

UCH-FC
DOC-B
R 896
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS



Fosfatidilinositol fosfatos: reguladores de la formación de raíces laterales mediante la modulación del tráfico endocítico en *Arabidopsis thaliana*

Por
Carlos Rubilar Hernández



Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología molecular, celular y neurociencias.

Julio, 2017
Santiago - Chile



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato:

Carlos Felipe Rubilar Hernández

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología molecular, celular y neurociencias en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 11 de Mayo del año 2017

Directora de tesis

Dra. Lorena Norambuena Morales

Comisión evaluadora

Dr. Marco Tulio Núñez (Presidente)

Dr. Michael Handford

Dr. Rodrigo Gutiérrez

Dr. Elías Utreras

Correo electrónico de contacto:
lnorambuena@uchile.cl (Directora de tesis),
cabemaru@gmail.com

BIOGRAFÍA



una grandiosa experiencia.

Mi vida comenzó un día 25 de Noviembre de 1986 en la ciudad de Santiago, capital de Chile. Soy fruto de mi mamá Viviana "Yuk" Hernández y mi papá Juan Carlos "Pepe" Rubilar, quienes con sus ejemplos de vida, empeño, consejos y profundo amor me han dado los valores con los cuales me muevo y me moveré en la vida. Pepes, los amo y admiro. Dos años después nació mi hermano Rodrigo, el Higuito, y sinceramente no sé cómo habría sido mi vida sin él. Mi hermano y yo nos criamos juntos en La Florida, Santiago, donde tuvimos una infancia muy buena. Lo amo y respeto muchísimo y espero que el nuevo paso que ha dado en la madurez junto a la Vale sea

Mi educación básica transcurrió desde el Colegio mixto "Victoria", una escuela muy pequeña, al inmenso Instituto Nacional "José Miguel Carrera", donde seguí mi formación hacia algo relacionado con la Biología. Sin tener mucho en claro, tomé la decisión a finales del 2004 de estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile. Es gratificante sentir que aunque el tiempo pase y también las distancias ya sean largas, el cariño que siento por mis amigos que hice en la carrera es fuerte y potente. Cito lo siguiente de mi antigua biografía: "tengo la convicción de que nos seguiremos juntando para reírnos de la vida y a darnos apoyo en los malos momentos" y cuán acertada es esta aseveración. Nos hemos lanzado por los diversos y desconocidos caminos de la ciencia: nos ha llevado y nos llevará por muchos lugares de Chile y el mundo. Alé!

He aquí ya casi terminado el Doctorado en Ciencias con mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias de la Universidad de Chile. Ha sido arduo el camino pero a la vez fue muy enriquecedor, me ha formado humana y científicamente; era lo que quería. Me ha llevado a mis límites, pero es satisfactorio sentir que ha valido la pena el esfuerzo. He aprendido el hacer ciencia y sentir que aún queda mucho por el cual aprender y enseñar me entrega entusiasmo para seguir adelante. La mayoría del proceso de convertirme en Doctor en Ciencias, la realicé en el Centro de Biología Molecular Vegetal. He visto pasar generaciones de personas con grandes cualidades humanas y científicas que han dejado huella en mi persona. En especial, quiero destacar entre ellas a mi tutora la Dra. Lorena Norambuena que me ha sabido guiar en este largo proceso, y a los ya Doctores en Ciencia Patricio Pérez y Lorena Pizarro por todo el apoyo, conversaciones científicas y de la vida, tecitos fríos, discusiones de seminarios, desmenuzados de artículos científicos y otros eventos de la vida científica. Me ha hecho tanto bien el discutir y contrastar visiones de lo que es la ciencia. La lógica dura, pero al mismo tiempo la pasión. Suena contradictorio, ¿no? Quedará para otra larga conversación. Los he visto partir a tierras lejanas, pero mis deseos están depositados en que construyan lo que deseen chiquillos Doctores, ustedes son increíblemente capaces.

