte, altas concentraciones de auxina promueven la unión de esta hormona a los receptores de auxina F-box, TIR1 y AFBs, que forman parte del complejo E3 ubiquitin ligasa SCF^{TIR/AFB} (Cardozo, T. & Pagano, M., 2004). Este complejo tiene como blanco las proteínas AUX/IAA (Gray y cols., 2001), las que tras ser ubiquitinadas son subsecuentemente dirigidas a degradación en el proteosoma, permitiendo la des-represión de las proteínas -ARF y, consecuentemente, la transcripción de sus genes blancos. Esta vía de señalización es comúnmente denominada "Vía de Señalización Canónica de Auxina".

Dependiendo del umbral de concentración de auxina alcanzado en la célula, el complejo SCF^{TIR/AFB}-auxina presenta diferentes afinidades por distintos miembros de la familia AUX/IAA, permitiendo la degradación diferencial de los represores y, con ello, activando diferentes programas transcripcionales (Zenser, N. y cols., 2001; Calderón Villalobos, L. y col., 2012; Shimizu-Mitao, Y. & Kakimoto, T., 2014). Coherentemente, el estudio de líneas de *Arabidopsis* mutantes para diversos componentes descritos dentro de la Vía Canónica de Señalización de Auxina presentan defectos a diversos niveles en el transcurso de la organogénesis de una Raíz Lateral (Péret, B. y cols., 2009) dando cuenta de la importancia de la señalización mediada por esta hormona, además de revelar la temporalidad en que diversos componentes moleculares participan en el desarrollo de estos órganos.

1.4.- La Modulación del Sistema de Endomembranas participa en el Desarrollo de Raíces Laterales

1.4.1.-Generalidades del Sistema de Endomembranas

Independiente de su origen filogenético las células eucariontes presentan una compleja compartimentación de las membranas intracelulares, que delimitan organelos funcionalmente distintos, y cuya identidad se sustenta, principalmente, en su composición proteica y lipídica. El conjunto de estos compartimientos membranosos conectados físicamente, o a través de un tráfico altamente regulado de vesículas se denomina Sistema de Endomembranas y es esencial en la síntesis, destinación, entrega y degradación de macromoléculas dentro de la célula (Contento A. & Bassham D., 2012).

En plantas el Sistema de Endomembranas incluye al Retículo Endoplasmático (ER), el Aparato de Golgi (GA), los Endosomas Tempranos o Red Trans-Golgi (TGN/EE), los compartimientos post TGN/EE que incluyen el Compartimiento Pre-vacuolar, conocido también como Endosomas Tardíos o Compartimientos Multivesiculares (PVC/LE/MVB), Vacuola (V) y la Membrana Plasmática (PM).

El movimiento de vesículas entre estos compartimientos puede ser funcionalmente dividido en dos rutas principales de tráfico: la vía secretoria y la vía endocítica. En la vía secretoria, proteínas y lípidos sintetizados *de novo* en el ER, y que no cuentan con ninguna señal de retención a este organelo, trafican al GA, principalmente. El GA está constituido por una serie de cisternas próximas entre sí, funcionalmente separadas, donde las macromoléculas son sometidas a progresivas y secuenciales modificaciones (Nickel, W. & Wieland, F., 1998) lo que condiciona su retención al GA, tráfico retrógrado

al ER, o tráfico anterógrado a compartimientos tardíos como TGN/EE, PVC/LE/MVB o la PM (flechas azules en la figura 2). En dirección inversa, la vía endocítica involucra la internalización de moléculas desde el espacio extracelular a través de la formación de una vesícula de PM, que circunscribe tanto cargos solubles como unidos a membrana (Robinson D. y cols., 2008; flechas rojas en la figura 2). Las vesículas endocitadas, denominadas endosomas, son enviadas al TGN/EE desde donde los cargos pueden re-dirigirse a la PM, lo que involucra el paso por un compartimiento especializado denominado "Endosoma de Reciclaje (RE)", o traficar a compartimientos tardíos como PVC/LE/MVB, para luego ser enviados a la vacuola para su degradación o almacenaje.

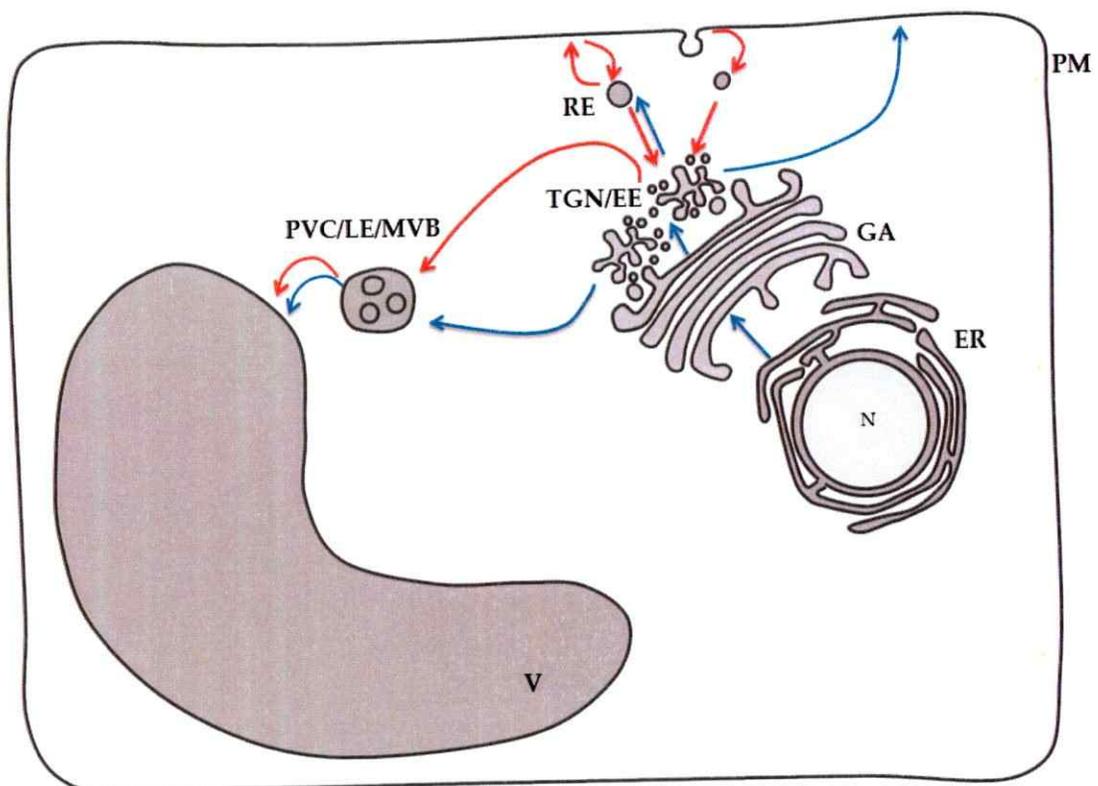


Figura 2. Sistema de Endomembranas de Célula Vegetal y Rutas de Tráfico. Los principales componentes del Sistema de Endomembranas incluyen la Membrana Plasmática (MP), el Retículo Endoplasmático (ER), el Aparato de Golgi (GA), la Red Transgolgi/Endosomas Tempranos (TGN/EE), Endosomas de Reciclaje (RE), el Compartimiento Prevacuolar/Endosomas Tardíos/Complejo Multivesicular (PVC/LE/MVB) y Vacuolas (V). Las flechas azules describen la ruta secretoria y las flechas rojas la ruta endocítica. N corresponde al núcleo celular.

1.4.2.- Auxina modula la internalización de Membrana Plasmática

Los niveles intracelulares de auxina dependen fundamentalmente de los facilitadores de eflujo de auxina denominados PIN ubicados en la MP (Pétrasek, J. y cols, 2006). Estas proteínas son sometidas de manera constitutiva a la internalización y reciclaje desde y hacia la MP, lo que constituye un mecanismo central para la regulación del transporte de auxina (Geldner, N. y cols, 2001; Geldner, N. y cols, 2003). Dentro de las vías de tráfico para la internalización de componentes de MP reportados en eucariontes, la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) es predominante y de las mejores descritas (Kirchhausen, T. y cols, 2014), las proteínas PIN son blanco de este mecanismo de endocitosis (Dhonukshe, P. y cols, 2007). Auxina inhibe la EMC impidiendo la internalización de las proteínas PIN regulando su abundancia en la MP, controlando de este modo su propio eflujo desde la célula (Paciorek, T. y cols, 2005). El mecanismo por el cuál auxina modula esta vía de tráfico no ha sido completamente descrito, pero se ha sugerido que involucra a un receptor de auxina ubicado en la vecindad de la MP denominado ABP1 (AUXIN BINDING PROTEIN 1; Robert, S. y cols, 2010). La alteración del ciclaje constitutivo de las proteínas PIN producto de la modulación de la EMC o a través de la alteración de los componentes que participan en la vía de señalización dependiente de ABP1 conducen a defectos en la organogénesis de raíces laterales (Lin, D. y cols, 2012; Chen, X. y cols, 2012; Wang, C. y cols, 2013).

1.5.- bZIP25 es un regulador negativo de la Vía de tráfico endocítico y del desarrollo de Raíces Laterales.

Los Factores de Transcripción (FT) son esenciales en la regulación de la expresión génica, participando, en consecuencia, virtualmente en todos los procesos biológicos. Los FT del tipo bZIP se encuentran presentes en todos los eucariontes y se caracterizan por contar en su estructura con un dominio integrado por una región básica para la unión con el DNA y un cierre de leucina implicado en la dimerización entre miembros de la familia bZIP (Landschulz, W. y cols., 1988). En plantas el papel de diversos bZIPs ha sido descrito, implicando su función en la regulación de la defensa a patógenos, señalización a diversos tipos de estrés, maduración de la semilla y desarrollo floral, entre otros (Jakoby, M. y cols., 2002; Corrêa, L. y cols., 2008). En *Arabidopsis* la familia de FT del tipo bZIP incluye 75 miembros los que de acuerdo a sus características estructurales se encuentran clasificados en 10 grupos (Jakoby, M. y cols., 2002). En particular, el FT bZIP25 de *Arabidopsis* pertenece al grupo C de la familia bZIPs que se caracterizan por compartir una alta homología con el bZIP de maíz OPAQUE2, involucrado en la regulación de genes que participan en el almacenaje de proteínas en la semilla (Schmidt, R. y col., 1992). En *Arabidopsis* bZIP25 posee funciones homólogas a OPAQUE2 regulando genes semilla específicos involucrados en el almacenaje de proteínas (Lara, P. y cols., 2003).

Por otro lado, bZIP25 fue caracterizado como un regulador negativo del tráfico endocítico en *Arabidopsis* (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015). La línea mutante pérdida de función de bZIP25, *bzip25-2*, muestra una toma acelerada de MP a través de la ruta endocítica, en comparación con el tipo silvestre y consecuentemente conduce a un marcaje más temprano de la membrana de la Vacuola mediante el uso de trazadores

endocíticos. Durante el estudio de *bZIP25* se observó, además, que la línea *bzip25-2* presenta una mayor densidad de raíces laterales comparada con el tipo silvestre (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015). Estos fenotipos podrían asociarse a la regulación de auxina de la EMC a través del receptor ABP1. Este receptor actúa como un regulador positivo de la endocitosis (Robert, S. y col., 2010; evaluado a través de la internalización de las proteínas PIN1, PIN2 y el trazador FM4-64), además, las líneas afectadas en la señalización río abajo de ABP1 presentan un aumento en la densidad de las raíces laterales en comparación a plantas silvestres (Lin, D. y col., 2012; Chen, X. y col., 2012). Sin embargo, la línea *bzip25-2* presenta niveles de transcritos de *ABP1* equivalentes a los del tipo silvestre (datos Dra. Lorena Pizarro, no publicado) sugiriendo que la vía auxina-ABP1 no está involucrada en el fenotipo de raíces laterales observados.

La aceleración del tráfico endocítico ha sido implicada en el desarrollo de raíces laterales, Pérez-Henríquez y cols (2012) reportaron que la droga Sortin2 induce la aceleración del tráfico endocítico en dirección a la Vacuola y, además, gatilla un aumento en el desarrollo de raíces laterales independiente del receptor de auxina *SCF^{TIR1/AFB}*. La inducción de raíces laterales dependiente de Sortin2 depende del tráfico a la Vacuola (Pérez-Henríquez, P. y cols., 2012) pues Sortin2 no logra superar la acción del inhibidor de la enzima Fosfatidilinositol-3-kinasa, Wortmanina (Robinson D. y col., 2008) un eficiente inhibidor del tráfico a la vacuola (da Silva, L. y col., 2005). Por tanto, la aceleración del tráfico endocítico a la Vacuola participa en la organogénesis de Raíces Laterales, lo que permite sugerir una relación causal entre la regulación de *bZIP25* del desarrollo Raíces Laterales y la modulación del tráfico endocítico.

Se estudió la expresión de bZIP25 en la raíz de *Arabidopsis* por medio de la base de datos de microarreglos eFP (<http://www.bar.utoronto.ca>) estos datos revelan un enriquecimiento de la expresión en la RP, particularmente, en la zona del meristema y la zona de elongación, en ambas regiones la expresión sigue un patrón radial con los mayores niveles entorno a los haces vasculares, y los niveles más bajos en la epidermis. A nivel del meristema auxina gatilla la destinación de las células fundadoras de una raíz lateral (Péret, B. y col., 2009) por lo que considerando la expresión de bZIP25 en esta región, sería posible sugerir un papel, directo o indirecto, de este factor de transcripción en la organogénesis de raíces laterales. Adicionalmente, se estudió la respuesta de la RP de línea *bzip25-2* ante un estímulo gravitrópico, pues los reportes de las líneas deficientes en la señalización de ABP1 presentan un característico retraso en la curvatura de la raíz resultado de este estímulo. La línea *bzip25-2* responde de manera equivalente a una plántula silvestre ante el desafío impuesto, apoyando el supuesto de que el fenotipo de pérdida de función de bZIP25 es independiente a la señalización mediada por ABP1.

En consideración a lo expuesto, debido a que el papel del tráfico endocítico a la Vacuola en la organogénesis de raíces laterales es un tema que comienza a ser explorado, delimitar si la regulación del Sistema Radicular por bZIP25 depende del tráfico endocítico a la Vacuola es de sumo interés, pues ofrece un blanco de estudio para determinar la maquinaria molecular que conforma esta vía alternativa. Sin embargo, es crucial para esto establecer si la regulación mediada por este factor de transcripción depende de la Vía Canónica de Auxina, por ello este seminario de título aborda el estudio del desarrollo de raíces laterales dependiente de bZIP25 en el

contexto de la respuesta a auxina y del tráfico endocítico para dar luces sobre la vía a través de la cual bZIP25 comanda la modulación del Sistema Radicular.

HIPOTESIS

El factor de transcripción bZIP25 de *Arabidopsis thaliana* participa en el desarrollo de raíces laterales mediante la regulación de la endocitosis.

OBJETIVOS

3.1.- Objetivo general

Estudio de la participación de bZIP25 de *Arabidopsis thaliana* en el desarrollo de raíces laterales mediado por auxina y por la modulación de la endocitosis.

3.2.- Objetivos específicos

- 1.- Evaluación de la participación de auxina en el desarrollo de raíces laterales en la línea mutante de bZIP25 mediante tratamientos con auxinas exógenas y de un inhibidor del tráfico de auxina.
- 2.- Determinar la participación de la endocitosis en el desarrollo de raíces laterales en la línea mutante de bZIP25 a través de tratamientos con moduladores del tráfico endocítico.
- 3.- Evaluar el desarrollo de raíces laterales al sobre-expresar bZIP25 en la línea de pérdida de función de este factor de transcripción.



MATERIALES Y METODOS

4.1.- Líneas de *Arabidopsis thaliana* utilizadas

Para el desarrollo de todos los experimentos se utilizó como línea silvestre el ecotipo Columbia-0 (Col-0) de *Arabidopsis thaliana*. Por otro lado, para el estudio del factor de transcripción bZIP25 se utilizó como herramienta dos líneas mutantes de la colección SALK que poseen una inserción de T-DNA en el locus At3g54620 que codifica para bZIP25. La línea SALK_119931C presenta la inserción de T-DNA en la región 5' no traducible (línea *bzip25-1*) y la línea SALK_148423C en el primer exón del gen que codifica a bZIP25 (línea *bzip25-2*). En contraparte, el ecotipo Col-0 presenta de manera íntegra la región codificante de bZIP25.

4.2.- Esterilización de semillas

Para el proceso de esterilización se preparó una solución en etanol 95% v/v no analítico de cloro comercial al 20% v/v y el detergente Tween-20 al 0,01% v/v. Con 1mL de esta solución se lavaron entre 300 y 500 semillas contenidas en un tubo eppendorf agitando por inversión durante 10 minutos. Bajo una campana de flujo laminar se retiró la solución descrita y se realizó un proceso de tres lavados consecutivos con etanol 95% v/v agitando las semillas en cada lavado durante 30 segundos. Posterior a esto, las semillas se mantuvieron expuestas al flujo laminar para su secado manteniendo abierta la tapa del tubo eppendorf que las contiene por un mínimo de 20 minutos, con objeto de conseguir la completa evaporación del etanol. Finalmente, se agregó 1mL de agua estéril filtrada a cada tubo contenedor de semillas.

4.3.- Estratificación de semillas

Como protocolo de estratificación las semillas esterilizadas depositadas en agua estéril se mantuvieron a 4°C en oscuridad por un mínimo de 48 horas.

4.4.- Condiciones de cultivo y crecimiento

Las semillas estratificadas se sembraron en medio de cultivo sólido (MCS) estéril el cual está compuesto de sacarosa 2% p/v, mioinositol 0,01% p/v, MES [ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico monohidrato] 0,05% p/v, medio Murashige y Skoog (MS) de cultivo 0,22% p/v y fitoagar 0,7% p/v, ajustado a pH 5,7 con KOH, sobre placas cuadradas de cultivo (120x120x17mm) conteniendo 40mL de MCS.

En cada placa con medio se sembraron dos filas de semillas separadas por aproximadamente 4cm. Cada fila contiene 20 semillas separadas de manera equidistante (ver figura 4A). Las placas se dispusieron de modo vertical para que el crecimiento de cada plántula siga la dirección del vector de gravedad y se mantuvieron en incubadores que proporcionan una temperatura de 22°C y un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Para el tratamiento de plántulas en presencia de los diferentes químicos y hormonas descritos en este capítulo se utilizó Medio de Cultivo Líquido (MCL) que corresponde al MCS sin fitoagar suplementado.

4.5.- Estudio del tráfico endocítico

Para el estudio del tráfico endocítico se utilizó el fluoróforo FM4-64 (Bolte, S. y col., 2004). Este compuesto es un esteril lipofílico, no-fluorescente en medio acuoso, sin embargo es fluorescente cuando se une a capas lipídicas. Esta característica permite utilizarlo como trazador endocítico, pues una vez unido a la MP es internalizado

secuencialmente a través de los compartimientos que componen la ruta endocítica. La figura 3 esquematiza la progresión en la internalización de FM4-64 por medio de compartimientos marcados en rojo. En A el trazador se encuentra en la MP desde donde es endocitado a través de vesículas hasta los EE/TGN como se muestra en la figura 1B. Desde este punto puede retornar a la Membrana Plasmática a través de vesículas de reciclaje, o seguir por la ruta endocítica hasta compartimientos pre-vacuolares (LE/MVB/PVC) como se muestra en figura 1C. Finalmente, desde LE/MVB/PVC alcanza la Vacuola, como se muestra en la figura 1D.

Se preparó una solución stock de FM4-64 a una concentración de 16mM usando como solvente agua estéril (preparación bajo campana de flujo laminar). Para la evaluación de la endocitosis plántulas de 7 días fueron incubadas en una solución de FM4-64 a una concentración de 5 μ M preparada en MCL. Las plántulas se mantuvieron en oscuridad y a 4°C por 15 minutos, lo que asegura la unión del trazador sólo a la Membrana Plasmática sin ser internalizado, tras lo cual son incubadas en MCL sin el trazador a temperatura ambiente. Las imágenes del proceso de internalización de FM4-64 se obtuvieron por medio del microscopio confocal Zeiss LSM 510. Se utilizó una longitud de onda de excitación de 543nm y la emisión fue recolectada a 588-696nm. Las observaciones se realizaron utilizando un objetivo 40X de inmersión en aceite.

En todos los tratamientos descritos en este capítulo que involucran el estudio de la internalización de FM4-64 en presencia de hormonas o drogas, las condiciones de trabajo son equivalentes a las aquí descritas, pero involucran el uso de MCL suplementado con las concentraciones de hormona o drogas requeridas. Las condiciones de observación fueron uniformes en todos los tratamientos, a menos que

se indique lo contrario. Los análisis de imágenes se realizaron mediante el programa LSM Image Browser en todos los casos.

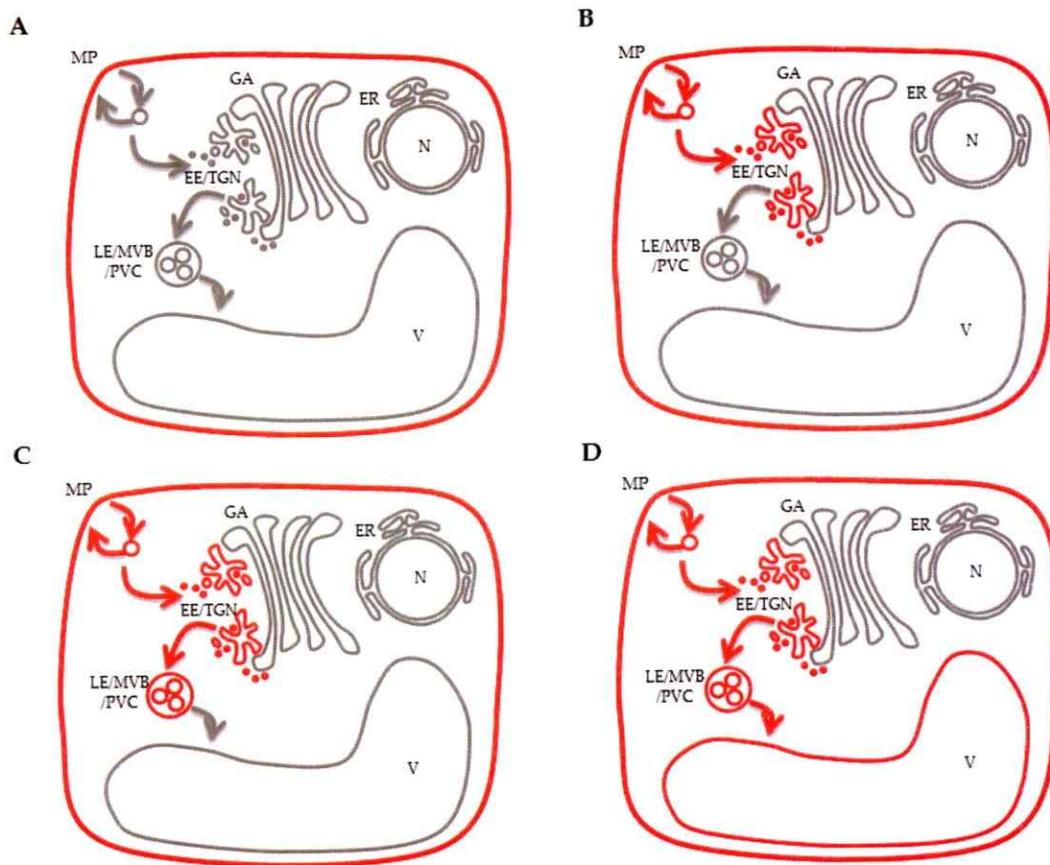


Figura 3. Internalización del trazador FM4-64 en una célula vegetal. El fluoróforo FM4-64 es un esteril lipofílico que fluoresce cuando se encuentra en una capa lipídica. En células vegetales es usado como trazador endocítico, pues es posible monitorear su fluorescencia a medida que es internalizado desde la PM. En A se marca en rojo lo que ocurre a 4°C en una célula vegetal expuesta a FM4-64, el compuesto se une a la MP donde fluoresce. En B el trazador es internalizado hasta los EE/TGN el primero punto de la ruta endocítica (visualizado luego de 5 minutos). En C se muestra el tráfico a tiempos más prolongados a compartimientos LE/MVB/PVC (visualizados luego de 30 minutos). Finalmente, el trazador llega al compartimiento más tardío en la ruta endocítica, la Vacuola (entre 60 y 90 minutos) como se representa en D. N = Núcleo y ER = Retículo Endoplasmático.

4.6.- Evaluación de la densidad de raíces laterales

4.6.1.- Tratamiento de plántulas

Plántulas de 7 días de crecimiento en MCS se transfirieron a placas de 6 pocillos (85,4x27mm) conteniendo 3mL de MCL suplementado con hormonas o drogas a las concentraciones requeridas, o con los solventes adecuados como condición control. A cada pocillo se transfirió un total de 7 plántulas las que se crecieron por 3 días en posición horizontal bajo condiciones de cultivo idénticas a las que provenían (22°C; fotoperiodo 16hrs luz/8hrs oscuridad) como se describe en el esquema de la figura 4.

4.6.2.- Tratamiento para aclaramiento de plantas

Con objeto de disminuir los pigmentos propios de la raíz y denotar la morfología de primordio de raíz lateral y raíces laterales emergidas las plántulas se sometieron a 3 lavados consecutivos en etanol 70% v/v de 30 minutos como mínimo. Luego se montaron sobre portaobjetos de vidrio y fijadas con ácido láctico. Finalmente, se almacenan a temperatura ambiente durante un mínimo de 10 horas.

4.6.3.- Condiciones de observación

Se registró el número de raíces laterales de plántulas aclaradas mediante observación directa a través de microscopía de campo claro en un microscopio Nikon modelo 190251 con una magnificación de 40X. Se discriminó entre aquellas raíces laterales que emergieron desde la RP (raíces emergidas) y de primordios de raíz lateral.

4.6.4.- Registro y medición del largo de raíz principal

Se obtuvo la imagen de plántulas aclaradas completas escaneando los portaobjetos que las contienen junto con una medida de referencia de tamaño conocido (escáner EPSON Perfection V600 Photo). La cuantificación del largo de raíz principal se realizó a través del programa de análisis de imagen tpsDig2.

El parámetro de densidad, ya sea para raíces emergidas, primordios de raíz lateral o para raíces laterales totales (corresponde a la suma de raíces emergidas y primordios de raíz lateral) se obtiene de la razón entre el número de raíces observado y el largo de raíz principal de cada planta.

4.7.- Tratamientos con auxinas

Para los ensayos que involucran el uso de la hormona auxina se utilizó la auxina natural IAA (ácido 3-indol acético) y la auxina sintética NAA (ácido 1-naftaleno acético). Se preparó una solución stock de IAA 100mM usando como solvente etanol absoluto (calidad analítica). Por otro lado, se preparó una solución stock de 100mM de NAA usando como solvente DMSO (dimetilsulfóxido, calidad analítica). Para ambos casos se preparó stocks diluidos de concentración final 10mM utilizando los solventes indicados para cada caso.

Para la evaluación de la densidad de raíces laterales se utilizaron soluciones de IAA y NAA a una concentración final de 0,1 μ M y 1 μ M para cada auxina. Por otro lado, para el estudio de la internalización del trazador FM4-64, se utilizó MCL suplementado con 10 μ M de auxina y se siguió la internalización del trazador hasta 60 minutos.

4.8.- Tratamientos con el inhibidor del tráfico polar de auxina NPA

Para los ensayos con el inhibidor del tráfico polar de auxina NPA (ácido 1-N-naftilfalamico) se preparó una solución stock de 100mM utilizando como solvente DMSO (dimetilsulfóxido)-la cual se diluyó 10 veces generando una solución de 10mM.

Se evaluó el crecimiento de plántulas germinadas en NPA, para esto se prepararon placas con MCS suplementado con NPA 10 μ M. Se sembraron 20 semillas por placa y se evaluó el crecimiento de las plántulas tomando como parámetro el largo de la raíz principal hasta 7 días después de la siembra. Se utilizó como control plántulas germinadas en MCS suplementado con DMSO bajo los mismos parámetros de cultivo:

Para la determinación de densidad de raíces laterales se utilizó soluciones de NPA en MCL a las concentraciones de 0,5 μ M y 1 μ M. La dinámica de internalización de FM4-64 en presencia de NPA se estudió utilizando NPA 10 μ M, durante un curso temporal de 5 a 60 minutos.

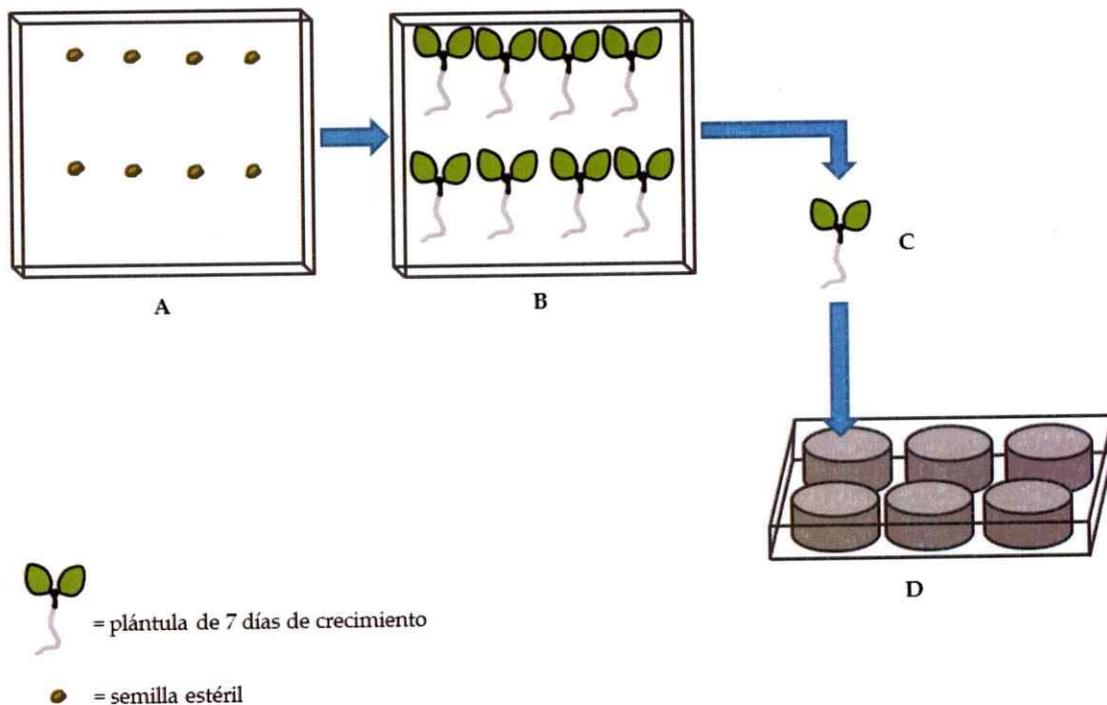


Figura 4. Diseño experimental para la evaluación del impacto de hormonas y drogas en la densidad de raíces laterales. Semillas estériles se sembraron en placas cuadradas de 120x120x12mm conteniendo 40mL de medio de cultivo sólido (A). Luego de 7 días de crecimiento (B) 7 plántulas (C) son tomadas y transferidas a cada pocillo de una placa de 6 pocillos (85,4x27mm) conteniendo 3mL de medio de cultivo líquido (D) suplementado con alguno de los tratamientos hormonales o con drogas descritos. En D las plántulas son mantenidas durante 3 días. Las condiciones de crecimiento siempre corresponden a 22°C y a un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las placas cuadradas son sembradas con dos filas de semillas, con 20 semillas por fila.

4.9.- Tratamientos con moduladores de tráfico endocítico

4.9.1.- Stocks de drogas

Se realizaron soluciones stocks dependiendo de la droga utilizada. Se preparó una solución stock de Wortmanina (Wm) 33mM, de Tirfostina A23 (TyrA23) 270mM y de Sortin2 de 20mg/mL utilizando en todos los casos DMSO (dimetilsulfóxido, calidad

analítica) como solvente. Tirfostina A23 fue diluida en DMSO a una concentración de 100mM. Se utilizó la droga BrefeldinaA (BFA) a 3,6mM disuelta en etanol absoluto.

4.9.2.- Tratamientos para evaluar la densidad de raíces laterales

Se preparó un grupo de soluciones de trabajo de las distintas drogas en MCL. Se ocupó Wm 33μM, TyrA23 30μM, Sortin2 25μg/mL y BFA 50μM.

4.9.3.- Estudio del tráfico endocítico

La dinámica de endocitosis del trazador FM4-64 se estudió en presencia de BFA 50μM, Sortin2 25μg/mL, Sortin2 50μg/mL, TyrA23 50μM y TyrA23 75μM. Por lo que se prepararon diluciones de estas drogas a partir de los stocks en MCL. Para BFA las observaciones se realizaron ente 5 y 60 minutos, para TyrA23 a 30 minutos a ambas concentraciones y para Sortin2 entre 30 minutos y 3 horas.

4.10.- Estudio del tráfico a la vacuola desde EE/TGN

Para determinar la dinámica de tráfico desde los EE/TGN en dirección a la Vacuola interrumpimos el tráfico endocítico a nivel de EE/TGN a través de la droga Brefeldina A, la cual impide el reciclaje de endosomas a la MP, y en consecuencia gatilla que los endosomas se aglomeran en una gran estructura denominada cuerpo de BFA (Pedrazzini, E. y col., 2013). Se incubaron plántulas de 7 días en medio de cultivo líquido con BFA 50μM por 30 minutos, para asegurar la formación del cuerpo de BFA en células de la punta de la raíz, como se muestra en la figura 5A. Luego las plántulas se co-incubaron en medio de cultivo líquido conteniendo FM4-64 5μM y BFA 50μM a 4°C durante 30 minutos (figura 5B). En suma una hora de incubación con BFA 50μM asegura la formación de uno o dos cuerpos de BFA por células, y 30 minutos de

incubación con FM4-64 permiten la llegada del trazador a la MP y al cuerpo de BFA sin que FM4-64 se internalice a compartimientos posteriores en la ruta de tráfico a la vacuola. Posterior a esto, se re-incuba en medio de cultivo líquido suplementado con BFA 50 μ M (figura 5C) a temperatura ambiente. Se consideró este punto como tiempo cero de observación, la internalización del trazador alcanza completamente el cuerpo de BFA tras 30 minutos a temperatura ambiente y es posible evidenciar fugas del tráfico en dirección a la vacuola en base a la llegada de FM4-64 al tonoplasto a tiempos prolongados (como 120 minutos, figura 5D).

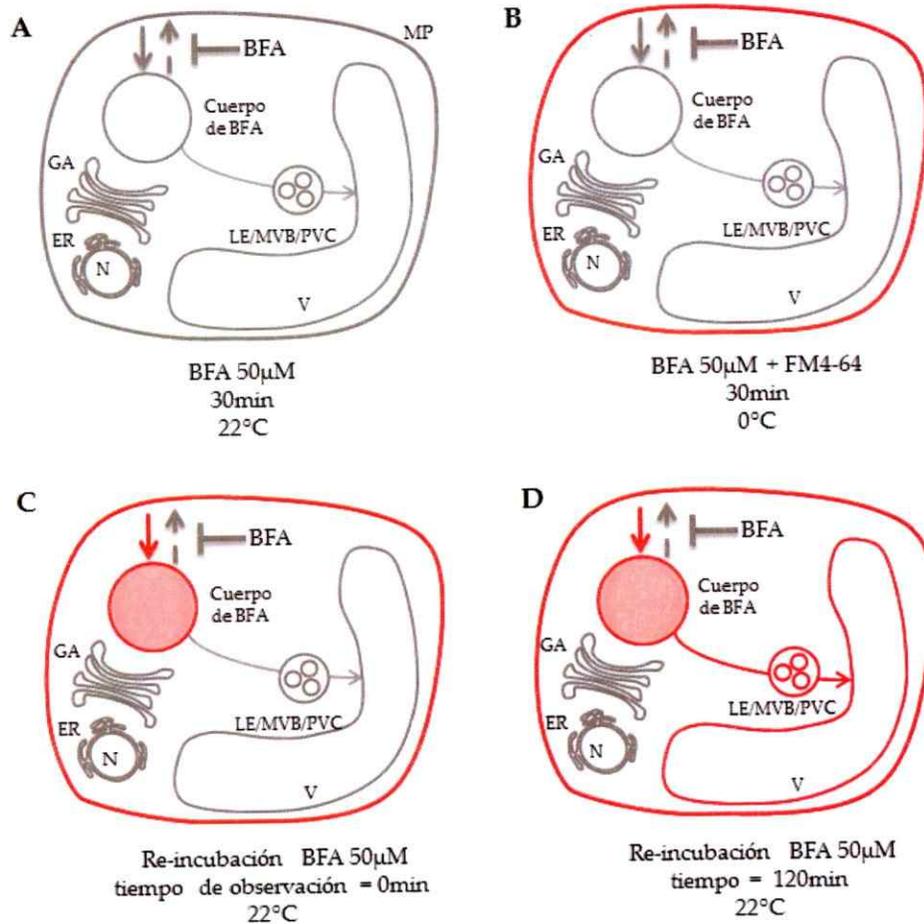


Figura 5. Esquema de la estrategia para analizar el tráfico post EE/TGN en dirección a la vacuola. En A se muestra el primer paso de la estrategia, que involucra la formación del cuerpo de BFA como resultado de BFA 50µM durante 30 minutos, a temperatura ambiente. En B se representa el segundo paso, que consiste en mantener la incubación en BFA 50µM, pero a la vez co-incubar con FM4-64 a 0°C por 30 minutos. En conjunto estas dos etapas aseguran la formación de uno o dos cuerpos de BFA por células (pues se ha reportado que una hora de tratamiento con BFA 50µM gatilla ese fenotipo) y además permite la tinción de la MP. Luego en B se muestra la internalización del trazador FM4-64 que sólo alcanza el cuerpo de BFA, y no otros compartimientos en la ruta endocítica en dirección a la Vacuola. La progresión temporal de este experimento permite evaluar el escape de vesículas desde el cuerpo de BFA en dirección a la Vacuola, en este caso será registrado a través del trazador, permitiendo estudiar la cinética de tráfico entre estos dos puntos de la ruta endocítica. Finalmente, a tiempos prolongados, como 120 minutos, el trazador alcanzará el tonoplasto como se muestra en D.

4.11.- Genotipificación de plantas de *Arabidopsis*

4.11.1.- Extracción de DNA

Se extrajo DNA genómico a partir de 10 plántulas de 7 o 10 días de cada una de las líneas en estudio. Para esto el tejido se congeló en nitrógeno líquido. Se trituró el tejido congelado y se agregó 100µL de solución tampón CTAB 2X (cetil-trimetil-amonio-bromidio 2% p/v, NaCl 1,4M, Tris HCl pH 8 100 mM, EDTA 20 mM, 2-mercaptoetanol 0,1% v/v) y se continuó la trituración hasta conseguir un homogenizado del tejido. Se agregó 600µL de CTAB 2X el que se suplementó con 0,5% de β-mercaptoetanol v/v. Se incubó entonces en agitación a 65°C por 45 minutos. Luego se centrifugó a 13000X g por 7 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Al sobrenadante se agregó 700µL de solución cloroformo:alcohol isoamílico en razón 24:1 y se mezcló por inversión durante 5 minutos. Se centrifugó a 8000X g durante 5 minutos y se separó la fase acuosa superior a un tubo limpio evitando tomar la interfase. Se volvió a centrifugar y a separar la fase acuosa superior. A esto se agregó 650µL de isopropanol y se mezcló. Se incubó a -20°C por 24 horas. Luego se centrifugó a 13000X g por 15

minutos y se eliminó el sobrenadante. El pellet de DNA se lavó con etanol 70% v/v. Se centrifugó entonces a 13000X g por 2 minutos, se eliminó el etanol y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por lo menos 15 minutos. Luego se resuspendió el pellet en 50µL de agua tratada con DEPC y fue almacenado a -20°C.

4.11.2.- Amplificación de DNA mediante PCR

Para dar cuenta de diferentes alelos a nivel genómico en las diversas línea de Arabidopsis en estudio, se utilizó alguno de los pares de partidores de la lista de la tabla I. Los productos de PCR analizados pueden ser divididos en dos grupos según su tamaño, por lo que se dividió en dos protocolos de PCR para ajustar las características de la polimerasa al fragmento amplificado. Los fragmentos sobre 1000pb fueron amplificados con el protocolo descrito en la tabla II, los fragmentos de menos de 1000pb con el protocolo detallado en la tabla III. En todos los casos el volumen final por reacción fue de 20µL. Cada reacción contaba con 1 unidad de enzima Paq5000TM DNA polimerasa (Paq5000 1kb/30 seg), solución tampón 1X con MgCl₂ 2mM, partidores a 250nM, dNTPs 25µM, 1µL de DNA genómico (50-200ng) y se completó el volumen con agua tratada con DEPC.

Tabla I. Lista de partidores usados durante el trabajo experimental

Nombre	Secuencia	Gen
206 = SALK_026937_rev	ATCTAAGAGACGGTACACGGAC	<i>bZIP25</i>
205 = SALK_026937_for	TGCTCAGCTATGCTAGTAG	<i>bZIP25</i>
NPT II 5	CAAGATGGATTGCACGCA	<i>nptII</i> (Kanamicina)
NPT II 3	CTATGTCCTGATAGCGGT	<i>nptII</i> (Kanamicina)
LBb1:3	ATCTTGCCGATTTGGAAC	
HigroF	TTTGTGTACGCCCGACAGT	<i>hpt</i> (Higromicina)

HigroR	AAGACCTGCCTGAAACCGA	<i>hpt</i> (Higromicina)
AT3G54620CDSRfor	GGCGATTGGGTAAGCGAT	<i>bZIP25</i> (isoforma 1)
AT3G54620.13CDSRev	TTAATGCTTGTGATTCCAATGG	<i>bZIP25</i> (isoforma 1)
AtActin4AA89 5'	CACACTTTCTACAATGAGCT	<i>ACTINA1</i> , <i>ACTINA11</i>
AtActin4AA320 3'	GCAGTGATCTCTTTGCTCAT	<i>ACTINA1</i> , <i>ACTINA11</i>

Tabla II. Protocolo de PCR 1: amplificación de fragmentos menores a 1000pb

Periodo	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	1	94°C	10 minutos	1
2	1	94°C	1 minuto	30
	2	56°C	30 segundos	
	3	72°C	30 segundos	
3	1	72°C	5 minutos	1

Tabla III. Protocolo de PCR 2: amplificación de fragmentos mayores a 1000pb

Periodo	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Denaturación inicial	94°C	10 minutos	1
2	Ciclos de amplificación	94°C	1 minuto	30
		56°C	30 segundos	
		72°C	50 segundos	
3	Elongación Final	72°C	5 minutos	1

4.11.3.- Electroforesis en gel de agarosa

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa (Lafken) 1,5% p/v en TAE 1X (Tris-base pH 7,6 40mM, ácido acético glacial 19mM y EDTA 1mM pH 8). Se mezcló 10µL del producto de PCR obtenido con

aproximadamente 2µL de buffer de carga 6X, (azul de bromofenol 0,25% p/v, xilencianol 0,25% p/v, ficol 30% p/v). Se utilizó un marcador de peso molecular dependiendo del fragmento esperado en el producto de PCR, para los fragmentos entre 200 y 800 pb se utilizó un marcador de 100pb (Fermentas) y para los fragmentos de 1kb a 10 kb se utilizó un marcador de 1 kilobase (Fermentas). En ambos casos se cargaron 250ng totales de marcador de peso molecular (5 µL de marcador a 50ng/µL). Se corrió el gel a 80mV de manera continua durante 50 minutos en una cámara de electroforesis. Luego se incubó el gel de agarosa en solución de bromuro de etidio 2mg/L por un mínimo de 20 minutos para la tinción del DNA y se visualizó por exposición a luz UV mediante un transiluminador que cuenta con sistema de adquisición de imagen (SYNGENE).

4.12.- Transformación estable de líneas de *Arabidopsis thaliana* mediante el protocolo de inmersión floral

Para la transformación estable de plantas silvestres y mutantes de *A. thaliana* se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3102 transformada con los vectores de interés (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) siguiendo el protocolo descrito por Zhang y colaboradores (2006). Las semillas provenientes de plantas transformadas fueron seleccionadas en medio suplementado con el antibiótico Higromicina B hasta la tercera generación en busca de poblaciones totalmente resistentes al antibiótico.

4.13.- Extracción de RNA

20 plantas de 10 días de crecimiento en MCS se congelaron utilizando nitrógeno líquido y pulverizaron, inmediatamente después se realizó la extracción de RNA utilizando el kit InviTrap Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex) bajo las instrucciones indicadas La

cuantificación de la concentración de RNA obtenido se determinó mediante el uso del espectrofotómetro Nanovue (General Electric).

4.14.- Síntesis de cDNA

Se tomaron 3,5µg de RNA de cada muestra y se trataron con DNasa I (DNase I - RNase Free, Thermo Scientific). A cada muestra se agregó 0,5 unidades de DNasa, 1X buffer DNasa I (DNase I - RNase Free, Thermo Scientific) con MgCl₂, 8 unidades del inhibidor de RNasas Ribolock (Ribolock RNase inhibitor, Thermo Scientific) hasta un volumen final de 20µL completando con agua tratada con DEPC. La reacción se incubó a 37°C por 45 minutos. Se inactivó la reacción agregando EDTA a una concentración final de 2,5mM e incubando a 65°C por 10 minutos. Tras esto, se mantuvo la reacción a 4°C (incubación en hielo). El RNA tratado según este protocolo fue el material de base para síntesis de cDNA.

A 1,3µg de RNA se adicionó un volumen de 1,5µL de OligoAP a una concentración de 0,5µg/mL a un volumen total de 10µL. Se incubó la reacción a 70°C por 5 minutos. Luego se mantuvo a 4°C (incubación en hielo). Luego se adicionó 1,5 unidades de Transcriptasa Reversa (Improm II Reverse Transcription System, Promega), 8 unidades de inhibidor de RNase (Ribolock RNase inhibitor, Thermo Scientific), Buffer Improm II Reverse Transcription System 1X (Promega), MgCl₂ 6,25 mM, dNTP 0,75 mM. La reacción de síntesis se llevó a cabo según el protocolo de la tabla IV. Como control negativo de la reacción de transcripción reversa, se realizó todo el procedimiento pero sin agregar la enzima transcriptasa reversa, lo que permite verificar la ausencia de DNA en la muestra de RNA utilizada para la síntesis de cDNA.

Tabla IV. Protocolo de síntesis de cDNA mediante retrotranscripción.

Etapa	Temperatura	Tiempo
1	25°C	5 minutos
2	42°C	60 minutos
3	70°C	15 minutos
4	4°C	∞

4.15.- Cuantificación de transcritos mediante RT-PCR semicuantitativo

Se utilizó el cDNA preparado para cuantificar los niveles de transcritos de genes de interés. Para esto se realizaron dos reacciones de PCR para el gen de interés y el gen constitutivo *ACTINA11* según lo descrito en la tabla V. El cDNA fue diluido en razón 1:1 y se ocupó 1µL por reacción. Cada reacción incluyó 1 unidad de enzima Paq5000TM DNA polimerasa, solución tampón 1X con MgCl₂ 2mM, partidores a 250nM, dNTPs 25µM y se completó el volumen con agua tratada con DEPC.

Tabla V. Protocolo de PCR utilizado para RT-PCR semicuantitativo.

Periodo	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Denaturación inicial	94°C	10 minutos	1
2	Ciclos de amplificación	94°C	1 minuto	25 o 30
		56°C	50 segundos	
		72°C	50 segundos	
3	Elongación Final	72°C	5 minutos	1

Los productos de PCR, fueron sometidos a electroforesis y visualizado en transiluminador según lo indicado en la sección "electroforesis en gel de agarosa" de este capítulo. La intensidad de las bandas se analizó mediante el programa ImageJ, y se relativizó los niveles de transcritos usando como referencia los niveles de transcrito del gen de actina.

4.16.- Identificación de localización subcelular mediante InmunoFluorescencia (IF)

El protocolo de IF se realizó por completo sobre un portaobjeto de vidrio en el que se encontraban montadas 3 plántulas. Se realizaron dos lavados con 200µL de la solución tampón PBS 1X por 5 minutos (Na₂HPO₄ 10mM, KH₂PO₄ 1,8mM, NaCl 0,137M y KCl 2,7mM llevado a pH de 7,4). Se fijó la muestra aplicando 200µL de paraformaldehído 4% por 30 minutos. Tras esto se realizaron tres lavados con 200µL de PBS 1X incubando en cada lavado 5 minutos. Se aplicó entonces 150µL de solución de bloqueo permeabilizante por una hora, (5% de suero de cabra, 0,5% de tritón x100 preparada en PBS 1X). Se preparó en solución de bloqueo la una dilución de 1:500 del anticuerpo primario anti-GFP (Sigma®) se retiró la solución de bloqueo permeabilizante inicial y se incubó durante 24 horas con la solución de bloqueo permeabilizante más el anticuerpo primario. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron 3 lavados con 200µL de PBS 1X por 5 minutos cada uno. Luego, se incubó con 100µL del anticuerpo secundario FITC (Sigma®) en dilución 1:1000 preparado en PBS, por una hora. Luego, se lavó dos veces con 200µL de PBS 1X por 5 minutos en cada lavado. Se incubó entonces con DAPI 1mg/L en dilución 1:5000 para marcar el núcleo. Finalmente, se realizó un lavado con 200µL de agua destilada. Se estudió la localización de los marcadores mediante microscopía confocal (LSM Zeiss 710).

RESULTADOS

5.1.- Amplificación y genotipificación de las líneas insercionales de bZIP25: *bzip25-1* y *bzip25-2*

Para la investigación desarrollada en torno a bZIP25 se seleccionaron dos líneas de la colección SALK de mutantes insercionales de T-DNA (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) utilizando la base de datos TAIR (The Arabidopsis Information Resource). TAIR contiene la información asociada al genoma de *Arabidopsis thaliana*, incluyendo las diferentes mutantes disponibles para cada gen a partir de las colecciones de mutantes existentes. Las líneas fueron denominadas *bzip25-1*(SALK_119931C) y *bzip25-2*(SALK_148423C) las que presentan la inserción de T-DNA en la región no traducible 5' UTR (UnTranslated Region) y el primer exón del gen de *bZIP25* respectivamente (Figura 6). La línea *bzip25-1* presenta niveles indistintos del transcrito de *bZIP25* con la línea silvestre, en cambio la línea *bzip25-2* tiene una disminución mayor al 90% en de los transcritos de bZIP25 (Pizarro, L., tesis doctoral 2015). El trabajo práctico de este Seminario de Título comenzó con la obtención de semillas (amplificación) de individuos de ambas líneas mutantes y de la línea silvestre, y la posterior corroboración de su genotipo.



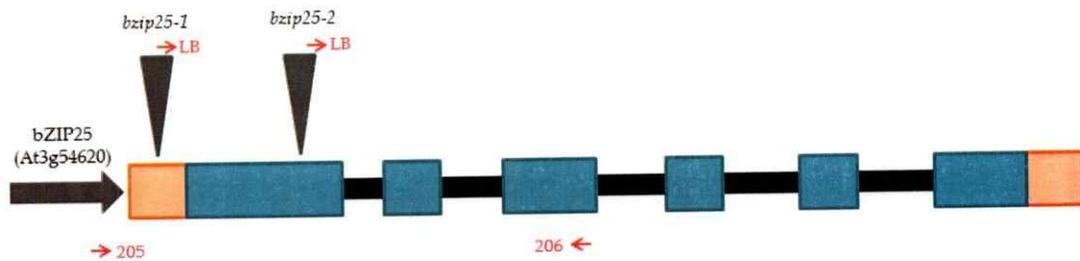


Figura 6.- Modelo génico de bZIP25. La representación indica en azul a los exones, en negro a los intrones y, en naranja a las regiones 5' y 3' no traducibles. La línea *bzip25-1* presenta el inserto en la región 5' UTR, mientras que *bzip25-2* en el primer exón. Los números 205 y 206 (tabla 1) representan el código de partidores específicos para la amplificación mediante PCR del alelo silvestre. La amplificación de los alelos mutantes se obtiene del uso del partidor LB que hibrida en el inserto de T-DNA junto con el partidor 206. La identificación particular de cada línea mutante se basó en el tamaño del amplificado.

Para determinar la presencia del alelo silvestre del gen que codifica para bZIP25 o la de los alelos mutantes en que bZIP25 ha sido interrumpido por la inserción de T-DNA, se obtuvo el DNA genómico de ambas líneas mutantes, y de plántulas silvestres a partir del cual se amplificó mediante PCR las distintas regiones de acuerdo a los partidores descritos en el esquema de la figura 6. En particular, para caracterizar la inserción de T-DNA se utilizó el partidor denominado LB que hibrida con la región terminal del inserto de T-DNA junto con el partidor genómico de dirección inversa 206 (figura 6; tabla 1).

La electroforesis de los productos de PCR muestra, de acuerdo a lo esperado, que la línea silvestre presenta sólo el alelo silvestre de bZIP25 (Figura 7A), amplificándose una banda de 1201pb (pares de bases). Por otro lado, a partir del DNA genómico de las líneas *bzip25-1* y *bzip25-2* no se amplifica el alelo silvestre de bZIP25, dando cuenta de la interrupción del gen de bZIP25, y además, evidenciando la condición de homocigosis de cada una de las mutaciones. Utilizando el partidor LB y en dirección inversa el partidor 206 que hibrida con una región del gen que codifica para bZIP25 no

interrumpida por la inserción de T-DNA (Figura 5) se amplifica una banda de 693pb desde el DNA genómico de *bzip25-1*, mientras que para *bzip25-2* de 440pb (Figura 6B), este resultado es concordante a la posición de la inserción de T-DNA para cada una de las líneas. En *bzip25-1* el fragmento amplificado comprende desde la interrupción provocada por el T-DNA en la región 5' UTR hasta la región marcada por el partidor 206 en el tercer exón como se muestra en la figura 6, mientras que en *bzip25-2* la amplificación involucra desde la interrupción en el primer exón, generándose productos de PCR de tamaño distinto, característico a cada mutante. Cabe destacar que se corroboró la calidad del DNA genómico amplificando como control un fragmento de 849pb del gen que codifica para actina (tabla 1), y además, como control de la inserción de T-DNA un fragmento de 655pb el gen *nptII* (tabla 1) parte del inserto de T-DNA y que confiere resistencia al antibiótico kanamicina (Figura 7C).

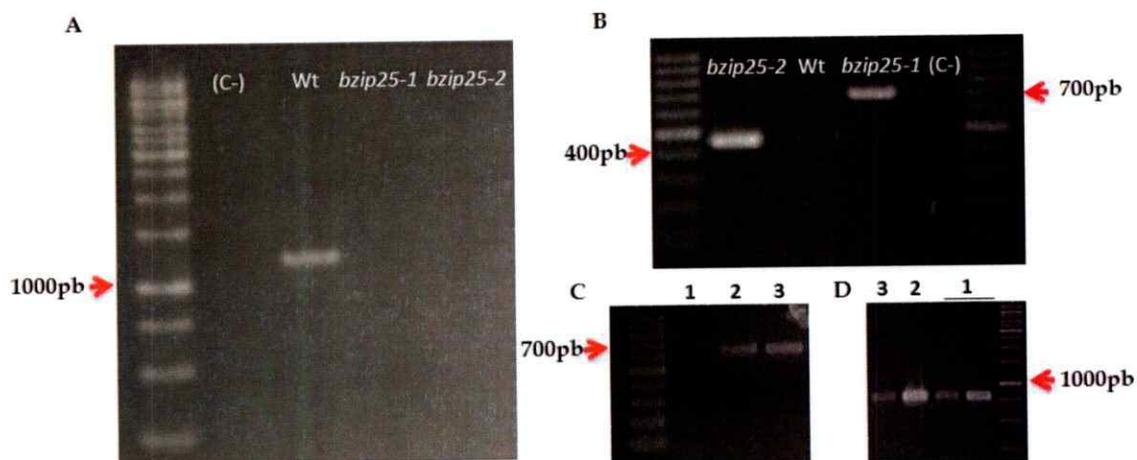


Figura 7. Genotipificación de mutantes insercionales de bZIP25. A y B muestran los resultados de las electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR. Los partidores diseñados para dar cuenta del alelo silvestre de bZIP25 (indicados como 205 y 206 en la Figura 6) amplifican un fragmento de DNA que se detecta sólo a partir del DNA genómico de la línea silvestre (Wt) como se observa en A. Utilizando el partidor LB que hibrida con el inserto de T-DNA y el partidor para el alelo silvestre de dirección inversa (205) se amplifican fragmentos de 693 o 440pb, como se observa en B, que dan cuenta de la inserción en el gen que codifica para bZIP25 en las líneas *bzip25-1* y *bzip25-2*, respectivamente. Como control de la inserción de T-DNA se

amplificó un fragmento del gen *nptII* el que solo es detectado en las líneas mutantes (C) y como control de calidad del DNA genómico, un fragmento del gen de actina, como se muestra en D. En C y D 1 corresponde a Wt, 2 a *bzip25-1* y 3 a *bzip25-2*. (C-) = control negativo.

5.2.- bZIP25 impacta el Sistema Radicular (SR) de *Arabidopsis thaliana*.

Si bien bZIP25 se expresa en múltiples tejidos de *Arabidopsis* (Weltmeier, F. y cols., 2009) uno de los tejidos registrados con altos niveles de expresión es la raíz (Lara, P. y cols., 2003) sugiriendo que bZIP25 cumple una función durante el normal desarrollo/mantenimiento de estos órganos. Las observaciones conducidas durante el trabajo de tesis doctoral de Lorena Pizarro (2015) indican que bZIP25 participa en la regulación de la organogénesis de raíces laterales debido a que la línea de pérdida de función de bZIP25 tiene una mayor densidad de Raíces Laterales. Para esclarecer si este factor de transcripción actúa particularmente a ese nivel o impacta otras dimensiones del SR, comenzamos evaluando el crecimiento de la Raíz Principal (RP) en las líneas mutantes de bZIP25 comparándolas con el tipo silvestre (Col-0) durante los 5, 7 y 10 días posteriores a la siembra (figura 8A). La línea *bzip25-1* no muestra diferencias respecto al tipo silvestre durante los días evaluados, observación consistente con los niveles de transcritos de bZIP25 indistintos a los de plántulas de tipos silvestre (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015), en cambio, plántulas de la línea *bzip25-2* presentan una RP de longitud mayor a plántulas silvestres, en todos los tiempos de crecimiento evaluados (Figura 8A). Un crecimiento significativamente mayor de la RP podría estar regulado a través de un aumento en la proliferación celular, por lo que es relevante en esta curva de crecimiento el día 5 de observación, donde se ha reportado que la proliferación celular es predominante (Cederholm, H. y cols., 2012). La diferencia porcentual entre el largo de la RP de plántulas silvestres y *bzip25-2* al día 5 de observación no es

significativamente distinto al día 7 o el día 10 (13% y 20%) con lo que descartamos una posible regulación del crecimiento directamente como resultado de un aumento en la proliferación.

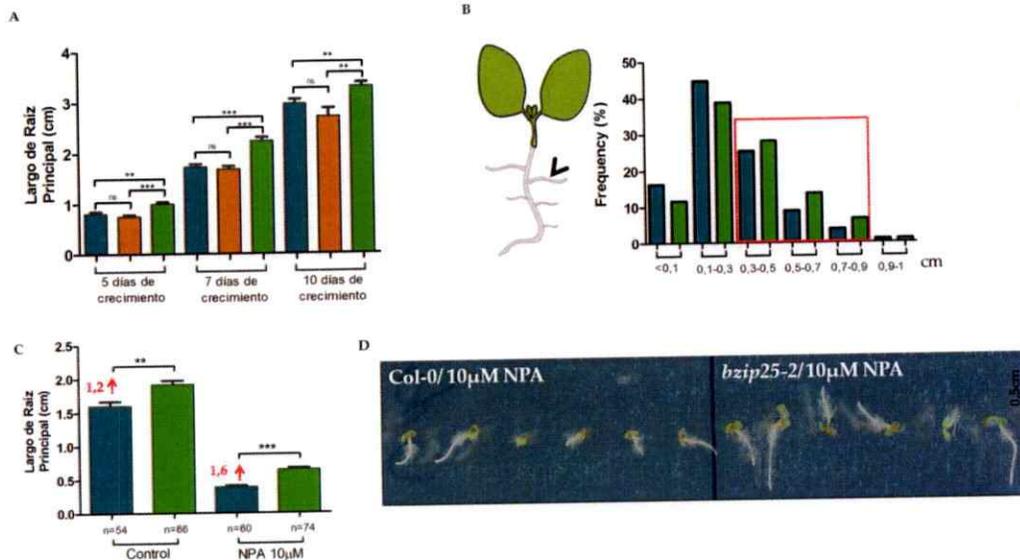


Figura 8. bZIP25 es un regulador negativo del Sistema Radicativo. **A** muestra plántulas silvestres del ecotipo Columbia-0 (Col-0) (columnas azules), *bzip25-1* (columnas naranjas) y *bzip25-2* (columnas verdes) crecidas en medio MS, el largo de la raíz principal fue registrado a los 5, 7 y 10 días de crecimiento (n=30). En **B** se cuantificó la longitud de las raíces laterales emergidas en individuos de 10 días de crecimiento Col-0 (columnas azules) y *bzip25-2* (columnas verdes) (n=15). Las longitudes registradas se graficaron como frecuencias. En **C**, las semillas Col-0 (columnas azules) y *bzip25-2* (columnas verdes) germinaron y crecieron en medio suplementado con NPA 10µM o con DMSO como control durante 7 días. Las flechas ascendentes en **C** indican las veces de cambio del largo de RP en la mutante respecto a la línea silvestre evaluadas en base al promedio de los datos. En **D** se muestra una imagen representativa del fenotipo de las plántulas registradas en **C** en tratamiento con NPA. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ns = no significativo. Para todos los casos se realizaron triplicados experimentales.

Desde este punto nuestros análisis prosiguen sólo sobre la línea *bzip25-2* debido al comportamiento homólogo al tipo silvestre de la línea *bzip25-1*. Para proseguir, se evaluó la longitud de las raíces laterales emergidas, como una aproximación a la

configuración espacial del SR en línea silvestre y en la línea de pérdida de función de *bZIP25*. Tal como muestra el esquema de la planta de *Arabidopsis* en la figura 8B (izquierda) las raíces laterales se distribuyen en un gradiente de crecimiento a lo largo de la RP, encontrándose las más largas cercanas a la zona de crecimiento aéreo (flecha negra, figura 8B) pues iniciaron su desarrollo tempranamente en comparación a las más cercanas a la punta de la raíz. Evaluamos la distribución del largo de raíces laterales emergidas en plántulas silvestres y mutantes *bzip25-2*, como muestra la figura 8B (derecha) la línea *bzip25-2* presenta un mayor porcentaje de Raíces Laterales emergidas en el tramo de 0,3cm a 1cm en comparación a la línea silvestre (figura 8B derecha, cuadro rojo). Congruentemente, el porcentaje de raíces cortas (menores a 0,3cm) es menor en la línea mutante, lo que sugiere un crecimiento acelerado de las Raíces Laterales emergidas en *bzip25-2*.