Como ven, esta biografía ha pasado a ser más parecida a una de agradecimientos. Es verdad, estoy agradecido de lo que la vida me ha dado y espero poder retribuir de alguna manera todo lo bueno que me ha sido dado con lo que soy ahora y en el futuro. Optimismo sensato. ¿Qué será el mundo a mis 40 años? Ni siquiera puedo imaginármelo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas las personas con las que he compartido durante todo este proceso denominado organogénesis de la tesis doctoral. Bromas aparte, quisiera agradecer profundamente a mis “pepes”, mi mamá Viviana y mi papá Juan Carlos y también a mi hermano Rodrigo y su novia Valentina quienes me han apoyado de muchas formas distintas a lo largo de todo este largo proceso. También a los integrantes no humanos Valkirio y RuPaula por todo el cariño.

Quisiera agradecer a todo el Centro de Biología Molecular Vegetal donde he trabajado y me he formado durante casi una década. A los profesores Claudia Stange, Michael Handford, Lilliana Cardemil y mi tutora por contribuir en mi formación y generar un espacio para poder hacer ciencia básica que estudia organismos vegetales en Chile. A Angélica Vega, Sebastián Urbina y Carmen Morales por todo el apoyo técnico y humano que llevan a cabo en el Centro. En especial quisiera agradecer a todo el equipo de la Dra. Lorena Norambuena tanto los que han migrado como a los nuevos integrantes por todo el apoyo tanto profesional y personal que me han brindado en todos estos años. Aun creo sinceramente que sin ustedes yo no hubiera sido capaz de realizar esta tesis. A mi tutora, la Dra. Lorena Norambuena, por creer en que yo era capaz de realizar un trabajo doctoral. Por formarme a veces espartanamente en el ámbito del pensamiento lógico y científico e igual creyendo de que era capaz de ir más allá. También a Patito Pérez y Lorena Pizarro por contribuir en mi formación como persona y como científico lo cual está reflejado en este trabajo doctoral. Amigos, les estoy eternamente agradecido. A Ricardo Tejos, Cecilia Rodríguez y Analía Espinoza

por aportar con todas las críticas y observaciones tanto en el contenido como en la forma de este trabajo doctoral. También quiero agradecer expresamente a Stefania, Claudio, Sara y Mili por todo el apoyo y punto de vista que me han entregado con respecto al trabajo doctoral y también incluyendo a Carolina, Diego y Sebastián: gracias por brindarme su amistad, compartiendo su mundo conmigo.

También quisiera agradecer profundamente a los "Bioteks" (incluyéndote Yorka), ya amigos de la vida que nos hemos apoyado en la buenas y en las no tan buenas también. A seguir caminando juntos, gracias por haberse cruzado en mi vida y hacerla una mejor. También quisiera agradecer a mis amigos que he realizado a través del gran espectáculo musical/televisivo que es Eurovisión con las que hemos compartido la pasión, la inmensa alegría, algunas veces rabia y desazón (sí, sí casi es locura, lo admito) por el verdadero Festival de festivales.

Por último, agradezco a todos los profesores de la comisión evaluadora: Dr. Marco Tulio Núñez, Dr. Michael Handford, Dr. Rodrigo Gutiérrez, Dr. Ariel Orellana y Dr. Elías Utreras por sus pertinentes observaciones y su disposición a la hora de discutir los resultados de este trabajo doctoral. También quiero agradecer a las secretarías de Postgrado Janet, Inés y ahora Claudia, por ejecutar el proceso administrativo de esta tesis, organizar los avances y estar dispuestas a resolver las dudas que emergían sobre las etapas del programa de doctorado.

FINANCIAMIENTO

Para la realización de esta tesis de Doctorado se contó con el financiamiento ligado a la Comisión Nacional de la Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) a través del proyecto FONDECYT 1120289 dirigido por la Dra. Lorena Norambuena, las Becas de Doctorado nacional CONICYT 21120545 y de Asistencia a Eventos y Cursos Cortos para Estudiantes de Doctorado año 2012, 2014 y 2015. Además, se contó con el financiamiento ligado a la Universidad de Chile a través del proyecto VID Enlace Grant 2016ENLO15/16 UCH.

ÍNDICE DE MATERIAS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
FINANCIAMIENTO	v
ÍNDICE DE MATERIAS	vi
LISTADO DE FIGURAS	viii
LISTADO DE TABLAS	xi
LISTADO DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
1.- INTRODUCCIÓN.	1
1.1.- Las raíces laterales: órganos post-embriónicos de la raíz primaria.	1
1.2.- La fitohormona auxina como regulador de la organogénesis de las raíces laterales.	3
1.3.- La organogénesis de las raíces laterales como un evento fisiológico modulable: evidencia de una vía independiente del complejo nuclear SCF ^{TIR1/AFBs} en la inducción de la formación de raíces laterales.	4
1.4.- El tráfico endocítico hacia la vacuola: un posible regulador de la organogénesis de raíces laterales por una vía independiente del complejo receptor nuclear de auxina.	6
1.5.- Los Fosfatidilinositoles fosfato y su participación en el tráfico endocítico en plantas.	10
2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	13
2.1.- Hipótesis.	13
2.2.- Objetivo general.	13
2.3.- Objetivos específicos.	13
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.	14
3.1.- Material biológico vegetal.	14
3.2.- Esterilización y crecimiento de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .	14
3.3.- Cultivo de <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	16
3.4.- Obtención de <i>Escherichia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> competentes y transformación.	17
3.5.- Transformación estable en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	19
3.6.- Extracción de DNA genómico vegetal.	19
3.7.- Extracción de RNA vegetal y síntesis de cDNA.	20
3.8.- Genotipificación de la línea mutante <i>atvps34-1</i> .	22
3.9.- Amplificación y clonamiento de la secuencia codificante de <i>PI4KIIIβ1</i> .	22
3.10.- Tratamientos de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> con	24

compuestos químicos.	
3.11.- Evaluación de la organogénesis de raíces laterales.	26
3.12.- Evaluación del tráfico endocítico.	27
3.13.- Evaluación del patrón de distribución subcelular de PI4P y PI3P.	27
3.14.- Microscopía confocal y detección de marcadores fluorescentes.	27
3.15.- Análisis de datos y pruebas estadísticas.	29
4.- RESULTADOS.	30
4.1.- Evaluación de la participación de la actividad PI3K y PI4K en la formación de las raíces laterales inducida por Sortin2.	30
4.1.1.- Evaluación de la participación de la actividad PI4K en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.	32
4.1.2.- Evaluación <i>in vivo</i> del cambio de los niveles de fosfatidilinositol 4-fosfato provocado por Sortin2.	35
4.1.3.- Evaluación de la participación de la actividad PI3K en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.	46
4.1.4.- Evaluación <i>in vivo</i> del cambio de los niveles de fosfatidilinositol 3-fosfato provocado por Sortin2.	51
4.2.- Evaluación del papel fisiológico de la función de la fosfatidilinositol 3-quinasa y las fosfatidilinositol 4-quinasa en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.	54
4.2.1.- Evaluación de la participación de la subfamilia <i>PI4KIIIβ</i> de las PI4K en la formación de raíces laterales.	54
4.2.2.- Evaluación de la participación de AtVPS34, gen que codifica para la fosfatidilinositol 3-quinasa, en la formación de raíces laterales.	75
4.3.- Evaluación de la participación del tráfico endocítico dependiente de los niveles de fosfatidilinositol 4-fosfato en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.	79
4.3.1.- Evaluación de la importancia de la actividad PI4K en el tráfico endocítico inducido por la acción de Sortin2.	79
4.3.2.- Evaluación de la participación de <i>PI4KIIIβ1</i> y <i>PI4KIIIβ2</i> en el tráfico endocítico inducido por Sortin2.	90
5.- DISCUSIÓN.	95
6.- CONCLUSIONES.	111
7.- BIBLIOGRAFÍA.	113