Auxina es requerida para el crecimiento de la raíz principal de *Arabidopsis*. El inhibidor del tráfico polar de auxina NPA (NaphthylPhthalamic Acid) retarda el crecimiento de la raíz principal debido a que reduce la elongación celular e inhibe el transporte polar de auxina a la zona de proliferación, inhibiendo, en consecuencia, la tasa de proliferación celular (Rahman, A. y col., 2007). Con objeto de evaluar la participación de auxina en el crecimiento de la raíz principal en la línea de pérdida de función de *bZIP25*, semillas del tipo silvestre y de la línea *bzip25-2* fueron germinadas en presencia de 10 μ M de NPA, y luego de 7 días de crecimiento se registró el largo de la raíz principal. Plántulas silvestres como *bzip25-2* son sensibles a la inhibición del crecimiento por NPA (Figura 8C y 8D) sin embargo, aún en la presencia de NPA, la línea de pérdida de función de *bZIP25* mantiene un promedio de crecimiento significativamente mayor que plantas silvestres, similar al registrado en condiciones control, 1.2 veces contra 1.6 veces de

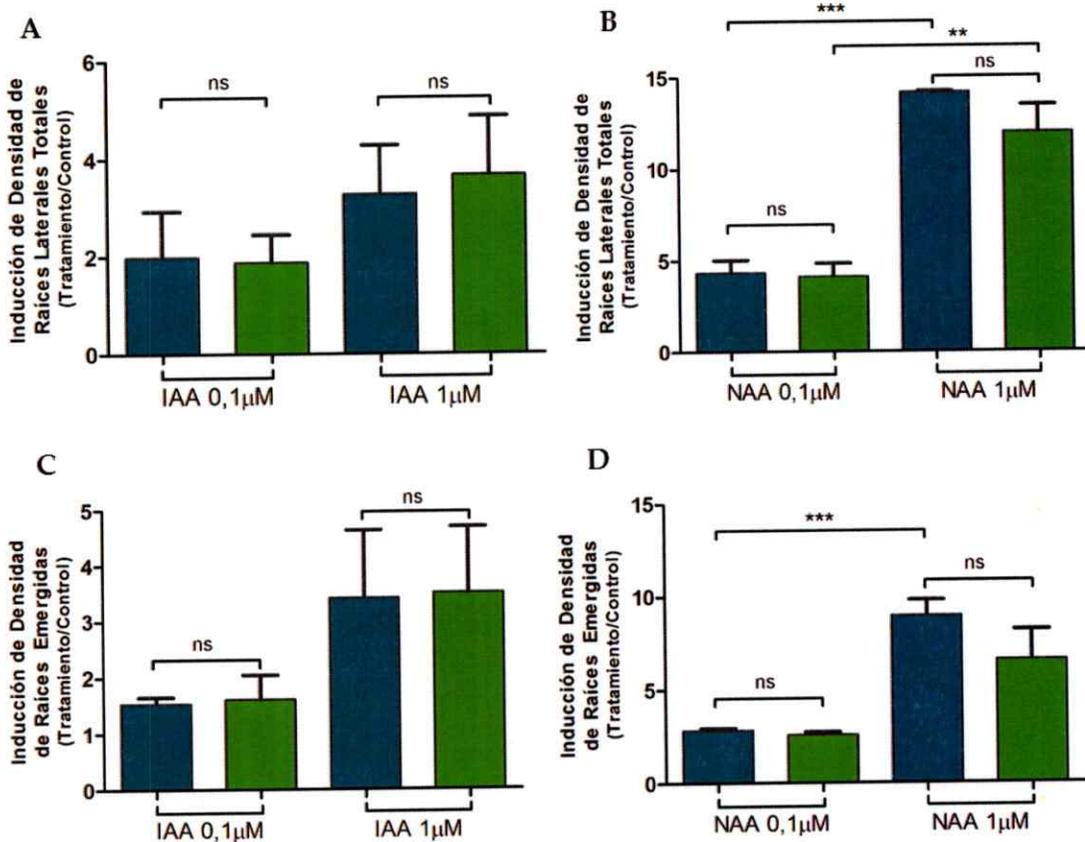
cambio. Este resultado muestra que el mayor crecimiento resultado de la carencia de bZIP25 supera la inhibición del transporte polar de auxina mediado por NPA. Por tanto, bZIP25 no solo gatilla un aumento en la densidad de Raíces Laterales como estaba reportado (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) sino que impacta de forma global el crecimiento del SR.

5.3.- La línea mutante *bzip25-2* es igualmente sensible que el tipo silvestre a la inducción de raíces laterales gatillada por la aplicación exógena de auxina

En *Arabidopsis* la formación y desarrollo de las raíces laterales es regulado por auxina. El primer evento en la organogénesis de raíces laterales involucra la destinación de células del periciclo en el meristema basal a células fundadoras de una raíz lateral (Péret, B. y col., 2009) lo que depende del establecimiento de un máximo de auxina en las células del protoxilema adyacentes al periciclo (Lavenus, J y col., 2013) conduciendo a la adecuada señalización a través de la Vía Canónica de Auxina. Con objeto de determinar si el mayor número de raíces laterales encontradas en la línea de pérdida de función de bZIP25 es resultado de una mayor sensibilidad en la respuesta a auxina durante los eventos tempranos de formación y desarrollo de una raíz lateral, se evaluó el número de raíces laterales en plántulas de la línea silvestre y la línea mutante *bzip25-2* en presencia de la auxina IAA (Indole-3-Acetic Acid) o la auxina sintética NAA (1-NaphthaleneAcetic Acid) aplicada de forma exógena.

El estudio del desarrollo de una raíz lateral se ha dividido en etapas que involucran distintos eventos y procesos fisiológicos, como proliferación celular, elongación, y la emergencia desde la raíz principal (Péret, B. y col., 2009). El parámetro de densidad total de Raíces Laterales integra el conjunto de Raíces Laterales sin discriminar su

estadio de desarrollo. Además de evaluar este parámetro en plántulas tratadas con auxina, se individualizó la densidad de Raíces Laterales emergidas y la densidad de primordios de Raíz Lateral. Este último considera todos los estadios de desarrollo previos a la emergencia (figura 1). Con estos valores se estableció la tasa de inducción de densidad, definida como la densidad de raíces en cada tratamiento normalizada por la densidad de raíces control (figura 9).



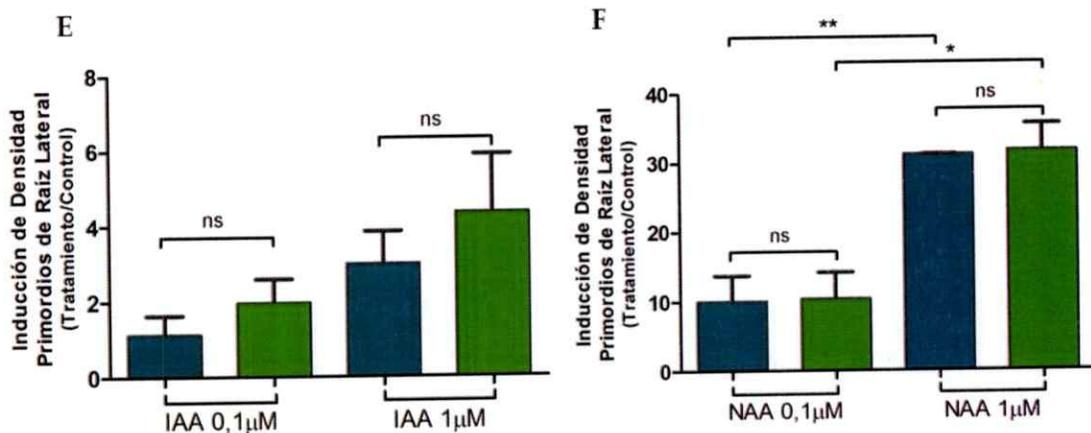


Figura 9. La pérdida de función de bZIP25 no gatilla mayor sensibilidad a la inducción de raíces laterales ante la aplicación de auxina exógena. En cada uno de los tratamiento plántulas silvestres y *bzip25-2* se crecieron en medio MS sólido por 7 días y fueron luego transferidas a medio líquido suplementado con IAA (0,1 o 1 μM concentración final; volumen equivalente de etanol absoluto para la condición control) o NAA (0,5 o 1 μM concentración final; volumen equivalente de DMSO para la condición control). Se obtuvo la densidad total de raíces laterales en cada tratamiento y se expresó la tasa de inducción de densidad de raíces laterales por el tratamiento normalizando por la condición control. En **A** y **B** se muestra la tasa de inducción de densidad total de raíces laterales en tratamiento con IAA o NAA, respectivamente. Se individualizó, además, la tasa de inducción de densidad de raíces laterales emergidas y de primordios de raíz lateral en tratamientos con IAA (**C** y **D**) y NAA (**E** y **F**). La línea silvestre (columnas azules) y la línea *bzip25-2* (columnas verdes) responden con la misma sensibilidad a la inducción por auxina de los parámetros descritos. Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes, con un número total de 21 plántulas evaluadas por cada tratamiento. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ns = no significativo.

Como se observa en la figura 9A, IAA promueve una inducción de manera dosis dependiente de la densidad total de raíces laterales. Esta auxina gatilla un aumento de aproximadamente 2 veces en la densidad de Raíces Laterales totales bajo el tratamiento de IAA 0,1 μM y de cuatro veces al aumentar la concentración a 1 μM respecto a la densidad de Raíces Laterales totales en plantas en tratamiento control, tanto para la línea silvestre como la mutante (Figura 9A). Una inducción comparable se observó al evaluar la tasa de densidad de raíces emergidas (Figura 9C) y de primordios

de raíz lateral (Figura 9E). Por lo tanto, plántulas silvestres y *bzip25-2* responden de la misma manera a la inducción de raíces laterales mediada por la aplicación exógena de IAA.

En el mismo sentido, la aplicación exógena de NAA conduce a un incremento de la densidad total de raíces laterales respecto al control tanto en plántulas silvestres como *bzip25-2*. Este incremento es cercano a 4,5 veces en tratamientos con NAA 0,1 μ M y de aproximadamente 13 veces al aumentar la concentración a 1 μ M (Figura 9B). Si se comparan las auxinas evaluadas, IAA tiene una capacidad inductora de densidad de Raíces Laterales menor al de NAA. Se ha descrito que NAA tiene una mayor permeabilidad celular (Savaldi-Goldstein, S. y cols., 2008) por lo que no dependería del sistema de transporte de auxina controlado por diversas familias de proteínas integrales en MP, lo que podría determinar la formación de máximos de respuesta a auxina, esenciales para la formación de una raíz lateral, con mayor frecuencia a lo inducido por IAA el cual es dependiente del transporte de auxina entre los tejidos de la raíz. La densidad de raíces emergidas (Figura 9D) y la densidad de primordios de raíz lateral (Figura 9F) aumentan en el tratamiento con NAA respecto al control también aumenta de manera dosis dependiente sin presentar diferencias significativas entre plántulas silvestres y *bzip25-2* en cada tratamiento.

Este resultado sugiere que la mayor densidad de Raíces Laterales observadas en la línea pérdida de función de *bZIP25* no responde a una mayor sensibilidad por auxina en los eventos de organogénesis de una raíz lateral.

5.4.- La alteración del tráfico polar de auxina conduce a la inhibición del desarrollo de raíces laterales de forma equivalente en plantas silvestre y en mutantes de pérdida de función de *bZIP25*.

NPA inhibe el tráfico polar de auxina alterando la distribución de esta hormona en los diferentes tejidos de la raíz (Rashotte, A. y col., 200) donde una de las consecuencias asociadas es la significativa disminución de raíces laterales (Reed, R. y col., 1998). Para reforzar la evidencia que sugiere que la mayor densidad de raíces laterales en la línea *bzip25-2* no es resultado de una mayor sensibilidad a la señalización mediada por auxina durante el desarrollo de una raíz lateral, se evaluó la densidad de raíces laterales en la línea mutante al inhibir el tráfico polar de auxina utilizando NPA.

Plántulas de 7 días de crecimiento fueron tratadas con NPA 0,5 o 1 μ M por 3 días. Se determinó la densidad total de raíces laterales, la densidad de raíces emergidas y la densidad de primordios de raíz lateral. A partir de estos valores se estableció la tasa de inhibición de la densidad de raíces laterales mediada por NPA (Figura 10).

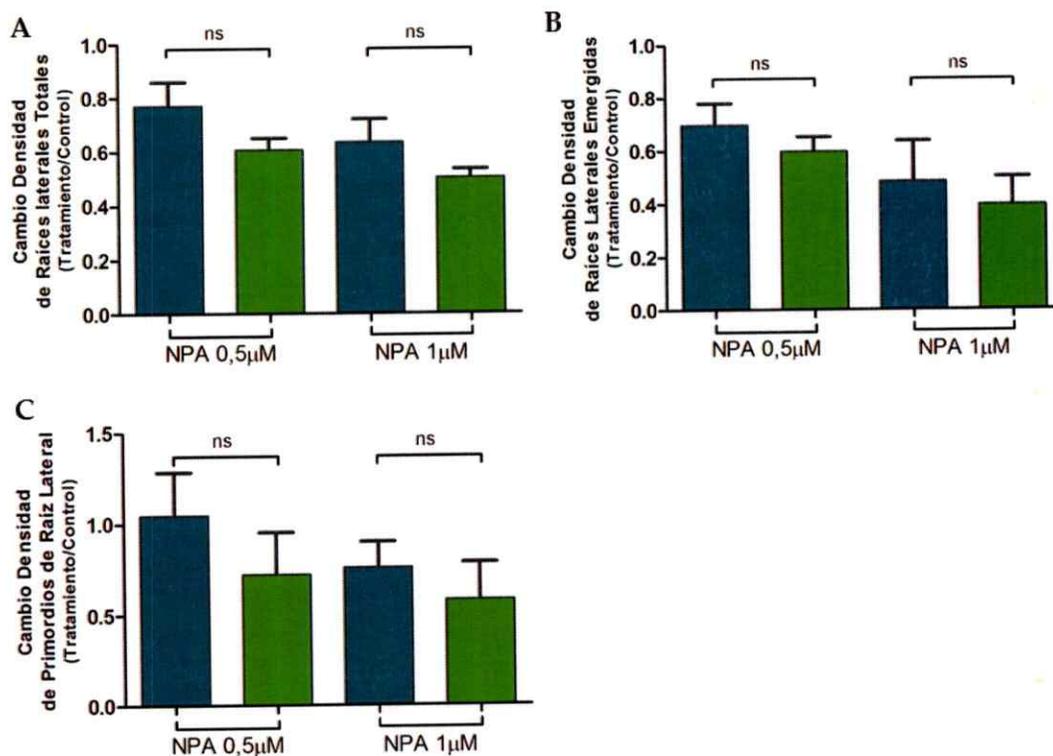


Figura 10. *bzip25-2* responde de igual manera que el tipo silvestre a la inhibición del desarrollo de raíces laterales mediada por NPA. Plántulas silvestres y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento fueron transferidas a medio líquido suplementado con el inhibidor del tráfico polar de auxina, NPA (0,5 o 1μM) por 3 días. Se determinó la densidad de raíces laterales totales, raíces laterales emergidas y primordios de raíz lateral para las plántulas en cada tratamiento y se generó la tasa de cambio de densidad para cada parámetro respecto a la condición control. La tasa de cambio en los tratamientos con 0,5μM y 1μM NPA es menor a uno para la densidad de raíces totales (**A**), emergidas (**B**) y primordios de raíces laterales (**C**). Estos resultados se traducen en que tanto la línea silvestre (columnas azules) como la línea *bzip25-2* (columnas verdes) responden con la misma sensibilidad a la inhibición del desarrollo de raíces laterales producto de la interrupción del tráfico polar de auxina. Los datos corresponden a cuatro réplicas experimentales independientes, con un número total de 28 plántulas evaluadas por cada tratamiento. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ns = no significativo.

Ambos tratamientos con NPA conducen a una disminución en la densidad de Raíces Laterales totales (Figura 10A), Raíces Laterales emergidas (Figura 10B) y primordios de Raíz Lateral (Figura 10C) respecto a la condición control, lo que se evidencia en una

tasa de cambio menor a uno en todos los casos. La línea silvestre como la línea *bzip25-2* presentan una tasa de cambio similar entre ellas en todas las condiciones experimentales, lo que muestra una sensibilidad equivalente ante la inhibición del desarrollo de raíces laterales mediada por NPA. Este resultado es coherente con un mecanismo asociado al desarrollo de raíces laterales en *bzip25-2* que tiene una causa distinta a una mayor sensibilidad a la señalización de auxina.

5.5.- La línea *bzip25-2* es menos sensible a la inhibición de la endocitosis mediada por auxina

La unión de auxina a su receptor ABP1 a nivel de la Membrana Plasmática (MP) bloquea la regulación positiva ejercida por ABP1 sobre la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) lo que gatilla la inhibición de la internalización de MP (Robert, S. y col., 2010). Considerando la aceleración en la internalización de MP reportada en la línea pérdida de función de *bZIP25* (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015) nos preguntamos si este fenotipo está asociado a la modulación de la endocitosis que involucra a auxina y su receptor ABP1. Para evaluar esta alternativa plántulas silvestres y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento se trataron con la auxina natural IAA o con la auxina sintética NAA a una concentración de 10 μ M, descritas ambas como inhibidores de la EMC en la raíz de plántulas silvestres de *Arabidopsis* (Paciorek, T. y col., 2005) y se evaluó la dinámica de internalización del trazador FM4-64.

La exposición de las plántulas a FM4-64 se realizó a 4°C para inhibir la endocitosis, condición en que este trazador se une a la MP sin ser internalizado. Tras reactivar la endocitosis incubando las plántulas a temperatura ambiente, FM4-64 unido a membrana comienza a ser internalizado. Plántulas silvestres en tratamiento control para

la auxina IAA, tras 5 minutos de reactivación de la endocitosis presentan el trazador en la MP (figura 11A, asterisco en panel superior) pero también en cuerpos intracelulares de tipo endosomal (figura 11A, cabeza de flecha amarilla en panel superior) dando cuenta del proceso de endocitosis de MP. En plántulas *bzip25-2*, 5 minutos desde la reactivación de la endocitosis conducen de manera homóloga a la internalización de MP, evidenciado a través de la observación de endosomas (figura 11C, cabeza de flecha amarilla en panel superior). Luego de 30 minutos de internalización del trazador en plántulas silvestres el número de estructuras de tipo endosomal observadas aumentó a simple vista en comparación a 5 minutos de internalización (figura 11A, cabeza de flecha amarilla en panel central), además, se observó que algunos de estos endosomas comparativamente poseen un mayor tamaño (figura 11A, cabeza de flecha naranja en panel central). Endosomas de mayor tamaño dan cuenta del avance de membrana marcada con FM4-64 en la ruta endocítica, este tipo de estructura correspondería a endosomas tardíos (PVC/LE/MVB) y en esta tesis serán denominados de esta forma (Figura 2; Richter, S. y col., 2009). De manera equivalente en plántulas *bzip25-2*, luego de 30 minutos, el aumento en el número de endosomas respecto a 5 minutos de internalización da cuenta de la progresión de la endocitosis (panel central en la figura 11C), sin embargo, el aumento en el número de endosomas, incluyendo endosomas tardíos, es mayor que lo observado para la línea silvestre (comparar paneles centrales en figura 11A y 11C). La progresión de la endocitosis se evidencia, también, en el aumento de endosomas luego de 60 minutos, pero la línea pérdida de función de *bZIP25*, congruentemente, presentó un mayor número de estos cuerpos intracelulares. Además, a esta temporalidad, en múltiples individuos *bzip25-2* se observó que el trazador alcanzó la membrana de la Vacuola (figura 11C, cabeza de

flecha verde en panel inferior) destino final de la MP que fue marcada con el trazador FM4-64, y que se observa a esta temporalidad como pequeños anillos.

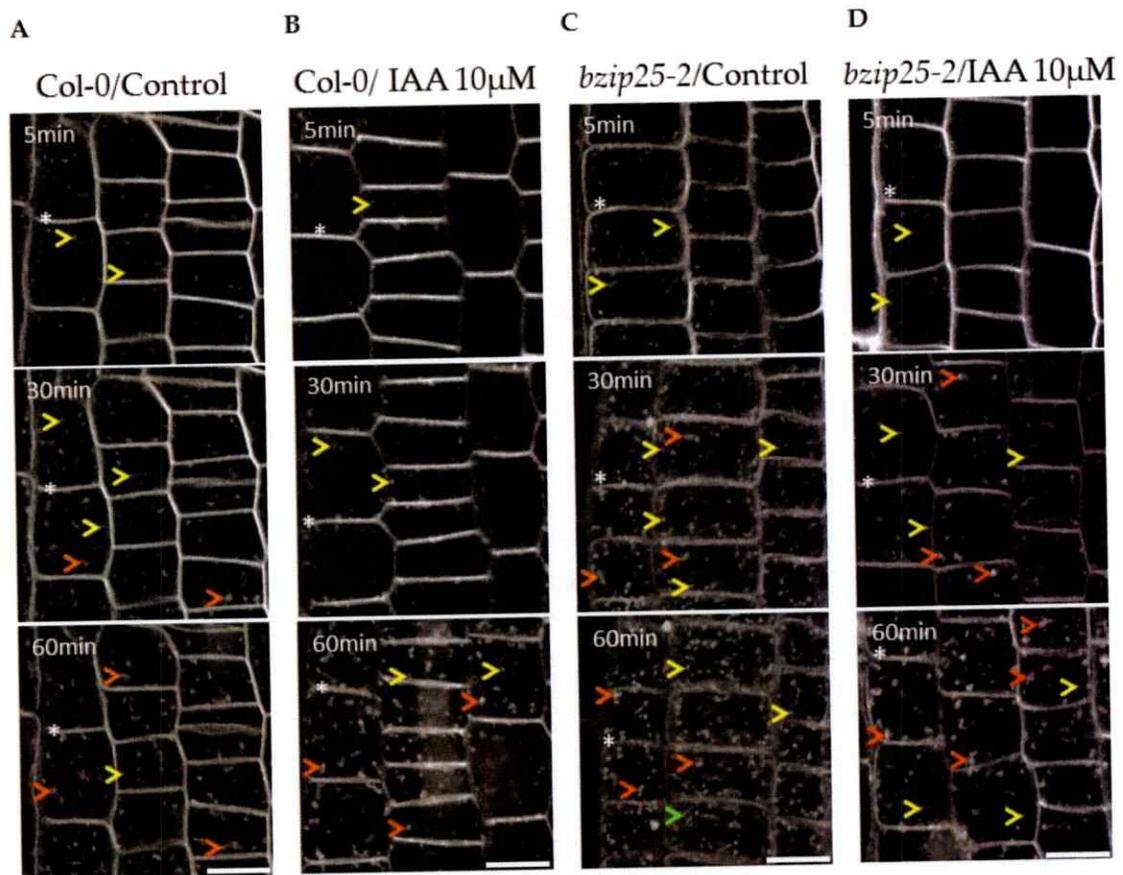


Figura 11. IAA es incapaz de inhibir completamente la endocitosis en la línea pérdida de función de bZIP25. Se presenta la dinámica de internalización de MP marcada con el trazador FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas silvestres (*Col-0*) y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento. Los asteriscos blancos, la cabeza de flecha amarilla, naranja y verde señalan la MP, endosomas, endosomas tardíos y la membrana vacuolar, respectivamente. En condiciones control (EtOH absoluto) tras 5 minutos de internalización se observa en células de plántulas silvestres la aparición de endosomas, a tiempos posteriores (30 y 60 minutos) se observa la aparición de endosomas tardíos, dando cuenta de la progresión de la internalización de membrana (A). La aplicación exógena de IAA 10µM inhibe la internalización, por lo que se observan menos endosomas y endosomas tardíos a 5, 30 y 60 minutos respecto a la condición control (B; reportado en Paciorek, T. y col., 2005). La internalización de MP en *bzip25-2* se caracterizó por la aparición de endosomas en mayor número respecto a la línea silvestre a tiempos tan tempranos como 5 minutos en condiciones control, a tiempos mayores (30 y 60 minutos) se observó de manera coherente a la aceleración endocítica descrita en esta línea (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) un mayor número de

endosomas y endosomas tardíos, e inclusive a 60 minutos el trazador alcanzó la membrana vacuolar, lo que no se presentó en plántulas silvestres (C). La línea *bzip25-2* es sensible a la inhibición de la internalización de MP dependiente de IAA, por lo que se observan un menor número de endosomas y endosomas tardíos en tratamiento con esta hormona respecto a la condición control (D). Sin embargo, en tratamiento con IAA endosomas y endosomas tardíos son más abundante en *bzip25-2* que en la línea silvestre, por lo que la línea pérdida de función de *bZIP25* es menos sensible a la inhibición de la endocitosis ejercida por IAA (B versus D). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal y son representativas de tres experimentos independientes con 4 plántulas evaluadas para cada tiempo. La barra de tamaño indica 20µm.

En presencia de la auxina IAA, la internalización del trazador FM4-64 en plántulas silvestres es inhibida tal como ha sido reportado (Paciorek, T. y col., 2005). Tras 5 minutos de reactivación de la endocitosis el número de endosomas que se observó en el tratamiento con IAA es menor en relación a la condición control para plántulas silvestres (paneles superiores figura 11A y 11B). Sin embargo, en plántulas *bzip25-2* la auxina IAA no disminuye el número de endosomas observados bajo la misma temporalidad de reactivación de la endocitosis. Por otro lado, a tiempos de observación posteriores IAA también altera el proceso endocítico en la línea pérdida de función de *bZIP25*. Tanto a 30 como a 60 minutos de observación el número de estructuras endosomales disminuye al comparar el tratamiento control respecto a la condición suplementada con IAA en *bzip25-2* (paneles centrales en figura 11C y 11D). A pesar de esto, la inhibición en la internalización del trazador FM4-64 ejercida por IAA es menos efectiva sobre la línea *bzip25-2*, tanto endosomas como endosomas tardíos (cabeza de flecha amarillas y naranjas, respectivamente en pales inferiores figura 11B y 11D) están presentes en mayor número en la línea pérdida de función de *bZIP25* respecto a la línea silvestre.

La acumulación de IAA en los diversos tejidos de la raíz depende del transporte polar de auxina, el que es regulado por proteínas de MP (Friml, J. 2003). La auxina sintética NAA posee una alta permeabilidad celular, por lo que no depende del transporte polar de auxina para alcanzar tejidos específicos (Savaldi-Goldstein, S. y cols., 2008; Kamimoto, Y. y col., 2012) por ello utilizamos NAA para evaluar la modulación de auxina en la endocitosis en la punta de la raíz de *A. thaliana* de manera independiente de su transporte polar dentro de este órgano. De manera consistente a lo observado en la condición control para el tratamiento con IAA (Etanol), durante tratamiento control para NAA (DMSO) la reactivación de la endocitosis gatilla la aparición de endosomas a tiempos tan temprano como 5 minutos en plántulas silvestres como en plántulas *bzip25-2*, donde son a simple vista más abundantes (figura 12A y 12C, cabezas de flecha amarilla en panel superior). A tiempos posteriores el número de endosomas observados aumentó en ambas líneas, observándose además, la aparición de endosomas tardíos (figura 12A y 12C, cabezas de flechas naranjas en paneles centrales e inferiores) dando cuenta de la progresión en la internalización del trazador FM4-64. Tanto a 30 como a 60 minutos se observó una mayor abundancia de ambos tipos de endosomas en la línea *bzip25-2*. Por otro lado, la reactivación de la endocitosis en plántulas silvestres en presencia de NAA inhibe la aparición de endosomas, bloqueando eficientemente la endocitosis de membrana marcada con FM4-64 (figura 12B, panel superior). En *bzip25-2*, en cambio, se observó la aparición de cuerpos endosomales aún en presencia de NAA (figura 12D, cabezas de flecha amarilla en panel superior) mostrando que auxina es incapaz de bloquear completamente la internalización del trazador en esta línea. La observación a 30 minutos revela que NAA bloquea en gran medida la internalización de membrana en la línea silvestre (figura 12B, panel central), en contraste, en *bzip25-2* se observaron múltiples endosomas, incluyendo endosomas tardíos (figura 12D, cabezas

de flechas amarillas y naranjas, respectivamente en panel central), sin embargo, el número de ambos tipos de endosomas es menor respecto a la condición control (contrastar paneles centrales en figura 12C y 12D) indicando que NAA bloquea la endocitosis en *bzip25-2* pero solo parcialmente. Coherente a la cinética de inhibición de la endocitosis mediada por NAA, tras 60 minutos de reactivación de la endocitosis se observó en la línea silvestre múltiples endosomas que dan cuenta de la internalización de membrana marcada con FM4-64 (Paciorek, T. y col., 2005), pero aún no es equiparable al número de endosomas que se observó en la condición control (paneles inferiores en figura 12A y 12B). De manera homóloga la línea *bzip25-2* a 60 minutos, presenta un número de endosomas mayor a lo observado a 30 minutos en tratamiento con NAA, pero en menor número a lo observado en la condición control (paneles inferiores en figura 12C y 12D). A pesar de esto, si se compara la densidad de endosomas a 60 minutos en la línea silvestre tratada con NAA (panel inferior figura 12B) con la misma condición para la línea *bzip25-2* (panel inferior figura 12D) se observa un mayor número de endosomas en la línea mutante por sobre la silvestre, reforzando las observaciones realizadas a 30 minutos.

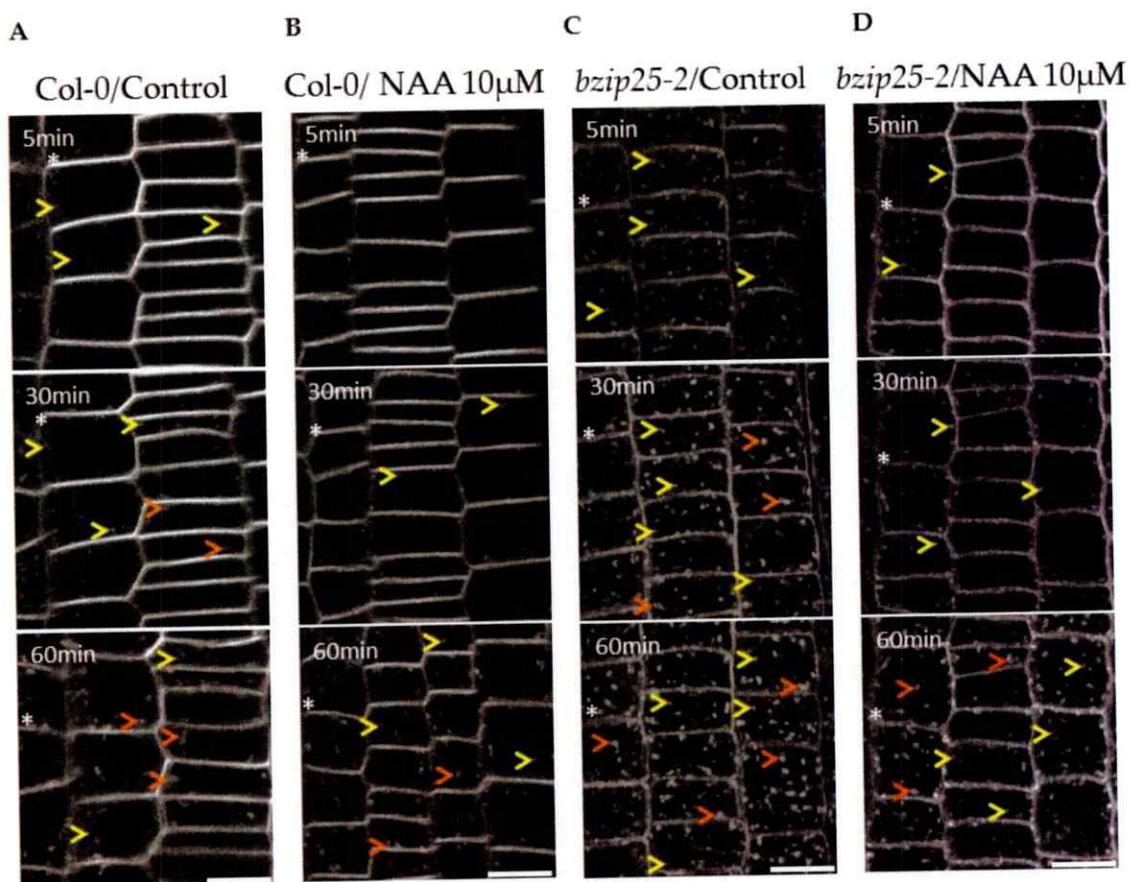


Figura 12. La inhibición de la endocitosis producto de la aplicación exógena de NAA es incompleta en la línea pérdida de función de *bZIP25*. Se muestra la dinámica de internalización de MP marcada con el trazador FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas silvestres (*Col-0*) y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento. Los asteriscos blancos, la cabeza de flecha amarilla y naranja señalan la MP, endosomas y endosomas tardíos, respectivamente. En células de plántulas silvestres la internalización del trazador se revela a 5 minutos por la aparición de endosomas, los que aumentan en número a 30 y 60 minutos, junto con la aparición de endosomas tardíos, dando cuenta de la progresión de la internalización de MP en el tiempo (condición control; DMSO) (**A**). La internalización de MP marcada con FM4-64 es inhibida completamente luego de 5 minutos de tratamiento con NAA 10µM en plántulas silvestres, por lo que no se observan compartimientos de tipo endosomal a esta temporalidad, se observó a 30 y 60 minutos que la endocitosis del trazador es reactivada, por lo que se observan endosomas y endosomas tardíos, sin embargo, en número menor que en la condición control, por lo que NAA continúa ejerciendo su acción inhibitoria en la internalización de membrana en una ventana temporal de 60 minutos en plántulas silvestres (**B**; Paciorek, T. y col., 2005). El número y tipo de endosomas en *bzip25-2* superó lo observado en la línea silvestre en cada uno de los tiempos evaluados en la condición control, consistente a la aceleración de la internalización de MP descrita para esta línea en la tesis doctoral de Lorena Pizarro

(2015) (C). El tratamiento con NAA 10 μ M inhibe la internalización del trazador en *bzip25-2* a lo largo de la línea temporal estudiada al contrastar con la condición control para esta mutante (D). Sin embargo, la inhibición de la endocitosis por la aplicación exógena de esta hormona es menor en *bzip25-2* respecto a lo observado en la línea silvestre (B versus D). Clara evidencia de esto se desprende de 5 minutos de internalización en presencia de NAA en la línea silvestre, donde la internalización del trazador es bloqueada completamente (panel superior en B), en contraste en *bzip25-2* fue posible observar endosomas (panel superior en D). Por lo tanto *bzip25-2* es menos sensible a la inhibición de la endocitosis ejercida por auxina. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopia confocal y son representativas de tres experimentos independientes con 4 plántulas evaluadas para cada tiempo. La barra de tamaño indica 20 μ m.

Por lo tanto, la línea de pérdida de función de bZIP25 es sensible a la inhibición de la endocitosis mediada por la aplicación de auxina exógena, sin embargo la endocitosis no logra ser inhibida en el mismo nivel que la línea silvestre, mostrando una endocitosis acelerada respecto a la línea silvestre aún en presencia de la hormona. Este fenotipo podría estar asociado a mayores niveles de ABP1 en la línea *bzip25-2* gatillando un cambio en la sensibilidad a la aplicación exógena de auxina.

5.6.- La aceleración de la endocitosis en *bzip25-2* es independiente de la señalización de auxina a través de ABP1.

Con motivo de analizar la diferencia en la sensibilidad a la inhibición de la endocitosis mediada por auxina en *bzip25-2*, exploramos un posible papel para ABP1. Estudiamos la internalización del trazador FM4-64 al inhibir el tráfico polar de auxina en la raíz de plántulas de 7 días mediante el uso de la droga NPA, lo que se traduce en una reducción en los niveles de auxina en la punta de la raíz (Rashotte, A. y col., 2000). Se ha reportado que la baja en los niveles de auxina en las células de la punta de la raíz conduce a la aceleración de la endocitosis (plántulas decapitadas en Baster, P. y col.,

2013). En condiciones control la reactivación de la endocitosis a temperatura ambiente conduce a la aparición de endosomas marcados con FM4-64 en la línea silvestre y en *bzip25-2*, los cuales son más abundantes en la línea mutante (cabezas de flecha amarilla en paneles superiores figura 13A y 13C). A 30 y 60 minutos el aumento de endosomas y la aparición de endosomas tardíos en ambas líneas da cuenta del progreso en la internalización de membrana marcada con FM4-64 (cabezas de flecha amarillas y naranjas, respectivamente en paneles centrales e inferiores en figura 13A y 13C). Consistente a los resultados descritos, se observó que *bzip25-2* posee un mayor número de ambos tipos de endosomas respecto a la línea silvestre, particularmente de endosomas tardíos (cabeza de flecha naranja en figura 13C). Por otro lado, tal como se esperaba, NPA gatilla la aceleración en la internalización de membrana marcada con FM4-64 en la línea silvestre, tras 5 minutos de reactivación de la endocitosis el número de endosomas que se observó fue mayor en el tratamiento con NPA respecto al control (figura 13B, cabezas de flecha amarilla en panel superior), de igual modo, tras 30 y 60 minutos se observó un mayor número de endosomas en el tratamiento con la droga respecto al control (endosomas y endosomas tardíos, cabezas de flecha amarilla y naranja, respectivamente, en panel central e inferior en figura 13B). En contraste no se detectaron diferencias evidentes entre la condición control y el tratamiento con NPA en la línea *bzip25-2* (figura 13D) observándose un número equivalente de endosomas y endosomas tardíos (cabezas de flechas amarillas y naranjas, respectivamente, en figura 13C y 13D). Además, el tratamiento con NPA en la línea silvestre no supera el nivel de internalización de membrana marcada con FM4-64 en *bzip25-2* en la condición control o en el tratamiento (figura 13B en contraste a figura 13C y 13D).

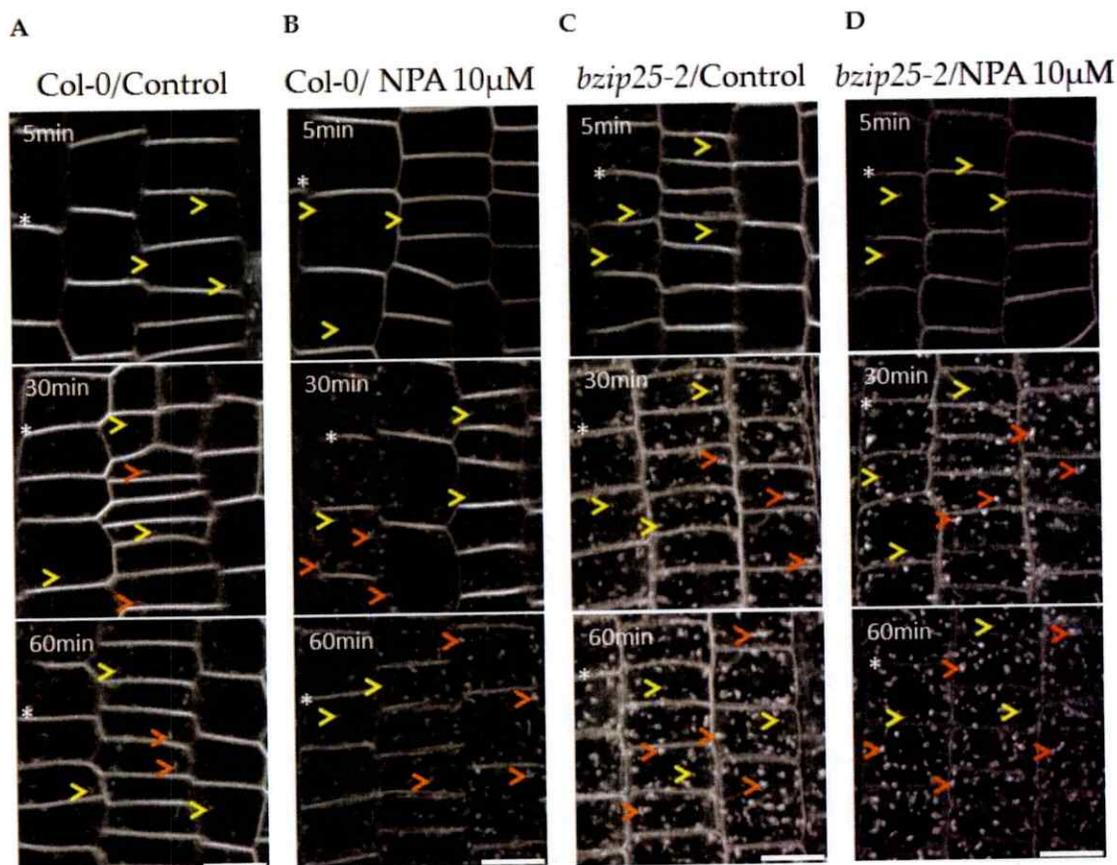


Figura 13. La línea pérdida de función de bZIP25 es insensible a la aceleración endocítica gatillada por la alteración del tráfico polar de auxina. Se presenta la dinámica de internalización de MP marcada con el trazador FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas silvestres (*Col-0*) y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento. Los asteriscos blancos, la cabeza de flecha amarilla y naranja señalan la MP, endosomas y endosomas tardíos, respectivamente. Luego de 5 minutos de internalización en células de plántulas silvestres en condiciones control (DMSO) se observaron endosomas los que progresivamente aumentan en número a 30 y 60 minutos de observación y dan lugar a la aparición de endosomas tardíos (**A**). Plántulas silvestres en tratamiento con NPA 10 μ M presentan un número mayor de endosomas respecto al control luego de 5 minutos de internalización del trazador, a 30 y 60 minutos se observó que los endosomas y endosomas tardíos son también mayores que en la condición control (**B**). En condición control *bzip25-2* presenta endosomas y endosomas tardíos en mayor número de lo observado para la condición control de plántulas silvestres consistente a la aceleración de la endocitosis descrita para esta línea (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) (**C**). El tratamiento con NPA 10 μ M, sin embargo, no gatilla un cambio a simple vista en el número y el tipo de endosomas presentes en la línea pérdida de función de bZIP25 (**D**). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal y son representativas de tres experimentos independientes con 4 plántulas evaluadas para cada tiempo. La barra de tamaño indica 20 μ m.

Estos resultados sugieren que la menor sensibilidad de *bzip25-2* a la inhibición de la endocitosis mediada por auxina no se debe a la activación de la vía mediada por ABP1 ante la pérdida de función de bZIP25. La activación de ABP1 en *bzip25-2* debieran gatillar un nivel de internalización de membrana aún más alto en ausencia de auxina respecto a la condición control (figura 13C y 13D). Apoyando estas observaciones se determinó que la línea *bzip25-2* posee los mismos niveles de transcritos de ABP1 que la línea silvestre (Dra. Lorena Pizarro, datos no publicados). Por lo tanto, la aceleración de la endocitosis desde MP observada en la línea *bzip25-2* es independiente a la regulación de la endocitosis en que participa auxina a través del receptor ABP1.

5.7.- El desarrollo de raíces laterales en la línea *bzip25-2* depende de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC).

Los resultados presentados sugieren que la mayor densidad de raíces laterales descrita en la línea pérdida de función de bZIP25 no está asociada a la alteración en la sensibilidad a auxina y con ello a la señalización comandada por esta hormona en la organogénesis de raíces laterales. Evaluamos entonces, si la aceleración en la internalización de MP es responsable de la mayor densidad de raíces laterales observadas en *bzip25-2*. Para esto estudiamos la densidad de raíces laterales en presencia de moduladores del tráfico endocítico en plántulas silvestres y pérdida de función de bZIP25 para evaluar el alcance de este fenotipo celular en el desarrollo de raíces laterales.

La droga Tirfostina A23 (TyrA23) inhibe la EMC (Banbury, D. y col., 2003) bloqueando la internalización de vesículas desde la MP (Figura 14A), primer paso en la ruta

endocítica. Plántulas de 7 días, silvestres y *bzip25-2*, se incubaron en TyrA23 por 3 días, luego de lo cual se cuantificó la densidad de primordios y de raíces laterales emergidas con objeto de determinar el impacto de la inhibición de la endocitosis de MP en el desarrollo de raíces laterales. El tratamiento con TyrA23 conduce a una disminución en la densidad de raíces emergidas en plántulas silvestres (barras azules en figura 14B), en cambio, en la línea *bzip25-2* no se observa este fenotipo, por lo que no se registran diferencias en la densidad de raíces emergidas entre el tratamiento control y el con TyrA23 (barras verdes en figura 14B). Por otro lado, el tratamiento con TyrA23 no altera la densidad de primordios en plántulas silvestres (barras azules en figura 14C). De manera inversa en el la línea *bzip25-2* el tratamiento con TyrA23 gatilla la disminución de la densidad de primordios de raíz lateral (barras verdes en figura 14C).

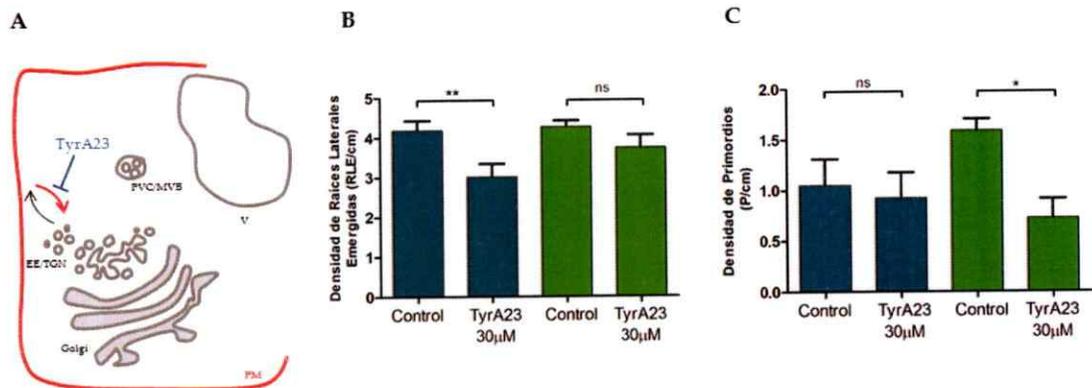


Figura 14. La Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) es relevante en el desarrollo de raíces laterales en *bzip25-2*. Se presenta en A un esquema de los principales componentes del Sistema de Endomembranas, a través de la flecha roja se describe la vía del tráfico endocítico inhibida por Tirfostina A23 (TyrA23). EE/TGN = Endosomas Tempranos/Red Trans Golgi, PVC/MVB = Compartimiento Pre vacuolar/Cuerpo Multivesicular, V = vacuola, PM = Membrana Plasmática. Plántulas silvestres y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento se transfirieron a medio líquido de cultivo suplementado con el inhibidor de la EMC Tirfostina A23 (TyrA23) 30µM por 3 días. Se determinó, entonces, la densidad de raíces laterales emergidas (B) y la densidad de primordios de raíz lateral (C) donde las columnas azules representan a la línea silvestre

y las verdes a *bzip25-2*. La densidad de raíces emergidas es sensible a la inhibición de la EMC en plántulas silvestres, sin embargo, la línea *bzip25-2* es insensible a esta inhibición (B). La densidad de primordios no se ve alterada en la línea silvestre por el tratamiento con TyrA23, por el contrario en *bzip25-2* la densidad de primordios disminuye, llegando al nivel registrado para la línea silvestre (C). Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes, con un número total de 18 plántulas evaluadas. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001; ns = no significativo.

Los resultados muestran que en nuestras condiciones experimentales la EMC es importante para el proceso de emergencia de raíces laterales en plántulas silvestres. Por tanto, la resistencia observada en *bzip25-2* a la inhibición de la emergencia de raíces laterales mediada por TyrA23 sugiere un aumento de la EMC en esta línea, lo que es coherente a los mayores niveles de transcrito de la cadena liviana de clatrina CLC2 reportados en *bzip25-2* (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015).

Por lo tanto, la EMC es relevante para la mayor densidad de raíces laterales observada ante la pérdida de función de bZIP25, pues el bloqueo de la EMC mediante TyrA23 restablece el nivel de primordios en la línea mutante *bzip25-2* al nivel de la línea silvestre. Es posible sugerir, además, que la EMC, en un segundo nivel, está involucrada en la emergencia de la raíz lateral (figura 14B), *bzip25-2* supera la inhibición de la emergencia al contar con una internalización de MP más robusta que el tipo silvestre.

5.8.- La internalización del trazador endocítico FM4-64 en la línea pérdida de función de bZIP25 es inhibida por Tirfostina A23 a concentraciones más altas que en la línea silvestre.

La pérdida de función de bZIP25 gatilla la aceleración del tráfico endocítico y una mayor densidad de raíces laterales respecto a la línea silvestre (Pizarro, L. tesis doctoral,

2015). Los resultados obtenidos sugieren que el desarrollo de raíces laterales en la línea mutante *bzip25-2* se conecta directamente con el tráfico endocítico, puntualmente, con la internalización de MP dependiente de clatrina (EMC; Endocitosis Mediada por Clatrina), para determinar si este tipo de endocitosis está diferencialmente regulado en *bzip25-2*, estudiamos la internalización del trazador endocítico FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas silvestres y mutantes *bzip25-2* en presencia del inhibidor de la EMC TyrA23, en concentraciones descritas por bloquear eficientemente la internalización de distintos trazadores de MP (Ortiz-Zapater, E. y col., 2006; Dhonukshe, P. y col., 2007), luego de 30 minutos de reactivación de la endocitosis en presencia de la droga. Se escogió esta temporalidad para evaluar el fenotipo, porque experimentalmente se observó que a 30 minutos es evidente la aceleración de la endocitosis en *bzip25-2* respecto a la línea silvestre (condiciones control en figuras 11, 12 y 13).

En condiciones control se detectaron endosomas en la línea silvestre, los cuales se observan también en la línea *bzip25-2* (figura 15, cabezas de flechas amarillas en condición control), sin embargo, y tal como se esperaba, se observó en *bzip25-2* endosomas de mayor tamaño, o endosomas tardíos (Dettmer, J. y col., 2006; Richter, S. y col., 2009). En células de la línea silvestre, luego de 30 minutos de exposición a TyrA23 50 μ M no se observó prácticamente ningún tipo de endosoma, y se observó que el trazador FM4-64 se encuentra restringido a la MP (figura 15, asterisco blanco en panel superior central) dando cuenta de la completa inhibición de la internalización de MP marcada con FM4-64 ante la exposición a la droga. Además, se observó que aglomeraciones del trazador aparecen a nivel de la MP ante TyrA23 50 μ M en la línea silvestre (figura 15, cabezas de flecha azul en panel superior central). Por otro lado, en

la línea de pérdida de función de *bZIP25*, el trazador no está limitado a la MP, sino que se observaron endosomas y endosomas tardíos luego del tratamiento con TyrA23 50 μ M dando cuenta de que la EMC está activa aún en presencia de la droga (figura 15, cabezas de flecha amarillas y naranjas en panel inferior central). Con objeto de determinar si *bzip25-2* es insensible a TyrA23, tratamos plántulas silvestres y mutantes con una concentración 50% mayor de esta droga. En plántulas silvestres TyrA23 75 μ M bloquea de manera completa la internalización de MP marcada con el trazador FM4-64 equivalente al fenotipo observado al tratar plántulas silvestres con TyrA23 50 μ M. En contraste a lo observado en plántulas *bzip25-2* tratadas con TyrA23 50 μ M una concentración de 75 μ M bloquea completamente la endocitosis del trazador, por lo que la señal de FM4-64 se observó sólo en la MP (figura 15, panel inferior izquierdo), de forma homóloga a lo que se observó con la línea silvestre a ambas concentraciones de la droga. Por lo tanto, la pérdida de función *bZIP25* conduce a una menor sensibilidad a TyrA23, lo que concuerda con los mayores niveles de transcrito de *CLC2* que codifica a una cadena liviana de clatrina, sugiriendo que esta menor sensibilidad a auxina se debe a la mayor tasa de EMC en *bzip25-2*.

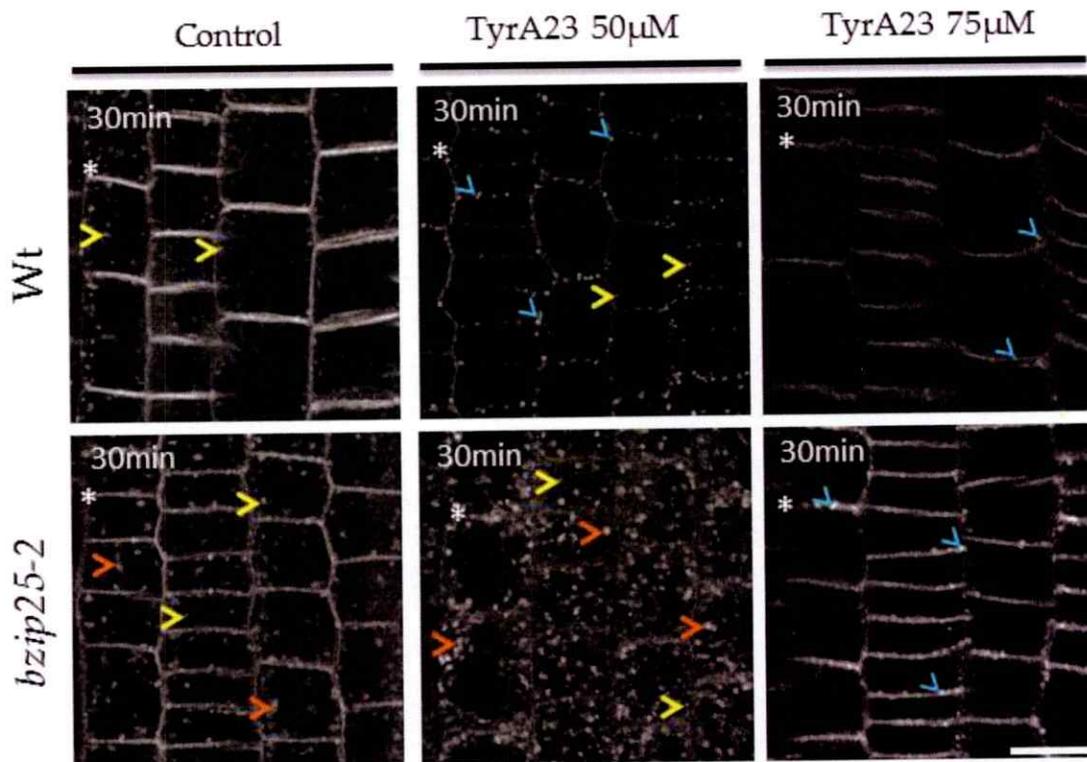


Figura 15. La línea *bzip25-2* es menos sensible a la inhibición de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) en comparación al tipo silvestre. Análisis de la internalización del trazador de Membrana Plasmática (MP) FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas silvestres (*Col-0*) y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento luego de 30 minutos en condiciones control (DMSO) o en tratamiento con Tirfostina A23 (TyrA23) 50 μ M o 75 μ M. Los asteriscos blancos, la cabeza de flecha amarilla, naranja y azul señalan la MP, endosomas, endosomas tardíos y aglomeración del trazador a nivel de MP, respectivamente. La línea pérdida de función de bZIP25 presenta en condiciones control múltiples endosomas y endosomas tardíos, en contraste en la línea silvestre sólo se observaron endosomas y en menor cantidad que la línea mutante (paneles derechos) dando cuenta de la aceleración en la internalización de MP en *bzip25-2*. El tratamiento con TyrA23 50 μ M inhibe la internalización de MP marcada con el trazador en la línea silvestre, en cambio, en la línea *bzip25-2* aún en presencia de la droga se observaron endosomas y endosomas tardíos (paneles centrales). La aplicación de 75 μ M inhibe eficientemente la entrada del trazador en ambas líneas (paneles izquierdos). Por lo tanto, *bzip25-2* es menos sensible que la línea silvestre a la inhibición mediada por TyrA23. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía confocal y son representativas de tres experimentos independientes con 4 plántulas evaluadas para cada tiempo. La barra de tamaño indica 20 μ m.

5.9.- La mayor densidad de raíces laterales reportada ante la pérdida de función de bZIP25 involucra la aceleración del tráfico endocítico a la Vacuola.

Nuestras observaciones indican que la endocitosis de PM es relevante para la organogénesis de raíces laterales, particularmente la mayor densidad de raíces laterales en la línea de pérdida de función de bZIP25 podría estar explicada por la inducción de esta vía de tráfico. Con objeto de determinar si la internalización de PM es suficiente para dar cuenta del fenotipo de raíces laterales en *bzip25-2* o, por otro lado, se requiere del tráfico endocítico río abajo de PM, interrumpimos el tráfico endosomal posterior a la PM.

En el tráfico de endomembranas participa maquinaria altamente especializada. La activación de GTPasas monoméricas del tipo ARF es requerida para la fisión de vesículas, activación que depende de factores de intercambio de nucleótido de guanidina (GEF) (Pizarro, L. & Norambuena, L., 2014). La droga Brefeldina A (BFA) se une al complejo ARF-GEF bloqueando el intercambio del nucleótido de guanidina y en consecuencia alterando el tráfico vesicular (Pedrazzini, E. y col., 2013). Particularmente, entre PM y EE/TGN BFA impide el reciclaje endocítico gatillando la aglomeración de endosomas en un compartimiento de gran tamaño conocido como cuerpos de BFA (Lam, S. y col., 2009; figura 16A) lo que colateralmente detiene el tráfico vesicular en dirección a la Vacuola.

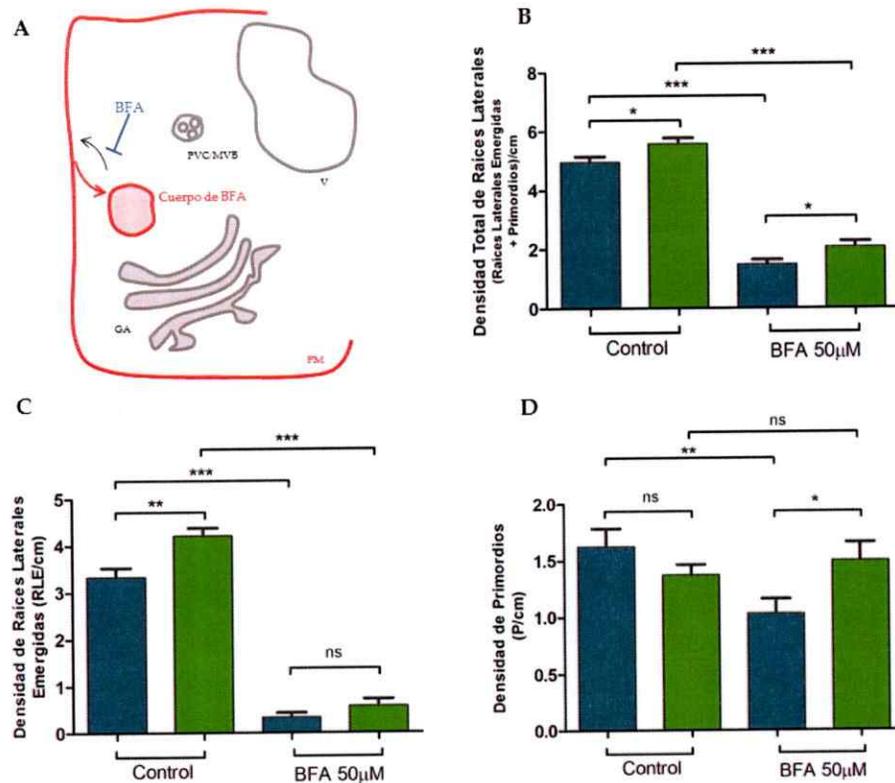


Figura 16. La línea *bzip25-2* es menos sensible a la inhibición del desarrollo de raíces laterales gatillada por la alteración del tráfico entre Membrana Plasmática y los Endosomas Tempranos/Red Trans-Golgi. Se esquematiza en **A** la ruta endocítica (flechas rojas) dentro del Sistema de Endomembranas en presencia de BrefeldinaA (BFA). EE/TGN = Endosomas Tempranos/Red Trans Golgi, PVC/MVB = Compartimiento Pre vacuolar/Cuerpo Multivesicular, V = vacuola, PM = Membrana Plasmática. BFA inhibe el reciclaje endocítico desde EE/TGN a la MP, gatillando el colapso endosomal en un único compartimento conocido como cuerpo de BFA. Plántulas silvestres y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento fueron transferidas a medio líquido suplementado con BFA 50 μM por 3 días. Se determinó la densidad de raíces laterales totales, raíces laterales emergidas y primordios de raíz lateral. BFA 50 μM inhibe la densidad total de raíces laterales en plántulas silvestres (columnas azules) y *bzip25-2* (columnas verdes) (**B**). Sin embargo, la línea mutante presentó una menor sensibilidad, por lo que la densidad total de raíces laterales es significativamente mayor en *bzip25-2* en comparación a la línea silvestre luego del tratamiento con la droga (**B**). Ambas líneas respondieron con igual sensibilidad a la inhibición de la densidad de raíces laterales emergidas, como resultado del tratamiento con BFA 50 μM (**C**) aunque la tasa de disminución es más drástica para la línea silvestre en comparación con *bzip25-2*, 10 veces versus 7,4. Por otro lado, BFA inhibe la densidad de primordios en plántulas silvestres, sin embargo, la línea *bzip25-2* es insensible al impacto de la droga sobre este parámetro (**D**). Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes, con un número total de 21 plántulas evaluadas. Estudio estadístico

realizado mediante análisis t-student: *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001; ns = no significativo.

Plántulas de 7 días de crecimiento de la línea silvestre y pérdida de función de bZIP25 se trataron con BFA 50µM durante 3 días para determinar el impacto de la alteración del tráfico entre PM y EE/TGN mediado por esta droga en la organogénesis de raíces laterales. Tras este periodo se determinó la densidad total de raíces laterales, y se describió, además, la densidad de primordios y de raíces laterales emergidas (figura 16).

La alteración del tráfico entre PM y EE/TGN por medio de BFA conduce a la disminución de la densidad de raíces laterales totales en plántulas silvestres, tanto como en plántulas *bzip25-2* (columnas azules y verdes, respectivamente, en figura 16B). BFA gatilla una densidad de raíces laterales totales 3,4 veces menor que el control para la línea silvestre y de 2,7 veces para *bzip25-2*. Por tanto, y como se desprende de la observación de la figura 16B, la línea silvestre presenta una mayor sensibilidad a BFA respecto a la línea pérdida de función de bZIP25, registrándose una mayor densidad de raíces laterales totales en *bzip25-2* luego del tratamiento (figura 16B).

La inhibición del reciclaje endocítico mediante BFA impacta principalmente sobre la emergencia de la raíz lateral tanto en plántulas silvestres como mutantes *bzip25-2*. En tratamiento con la droga plántulas silvestres tienen una densidad de raíces emergidas 10 veces menor que su respectivo control, mientras que en *bzip25-2* la disminución es de 7,4 veces (Figura 16C). En contra parte, la densidad de primordios se ve reducida sólo 0,5 veces en la línea silvestre luego del tratamiento con BFA 50µM y la línea

pérdida de función de bZIP25 es insensible a la reducción en la densidad de primordios ante la exposición a la droga (figura 16D).