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Tráfico endocítico hacia la vacuola en <i>Arabidopsis thaliana</i> .	8
Figura 2. Efecto de la inhibición de la actividad PI4K en la formación de raíces laterales.	33
Figura 3. Distribución subcelular del biosensor de PI4P en células de la raíz primaria bajo la exposición a Sortin2.	37
Figura 4. Cuantificación del reclutamiento del biosensor fluorescente de PI4P en la membrana plasmática y en compartimentos intracelulares en células de la raíz primaria bajo exposición a Sortin2.	39
Figura 5. Efecto de la inhibición de la actividad PI4K en la distribución subcelular del biosensor de PI4P en células de la raíz primaria expuesta a Sortin2.	41
Figura 6. Efecto de la inhibición de la actividad PI4K que reprime la formación de primordios inducida por Sortin2 en la distribución subcelular del biosensor de PI4P.	43
Figura 7. Cuantificación del reclutamiento del biosensor fluorescente de PI4P en la membrana plasmática y en los compartimentos intracelulares al inhibir la actividad PI4K en células de la raíz primaria bajo exposición a Sortin2.	45
Figura 8. Efecto de LY294002 en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.	48
Figura 9. Efecto de wortmanina en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.	50
Figura 10. Distribución subcelular del biosensor de PI3P en células de la raíz primaria de <i>Arabidopsis</i> bajo la exposición a Sortin2.	53
Figura 11. Evaluación del fenotipo de la raíz primaria de la línea con pérdida de función de <i>PI4KIIIβ1</i> y <i>PI4KIIIβ2</i> .	55

Figura 12. Evaluación de la formación de raíces laterales de la línea con pérdida de función de <i>PI4KIIIβ1</i> y <i>PI4KIIIβ2</i> .	58
Figura 13. Respuesta de la línea con pérdida de función de <i>PI4KIIIβ1</i> y <i>PI4KIIIβ2</i> a la inducción de raíces laterales promovida por Sortin2.	60
Figura 14. Respuesta de la línea con pérdida de función de <i>PI4KIIIβ1</i> y <i>PI4KIIIβ2</i> a la inducción de raíces laterales promovida por la aplicación exógena de la auxina NAA.	62
Figura 15. Rescate del defecto de la línea mutante con pérdida de función de <i>PI4KIIIβ1</i> y <i>PI4KIIIβ2</i> al administrar exógenamente PI4P.	64
Figura 16. Sensibilidad de la formación de raíces laterales en la línea con pérdida de función de <i>PI4KIIIβ1</i> y <i>PI4KIIIβ2</i> frente a la inhibición de la actividad PI4K.	67-68
Figura 17. Amplificación y subclonación de la secuencia codificante de <i>PI4KIIIβ1</i> en los vectores de amplificación en bacterias y de expresión constitutiva en plantas.	73
Figura 18. Evaluación de la arquitectura radicular de la línea heterocigota de pérdida de función del gen que codifica para una PI3K, <i>AtVPS34</i> .	76
Figura 19. Evaluación de la inducción de raíces laterales promovida por Sortin2 en la línea con pérdida de función de <i>AtVPS34</i> .	78
Figura 20. Efecto en el tráfico endocítico hacia la vacuola al inhibir la actividad PI4K que reprime la formación de primordios inducida por Sortin2.	80-81
Figura 21. Cuantificación de la cinética del tráfico endocítico gatillado por Sortin2 al inhibir la actividad PI4K que reprime la formación de primordios inducida por Sortin2.	84-85
Figura 22. Efecto en el tráfico endocítico hacia la vacuola al bloquear la actividad PI4K.	89

Figura 23. Evaluación del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillado por Sortin2 en la línea con pérdida de función de <i>PI4KIIIβ1</i> y <i>PI4KIIIβ2</i> .	91
Figura 24. Cuantificación de la cinética del tráfico endocítico gatillado por Sortin2 en la línea con pérdida de función de <i>PI4KIIIβ1</i> y <i>PI4KIIIβ2</i> .	93
Figura 25. Modelo de trabajo: posibles factores que participarían en el tráfico endocítico hacia la vacuola modulado por fosfatidilinositoles fosfato que estimula la formación de primordios inducida por Sortin2.	101
Figura 26. Metabolismo de Fosfatidilinositoles descrito en plantas.	106