En condiciones control se registró para *bzip25-2* una densidad total de raíces laterales mayor que en la línea silvestre, concordante al fenotipo ya descrito para esta mutante en condiciones estándar de crecimiento (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015). Tras evaluar la densidad de raíces laterales emergidas y la densidad de primordios de raíz lateral se reveló que la diferencia significativa entre plántulas silvestres y mutantes en el parámetro densidad total de raíces laterales deriva de la mayor densidad de raíces laterales emergidas en *bzip25-2* (columnas condición control en figura 16C). Por otro lado, el tratamiento con el inhibidor del reciclaje endocítico reveló que esta vía de tráfico es importante tanto para la generación del primordio como para la emergencia del mismo, pues BFA impacta en la densidad de raíces emergidas y en la densidad de primordios de raíz lateral en plántulas silvestres (columnas azules en tratamiento con BFA en figuras 16C y 16D), sin embargo, ambos parámetros están menos afectados en la línea mutante, la disminución de la densidad de raíces emergidas es 2,6 veces menor en *bzip25-2* respecto a la línea silvestre (7,4 frente a 10 veces de disminución respectivamente) y, además, no se observó una disminución en la densidad de primordios en el tratamiento con la droga. En consecuencia, la menor sensibilidad de la línea pérdida de función de bZIP25 al tratamiento con BFA en cuanto a la densidad total de raíces laterales (figura 16B) es resultado de la mantención de la organogénesis de primordios aún en presencia de BFA.

Se documentó para la línea *bzip25-2* la formación de un cuerpo de BFA de forma acelerada respecto a la línea silvestre, fenotipo coherente a la aceleración endocítica observada en esta línea mutante (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015). El desarrollo de

raíces laterales fue impactado negativamente luego del tratamiento con BFA en plántulas silvestres, dado que *bzip25-2* presenta una mayor sensibilidad celular a BFA cabría esperar un mayor impacto en la densidad total de raíces laterales en esta línea, sin embargo, se observó una menor sensibilidad respecto a la línea silvestre en este parámetro. Con objeto de buscar evidencias que permitan entender el contraste entre el fenotipo celular y el fenotipo de raíces laterales evaluamos, en primer lugar, la internalización del trazador endocítico FM4-64 en presencia de BFA 50 μ M a lo largo de una ventana temporal de 60 minutos en plántulas silvestres y mutantes *bzip25-2* centrándonos en el proceso de formación del cuerpo de BFA. Utilizamos esta temporalidad pues se describió la formación completa de un máximo de dos cuerpos de BFA por célula en la raíz de plántulas silvestres de *Arabidopsis* (Lam, S. y col., 2009; Löffke, C. y col., 2015). En condiciones control se observó que durante los tres tiempos evaluados (15, 30 y 60 minutos) la línea pérdida de función de *bZIP25* presenta un mayor número de endosomas en contraste a la línea silvestre (cabeza de flecha amarilla en figura 17A). A partir de 30 minutos se observaron endosomas tardíos en ambas líneas (cabeza de flecha naranja en figura 17A), sin embargo, *bzip25-2* presenta un mayor número de este tipo de endosomas, coherente con los resultados previamente reportados. Por otro lado, luego de 15 minutos en tratamiento con BFA 50 μ M, se observaron múltiples endosomas en ambas líneas que en comparación son indistinguibles en cuanto a número y densidad (cabeza de flechas amarillas en paneles superiores en la figura 17B). Tras 30 minutos de exposición a la droga, en comparación a la condición control, la cantidad de endosomas tardíos disminuye en ambas líneas, pero más robustamente en la mutante pérdida de función de *bZIP25* (cabeza de flecha naranja en paneles centrales en figura 17B). En contraste, también a 30 minutos de exposición con BFA 50 μ M, se observó la aparición de cuerpos intracelulares marcados

con FM4-64 de mayor tamaño que un endosomas o un endosoma tardío (flecha roja en paneles centrales en figura 17B) y que dan cuenta de etapas tempranas en la formación del cuerpo de BFA. Estos cuerpos son más abundantes en la línea *bzip25-2* en comparación con la línea silvestre, que es coherente a la aceleración de la endocitosis reportada para la pérdida de función de bZIP25 (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015); e inclusive en *bzip25-2* algunas estructuras alcanzan las características de tamaño de un cuerpo de BFA (referencia; cabeza de flecha roja en panel central en figura 17B). Luego de 60 minutos estructuras de tipo endosomas o endosomas tardíos se observaron con muy baja frecuencia en la línea silvestre y en *bzip25-2*, se observó principalmente estructuras que dan cuenta de la formación del cuerpo de BFA y cuerpos de BFA propiamente tal (flecha roja y cabeza de flecha roja, respectivamente, en paneles inferiores en la figura 17B).

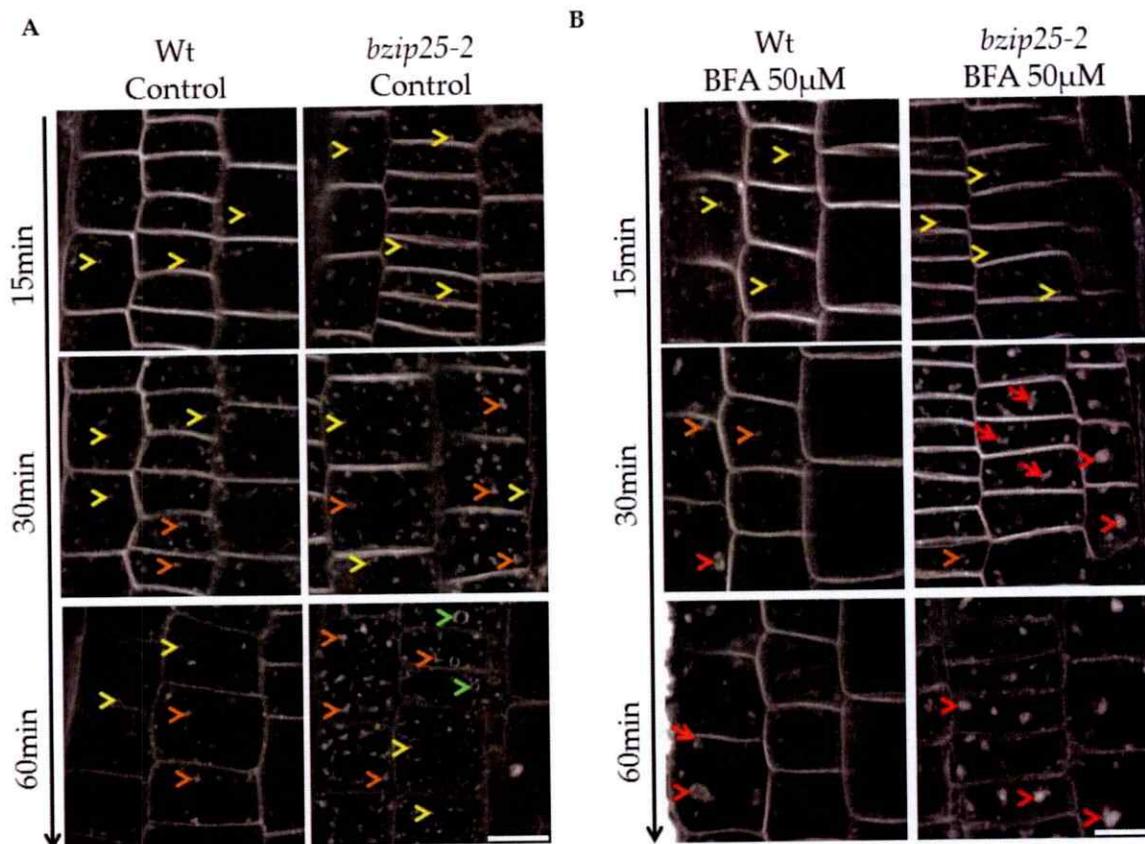


Figura 17. El proceso de formación del cuerpo de BFA está acelerado en la línea *bzip25-2*. Dinámica de internalización de Membrana Plasmática (MP) marcada con el trazador FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas silvestres (Col-0) y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento tratadas con BFA 50µM o con EtOH como control. La cabeza de flecha amarilla, naranja, roja, verde y la flecha roja indican endosomas, endosomas tardíos, cuerpo de BFA, membrana vacuolar y cuerpos de BFA en formación, respectivamente. En condiciones control (A) tras 15 minutos de internalización el número de endosomas es mayor en la línea *bzip25-2* respecto a la línea silvestre (paneles superiores en A), luego de 30 minutos de manera consistente el número de endosomas y endosomas tardíos es mayor en la línea mutante (paneles centrales en A), e inclusive a 60 minutos el trazador alcanza en gran número de individuos la membrana de la Vacuola (paneles inferiores en A). En presencia de BFA 50µM (B) luego de 15 minutos de internalización del trazador se observó un número indistinguible de endosomas entre ambas líneas (paneles superiores en B), a 30 minutos el número de endosomas tardíos disminuye en la línea mutante en comparación a la silvestre, además, aparecen cuerpos de BFA en formación en *bzip25-2* en mayor número respecto a la línea silvestre (paneles centrales en B), finalmente, a 60 minutos *bzip25-2* presentó mayor número de cuerpos de BFA en formación y cuerpos de BFA formados (paneles inferiores en B). Estos resultados son concordantes a la aceleración en la formación del cuerpos de BFA reportado en *bzip25-2* consistente con la aceleración de la endocitosis propia de esta línea mutante (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015), pero revelan además, la formación de múltiples estructuras tempranas

en la formación de un cuerpo de BFA. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopia confocal y son representativas de tres experimentos independientes con 4 plántulas evaluadas para cada tiempo. La barra de tamaño indica 20µm.

Estas observaciones dan cuenta de que la mayor sensibilidad celular a BFA ante la pérdida de función de bZIP25 radica no solo en el establecimiento más rápido y de mayor tamaño de un cuerpo de BFA como resultado de la aceleración de la endocitosis (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015), sino que también, en el establecimiento de múltiples estructuras tempranas en la formación de un cuerpo BFA (flechas rojas en figura 17B), los cuales probablemente, se agrupan o colapsan en un solo cuerpo de BFA a medida que la cinética de observación en presencia de la droga avanza. La mayor sensibilidad a nivel celular contrasta con la menor sensibilidad a la inhibición de la densidad de raíces laterales gatillada por BFA en *bzip25-2*. Se reportó que el tráfico entre la MP y la Vacuola es importante en el desarrollo de raíces laterales (Pérez-Henríquez, P. y col., 2012). Si a nivel celular el tráfico endocítico en *bzip25-2* es capaz, además, de superar la agregación de vesículas en el cuerpo de BFA y continuar hasta alcanzar la Vacuola este fenotipo podría dar cuenta de la resistencia a BFA en término del desarrollo de raíces laterales.

Para aproximarnos a esta hipótesis, plántulas de 7 días de la línea silvestre y mutante se incubaron por 30 minutos en BFA 50µM y luego se co-incubaron con BFA 50µM y FM4-64 por otros 30 minutos, esta estrategia asegura la formación de uno o dos cuerpos de BFA por célula (Lam, S. y col., 2009) y asegura, además, que el trazador endocítico que ingresa se concentre en el/los cuerpo(s) de BFA en formación (figura 18). Transcurrida esta incubación se consideró el tiempo cero experimental y se estudió la cinética de internalización del trazador endocítico desde 30 a 120 minutos con objeto

de observar en qué línea se supera el bloqueo del tráfico mediado por BFA, y por tanto el trazador puede alcanzar la Vacuola, tal como se indica en la figura 5.

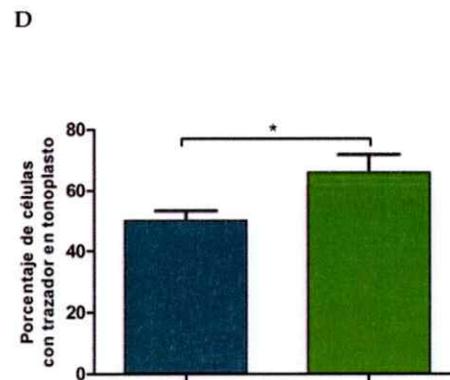
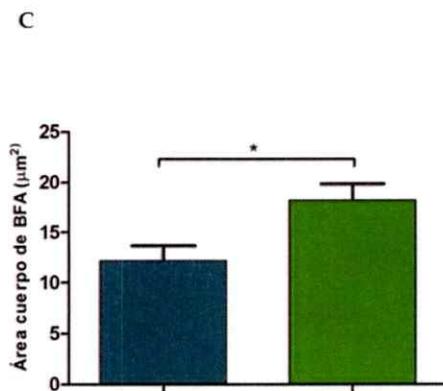
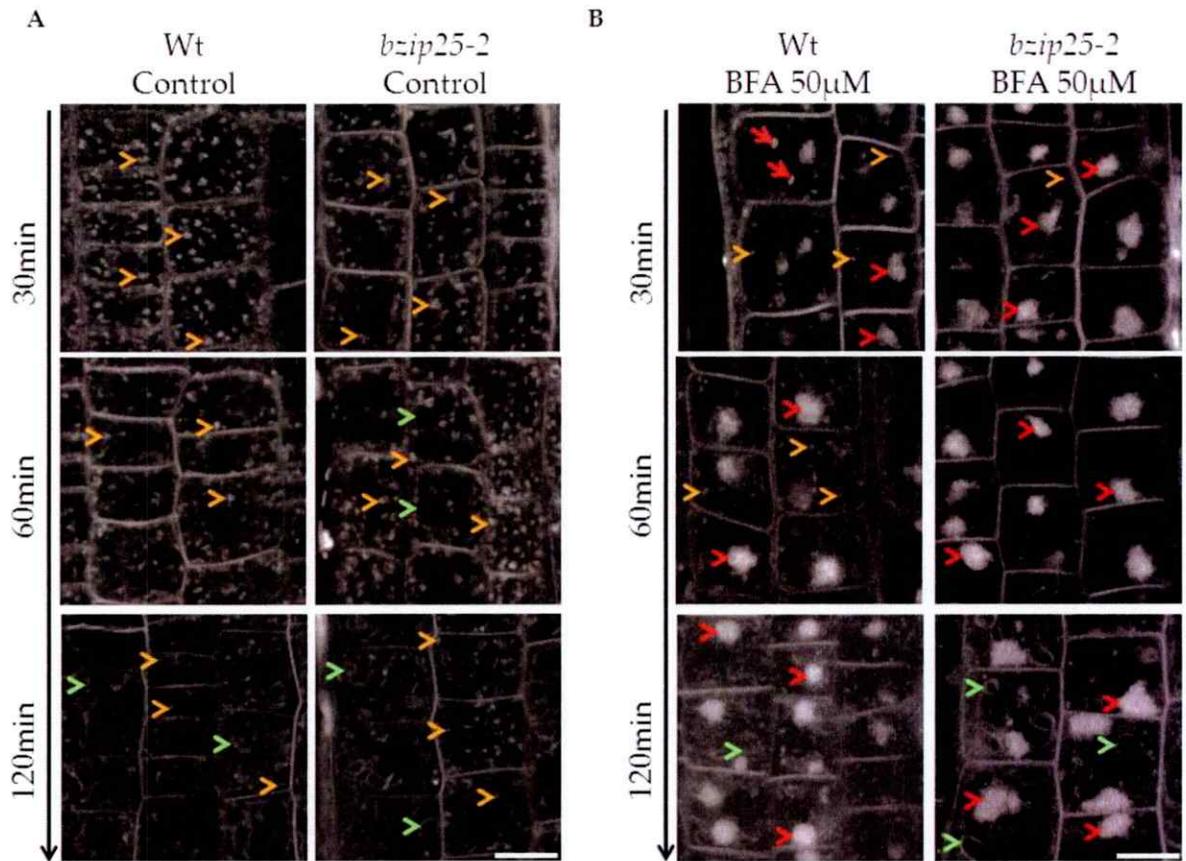


Figura 18. En *bzip25-2* el tráfico a la Vacuola supera la alteración del tráfico endocítico gatillada por BFA. Internalización de Membrana Plasmática (MP) marcada con el trazador FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas silvestres (Col-0) y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento tratadas con BFA 50 μ M o con DMSO como control según metodología descrita en la figura 3. La cabeza de flecha naranja, roja, verde y la flecha roja indican endosomas tardíos, cuerpo de BFA, membrana vacuolar y cuerpos de BFA en formación, respectivamente. En las gráficas presentadas columnas azules y verdes representan a la línea silvestre y *bzip25-2*, respectivamente. Bajo la condición control (A) el número de endosomas tardíos es equivalente a 30 minutos entre la línea silvestre y *bzip25-2* (paneles superiores en A), a 60 minutos el trazador alcanza la membrana de la Vacuola en la línea mutante, pero no en la silvestre (paneles centrales en A), luego de 120 minutos el trazador alcanza la membrana vacuolar en ambas líneas (paneles inferiores en A) resultados consistentes con la aceleración en la internalización de MP reportada para la línea pérdida de función de bZIP25. Por otro lado, 30 minutos de internalización de MP en presencia de BFA bajo las condiciones experimentales descritas en la figura 3, dan cuenta de la aparición de cuerpos de BFA mayores en tamaño (C) y número en la línea mutante al comparar con la silvestre (paneles superiores en B), tras 60 minutos en la línea silvestre aún se observó la presencia endosomas tardíos, y estructuras tempranas en la formación de un cuerpo de BFA, no así en *bzip25-2*, donde predomina un cuerpo de BFA establecido (paneles centrales en B). Luego de 120 minutos, en ambas líneas se observó uno o dos cuerpos de BFA por células, además, el trazador alcanza robustamente la Vacuola en *bzip25-2* (paneles inferiores en B) en un mayor número de células (D). Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopia confocal y son representativas de tres experimentos independientes con 4 plántulas evaluadas para cada tiempo. La barra de tamaño indica 20 μ m. Se utilizaron 10 células por plántula para en la evaluación del cuerpo de BFA y durante el análisis de la llegada del trazador a la Vacuola. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001; ns = no significativo.

Al evaluar 30 minutos del tratamiento control se observaron múltiples endosomas tardíos en células tanto de la línea silvestre como en *bzip25-2*, indistinguible en número o densidad (cabeza de flechas naranjas, paneles superiores en figura 18A). Luego de 60 minutos, el fenotipo de endosomas tardíos se mantiene invariable al comprar ambas líneas, sin embargo en *bzip25-2* el trazador FM4-64 alcanza la membrana de la Vacuola (cabezas de flechas verdes, paneles centrales en figura 18A). Tras 120 minutos el número y el tipo de endosomas es comparable en células de la raíz de plántulas silvestres y mutantes y, además, en ambos casos el trazador alcanza la membrana de

la Vacuola. Por otro lado, a 30 minutos del tratamiento se observó aproximadamente un cuerpo de BFA por célula en la línea silvestre y en *bzip25-2*. Se observó que el tamaño del cuerpo de BFA era mayor en células de la línea mutante (figura 18C). Por el contrario, en la línea silvestre se observaron múltiples endosomas, estructuras tempranas en la formación de un cuerpo de BFA, y cuerpos de BFA más pequeños que en la línea mutante (cabeza de flecha naranja, flechas rojas y cabezas de flechas, respectivamente, panel superior en figura 18B). Luego, a 60 minutos de observación el tamaño del cuerpo de BFA se homogeniza entre ambas líneas (cabeza de flecha roja, paneles centrales en figura 18B). A 120 minutos de tratamiento se observó en la línea silvestre uno o dos cuerpos de BFA completamente definidos por célula, en *bzip25-2* se observó, también, uno o dos cuerpos de BFA por célula, sin embargo estos cuerpos presentan límites difusos en comparación a los observados en la línea silvestre y, además, a simple vista presentan un mayor tamaño (cabezas de flecha roja, paneles inferiores en figura 18B). De manera interesante tras 120 minutos el trazador FM4-64 alcanza la membrana de la Vacuola en *bzip25-2*, en contraste a la línea silvestre (cabeza de flecha verde, panel inferior en figura 18B). En refuerzo de esta idea, el porcentaje de células en *bzip25-2* en donde se observó el trazador en la Vacuola es significativamente mayor a lo observado en células de plántulas silvestres, como se registra en la figura 18D. Por lo tanto, ante la pérdida de función de bZIP25 la formación del cuerpo de BFA está acelerada, sin embargo, el tráfico endocítico escapa en parte al bloqueo gatillado por esta droga y continúa en dirección a la Vacuola, lo que probablemente permite la organogénesis de raíces laterales aún en presencia de BFA de manera más robusta que en plántulas silvestres (figura 16).

5.10.- La aceleración del tráfico a la Vacuola ejerce una acción sinérgica en la inducción de la densidad de raíces laterales en la línea pérdida de función de bZIP25

Los resultados descritos sugieren que el tráfico endocítico entre la MP y la Vacuola cumple un papel en la mayor densidad total de raíces laterales observadas en la línea de pérdida de función de bZIP25. Para dar cuenta de esta relación utilizamos como herramienta la droga Sortin2 descrita por acelerar el tráfico a la Vacuola de diferentes proteínas de MP y del trazador FM4-64 (Figura 19A) y, además, induce el desarrollo de raíces laterales (Pérez-Henríquez, P. y col., 2012). Plántulas silvestres y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento se incubaron en medio conteniendo Sortin2 25µg/mL por 3 días. Concentración descrita como suficiente para inducir el desarrollo de raíces laterales en plántulas silvestres (Pérez-Henríquez, P. y col., 2012). Luego de este periodo se cuantificó la densidad total de raíces laterales.

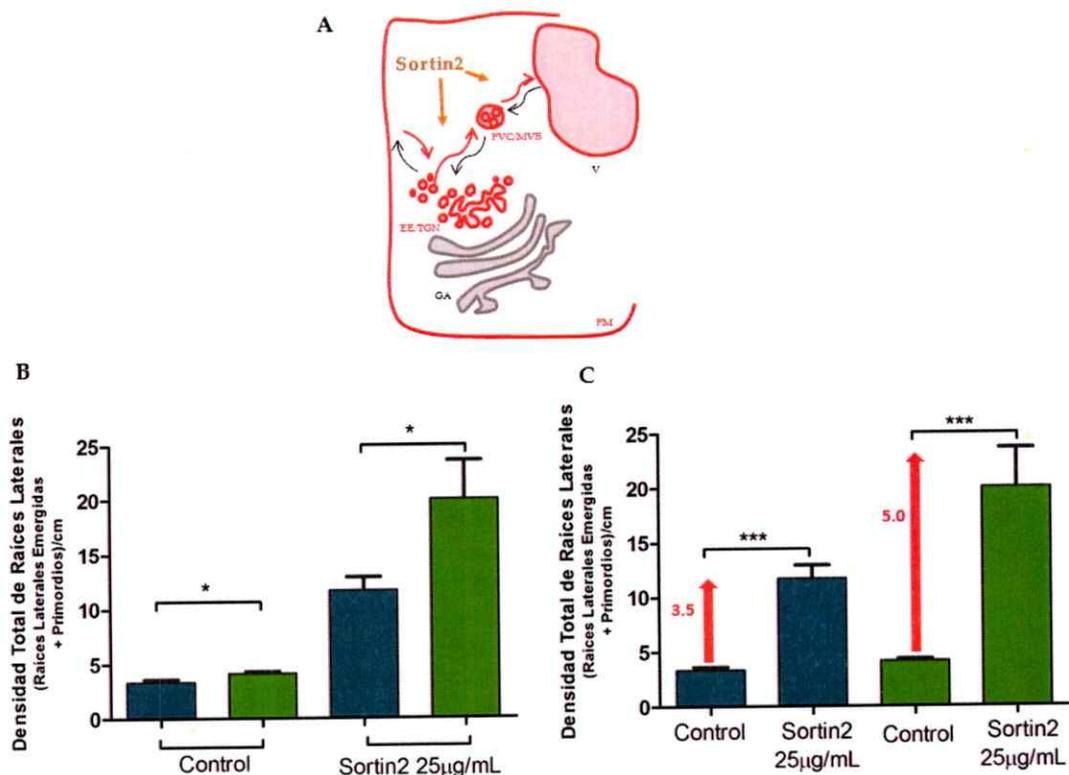


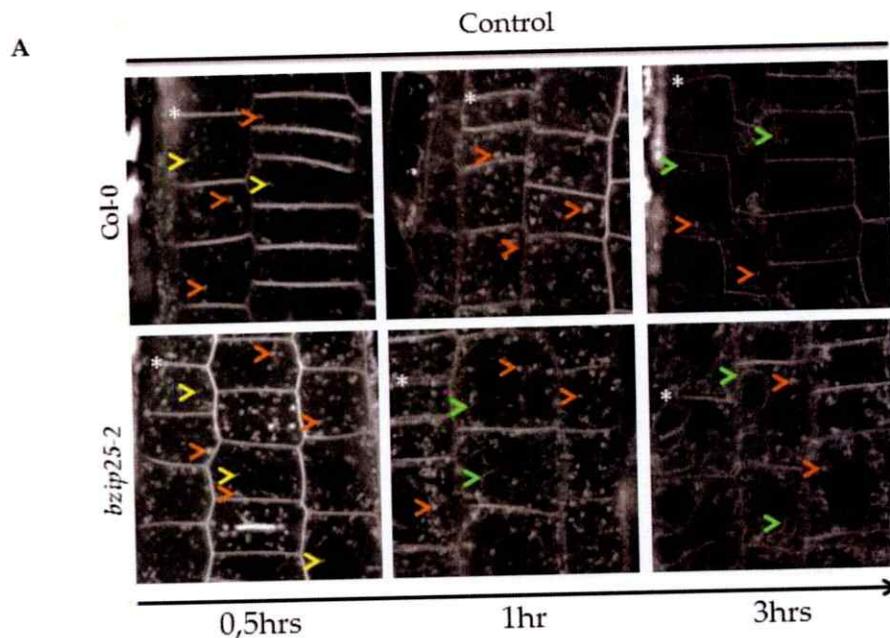
Figura 19. El acelerador del tráfico a la Vacuola Sortin2 tiene un efecto sinérgico sobre el desarrollo de raíces laterales observado en la línea de pérdida de función de *bZIP25*. Se esquematiza en **A** la ruta endocítica (flechas rojas) dentro del Sistema de Endomembranas en presencia de Sortin2. EE/TGN = Endosomas Tempranos/Red Trans Golgi, PVC/MVB = Compartimiento Pre vacuolar/Cuerpo Multivesicular, V = vacuola, PM = Membrana Plasmática. Sortin2 acelera el tráfico endocítico entre la MP y la Vacuola. Plántulas silvestres y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento fueron transferidas a medio líquido suplementado con Sortin2 25µg/mL por 3 días. Posteriormente, se determinó la densidad total de raíces laterales. En condiciones control la línea silvestre (columnas azules) presentó una densidad total de raíces laterales menor que *bzip25-2* (columnas verdes) como se observa en **B**, además, ambas líneas son sensibles al tratamiento con Sortin2, sin embargo *bzip25-2* es más sensible que la línea silvestre a la inducción de la densidad total de raíces laterales en presencia de la droga (**B**). Al comparar las veces de cambio del parámetro densidad se observó que en presencia de Sortin2 *bzip25-2* presentó un cambio que es mayor a la suma del registrado en plántulas silvestres por acción de Sortin2 y el endógeno de esta línea mutante en comparación a la línea silvestre (0,5 veces de cambio) (**C**). Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes, con un número total de 18 plántulas evaluadas. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ns = no significativo.

En condiciones control la línea *bzip25-2* presentó una mayor densidad total de raíces laterales en comparación con la línea silvestre, acorde a lo reportado en la tesis doctoral de Lorena Pizarro (2015) y en este seminario de título (figura 19B). Se observó que el tratamiento con Sortin2 induce un aumento en la densidad total de raíces laterales en la línea silvestre como en *bzip25-2*. Sin embargo, la línea pérdida de función de *bZIP25* es más sensible a la droga presentando una densidad total de raíces laterales significativamente mayor que el tipo silvestre (figura 19B). Sortin2 gatilla un aumento aproximado de 4 veces sobre el índice de densidad de raíces laterales en plántulas silvestres (Pérez-Henríquez, P. y col., 2012), con un promedio de 3,5 veces bajo nuestras condiciones experimentales, al evaluar este parámetro en *bzip25-2* contrastando la condición tratamiento versus el control encontramos que Sortin2 induce un aumento de 5 veces del índice total de raíces laterales (figura 19C), mayor a lo reportado para la línea silvestre.

Este resultado revela que en presencia del acelerador endocítico Sortin2 la densidad total de raíces laterales en *bzip25-2* es incrementada de manera sinérgica en comparación al fenotipo reportado para plántulas silvestres en tratamiento con Sortin2 y el fenotipo de densidad total de raíces laterales endógeno en *bzip25-2* (0,5 veces más que el de plántulas silvestres). Este resultado apoya la conexión entre el incremento en la densidad de raíces laterales y el tráfico acelerado a la Vacuola desde MP en la línea de pérdida de función de *bZIP25*.

Con objeto de determinar si la mayor densidad total de raíces laterales en tratamiento con Sortin2 tienen una correlación con la internalización de MP a nivel celular en la línea mutante estudiamos la internalización del trazador FM4-64 en células de la raíz de plántulas de 7 días de crecimiento de la línea silvestre y *bzip25-2* en presencia de

Sortin2 25µg/mL y 50µg/mL, siendo esta última concentración la descrita por acelerar el tráfico de diversas proteínas de MP a la Vacuola (Pérez-Henríquez, P. y col., 2012). Al evaluar la internalización de FM4-64 luego de 30 minutos en condiciones control, se observó en la línea *bzip25-2* un mayor número de endosomas y endosomas tardíos respecto a la línea silvestre (cabeza de flecha amarilla y naranja, respectivamente, paneles izquierdos en figura 20A). Por otro lado, a 60 minutos el trazador alcanza la membrana de la Vacuola en la línea mutante (cabeza de flecha verde, paneles centrales en figura 20A), en contraste a la línea silvestre donde no se observó. Luego de 3 horas el trazador se observó en la membrana de la Vacuola de ambas líneas lo que significa que la ruta de tráfico es funcional (cabeza de flecha verde, paneles derechos en figura 20A).