LISTADO DE TABLAS

Tabla I. Patrón de digestión esperado de la secuencia codificante de <i>PI4KIIIβ1</i> .	74
Tabla II. Patrón de digestión esperado del vector pCR8- <i>PI4KIIIβ1</i> .	74
Tabla III. Patrón de digestión esperado del vector pGWB5- <i>PI4KIIIβ1</i> .	74

LISTADO DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y NOMENCLATURAS

+/-; +/-	Plántula heterocigota de inserto de T-DNA; plántula sin inserción de T-DNA.
µg/mL, mg/mL	Microgramos por mililitro; microgramo por mililitro.
AFB	F-Box de la señalización de auxina.
ANOVA	Análisis de la varianza.
ARF	Factor que responde a auxina.
Bz	Zona de ramificación de raíces laterales.
cm, mm, nm	Centímetro; milímetro; nanómetro.
CPV	Cuerpos pre-vacuolares.
D.O.₆₀₀	Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600nm.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNA, cDNA	Ácido desoxirribonucleico; ácido desoxirribonucleico complementario.
dNTPs	Desoxinucleótidos.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ER	Endosoma de reciclaje.
ETar.	Endosoma Tardío.
ETem.	Endosoma Temprano.
FM4-64	N-(3-trietilamoniopropil)-4-(6-(4-(dietilamino) fenil) hexatrienil)-piridinio dibromuro.
Fz	Zona de formación de raíces laterales.
g, mg, µg, ng	Gramo; miligramo; microgramo; nanogramo.
GTP	Guanosin trifosfato.
Kb, bp	Kilobase, par de base.
LB	Luria Broth.
min	Minuto.
mL, µL	Mililitro, microlitro.
mM, µM	Milimolar, micromolar.
MP	Membrana plasmática.
NAA	Ácido naftalenacético.
°C	Grados Celcius.
PAO	Óxido de Fenilarsina.
PC	Pared celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PH	Dominio de unión a PIs, <i>Plekstrin Homolog</i> .
PI	Fosfatidilinositol.
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa.
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato.
PI4K	Fosfatidilinositol 4-quinasa.
PI4KIIIβ	Fosfatidilinositol 4-quinasa tipo IIIβ.
PI4P	Fosfatidilinositol 4-fosfato.
RNA	Ácido Ribonucleico.

rpm	Revoluciones por minuto.
RTG	Red Trans-Golgi.
SCF	Complejo proteico conformado por Skp, Cullin y F-box.
SLR/IAA14	<i>Solitary root</i> /ácidoindolacético 14.
T-DNA	DNA de transferencia.
U	Unidad de actividad enzimática.
U.A.	Unidad Arbitraria de fluorescencia.
V	Volt.
v/v; p/v	Volumen por 100mL de solución; peso por 100mL de solución.
Wm	Wortmanina.
wt	Planta silvestre ecotipo Columbia-0.
YFP, eGFP	Proteína fluorescente amarilla; proteína fluorescente verde mejorada.
λ	Longitud de onda.

RESUMEN

Las raíces laterales son órganos post-embrionarios originados por la especificación de células del periciclo de la raíz primaria transformándose a células fundadoras de raíces laterales y posteriormente a un primordio de raíz lateral. Utilizando el compuesto químico Sortin2 se ha vinculado al tráfico endocítico hacia la vacuola como un factor importante en la formación de nuevos primordios de raíces laterales por una vía independiente del complejo receptor de auxina SCF^{TIR1/AFBs} diferenciándolo del mecanismo modulado por el plan endógeno de formación de raíces laterales. La formación de raíces laterales inducida por Sortin2 es reprimida por el inhibidor de la actividad enzimática PI3K y PI4K, Wortmanina. En este trabajo, estudiamos la participación de la actividad PI3K y PI4K en la formación de raíces laterales promovida por Sortin2 y su papel en el tráfico endocítico hacia la vacuola en *Arabidopsis thaliana*. Hemos mostrado que Sortin2 induce un cambio de los niveles de PI3P en el tonoplasto y de PI4P en la membrana plasmática y compartimientos intracelulares, posiblemente del tipo endosomas tempranos/Red Trans-Golgi. Además, la actividad PI3K – llevada a cabo por VPS34 – participa en la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2, mientras que las PI4K, PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2, son esenciales en este proceso. Se sugiere que PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2 son las actividades PI4K que son requeridas en el aumento transitorio de PI4P en las membranas subcelulares, participando en la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola ambos inducidos por Sortin2. Interesantemente PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2 también participan como reguladores negativos de la formación endógena de primordios de raíces laterales muy probablemente por su papel en el tráfico endocítico hacia la vacuola. En resumen,