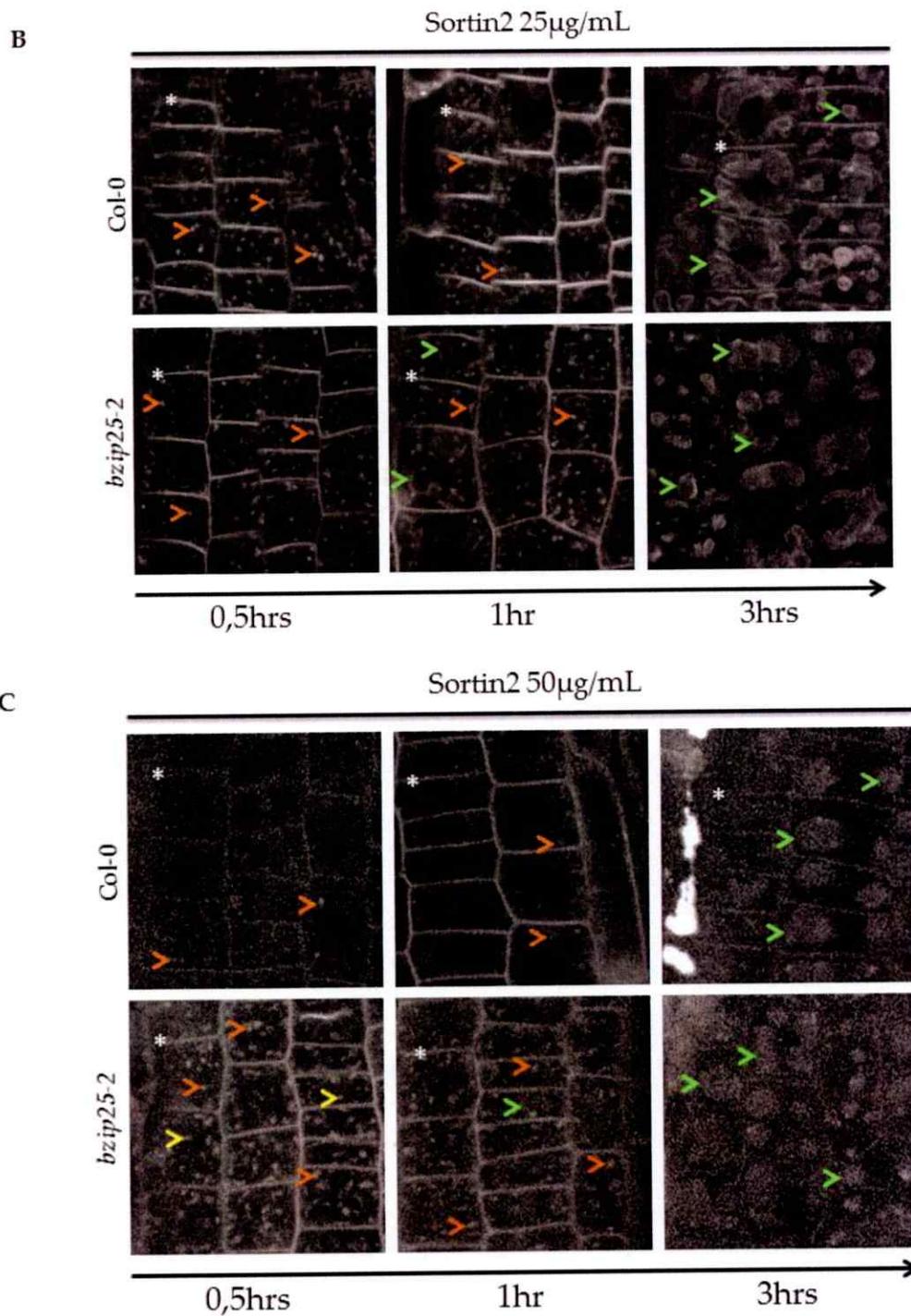


Figura 20. La línea de pérdida de función de *bZIP25* es hipersensible a la aceleración del tráfico a la Vacuola inducida por Sortin2. Se presenta la dinámica de internalización de Membrana Plasmática (MP) marcada con el trazador FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas silvestres (Col-0) y *bzip25-2* de 7 días de

crecimiento tratadas con Sortin2 25µg/mL, Sortin2 50µg/mL o con DMSO como control. La cabeza de flecha amarilla, naranja, verde y asteriscos blancos indican endosomas, endosomas tardíos, membrana vacuolar y MP, respectivamente. En condiciones control a 0,5 horas de internalización del trazador se observó un mayor número de endosomas y endosomas tardíos en células de plántulas *bzip25-2* en comparación a la línea silvestre (A, paneles izquierdos). Luego de una hora el trazador alcanza la membrana de la Vacuola en la línea mutante, pero no en la línea silvestre (A, paneles centrales). Tras 3 horas el trazador se observó en la membrana de la vacuola en ambas líneas (A, paneles izquierdos). Este resultado, consistentemente, da cuenta de la aceleración de la endocitosis en la línea pérdida de función de bZIP25. En tratamiento con Sortin2 25µg/mL ambas líneas presentan un número equivalente de endosomas tardíos luego de 0,5 horas de internalización del trazador, revelando la aceleración en la internalización mediada por Sortin2 (B, paneles izquierdos). Tras una hora de tratamiento el trazador alcanza de manera evidente la membrana vacuolar en *bzip25-2* (B, paneles centrales). A tres horas de exposición a Sortin2 25µg/mL gran parte de la señal de FM4-64 se centra en la membrana de la Vacuola para ambas líneas, sin embargo, sólo en la línea silvestre el trazador sigue asociado a la MP, en *bzip25-2* la señal se restringe completamente a la Vacuola (B, paneles derechos). Remarcablemente, en tratamiento con Sortin2 50µg/mL se observó un fenotipo homólogo luego de 3 horas, por lo que el trazador está mayoritariamente en la membrana vacuolar en la línea *bzip25-2*, mientras que en la línea silvestre aún es detectable en la MP (C, paneles derechos). Por lo tanto, Sortin2 induce un aumento en la internalización de MP en la línea pérdida de función de bZIP25. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopia confocal y son representativas de tres experimentos independientes con 4 plántulas evaluadas para cada tiempo. La barra de tamaño indica 20µm.

En contraste, se observó a 30 minutos de internalización de FM4-64 en presencia de Sortin2 25µg/mL un número similar de endosomas tardíos en células de la línea silvestre y de *bzip25-2* (cabezas de flecha amarillas, paneles izquierdos en figura 20B). Tras una hora de tratamiento el trazador alcanza la membrana de la Vacuola en ambas líneas (cabeza de flecha verdes, paneles centrales en figura 20B). Estas observaciones son coherentes a la aceleración de la endocitosis mediada por Sortin2 lo que conduce a un fenotipo de endocitosis homólogo entre ambas líneas a esta temporalidad de observación. Se evaluó, por tanto, la internalización del trazador a tiempos posteriores. A 3 horas de internalización de FM4-64 en presencia de Sortin2 25µg/mL se observó nítidamente la morfología de la Vacuola en plántulas silvestres, pues gran parte del

trazador alcanzó la membrana de la Vacuola (panel superior derecho en figura 20B). En células de plántulas *bzip25-2* toda la señal del trazador se observó limitada a la Vacuola (panel inferior izquierdo en figura 20B), en contraste a plántulas silvestres donde a esta temporalidad se observó aún trazador asociado a la MP (asteriscos blancos, figura 20B). Estos resultados muestran que la aceleración de la internalización de MP gatillada por Sortin2 se potencia en plántulas de la línea *bzip25-2*.

El tratamiento con Sortin2 50µg/mL generó complicaciones con la detección de la señal del trazador, sin embargo, entrega un resultado consistente a las observaciones descritas en tratamiento con Sortin2 25µg/mL a las 3 horas donde el trazador FM4-64 se encuentra mayoritariamente en la membrana de la Vacuola, sin embargo, parte de la señal del trazador también se distingue a nivel de la MP en la línea silvestre, mientras que en *bzip25-2* es casi imperceptible.

En forma integrada estos datos indican que la aceleración del tráfico endocítico a la Vacuola se relaciona directamente con la mayor densidad de raíces laterales observadas en la línea de pérdida de función de *bZIP25*.

5.11.- El tráfico entre los Endosomas Tardíos o Compartimientos Prevacuolares y la Vacuola está involucrado en el desarrollo de raíces laterales dependiente de *bZIP25*.

Los resultados presentados apuntan a que la aceleración del tráfico endocítico entre la MP y la Vacuola es relevante para la mayor densidad de raíces laterales observada en *bzip25-2* respecto a la línea silvestre. Con objeto de identificar si la endocitosis dirigida a la Vacuola o bien a un compartimento previo en la ruta de tráfico endocítico posterior a los Endosomas Tempranos/Red Trans-Golgi es importante en el desarrollo de raíces

laterales en *bzip25-2*, alteramos el tráfico entre el compartimiento prevacuolar (conocidos también como Endosomas Tardíos o el Cuerpo Multivesicular) y la Vacuola por medio de la droga Wortmanina (Wm).

Wm inhibe el tráfico de endomembranas (Figura 21A) modificando la composición de fosfatidilinosoles como resultado de la inhibición de enzimas requeridas en su síntesis (fosfatidilinositol-3-kinasa, PI-3K, y fosfatidilinositol-4-kinasa, PI-4K; Takáč, T. y col., 2012). Estos fosfatidilinosoles son requeridos para el tráfico entre el compartimiento prevacuolar y la Vacuola, la droga impacta la estructura del compartimiento, el cual se observa como pequeños anillos en el interior celular (Robinson D. y col., 2008).

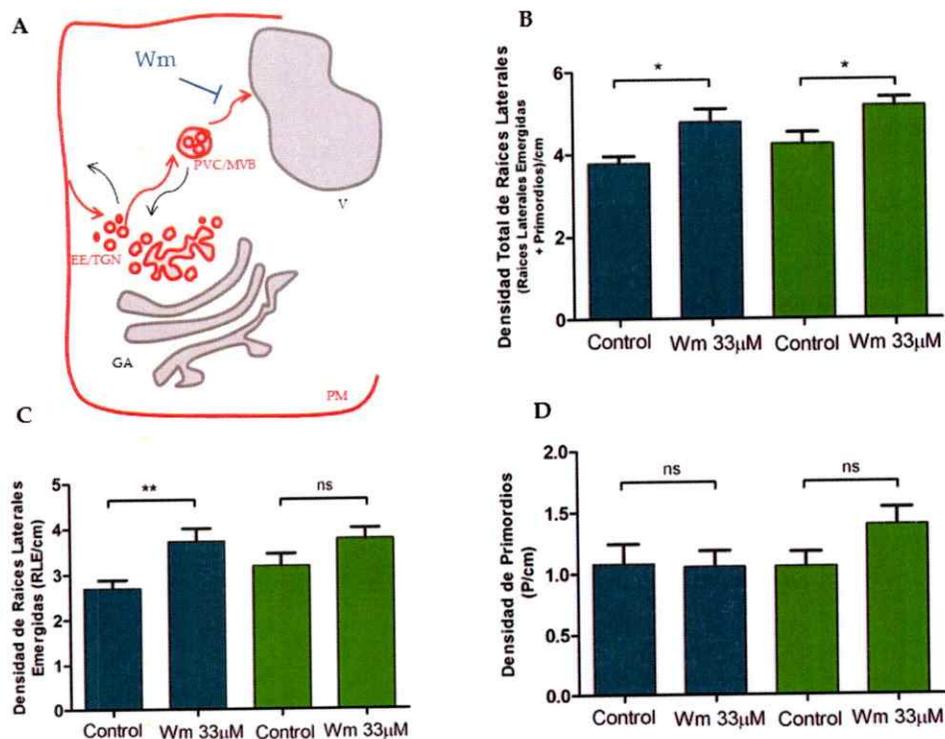


Figura 21. La línea *bzip25-2* y la línea silvestre incrementan la densidad de raíces laterales ante la alteración del tráfico entre compartimientos pre-vacuolares y la Vacuola mediado por Wm. En A se muestra a través de las flechas rojas la ruta endocítica dentro del Sistema de Endomembranas en presencia de Wortmanina (Wm).

EE/TGN = Endosomas Tempranos/Red Trans Golgi, PVC/MVB = Compartimiento Pre vacuolar/Cuerpo Multivesicular, V = vacuola, PM = Membrana Plasmática. Wortmanina inhibe el tráfico entre PVC/MVB y la Vacuola. Plántulas silvestres y *bzip25-2* de 7 días de crecimiento fueron transferidas a medio líquido suplementado con Wm 33 μ M por 3 días. Posteriormente, se determinó la densidad total de raíces laterales, la densidad de raíces laterales emergidas y la densidad de primordios. Wm 33 μ M induce un aumento en la densidad total de raíces laterales de la línea silvestre (columnas azules) y mutante (columnas verdes) (B). La droga repercute en un aumento en la densidad de raíces emergidas en la línea silvestre, pero no se observó cambios en este parámetro en la línea mutante (C). Por otro lado, no se observó ningún tipo de cambio en la densidad de primordios de raíces laterales en la línea silvestre o *bzip25-2* luego del tratamiento con Wm 33 μ M (D). Estos resultados sugieren que Wm induce la densidad de raíces emergidas y primordios en ambas líneas. En plántulas silvestres la densidad de primordios debe aumentar para poder compensar el cambio significativo en la densidad de raíces emergidas (C), por otro lado, en *bzip25-2* ambos parámetros deben estar inducidos para que en suma gatillen el aumento en la densidad total de raíces laterales registrado. Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes, con un número total de 21 plántulas evaluadas. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ns = no significativo.

Plántulas de 7 días de crecimiento de la línea silvestre y *bzip25-2* se incubaron en medio suplementado con Wm 33 μ M por 3 días tras lo cual se evaluó la densidad total de raíces laterales, la densidad de raíces laterales emergidas y la densidad de primordios de raíz lateral. Wm 33 μ M gatilla un aumento en la densidad total de raíces laterales tanto en la línea silvestre como en *bzip25-2* (figura 21B). En plántulas silvestres Wm aumenta de manera significativa la densidad de raíces emergidas (figura 21C) sin alterar la densidad de primordios de raíz lateral (figura 21D). Si se considera en esta línea el aumento en el número de raíces emergidas por centímetro de raíz, se espera un descenso en la densidad observada de primordios, sin embargo, este parámetro se mantiene invariable respecto al control, por lo tanto Wm 33 μ M induce primordios y emergencia en plántulas silvestres compensando de este modo el índice de primordios (figura 21D). Por otro lado, Wm 33 μ M no gatilla cambios significativos en la densidad de raíces emergidas (figura 21C) o en la densidad de primordios de raíz

lateral (figura 21D) en la línea pérdida de función de bZIP25, en contraste la suma de estos dos parámetros en densidad total de raíces laterales muestra un aumento respecto al control (figura 21B), por lo tanto, Wm 33 μ M induce la emergencia tanto como los primordios en *bzip25-2* y el efecto sumatorio de estos cambios tiene significancia estadística al momento de evaluar el índice de densidad total de raíces laterales. Por lo tanto Wm tiene el mismo efecto sobre *bzip25-2* y sobre Col-0, sin embargo, *bzip25-2* sigue presentando una mayor densidad de RL que Col-0 en el tratamiento Wm, sugiriendo que la inhibición mediada por Wm induce RL a través de un mecanismo distinto al de bZIP25.

Si bien, estos resultados muestran que el tráfico hasta compartimientos pre-vacuolares en nuestras condiciones experimentales participa en el desarrollo de raíces laterales, no imita el fenotipo de la línea mutante, ni tampoco gatilla una sinergia sobre la línea pérdida de función de bZIP25.

Estas evidencias indican que la aceleración de la endocitosis a la Vacuola participa en el aumento de densidad de raíces laterales en la línea pérdida de función de bZIP25, sin embargo, con estos experimentos no es posible discriminar el papel de alguna vía de tráfico en particular posterior a los Endosomas Tempranos/Red Trans-Golgi.

5.12.- Generación de líneas sobre-expresoras de bZIP25

Los análisis realizados en la línea de pérdida de función de bZIP25 evidencian que este factor de transcripción participa en la organogénesis de Raíces Laterales de *Arabidopsis thaliana* a través de la modulación del tráfico endocítico. Con objeto de confirmar que la pérdida de bZIP25 gatilla los fenotipos observados se utilizó como estrategia el estudio de la sobre-expresión de bZIP25 generando líneas de *Arabidopsis*

transgénicas que expresen de forma constitutiva la región codificante de bZIP25 bajo la dirección del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor.

La base de datos TAIR (The Arabidopsis Information Resource) detalla tres modelos génicos desde el locus At3g54620 que codifican para bZIP25. Se detectó que dos de las versiones de mRNA descritas se expresaban en plántulas silvestres. Los correspondientes dos cDNA se clonaron en el vector pCR8/GW/TOPO/TA, que permite mediante tecnología basada en recombinación el sub-clonamiento en vectores de destino (tecnología Gateway; Katzen, F. 2007) para posteriormente clonar en el vector de destino binario pGWB5 que permite la fusión en el extremo carboxilo terminal de la región codificante de la proteína GFP y otorga resistencia al antibiótico higromicina (Realizado durante la unidad de investigación Arantzazú Bidegáin, estudiante Ingeniería en Biotecnología Molecular).

Posterior al clonamiento en el vector de expresión en plantas pGWB5, plantas de las líneas silvestre y *bzip25-2* se transformaron a través del protocolo de inmersión floral basado en *Agrobacterium tumefaciens*. En este seminario de título se estudió, en particular, la isoforma AT3G54620.1 indicada en el modelo génico de bZIP25 en TAIR, que codifica una proteína de 403 aminoácidos correspondiente a la isoforma de mayor tamaño, y que desde aquí en adelante será denominada "bZIP25.1"

Las semillas de las plantas transformadas (T1; generación Transformante 1) fueron seleccionadas por resistencia al antibiótico higromicina. Se determinó, en primer lugar, la concentración mínima del antibiótico a la que una planta de *A. thaliana* portadora del gen de resistencia es capaz de crecer y desarrollarse de manera normal en contraste a una planta no resistente. Este análisis determinó que esta concentración corresponde a

50µg/mL de higromicina. Tal como se observa en la figura 22A un individuo resistente al antibiótico no tiene defectos en el crecimiento, ni tampoco en el desarrollo.

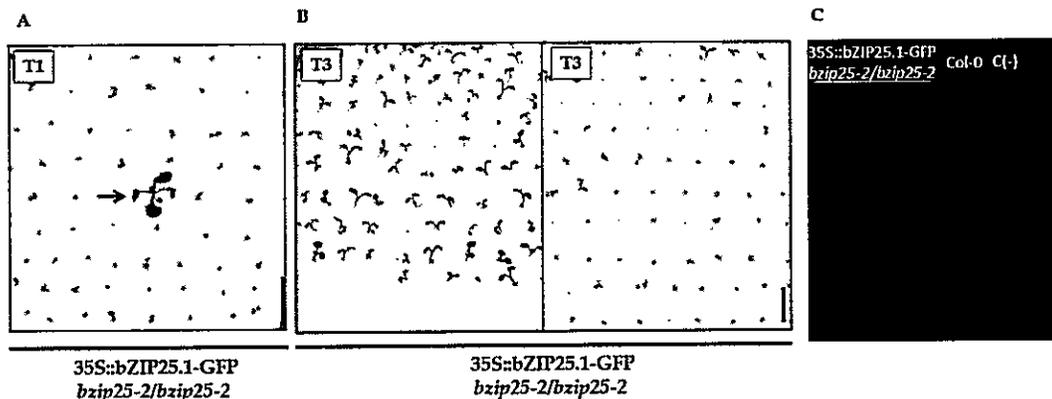


Figura 22. Selección y genotipificación de plantas homocigotas 35S::bZIP25.1-GFP. Plantas adultas del tipo silvestre y mutante fueron transformadas mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* a través del método de inmersión floral para integrar una construcción que incluye una de las isoformas de transcripción de bZIP25 "bZIP25.1" fusionada a la proteína fluorescente verde (GFP) dirigida por el promotor constitutivo 35S, y el gen que otorga resistencia al antibiótico higromicina hpt. Las semillas de estas plantas fueron crecidas en higromicina 50µg/mL (T1; generación Transformante 1) donde se seleccionaron individuos que no tienen problemas en su crecimiento y desarrollo como el observado en A (indicado por la flecha negra). Luego, se repitió el ensayo de selección por resistencia a antibiótico en semillas obtenidas desde individuos T1 y T2 correspondiente a la generación T2 y T3, respectivamente generación Transformante 2). Sucesivamente, para identificar individuos homocigotos como los observados en el cuadro izquierdo de la figura B, en contraste a individuos heterocigotos como el mostrado en el cuadro derecho de la figura B. Desde el DNA de plántulas transformadas con la construcción de interés se amplifica una banda de 1176pb dando cuenta de bZIP25.1-GFP. *bzip25-2/bzip25-2* indica que la transformación con la construcción de interés fue realizada sobre individuos homocigotos de la línea mutante *bzip25-2*.

Los individuos resistentes al antibiótico de la generación T1 se crecieron hasta completar su desarrollo para la obtención de semillas (semillas T2; generación Transformante 2). Las semillas T2 fueron, también, sometidas a selección por resistencia al antibiótico higromicina, y se observó que un 75% de la población se desarrolla sin problemas en medio suplementado con el antibiótico, el restante 25% de la población muere. Esta razón es consistente con la segregación de individuos

heterocigotos para la resistencia al antibiótico y con ello al transgen. Para asegurar la obtención de líneas homocigotas las semillas derivadas de individuos T2 fueron sometidas a una nueva ronda de selección por resistencia al antibiótico (T3; generación Transformante 3). Las semillas derivadas de un individuo homocigoto para la inserción son en un 100% resistentes a higromicina 50µg/mL (cuadro izquierdo en figura 22B) en cambio las semillas derivadas de un individuo heterocigoto dan lugar a plántulas que son sensibles a higromicina (cuadro derecho en figura 22B).

Con objeto de mostrar que las líneas seleccionadas como homocigotas desde la resistencia a Higromicina B son portadoras de la construcción de interés se extrajo DNA genómico de las plántulas seleccionadas y se amplificó el transgen correspondiente. La figura 22C muestra la electroforesis de los productos de PCR para la isoforma bZIP25.1. Tal como se esperaba una banda de 1176pb correspondiente a la secuencia codificante de *bZIP25.1* se observó a partir de líneas transformadas dando cuenta de la presencia de la construcción *35S::bZIP25.1-GFP*, la que no se observa en la línea mutante de bZIP25 o silvestre sin transformar.

5.13.- bZIP25.1 presenta una localización subcelular nuclear en *Arabidopsis*

Se ha caracterizado a bZIP25 como un factor de transcripción (Schmidt, R. y col., 1992) por lo que es probable que su localización subcelular sea el núcleo. Dado que la isoforma bZIP25.1 cuenta con una etiqueta GFP en su extremo carboxilo terminal se estudió la localización de la proteína de fusión utilizando una lupa de epifluorescencia. Tal como se observa en la figura 23A plántulas *bzip25-2* portadoras de la construcción *35S::bZIP25.1-GFP* son positivas a la fluorescencia de la proteína verde fluorescente, en contraste a plántulas que provienen de semillas no transformadas. Además, se

observó un patrón de fluorescencia punteado que podría ser indicativo de la compartimentación de la proteína de fusión dentro de la célula. Para determinar la localización subcelular de la proteína de fusión estudiamos la fluorescencia en células de la punta de la raíz de plántulas de 7 días de crecimiento de la línea transgénica mediante microscopia confocal. La señal de bZIP25.1-GFP se encuentra ocupando de manera uniforme un compartimento circular que se asemeja al núcleo, como se deriva de la observación de la morfología celular a partir de la imagen obtenida desde el campo claro (figura 23B cuadro izquierdo). Para validar la hipótesis respecto a la localización subcelular de bZIP25.1-GFP se realizó un ensayo de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos anti-GFP y co-marcando con el fluoróforo de unión a DNA DAPI, en plántulas transgénicas de 5 días de crecimiento. La observación mediante microscopia confocal revela que DAPI y GFP ocupan una misma localización dentro de las células, por lo que se puede afirmar que la proteína de fusión bZIP25.1-GFP expresada en la línea *bzip25-2* posee una localización nuclear.

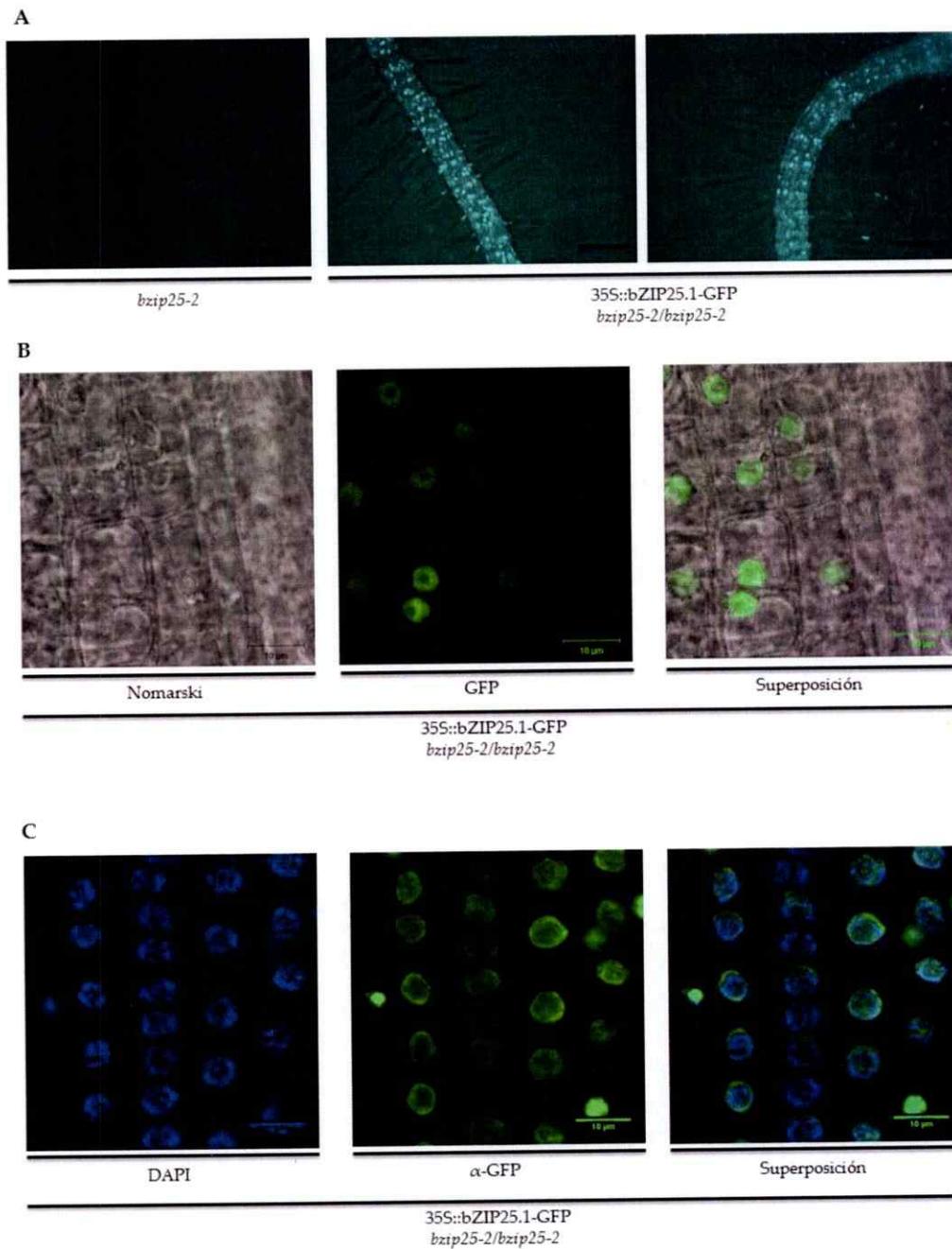


Figura 23. La proteína de fusión bZIP25.1-GFP localiza en el núcleo de células de *Arabidopsis thaliana*. En **A** plántulas de 7 días de crecimiento de la línea *bzip25-2* y de la línea *bzip25-2* expresando la construcción 35S::bZIP25.1-GFP se observaron mediante una lupa de epifluorescencia para detectar la emisión de la proteína fluorescente verde (GFP). Se observó que sólo la línea transgénica es GFP positiva y posee, además, un patrón punteado de emisión de fluorescencia, lo que sugiere la

compartimentación de la proteína de fusión. En **B** imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de plántulas *bzip25-2* expresando *35S::bZIP25.1-GFP*. La superposición de la señal de GFP con el campo claro, sugieren que la proteína de fusión localiza en el núcleo. En **C** imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de una inmunofluorescencia contra GFP en plántulas de 5 días que expresan la proteína de fusión bZIP25.1-GFP junto con el co-marcaje DAPI para identificar el DNA. Ambos marcadores co-localizan, lo que indica que bZIP25.1-GFP localiza en el núcleo. En **A** las barras indican 150µm. *bzip25-2/bzip25-2* indica que la transformación con la construcción de interés fue realizada sobre individuos homocigotos de la línea mutante *bzip25-2*.

5.14.- bZIP25.1 rescata el fenotipo de densidad de raíces laterales de la línea de pérdida de función de bZIP25.

Uno de los parámetros asociados al Sistema Radicular (SR) alterado en la línea de pérdida de función de bZIP25 es la mayor densidad de Raíces Laterales observada en comparación al tipo silvestre. Para evaluar si el impacto en el SR es resultado de la pérdida de función de bZIP25 evaluamos la densidad de Raíces Laterales en plántulas *bzip25-2* que acumulan la proteína bZIP25.1-GFP. Como primera aproximación se evaluó por observación directa el SR de plántulas silvestres, *bzip25-2* y *bzip25-2* expresando bZIP25.1-GFP luego de 18 días post siembra en Medio de Cultivo Sólido. Como muestra la figura 24A la línea de pérdida de función de bZIP25 muestra un SR más robusto que la línea silvestre, resultado de un amplio número de Raíces Laterales Emergidas, en cambio la línea mutante en que se expresa la construcción bZIP25.1-GFP presenta un SR que es homologable al de la línea silvestre. Al cuantificar la densidad de Raíces Laterales totales, siguiendo el protocolo ya descrito en este seminario de título para plántulas de 10 días, observamos que la línea pérdida de función de bZIP25 expresando bZIP25.1-GFP es menor que la registrada en la línea *bzip25-2* e inclusive menor que en la silvestre, dando cuenta que la densidad de Raíces Laterales es regulada por bZIP25. Una posible explicación a la menor densidad de Raíces Laterales en comparación a la línea silvestre en la línea que expresa bZIP25.1-

GFP puede estar relacionada con los niveles de transcrito de la construcción. Por tanto, comparamos la expresión de bZIP25 entre la línea silvestre y la línea mutante expresando bZIP25.1-GFP y observamos que la línea transgénica tiene mayores niveles del transcrito de la isoforma bZIP25.1 que el tipo silvestre (relativizado en base a los niveles de transcrito del gen de actina mediante PCR semi cuantitativo) constituyéndose como una línea sobre-expresora de esta isoforma (figura 24C). Consecuentemente, la drástica disminución en la densidad de raíces laterales puede tener relación con niveles más altos de la proteína mediando la represión de genes vitales para el desarrollo y/o crecimiento de una raíz lateral.

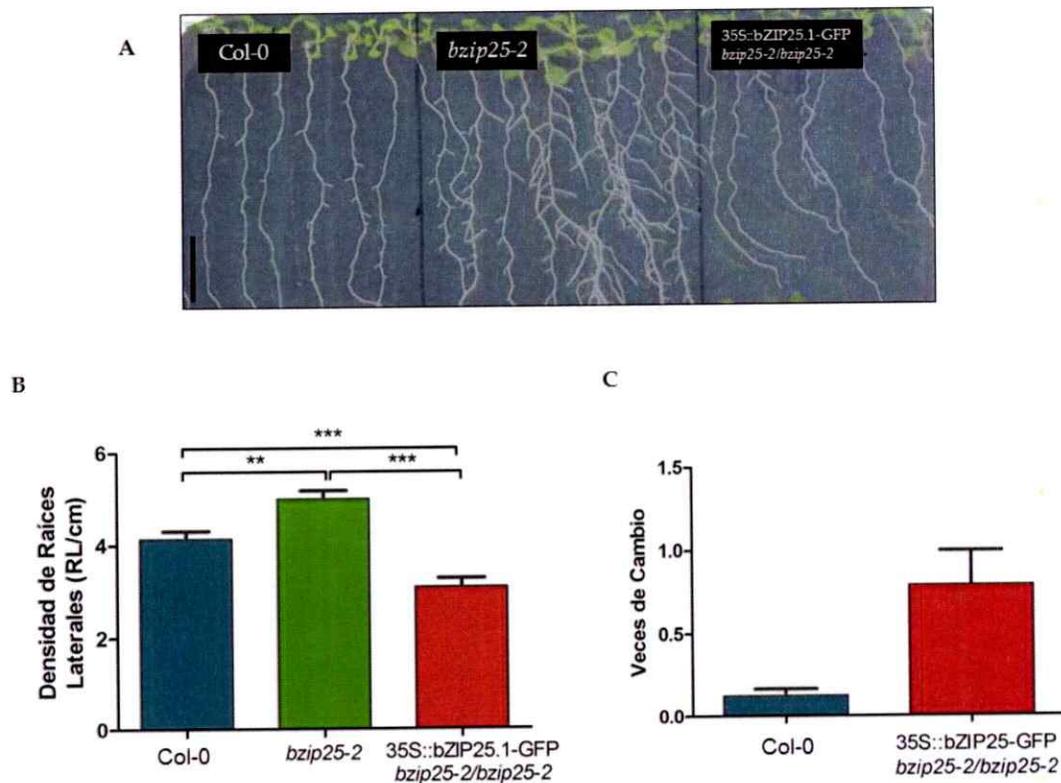


Figura 24. La línea bZIP25.1-GFP tiene una menor densidad de raíces laterales que la línea de pérdida de función de bZIP25 y la línea silvestre. En A se muestran plantas de 18 días crecidas en medio sólido de manera continua, se observa a primera vista que la línea que expresa a bZIP25.1-GFP tiene un menor número de raíces laterales que la línea silvestre y que *bzip25-2*. En B, plántulas de 7 días de crecimiento

de la línea silvestre (Col-0), *bzip25-2* y *35S::bZIP25.1-GFP bzip25-2/bzip25-2* fueron transferidas a medio líquido por 3 días luego de lo cual se evaluó la densidad total de raíces laterales, la línea pérdida de función de bZIP25 presenta una densidad de raíces laterales mayor que el tipo silvestre, consistente a los resultados descritos (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) y presentados en este seminario de título. Por otro lado, la línea bZIP25.1-GFP presenta una densidad de raíces laterales menor que la línea mutante, por lo que la expresión de esta isoforma rescata el fenotipo de pérdida de función de bZIP25, pero además, la disminución es inclusive menor que en la línea silvestre. En C se muestran los niveles de transcrito de bZIP25.1 en la línea silvestre y la línea transformada con la construcción *35S::bZIP25.1-GFP* relativizados a los niveles de transcrito del gen de actina cuya expresión se mantiene constante. La línea transformada presenta mayores niveles de transcrito de *bZIP25* que la línea silvestre, lo que permite sugerir que la inhibición exacerbada de la densidad de raíces laterales en la línea bZIP25.1-GFP es resultado de una mayor expresión del factor de transcripción bZIP25. La barra en A es igual a 1cm. Los datos en B corresponden a cuatro réplicas experimentales independientes, con un número total de 28 plántulas evaluadas. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001; ns = no significativo. *bzip25-2/bzip25-2* indica que la transformación con la construcción de interés fue realizada sobre individuos homocigotos de la línea mutante *bzip25-2*.

5.15.- Plántulas pérdida de función de bZIP25 expresando bZIP25.1-GFP presentan una internalización de Membrana Plasmática (MP) equivalente a plántulas silvestres.

Se mostró que la pérdida de función de bZIP25 gatilla un aceleración de la endocitosis del trazador FM4-64 (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015). Con objeto de determinar si la pérdida de función de bZIP25 es responsable de este fenotipo estudiamos la internalización del trazador FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas de 7 días de crecimiento silvestres, *bzip25-2* y *bzip25-2* que expresan a bZIP25.1-GFP. Tal como se describió la línea de pérdida de función de bZIP25 internaliza de forma acelerada el trazador de MP FM4-64 en comparación con la línea silvestre (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) lo que se puede observar a 15 minutos en el número y tamaño de los endosomas y endosomas tardíos en comparación con la línea silvestre y la línea bZIP25.1-GFP (cabeza de flecha amarilla y naranja, respectivamente, en figura 25). Por

otro lado, la línea *bzip25-2* expresando bZIP25.1-GFP muestra un nivel de internalización del trazador equivalente a la línea silvestre, presentando a 15 minutos de internalización principalmente endosomas, y de forma poco frecuente endosomas tardíos (figura 25). Luego de 30 minutos, la frecuencia de endosomas tardíos aumenta en la línea silvestre, no así en la línea bZIP25.1-GFP, por lo que es posible sugerir que exista un retraso en la internalización de MP en estas plántulas (figura 25). Por otro lado, tras 30 minutos el número de ambos tipos de endosomas es mayor en la línea mutante *bzip25-2* que en su contraparte silvestre o sobre-expresora de bZIP25.1-GFP. Estos resultados confirman que la aceleración de la endocitosis reportada en *bzip25-2* es resultado de la carencia de bZIP25, por otro lado, sugieren que la sobre-expresión de bZIP25 puede no solo rescatar el fenotipo de endocitosis al nivel del tipo silvestre, sino que inducir la disminución de la internalización de MP, en concordancia con los mayores niveles de transcrito detectados y la menor densidad de RL.

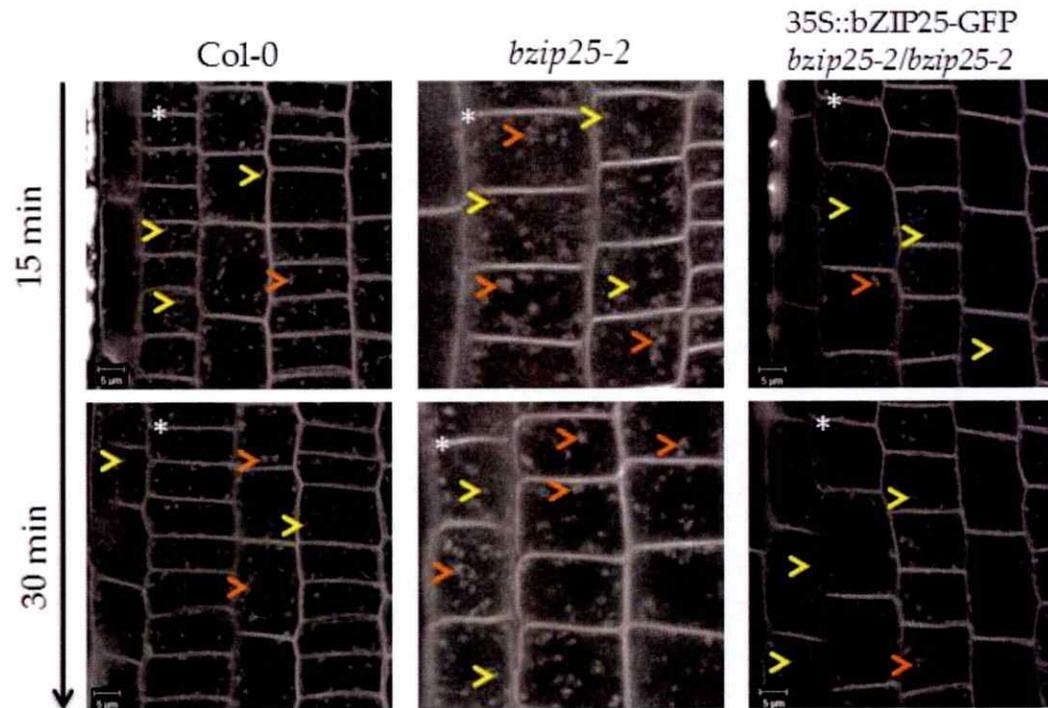


Figura 25. La internalización de Membrana Plasmática (MP) es homóloga entre la línea bZIP25.1-GFP y la línea silvestre. Se muestra la dinámica de internalización del trazador de MP FM4-64 en células de la punta de la raíz de plántulas de 7 días de crecimiento silvestres (Col-0), *bzip25-2*, y bZIP25.1-GFP incubadas en medio MS líquido y observadas mediante microscopia confocal. La cabeza de flecha amarilla, naranja y asteriscos blancos indican endosomas, endosomas tardíos y MP, respectivamente. Tras 15 minutos de internalización la línea silvestre presenta múltiples endosomas y con baja frecuencia endosomas tardíos, en contra parte la línea *bzip25-2* presenta múltiples endosomas y endosomas tardíos. Por otro lado, los endosomas observados en la línea bZIP25.1-GFP son comparable a los de plántulas silvestre. Luego de 30 minutos de internalización se observó coherentemente que *bzip25-2* presenta un mayor número de ambos tipos de endosomas en comparación con la línea silvestre y sobre-expresora de bZIP25.1-GFP, las cuales son comparable entre sí, Por lo tanto bZIP25.1-GFP rescata el fenotipo de aceleración de la endocitosis observado en la línea mutante *bzip25-2*. Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes con 4 plántulas evaluadas para cada tiempo.

5.16.- La expresión de bZIP25.1-GFP en la línea de pérdida de función de bZIP25 no altera la sensibilidad a la inducción de raíces laterales por aplicación de auxina.

Luego de observar que la línea que expresa bZIP25.1-GFP tiene una menor densidad de raíces laterales nos preguntamos si este fenotipo tiene relación con una menor sensibilidad a auxina. Para resolver esta interrogante evaluamos la densidad de raíces laterales totales en plántulas de 7 días que expresan bZIP25.1-GFP luego del tratamiento por 3 días con IAA 1 μ M. Como se observa en la figura 26 en el tratamiento libre de la hormona la línea que expresa a bZIP25.1-GFP presenta una menor densidad de raíces laterales que la línea pérdida de función de bZIP25, sin embargo, bajo estas condiciones experimentales desaparecen las diferencias en comparación con el tipo silvestre, lo que puede tener relación con un silenciamiento parcial del transcrito de bZIP25.1-GFP, pues se ha reportado que esto puede ocurrir cuando un gen es dirigido por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (Hull, R. y cols., 2000). Por otro lado, luego del tratamiento con IAA 1 μ M la inducción de raíces laterales mediada por la aplicación de auxina es equivalente en todas las líneas evaluadas lo que indica que las líneas son igualmente sensibles al desarrollo de Raíces Laterales mediado por la aplicación de auxina exógena.

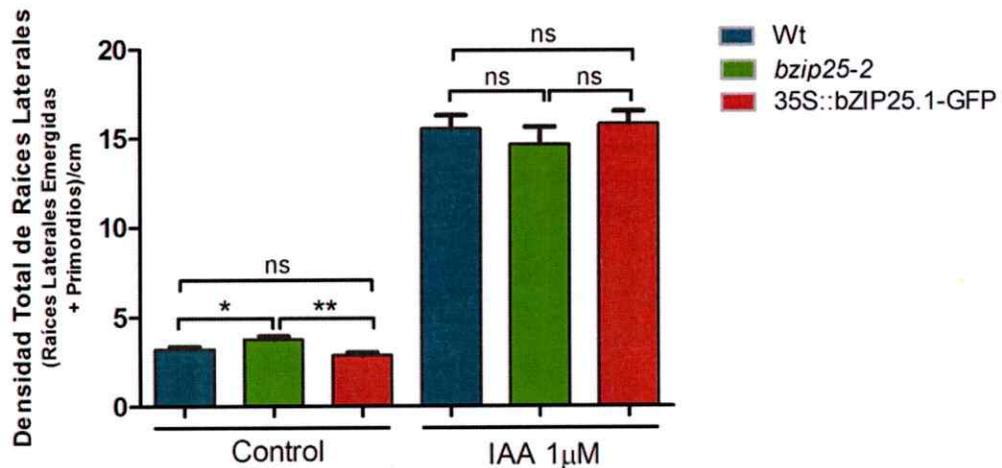


Figura 26. Plántulas expresando bZIP25.1-GFP son igual de sensible a la inducción de la densidad de raíces laterales mediada por la aplicación de auxina exógena que plántulas silvestres o plántulas línea pérdida de función de bZIP25. Plántulas silvestres (Wt), *bzip25-2* y 35S::bZIP25.1-GFP *bzip25-2/bzip25-2* de 7 días de crecimiento fueron transferidas a medio líquido suplementado con IAA 1µM por 3 días. Se determinó entonces la densidad total de raíces laterales. En condiciones control (EtOH) la línea pérdida de función de bZIP25 presenta una densidad de raíces laterales mayor que la línea silvestre y la línea que expresa a bZIP25.1-GFP. En tratamiento con IAA 1µM la inducción de raíces laterales es equivalente entre todas las líneas estudiadas, por lo que no se observan diferencias significativas en la densidad total de raíces laterales. Este resultado da cuenta de una sensibilidad equivalente entre las líneas estudiadas en cuanto al desarrollo de raíces laterales mediada por la aplicación de auxina exógena. Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes, con un número total de 18 plántulas evaluadas por cada tratamiento. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *= $p < 0.05$; **= $p < 0.01$; ***= $p < 0.001$; ns = no significativo.

5.17.- El desarrollo de raíces laterales en plántulas de la línea bZIP25.1-GFP es más sensibles a la inhibición de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) respecto a la línea silvestre o *bzip25-2*.

La droga Tirfostina A23 (TyrA23) inhibe la EMC desde la Membrana Plasmática (MP) (Banbury, D. y col., 2003) bloqueando el primer paso en la ruta endocítica. Estudiamos en este seminario el impacto de TyrA23 en el desarrollo de raíces laterales en la línea silvestre y en la línea pérdida de función de bZIP25 encontrando que la principal diferencia se origina en torno a la emergencia de raíces laterales, donde la línea de

pérdida de función es insensible a la inhibición mediada por la droga. Con objeto de determinar si este fenotipo es resultado de la pérdida de función de bZIP25 plántulas de 7 días de crecimiento *bzip25-2* expresando a bZIP25.1-GFP se traspasaron a medio suplementado con TyrA23 30 μ M tras lo cual se evaluó la densidad total de raíces laterales (figura 27). De manera interesante se observaron diferencia a partir del parámetro global de densidad total de raíces laterales, lo que no se observa al contrastar solo la línea silvestre y *bzip25-2* a nivel de este parámetro. La sobre-expresión de bZIP25.1-GFP sugiere una mayor sensibilidad a TyrA23, observación coherente a los menores niveles de expresión de la cadena liviana de clatrina *CLC2* reportados para esta línea (datos Dra. Lorena Pizarro, no publicado).

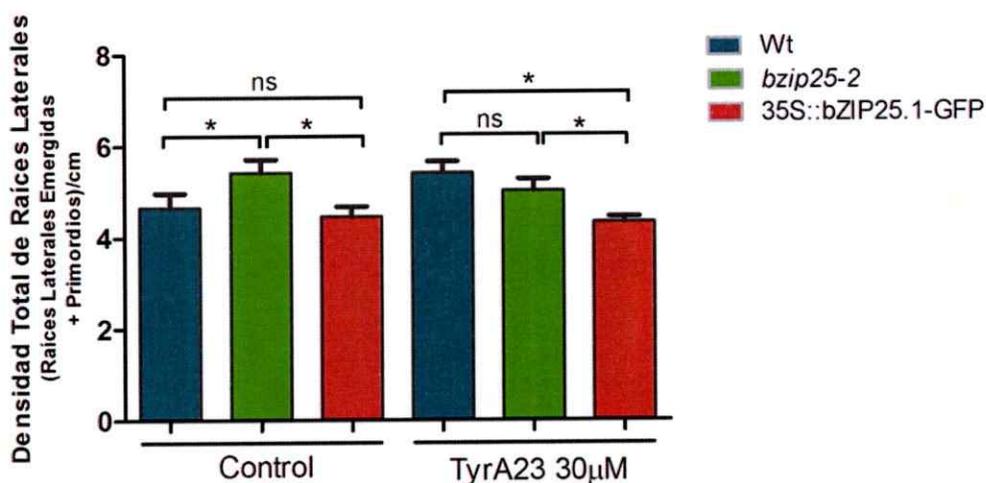


Figura 27. La inhibición de la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) inhibe el desarrollo de raíces laterales en la línea bZIP25.1-GFP. Plántulas silvestres (Wt), *bzip25-2* y 35S::bZIP25.1-GFP *bzip25-2/bzip25-2* de 7 días de crecimiento fueron transferidas por 3 días a medio líquido con el inhibidor de la EMC Tirfostina A23 (TyrA23) a una concentración de 30 μ M. Tras lo cual se obtuvo la densidad total de raíces laterales. En condiciones control la línea de pérdida de función presenta una mayor densidad total de raíces laterales que la línea silvestre y bZIP25.1. En tratamiento con TyrA23 30 μ M la densidad total de raíces laterales no es modulada en plántulas silvestres o *bzip25-2*. Sin embargo, plántulas expresando bZIP25.1-GFP muestran una inhibición en la densidad total de raíces laterales luego del tratamiento. Los datos corresponden a tres réplicas experimentales independientes, con un número total de 18

plántulas evaluadas por cada tratamiento. Estudio estadístico realizado mediante análisis t-student: *=p<0.05; **=p<0.01; ***=p<0.001; ns = no significativo. *bzip25-2/bzip25-2* indica que la transformación con la construcción de interés fue realizada sobre individuos homocigotos de la línea mutante *bzip25-2*.

En conjunto estos resultados refuerzan el vínculo entre la modulación del tráfico endocítico por parte del factor de transcripción bZIP25 y el desarrollo de raíces laterales. Sin embargo, aún es necesaria investigación que determine cómo puntualmente bZIP25 participa en el desarrollo y/o inducción de una raíz lateral, probablemente y con base en los datos observados mediante procesos que involucran de forma constitutiva el tráfico a la Vacuola, o el direccionamiento del tráfico desde MP a compartimientos tempranos en la ruta endocítica como los Endosomas de Reciclaje o los EE/TGN.

DISCUSION

A lo largo de su evolución las plantas desarrollaron como mecanismo de adaptabilidad una amplia plasticidad morfológica y fisiológica. Uno de los ejemplos más impresionantes de esta adaptabilidad se observa en la variedad de configuraciones que puede adoptar su Sistema Radicular (SR) ante diferentes tipos de estímulos (Gruber, B. y cols., 2013; Robbins, N. & Dinneny, J. 2015) los que son determinados tanto por componentes intrínsecos, codificados en el genoma de la planta, como a la adecuada integración de señales ambientales (Malamy, J. 2005). El SR impacta directamente en los rendimientos de especies vegetales de interés agronómico al ser responsable de la toma de agua y nutrientes, por tanto la comprensión de los determinantes genéticos y ambientales que modulan el SR es de vital interés en la búsqueda de variedades que optimicen las condiciones de cultivo.

Los datos aquí presentados muestran que el factor de transcripción bZIP25 es parte de la maquinaria intrínseca que participa en la configuración del SR actuando como un regulador negativo del crecimiento del SR. Los experimentos realizados sugieren que la modulación del tráfico endocítico, y no la alteración de la señalización de la hormona auxina, da cuenta del impacto de bZIP25 sobre el SR.

6.1.- La pérdida de función de bZIP25 impacta positivamente sobre el desarrollo del SR de manera independiente de auxina

6.1.1.- Crecimiento de la Raíz Principal y crecimiento de raíces laterales

La evaluación del largo de la Raíz Principal (RP) de plántulas silvestres, y de las mutantes *bzip25-1* y *bzip25-2* a lo largo de un curso temporal de 10 días reveló un largo de RP mayor para *bzip25-2* en cada día evaluado respecto a las otras dos líneas,

mostrando que la pérdida de función de bZIP25 conduce a un crecimiento acelerado de la RP (figura 8A). Nuestros antecedentes muestran, además, para la línea pérdida de función de bZIP25, *bzip25-2*, una mayor densidad de raíces laterales (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) las cuales presentan una mayor longitud que las observadas en el tipo silvestre (figura 8B). En conjunto, estas observaciones revelan un crecimiento exacerbado del SR en ausencia de bZIP25 en comparación a la línea silvestre y dan cuenta de su papel como regulador negativo del SR.

En *Arabidopsis* la RP y las raíces laterales siguen un arreglo celular y un patrón de crecimiento homólogo. La tasa de crecimiento de estos órganos está determinada por el balance entre la generación de nuevas células en la región del meristema de la raíz y las células que dejan la zona de elongación (Beemster, G. & Baskin, T. 1998; Cederholm, H. y col., 2012). Este proceso está comandado por la señalización de diversas hormonas, dentro de las cuales citoquinina y auxina participan como los principales reguladores, e interesantemente sus señalizaciones actúan de manera antagónica (Cederholm, H. y col., 2012). La promoción de la división celular requiere de altos niveles de auxina en la región del meristema en la punta de la raíz, el transporte de esta hormona a esta región depende de los facilitadores del transporte de auxina, proteínas PIN (Vieten, A. y col., 2007), citoquinina activa a los factores de transcripción ARR1 y ARR12 que activan la expresión de los represores de la respuesta transcripcional de auxina (AUX/IAA) reprimiendo la expresión de las proteínas PIN (Moubayidin, L. y col., 2010), lo que en consecuencia promueve la diferenciación celular por sobre la división celular. En contraparte auxina actúa como regulador positivo de la hormona ácido giberélico que media la inhibición de la señalización de citoquinina disminuyendo los niveles de expresión de ARR1 (Richards, D. y col., 2001; Fu, X. &

Harberd, N., 2003), de este modo, promueve el flujo de auxina al ápice de la raíz y con ello la división celular, y en consecuencia favorece el crecimiento de la raíz.

Por tanto, mayores niveles de ácido giberélico o auxina podrían explicar el crecimiento exacerbado de la RP y el crecimiento de las raíces laterales ante la pérdida de función de bZIP25. Sin embargo, nuestra observación de una mayor densidad de raíces laterales en *bzip25-2* se contrapone al papel del ácido giberélico como un regulador negativo del desarrollo de raíces laterales (Gou, J. y col., 2010) por lo que descartamos que el fenotipo observado se deba a mayores niveles de esta hormona. Fu & Harberd (2003) evidenciaron que el inhibidor del transporte de auxina NPA restringe el crecimiento de la RP alterando la señalización de ácido giberélico, probablemente al atenuar los niveles de auxina hacia la punta de la raíz. Nosotros evaluamos el crecimiento de la raíz principal en plántulas *bzip25-2* y silvestres germinadas en medio suplementado con NPA y observamos que sobre la línea silvestre tanto como sobre la línea mutante *bzip25-2* NPA gatilla la inhibición del crecimiento de la RP. Sin embargo, la línea pérdida de función de bZIP25 presenta una sensibilidad menor a esta inhibición respecto a la línea silvestre (figura 8C y 8D) sugiriendo mayores niveles de auxina en la línea *bzip25-2*. No obstante, al contrario de lo esperado en base al papel de auxina sobre la señalización del ácido giberélico en el crecimiento de la RP, se encuentra reportado que mayores niveles totales de auxina inhiben el crecimiento de la RP (Rahman, A. y col., 2007) en este sentido, por ejemplo, líneas mutantes de *Arabidopsis* que presentan un incremento en los niveles endógenos de auxina presentan largos de RP más cortos que el tipo silvestre (Delaure, M. y col., 1998; Zhao, Y. y col., 2001) indicando que el mecanismo de la regulación del crecimiento de la RP mediado por bZIP25 no está asociado a la regulación de auxina y ácido giberélico.

6.1.2.- Densidad de raíces laterales

Líneas mutantes de *Arabidopsis* que poseen niveles endógenos de auxina elevados o la aplicación exógena de auxina sobre plántulas silvestres gatilla un incremento en la densidad de raíces laterales (Boerjan, W. y col., 1995; Delaure, M. y col., 1998; Zhao, Y. y col., 2001). La línea pérdida de función de *bZIP25* posee una mayor densidad de raíces laterales (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) lo que sugiere, nuevamente, mayores niveles de auxina. Como acotamos previamente, mayores niveles de auxina inhiben el crecimiento de la RP (Rahman, A. y col., 2007) fenotipo no observado para la mutante *bzip25-2*, quien posee un largo de RP superior a la línea silvestre. Por otro lado, mayores niveles de auxina implican a nivel celular la inhibición de la internalización de MP y de proteínas que son normalmente endocitadas (Paciorek, T. y col., 2005). Por el contrario, *bzip25-2* presenta una internalización acelerada del trazador FM4-64 (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015) y, además, experimentos en curso revelan que algunas proteínas de MP son internalizadas de forma acelerada en comparación a la línea silvestre (unidad de investigación Macarena Martínez, estudiante Ingeniería en Biotecnología Molecular) sugiriendo en conjunto que esta línea no posee mayores niveles de auxina.

Además, *bzip25-2* es menos sensible a la inhibición de la endocitosis como resultado de la aplicación de auxina exógena en comparación a la línea silvestre (figura 11 y 12). La inhibición de la endocitosis por auxina depende de su unión al receptor de auxina ABP1. Este receptor actúa como inductor de la endocitosis cuando no se encuentra asociado de su hormona blanco (Robert, S. y col., 2010). De este modo, mayores niveles de ABP1 podrían dar cuenta de la endocitosis acelerada en la línea pérdida de función de *bZIP25*, sin embargo, al disminuir los niveles de auxina en la punta de la raíz

bloqueando el tráfico de auxina a esa región mediante NPA, no detectamos diferencias en la internalización de MP en *bzip25-2*, al contrario de la línea silvestre donde se acelera la endocitosis del trazador FM4-64 (figura 13) consecuencia de mayores niveles de ABP1 no unido a auxina. Además, *bzip25-2* ni tampoco la línea que sobre expresa bZIP25.1-GFP presentan niveles transcripcionales de *ABP1* mayores que la línea silvestre (datos no publicados, Dra. Lorena Pizarro) lo que podría extrapolarse a niveles equivalentes de este receptor en todas las líneas. Finalmente, se reportó que la señalización de ABP1 estabiliza los represores transcripcionales de la respuesta a auxina, proteínas AUX/IAA (Tomas, A. y col., 2013). Tal como se ha mostrado, la estabilización de estas proteínas bloquea la organogénesis de raíces laterales (Fukaki, H. y col., 2002; Yang, X. y col., 2004) contrario a la mayor densidad de raíces laterales observada en *bzip25-2*.

En conjunto, estas observaciones impiden asociar los fenotipos de crecimiento crecimiento exacerbado de la raíz principal y laterales, y la mayor densidad de raíces laterales en *bzip25-2* a un desbalance hormonal, particularmente de la hormona auxina.

6.2.- La línea *bzip25-2* no presenta defectos en la percepción de auxina

La señalización dependiente de auxina es crucial para múltiples procesos de desarrollo en *Arabidopsis*, líneas que presentan alteraciones en componentes moleculares/celulares que participan en la vía canónica de señalización de auxina (Tiwari, S. y cols., 2001; Cardozo & Pagano, 2004; Tiwari y cols., 2004) exhiben diferencias en la sensibilidad a la aplicación de auxina exógena (Watahiki, M. & Yamamoto, K., 1997; Yang, X. y col., 2004). Sin embargo, descartamos que la línea *bzip25-2* presente alterada la percepción de auxina, pues la aplicación exógena de las

auxinas IAA o NAA en concentraciones clásicamente utilizadas para evaluar la sensibilidad a esta hormona (Uehara, T. y col., 2008; Mei, Y. y col., 2012) gatillan la misma inducción de densidad total de raíces laterales en línea silvestre y mutante (figura 9 y 10). Además, la alteración de los niveles de auxina en la raíz mediante NPA no reveló diferencias en torno a la densidad total de raíces laterales para ambas líneas (figura 11), dando cuenta de que la percepción de auxina en la línea pérdida de función de *bZIP25* es equivalente al de la línea silvestre.

Por otro lado, cambios en los niveles de auxina o alteraciones en la percepción de auxina repercuten, además, sobre la expresión de genes de respuesta a auxina que pueden ser detectados en análisis de expresión génica global (Huang, Y. y col., 2008). El transcriptoma de *bzip25-2* en comparación a la línea silvestre fue determinado durante la tesis doctoral de Lorena Pizarro (2015). Dentro de los genes que se expresan diferencialmente en la línea pérdida de función de *bZIP25* no se encuentran los principales genes de respuesta a auxina (Nemhauser, J. y col., 2006) y tampoco se detectan cambios en genes asociados a la señalización de otras de las principales hormonas conocidas en plantas. Puntualmente, se detectó que los niveles de transcritos de un putativo transportador de auxina "PILS1 (PIN-LIKES 1)" se encuentran aumentados en *bzip25-2*. Las proteínas PILS localizan en el retículo endoplasmático y contribuyen a la homeostasis de auxina determinando su distribución intracelular (Barbez, E. y col., 2012; Feraru, E. y col., 2012). Normalmente PILS1 no se expresa en plántulas silvestres, su expresión se limita a órganos florales en plantas adultas (Barbez, E. y col., 2012) por lo que detectamos una expresión anormal de PILS1 en plántulas *bzip25-2*. A la fecha no existen reportes de líneas pérdida de función de este putativo transportador de auxina, pero se mostró que la sobre-expresión de PILS1

gatilla plantas enanas con una configuración arbustiva de la región fotosintéticamente activa, con serios problemas en el desarrollo floral, lo que conduce a que estas líneas sean infértiles (Barbez, E. y col., 2012). Además, la expresión ectópica de PILS1 en la raíz, a través de un promotor específico de este tejido, inhibe el crecimiento de los pelos radiculares (Bardez, E. y col., 2012). Ninguno de estos fenotipos, propios de mayores niveles de expresión de PILS1, están presentes en la línea *bzip25-2*, por lo que nuestras observaciones ante la pérdida de función de bZIP25 no son consecuencia del aumento de la expresión de este putativo transportador de auxina.

De manera integrada los datos muestran que las modificaciones del SR ante la pérdida de función de bZIP25 no derivan de defectos en la homeostasis o señalización de auxina.

6.3.- La aceleración del tráfico endocítico en dirección a la Vacuola determina los cambios en el Sistema Radicular observados en *bzip25-2*

6.3.1.- La Endocitosis Mediada por Clatrina participa en el desarrollo de raíces laterales

La internalización de MP es de suma importancia en múltiples aspectos del desarrollo y la fisiología de la planta (Surpin, M. & Raikhel, N., 2004; Pizarro, L. & Norambuena, L., 2014). En particular la Endocitosis Mediada por Clatrina (EMC) regula la abundancia de proteínas a dos niveles: la MP y en los EE/TGN, participando de este modo en procesos de señalización y redireccionamiento de proteínas a otros compartimientos dentro del Sistema de Endomembranas (Chen, X. y col., 2011). Nosotros reportamos que la pérdida de función de bZIP25 altera la sensibilidad al inhibidor de la EMC Tirfostina A23 (TyrA23). Para bloquear completamente la EMC en

bzip25-2 se requieren concentraciones más altas de TyrA23 en comparación a la línea silvestre (figura 15). Adicionalmente, *bzip25-2* presenta mayores niveles de transcritos de la cadena liviana de clatrina *CLC2* (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015). Se ha establecido que durante la EMC la cadena liviana de clatrina comanda el ensamblaje de la maquinaria que permite la internalización de MP (Wilbur, J. y col., 2010). Con base en estos antecedentes es posible postular que aceleración de la endocitosis en *bzip25-2* es resultado de una robustecida EMC sustentada en mayores niveles de componentes que participan de esta vía de tráfico, lo que conduce a una menor sensibilidad al inhibidor TyrA23. En esta misma línea, la incapacidad de auxina para bloquear completamente la internalización de MP en *bzip25-2* observada a través del tratamiento con IAA o NAA (figuras 11 y 12) tiene relación con el refuerzo de la EMC que es blanco de auxina (Robert, S. y col., 2010), por tanto, se espera que en tratamiento con mayores concentraciones de las auxinas utilizadas la inhibición de la internalización de MP en *bzip25-2* alcance el fenotipo observado en plántulas silvestres. Sin embargo, para validar este postulado es necesario evaluar la expresión del resto de la maquinaria requerida en la EMC.

Por otro lado, durante la citoquinesis en células vegetales el tráfico vesicular dependiente de clatrina es redirigido al plano de división, particularmente, se ha mostrado que la cadena liviana de clatrina *CLC2* es blanco del redireccionamiento (Van Damme, D. y col., 2011). Las vesículas en el plano de división forman un compartimiento transitorio denominado placa celular que sustenta la separación entre las nuevas células y guía la deposición de la pared celular (Montagnac, G. y col., 2008). En *bzip25-2* el Sistema Radicular crece aceleradamente respecto a la línea silvestre. Nuestras observaciones a simple vista indican que en el ápice de la raíz de ambas

líneas los tamaños celulares no presentan diferencias, por lo que el crecimiento del sistema de raíces en *bzip25-2* debe estar sustentado en la aceleración coordinada de dos procesos: división celular y crecimiento celular. En cuanto a la división celular, los mayores niveles de EMC sugeridos ante la pérdida de función de bZIP25 son coherentes a la maquinaria celular requerida para sostener el crecimiento en base a división celular.

En cuanto a la organogénesis de raíces laterales, a la fecha no existen reportes que muestren que la inducción de la EMC impacta en el desarrollo de estos órganos. En sentido inverso se ha mostrado que la pérdida de función de dos de las tres cadenas livianas de clatrina que codifica el genoma de *Arabidopsis* decrece el nivel de internalización de proteínas de MP entre las que se cuentan los facilitadores de flujo de auxina, proteínas PIN, gatillando múltiples defectos asociados a la percepción de auxina, entre ellos la disminución en la densidad de raíces laterales (Wang, C. y col., 2013). Sin embargo, previamente mostramos que la pérdida de función de bZIP25 no conduce a defectos en la señalización o en la percepción de auxina. Si bien las proteínas PIN son blanco de internalización a través de la EMC están sometidas al reciclaje endocítico de manera constitutiva (Kleine-Vehn, J. y col., 2008) por lo que es posible que en *bzip25-2* estas proteínas sean redirigidas a la MP de forma acelerada impidiendo la aparición de fenotipos propios de la alteración en la percepción de auxina. Para validar esto es necesario, por una parte evaluar el reciclaje endocítico en *bzip25-2* y, además, determinar la abundancia y distribución de las proteínas PIN en esta línea mutante. Sin embargo, y en sustento de esta hipótesis, nosotros mostramos que en la línea pérdida de función de bZIP25 existe una fuga de tráfico vesicular desde el cuerpo de BFA (compartimiento que surge como resultado del bloqueo del reciclaje endocítico)

en dirección a la Vacuola (figura 18), por lo que es probable que la fuga vesicular esté también redirigiendo material de tráfico a la MP.

Nuestros resultados muestran que la EMC es importante para el desarrollo de raíces laterales. En plántulas silvestres la inhibición de la EMC impacta en la emergencia de la raíz lateral, no así en el número de primordios observados. Por otro lado, *bzip25-2* es insensible a la inhibición de la emergencia producto de la inhibición de la EMC, sin embargo, disminuyen los primordios de raíz lateral (figura 14B y 14C). Desde la destinación celular que da comienzo al proceso de desarrollo de una raíz lateral hasta la emergencia de estos órganos a través la Raíz Principal (RP) se suceden múltiples etapas de proliferación y crecimiento celular (Péret, B. y col., 2009). Como hemos mencionado la división celular en plantas requiere de la EMC, por lo que una posible explicación a la disminución en la emergencia de raíces laterales en plántulas silvestres, pero no en *bzip25-2*, puede ser resultado de un retraso en el desarrollo del primordio, quedando en etapas tempranas (figura 1), al estar restringida la EMC requerida para la citoquinesis.

Por otro lado, la inhibición de la EMC también puede estar afectando el desarrollo de primordios. En plántulas silvestres la disminución en la densidad de raíces laterales emergidas sostiene la caída en la densidad de primordios observada, pues los primordios se encuentran aún restringidos a la RP. Por otro lado, en *bzip25-2* los primordios existentes continúan el desarrollo hacia la emergencia, pero no se originan primordios nuevos, por lo que observamos la caída del parámetro densidad de primordios para la línea mutante (figura 14C). Por lo tanto, la EMC cumple un papel en la iniciación de primordios tanto como en la emergencia. Para validar estos supuestos

es necesario realizar un estudio detallado del estado de desarrollo de las raíces laterales (figura 1) en plantas silvestres y *bzip25-2* ante la inhibición de la EMC.

6.3.2.- El tráfico a la Vacuola es requerido para el desarrollo de raíces laterales en *bzip25-2*

Los cambios fisiológicos que se observan en una planta son consecuencia de la adecuada integración de señales ambientales (Malamy, J. 2005). El Sistema Radicular, por ejemplo, puede alcanzar múltiples configuraciones dependiendo de los tipos y concentraciones de nutrientes que se encuentren disponibles (Gruber, B. y col., 2013). Algunos de estos nutrientes son censados a través de transportadores específicos a nivel de la MP, los que son blancos de internalización por medio de la EMC y dirigidos a la Vacuola para degradación como parte de la vía de señalización de la que son parte (Takano, J. y col., 2010; Barberon, M. y col., 2011). Esta evidencia muestra que el tráfico endocítico desde MP a la Vacuola activamente participa en la integración de señales que impactan en el crecimiento y desarrollo de una planta.

Nuestros resultados revelan que en presencia de la droga Brefeldina A (BFA), un disruptor del tráfico entre la PM y los EE/TGN, la densidad total de raíces laterales se ve menguada drásticamente en la línea silvestre y la línea pérdida de función de *bZIP25*, sin embargo, en presencia de la droga *bzip25-2* presenta una densidad total de raíces laterales significativamente mayor que la línea silvestre (figura 16). Particularmente, BFA impide el reciclaje endocítico gatillando la formación de un compartimiento citoplasmático integrado por el colapso de múltiples endosomas denominado cuerpo de BFA (Lam, S. y col., 2009; Löffke, C. y col., 2015). En células de la raíz de plántulas *bzip25-2* se reportó la formación acelerada del cuerpo de BFA

congruente a la aceleración en la internalización de MP en esta línea (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015). Aquí mostramos, además, que durante la formación del cuerpo de BFA en *bzip25-2* (a través del seguimiento de la internalización del trazador FM4-64) se establecen varias estructuras tempranas, o cuerpos de BFA en formación, superiores en tamaño a endosomas tardíos, los que probablemente colapsan transcurrido el tiempo en un solo cuerpo de BFA (figura 17). La mayor sensibilidad celular a la droga en la línea pérdida de función de *bZIP25*, entendida como la aceleración en el establecimiento del cuerpo de BFA, contrasta con el fenotipo de raíces laterales observado a nivel de plántula completa. Considerando el impacto del tráfico a la Vacuola en diversos procesos fisiológicos evaluamos posibles fugas de tráfico de membrana desde el cuerpo de BFA en *bzip25-2*. Como esperábamos, membrana marcada con el trazador FM4-64 restringida al cuerpo de BFA alcanza la Vacuola de forma acelerada en la línea mutante (figura 18). Coherente a esta idea los cuerpos de BFA reportados en la línea mutante son menos definidos que los de la línea silvestre (figura 17 y 18) dando cuenta probablemente del escape de membrana a otros compartimientos. Si bien se han realizado importantes progresos en el conocimiento de la maquinaria responsable de la iniciación, patrón de desarrollo y emergencia de raíces laterales (todos eventos regulados por la señalización de auxina; Péret, B. y col., 2009) los eventos previos a la iniciación aún no se han dilucidado por completo. Interesantemente, se reportó la organogénesis de raíces laterales de manera independiente de la vía canónica de auxina, pero dependiente del tráfico endocítico en dirección a la Vacuola (Pérez-Henríquez, P. y col., 2012). Coherentemente, la mayor densidad total de raíces laterales en *bzip25-2* tratada con BFA es resultado de una mayor densidad de primordios (figura 16D), lo que en suma sugiere que en la línea mutante el tráfico a la Vacuola permite la organogénesis de raíces laterales.

Considerando estos análisis, sometimos a la línea pérdida de función de bZIP25 a la droga Sortin2, en presencia de la cual plántulas silvestres aumentan su densidad total de raíces laterales y a nivel celular se induce la internalización de MP en dirección a la Vacuola (Pérez-Henríquez, P. y col., 2012). La línea *bzip25-2* es sensible a la acción del compuesto, por lo que se observó un incremento en la densidad total de raíces laterales respecto a la condición control. Sin embargo, y de manera inesperada, la línea mutante es hipersensible a la droga superando la inducción de densidad total de raíces laterales observada en la línea silvestre (figura 19). Congruentemente a nivel celular la internalización del trazador FM4-64 a la Vacuola se ve acelerada en *bzip25-2* (figura 20). Nuestros datos sugieren que ante la pérdida de función de bZIP25 se refuerza la EMC, sin embargo, se desconoce que vías de tráfico en particular son moduladas en presencia de Sortin2, lo que puede conducir a la hipersensibilidad registrada para la línea mutante si se activan varias vías de tráfico importantes para el desarrollo de raíces laterales, pero no se ha indagado en como impactan en el Sistema Radicular.

Con objeto de acotar la relevancia del tráfico a la Vacuola en el desarrollo de raíces laterales en la línea pérdida de función de bZIP25 interrumpimos el tráfico entre los compartimientos prevacuolares y la Vacuola por medio de la droga Wortmanina (Wm). En presencia de la droga ambas líneas presentan un aumento en la densidad total de raíces laterales (figura 21B), sin embargo, en plántulas silvestres el aumento está asociado al aumento en la densidad de primordios (figura 21C), mientras que en *bzip25-2* no se observó un aumento directo en la densidad de raíces emergidas o en la densidad de primordios (figura 21C y 21D), por lo que suponemos que existe una inducción de ambos parámetros que tiene importancia biológica, pues en suma dan

cuenta de un cambio significativo de la densidad total de raíces laterales (figura 21B). Para la inducción de raíces laterales mediada por Sortin2 el tráfico entre compartimientos prevacuolares y la Vacuola es requerido (Pérez-Henríquez, P. y col. 2012), sin embargo, no es esencial en *bzip25-2*, resultado que se condice con la menor sensibilidad celular a Wm reportada en esta línea (Pizarro, L. tesis doctoral, 2015).

En suma los experimentos permiten determinar que el tráfico vesicular post EE/TGN en dirección a la Vacuola es relevante para el desarrollo de raíces laterales observado en *bzip25-2*, no obstante con los experimentos realizados no es posible determinar si un compartimiento previo a la Vacuola cumple un rol central en el mecanismo de inducción de RL mediado por bZIP25.

6.4.- La expresión de bZIP25.1-GFP en la línea *bzip25-2* rescata el comportamiento de la línea silvestre

La base de datos TAIR (The Arabidopsis Information Resource) predice para el locus de *bZIP25* At3g54620 tres isoformas de empalme alternativo. Se detectaron dos de estas isoformas en plántulas silvestres (isoforma 1 y 2, bZIP25.1 y bZIP25.2, respectivamente) las que fueron clonadas (Realizado durante la unidad de investigación de Arantzazú Bidegain, estudiante Ingeniería en Biotecnología Molecular) y utilizadas para la transformación estable de plántulas silvestres y *bzip25-2* mediante el método de inmersión floral a través de *Agrobacterium tumefaciens* (Sparkes, I. y cols. 2006). Por lo tanto, se espera que en plántulas de *Arabidopsis* la función de bZIP25 esté mediada por las isoformas bZIP25.1 y bZIP25.2, en esta tesis se evaluó la función de bZIP25.1 logrando revertir los fenotipos asociados a la pérdida de función de bZIP25 en la mutante *bzip25-2*, lo que nos permite otorgar a esta isoforma las funciones asociadas a

la regulación negativa de la endocitosis y del desarrollo de raíces laterales. La función desempeñada por bZIP25.2 no ha sido determinada, sin embargo, sería interesante de analizar pues esta isoforma corresponde a una proteína de menor tamaño correspondiente mayoritariamente al dominio de cierre de leucina C, característico de los bZIP del tipo C (Pizarro, L., tesis doctoral, 2015). Por lo tanto, esta isoforma podría tener funciones distintas a la isoforma 1, incluyendo un cambio de afinidad por los factores de transcripción del tipo bZIP-S1 y C con los cuales bZIP25 forma heterodimeros funcionales.

La regulación de la expresión génica por parte de los factores de transcripción bZIP25 depende de su dimerización (Landschulz, W. y cols., 1988). Se ha mostrado particularmente para bZIP25 la prevalencia de la heterodimerización por sobre la homodimerización durante la modulación de la transcripción (Ehlert, A. y col., 2006; Weltmeier, F. y col., 2006). La sobre-expresión de bZIP25.1-GFP sugiere que las interacciones de heterodimerización asociadas a bZIP25 son específicas, pues los fenotipos observados en la línea mutante *bzip25-2* son rescatados en presencia de la proteína de fusión, y además, no se observan nuevos fenotipos, los que podrían resultar de hetero interacciones favorecidas por los niveles de proteína bZIP25.1-GFP disponibles a nivel celular.

CONCLUSIONES

Los resultados presentados y discutidos en este trabajo permiten establecer como principales conclusiones:

1. bZIP25 es un regulador negativo del desarrollo del Sistema Radicular. Su papel en el desarrollo de raíces laterales estaría comandado por la internalización de una señal que es dirigida a la Vacuola, y que es internalizada mediante Endocitosis Mediada por Clatrina.
2. El papel de bZIP25 en el desarrollo de raíces laterales no se relaciona con cambios en los niveles y/o sensibilidad a auxinas.
3. La isoforma de bZIP25, bZIP25.1 fusionada a GFP es una proteína funcional que se localiza en el núcleo capaz de rescatar los fenotipos observados en la línea pérdida de función de bZIP25, *bzip25-2*.

PROYECCIONES

Con objeto de establecer directamente la relación entre la Endocitosis Mediada por Clatrina y el desarrollo de raíces laterales modulado por bZIP25 es informativo generar líneas de mutantes múltiples para *bZIP25* y las cadenas livianas de clatrina que se expresan normalmente en la raíz de *Arabidopsis*.

El desarrollo de raíces laterales y la internalización de MP debe ser estudiado en la línea que sobre-expresa *bZIP25.1-GFP* en presencia de Brefeldina A y Sortin2. Estos experimentos son claves para determinar si el tráfico endocítico en dirección a la Vacuola es responsable del desarrollo diferencial de raíces laterales observado en la línea pérdida de función de bZIP25, *bzip25-2*.

Con objeto de descartar de forma directa un desbalance hormonal en la línea mutante *bzip25-2* y sobre-expresora de *bZIP25.1-GFP* es necesario establecer un perfil hormonal de ambas en contraste a la línea silvestre.

Estudiar el impacto de la expresión de la isoforma bZIP25.2 en la línea mutante *bzip25-2*.

Finalmente, es interesante determinar los compañeros de dimerización de bZIP25 que dan cuenta de los fenotipos observados en esta investigación. bZIP25 heterodimeriza con factores de transcripción del tipo S1 de la familia bZIP: bZIP53, bZIP44, bZIP2, bZIP11 y bZIP1 (Ehlert, A. y col., 2006) por lo que líneas mutantes de estos factores de transcripción son un buen blanco de análisis.

BIBLIOGRAFIA

- Atta, R., Laurens, L., Boucheron-Dubuisson, E., Guivarch, A., Camero, E., Giraudat-Pautot, V., Rech, P., Chriqui, D. (2009) Pluripotency of Arabidopsis xylem pericycle underlies shoot regeneration from root and hypocotyl explants grown in vitro. *Plant J.* 57(4):626-644.
- Banbury, N., Oakley, J., Sessions, R., Banting, G. (2003) Tyrphostin A23 inhibits internalization of the transferring receptor by perturbing the interaction between tyrosine motifs and the medium chain subunit of the AP-2 adaptor complex. *J. Biol. Chem.* 278: 12022–12028.
- Baster, P., Robert, S., Kleine-Vehn, J., Vanneste, S., Kania, U., Grunewald, W., De Rybel, B., Beeckman, T., Friml, J. (2013) SCF(TIR1/AFB)-auxin signalling regulates PIN vacuolar trafficking and auxin fluxes during root gravitropism. *EMBO J.* 32(2):260-274.
- Barbez, E., Kubeš, M., Rolčík, J., Béziat, C., Pěňčík, A., Wang, B., Rosquete, M., Zhu, J., Dobrev, P., Lee, Y., Zažímalová, E., Petrášek, J., Geisler, M., Friml, J., Kleine-Vehn, J. (2012) A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature* 485(7396):119-122.
- Beemster, G., Baskin, T. (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* 116(4):1515-26.
- Boerjan, W., Cervera, M., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Van Onckelen, H., Van Montagu, M., Inzé, D. (1995) Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7(9): 1405–1419.
- Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N., Satiat-Jeunemaitre, B. (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J Microsc.* 214(Pt 2):159-173.
- Calderón Villalobos, L., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S., Estelle, M. (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol.* 8(5):477-85.
- Cardozo, T., Pagano, M. (2004) The SCF ubiquitin ligase: Insights into a molecular machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:739-751.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., Bennett, M. (2003) Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8(4):165-171.
- Cederholm, H., Iyer-Pascuzzi, A., Benfey, P. (2012) Patterning the primary root in Arabidopsis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 1(5):675-691.
- Chen, X., Irani, N., Friml, J. (2011) Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Curr Opin Plant Biol.* 14(6):674-682.

- Chen, X., Naramoto, S., Robert, S., Tejos, R., Löffke, C., Lin, D., Yang, Z., Friml, J. (2012) ABP1 and ROP6 GTPase signaling regulate clathrin-mediated endocytosis in Arabidopsis roots. *Curr Biol.* 22(14):1326-1332.
- Corrêa, L., Riaño-Pachón, D., Schrago, C., dos Santos, R., Mueller-Roeber, B., Vincentz M. (2008) The role of bZIP transcription factors in green plant evolution: adaptive features emerging from four founder genes. *PLoS One* 3(8):e2944.
- Contento, A., Bassham, D. (2012) Structure and function of endosomes in plant cells. *J. Cell Sci.* 125:3511-3518.
- DaSilva, L., Taylor, J., Hadlington, J., Hanton, S., Snowden, C., Fox, S., Foresti, O., Brandizzi, F., Denecke, J. (2005) Receptor salvage from the prevacuolar compartment is essential for efficient vacuolar protein targeting. *Plant Cell* 17: 132–148.
- Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D., Mravec, J., Stierhof, Y., Friml J. (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol.* 17(6):520-527.
- Delarue, M., Prinsen, E., Onckelen, H., Caboche, M., Bellini, C. (1998) Sur2 mutations of Arabidopsis thaliana define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant J.* 14(5):603-11.
- Dettmer, J., Hong-Hermesdorf, A., Stierhof, Y., Schumacher, K. (2006) Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* 18(3):715–730.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., Scheres, B. (1993) Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* 119(1):71-84.
- Ehlert, A., Weltmeier, F., Wang, X., Mayer, C., Smeekens, S., Vicente-Carbajosa, J., Dröge-Laser, W. (2006) Two-hybrid protein-protein interaction analysis in Arabidopsis protoplasts: establishment of a heterodimerization map of group C and group S bZIP transcription factors. *Plant J.* 46(5):890-900.
- Feraru, E., Vosolsobě, S., Feraru, M., Petrášek, J., Kleine-Vehn, J. (2012) Evolution and Structural Diversification of PILS Putative Auxin Carriers in Plants. *Front Plant Sci.* 3:227.
- Friml, J. (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol.* 6(1):7-12.
- Fu, X., Harberd, N. (2003) Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* 42:740-743.
- 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. *Plant J.* 29(2):153-168.
- Fukaki, H., Tasaka M. (2009) Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Mol Biol.* 69(4):437-449.

- Geldner, N., Anders, N., Wolters, H., Keicher, J., Kornberger, W., Müller, P., Delbarre, A., Ueda, T., Nakano, A., Jürgens, G. (2003) The Arabidopsis GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell* 112(2):219-230.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y., Jürgens, G., Palme K. (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature* 413(6854):425-428.
- Gray, W., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O., Estelle, M. (2001) Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* 414(6861):271-276.
- Gou, J., Strauss, S., Tsai, C., Fang, K., Chen, Y., Jiang, X., Busov, V. (2010) Gibberellins regulate lateral root formation in *Populus* through interactions with auxin and other hormones. *Plant Cell* 22(3):623-639.
- Gruber, B., Giehl, R., Friedel, S., von Wirén, N. (2013) Plasticity of the Arabidopsis root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 163(1):161-179.
- Huang, Y., Chang, Y., Hsu, J., Chuang, H. (2008) Transcriptome analysis of auxin-regulated genes of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. 420(2):118-124.
- Hull, R., Harper, G., Lockhart, B. (2000) Viral sequences integrated into plant genomes. *Trends Plant Sci.* 5(9):362-365.
- Ivanov, V., Dubrovsky, J. (2013) Longitudinal zonation pattern in plant roots: conflicts and solutions. *Trends Plant Sci.* 18(5):237-243.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F.; bZIP Research Group. (2002) bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* 7(3):106-111.
- Jürgens, G. (2003) Growing up green: cellular basis of plant development. *Mech Dev.* 120(11):1395-1406.
- Kamimoto, Y., Terasaka, K., Hamamoto, M., Takanashi, K., Fukuda, S., Shitan, N., Sugiyama, A., Suzuki, H., Shibata, D., Wang, B., Pollmann, S., Geisler, M., Yazaki, K. (2012) Arabidopsis ABCB21 is a facultative auxin importer/exporter regulated by cytoplasmic auxin concentration. *Plant Cell Physiol.* 53(12):2090-2100.
- Katzen F. (2007) Gateway® recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov.* 2(4):571-589.
- Kirchhausen, T., Owen, D., Harrison, S. (2014) Molecular structure, function, and dynamics of clathrin-mediated membrane traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6(5):a016725.
- Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P., Wiśniewska, J., Paciorek, T., Benková, E., Friml, J. (2008) ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in Arabidopsis. *Curr Biol.* 18(7):526-531.
- Koornneef, M., Meinke, D. (2010) The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J.* 61(6):909-921.

- Nemhauser, J., Hong, F., Chory, J. (2006) Different plant hormones regulate similar processes through largely non overlapping transcriptional responses. *Cell* 126(3):467-475.
- Ortiz-Zapater, E., Soriano-Ortega, E., Marcote, M., Ortiz-Masia, D., Aniento, F. (2006) Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. *Plant J.* 48: 757–770.
- Paciorek, T., Zazimalová, E., Ruthardt, N., Petrášek, J., Stierhof, Y., Kleine-Vehn, J., Morris, D., Emans, N., Jürgens, G., Geldner, N., Friml, J. (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature* 435(7046):1251-1256.
- Pedrazzini, E., Komarova, N., Rentsch, D., Vitale A. (2013) Traffic routes and signals for the tonoplast. *Traffic* 14(6):622-628.
- Parizot, B, Laplaze, L., Ricaud, L., Boucheron-Dubuisson, E., Bayle, V., Bonke, M., De Smet, I., Poethig, S., Helariutta, Y., Haseloff, J., Chriqui, D., Beeckman, T., Nussaume, L. (2008) Diarch symmetry of the vascular bundle in *Arabidopsis* root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation. *Plant Physiol.* 146(1):140-148.
- Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, J., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., Bennett, M. (2009) *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14(7):399-408.
- Pérez-Henríquez, P., Raikhel, N., Norambuena, L. (2012) Endocytic Trafficking towards the Vacuole Plays a Key Role in the Auxin Receptor SCFTIR-Independent Mechanism of Lateral Root Formation in *A. thaliana*. *Mol. Plant* 5(6):1195-209.
- Petrášek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J., Abas, M., Seifertová, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanová, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benková, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O., Fink, G., Geisler, M., Murphy, A., Luschnig, C., Zazimalová, E., Friml, J. (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312(5775):914-918.
- Pizarro, L., Norambuena, L. (2014) Regulation of protein trafficking: posttranslational mechanisms and the unexplored transcriptional control. *Plant Sci.* 225:24-33.
- Pizarro, L. (2015) Tesis Doctoral: "Identificación y estudio funcional de factores de transcripción que regulan la expresión de genes del sistema de endomembranas en *Arabidopsis thaliana*". Director Dra. Lorena Norambuena. Co-director: Dra. Victoria Guixé.
- Rahman, A., Bannigan, A., Sulaman, W., Pechter, P., Blancaflor, E., Baskin, T. (2007) Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Plant J.* 50(3):514-528.
- Ramireddy, E., Chang L., Schmölling, T. (2014) Cytokinin as a mediator for regulating root system architecture in response to environmental cues. *Plant Signal Behav.* 9(1):e27771.

Lam, S., Cai, Y., Tse, Y., Wang, J., Law, A., Pimpl, P., Chan, H., Xia, J., Jiang, L. (2009) BFA-induced compartments from the Golgi apparatus and trans-Golgi network/early endosome are distinct in plant cells. *Plant J.* 60(5):865-881.

Landschulz, W., Johnson, P., McKnight, S. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240(4860):1759-1764.

Lara, P., Oñate-Sánchez, L., Abraham, Z., Ferrándiz, C., Díaz, I., Carbonero, P., Vicente-Carbajosa, J. (2003) Synergistic activation of seed storage protein gene expression in *Arabidopsis* by ABI3 and two bZIPs related to OPAQUE2. *J Biol Chem.* 278(23):21003-21011.

Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarch, S., Lucas, M., De Smet, I., Fukaki, H., Beeckman, T., Bennett, M., Laplaze, L. (2013) Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci.* 18(8):450-458.

Li, X., Zeng, R., Liao, H. (2015) Improving crop nutrient efficiency through root architecture modifications. *J Integr Plant Biol.* [Epub ahead of print].

Lin, D., Nagawa, S., Chen, J., Cao, L., Chen, X., Xu, T., Li, H., Dhonukshe, P., Yamamuro, C., Friml, J., Scheres, B., Fu, Y., Yang, Z. (2012) A ROP GTPase-dependent auxin signaling pathway regulates the subcellular distribution of PIN2 in *Arabidopsis* roots. *Curr Biol.* 22(14):1319-1325.

Löfke, C., Scheuring, D., Dünser, K., Schöller, M., Luschig, C., Kleine-Vehn, J. (2015) Tricho- and atrichoblast cell files show distinct PIN2 auxin efflux carrier exploitations and are jointly required for defined auxin-dependent root organ growth. *J Exp Bot.* 2015 66(16):5103-512.

Malamy, J. (2005) Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* 28: 67–77.

Malekpoor Mansoorkhani, F., Seymour, G., Swarup, R., Moeiniyan Bagheri, H., Ramsey, R., Thompson, A. (2014) Environmental, developmental, and genetic factors controlling root system architecture. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 30(1-2):95-112.

Mei, Y., Jia, W., Chu, Y., Xue, H. (2012) *Arabidopsis* phosphatidylinositol monophosphate 5-kinase 2 is involved in root gravitropism through regulation of polar auxin transport by affecting the cycling of PIN proteins. *Cell Res.* 22(3):581-597.

Montagnac, G., Echard, A., Chavier, P. (2008) Endocytic traffic in animal cell cytokinesis. *Curr Opin Cell Biol* 20:454–461.

Mounier, E., Pervent, M., Ljung, K., Gojon, A., Nacry, P. (2014) Auxin-mediated nitrate signalling by NRT1.1 participates in the adaptive response of *Arabidopsis* root architecture to the spatial heterogeneity of nitrate availability. *Plant Cell Environ.* 37(1):162-74.

- Richards, D., King, K., Ait-ali, T., Harberd, N. (2001) How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signalling. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:67–88.
- Rashotte, A., Brady, S., Reed, R., Ante, S., Muday, G. (2000) Basipetal auxin transport is required for gravitropism in roots of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122(2):481-490.
- Reed, R., Brady, S., Muday, G. (1998) Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118(4):1369-1378.
- Richter, S., Voss, U., Jürgens, G. (2009) Post-Golgi traffic in plants. *Traffic* 10(7):819-828.
- Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Čovanová, M., Hayashi, K., Dhonukshe, P., Yang, Z., Bednarek, S., Jones, A., Luschnig, C., Aniento, F., Zažímalová, E., Friml, J. (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell* 143(1):111-121.
- Robbins, N., Dinneny, J. (2015) The divining root: moisture-driven responses of roots at the micro- and macro-scale. *J Exp Bot.* 66(8):2145-2154.
- Robinson, D., Jiang, L., Schumacher, K. (2008) The Endosomal System of Plants: Charting New and Familiar Territories. *Plant Physiol.* 147(4): 1482–1492.
- Ruiz-Herrera, L., Shane, M., López-Bucio, J. (2015) Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 4(4):431-443.
- Savaldi-Goldstein, S., Baiga, T., Pojer, F., Dabi, T., Butterfield, C., Parry, G., Santner, A., Dharmasiri, N., Tao, Y., Estelle, M., Noel, J., Chory J. (2008) New auxin analogs with growth-promoting effects in intact plants reveal a chemical strategy to improve hormone delivery. *PNAS* 105(39):15190-15195.
- Satbhai, S., Ristova, D., Busch, W. (2015) Underground tuning: quantitative regulation of root growth. *J Exp Bot.* 66(4):1099-1112.
- Schmidt, R., Ketudat, M., Aukerman, M., Hoschek, G. (1992) Opaque-2 is a transcriptional activator that recognizes a specific target site in 22-kD zein genes. *Plant Cell* 4(6):689-700.
- Shimizu-Mitao, Y., Kakimoto, T. (2014) Auxin sensitivities of all *Arabidopsis* Aux/IAAs for degradation in the presence of every TIR1/AFB. *Plant Cell Physiol.* 55(8):1450-1459.
- Surpin, M., Raikhel, N. (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(2):100-109.
- Takáč, T., Pechan, T., Šamajová, O., Ovečka, M., Richter, H., Eck, C., Niehaus, K., Šamaj, J. (2012) Wortmannin Treatment Induces Changes in *Arabidopsis* Root Proteome and Post-Golgi Compartments. *J. Proteome Res.* 11:3127–3142.

Tiwari, S., Hagen, G., Guilfoyle, T. (2004) Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* 16:533-543.

Tiwari, S., Wang, X., Hagen, G., Guilfoyle, T. (2001) AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell* 13: 2809-2822.

Tomas, A., Paque, S., Stierlé, V., Quettier, A., Muller, P., Lechner, E., Genschik, P., Perrot-Rechenmann, C. (2013) Auxin-binding protein 1 is a negative regulator of the SCF(TIR1/AFB) pathway. *Nat Commun.* 4:2496.

Uehara, T., Okushima, Y., Mimura, T., Tasaka, M., Fukaki, H. (2008) Domain II mutations in CRANE/IAA18 suppress lateral root formation and affect shoot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 49(7):1025-1038.

Van Damme, D., Gadeyne, A., Vanstraelen, M., Inzé, D., Van Montagu, M., De Jaeger, G., Russinova, E., Geelen, D. (2010) Adaptin-like protein TPLATE and clathrin recruitment during plant somatic cytokinesis occurs via two distinct pathways. *PNAS* 108(2):615-620.

Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P., Friml, J. (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.* 12(4):160-168.

Vilches-Barro, A., Maizel, A. (2015) Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol.* 23:31-38.

Wang, C., Yan, X., Chen, Q., Jiang, N., Fu, W., Ma, B., Liu, J., Li, C., Bednarek, S., Pan, J. (2013) Clathrin light chains regulate clathrin-mediated trafficking, auxin signaling, and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25(2):499-516.

Watahiki, M., Yamamoto, K. (1997) The massugu1 mutation of *Arabidopsis* identified with failure of auxin-induced growth curvature of hypocotyl confers auxin insensitivity to hypocotyl and leaf. *Plant Physiol.* 115(2):419-426.

Weltmeier, F., Rahmani, F., Ehlert, A., Dietrich, K., Schütze, K., Wang, X., Chaban, C., Hanson, J., Teige, M., Harter, K., Vicente-Carbajosa, J., Smeekens, S., Dröge-Laser, W. (2009) Expression patterns within the *Arabidopsis* C/S1 bZIP transcription factor network: availability of heterodimerization partners controls gene expression during stress response and development. *Plant Mol Biol.* 69(1-2):107-119

Wilbur, J., Hwang, P., Ybe, J., Lane, M., Sellers, B., Jacobson, M., Fletterick, R., Brodsky, F. (2010) Conformation switching of clathrin light chain regulates clathrin lattice assembly. *Dev Cell.* 18(5): 841-848.

Yang, X., Lee, S., So, J., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R., Hobbie, L., Estelle, M. (2004) The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCF(TIR1). *Plant J.* 40(5):772-82.

Zenser, N., Ellsmore, A., Leasure, C., Callis, J. (2001) Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *PNAS* 98:11795-11800. Zouhar, J., Hicks, G., Raikhel, N.

(2004) Sorting inhibitors (sortins): chemical compounds to study vacuolar sorting in Arabidopsis. PNAS 101: 9497 – 950.

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S., Niu, Q., Chua, N. (2006) Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana using the floral dip method. Nat Protoc. 1(2):641-646.

Zhao, Y., Christensen, S., Fankhauser, C., Cashman, J., Cohen, J., Weigel, D., Chory, J. (2001) A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. Science 291(5502):306-309.