hemos determinado que el tráfico endocítico hacia la vacuola regulado por *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* es un factor crítico en la inducción de la formación de primordios de raíces laterales por un mecanismo independiente de $SCF^{TIR1/AFBs}$. Además, se propone a PI4P como un factor importante que controla la formación de primordios de raíces laterales mediante un mecanismo inducido por la acción de Sortin2. La mayor importancia de las actividades PI quinasas en la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2 en comparación al del plan endógeno apoya que estos mecanismos serían distintos entre sí. El mecanismo modulado por Sortin2 podría ser activado por estímulos medioambientales contribuyendo a la respuesta de las plantas a este cambio para inducir la organogénesis de raíces laterales. Esto abre una nueva línea de investigación dentro del campo del tráfico de endomembranas y su impacto en la fisiología de *Arabidopsis thaliana* y en otros modelos vegetales.

ABSTRACT

Lateral roots are post-embryonic organs originated by the specification of primary root pericycle cells which became lateral root founder cells and then lateral root primordia. Using Sortin2, endocytic trafficking toward the vacuole has been linked as a crucial factor on the new lateral root primordia formation by an auxin complex receptor SCF^{TIR1/AFBs} - independent way which is different from the lateral root primordia formation controlled by the endogenous Arabidopsis body plan. Sortin2-induced lateral root formation is repressed by PI3K and PI4K enzymatic activities inhibitor, Wortmannin. In this work, we studied the involvement of these activities into Sortin2-induced lateral root formation and their role into the endocytic trafficking toward the vacuole in *Arabidopsis thaliana*. We have shown that Sortin2 changes PI3P levels into the tonoplast and PI4P levels at the plasma membrane and intracellular compartments, possibly TGN-like. Additionally, PI3K activity controlled by VPS34 participates into the Sortin2-induced primordia lateral root formation. Moreover, PI4KIIIβ1 and PI4KIIIβ2 are essential for this physiological process. It is suggested that PI4KIIIβ1 and PI4KIIIβ2 are the required PI4K activities to boost PI4P at plasma membrane and TGN participating on Sortin2-endocytic trafficking to the vacuole acceleration. However, PI4KIIIβ1 and PI4KIIIβ2 participate as negative regulators of endogenous lateral root primordia formation likely because of their role into endocytic trafficking toward the vacuole. Overall, we have stressed that endocytic trafficking towards the vacuole regulated by PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2 is a critical factor into lateral root primordia formation induced by a SCF^{TIR1/AFBs}-independent mechanism. Moreover, It is proposed PI4P is an important factor that controls lateral root primordia formation by the Sortin2-induced mechanism.

The greater importance of PI-kinase into Sortin2-induced lateral root primordia formation in comparison to endogenous lateral root primordia formation supports that both mechanisms are different each other. The Sortin2-induced mechanism might be activated by environmental stimuli contributing to plant response to this stimulus to induce lateral root organogenesis. This opens a new research area into endomembrane trafficking and its impact into *Arabidopsis thaliana* physiology and another plant species.

1.- INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos fotosintéticos sésiles con la extraordinaria capacidad de generar nuevos órganos a lo largo de su vida. El embrión contenido en la semilla presenta un cuerpo rudimentario que se compone de una o dos hojas embrionarias llamadas cotiledones, la radícula y un tejido conectivo entre estos dos órganos denominado hipocotilo. Al germinar el embrión, la radícula comienza a crecer en dirección del vector de gravedad y a diferenciarse conformando una raíz primaria, la cual es capaz de absorber el agua y los macro y micronutrientes desde el suelo. La raíz primaria presenta tres zonas de desarrollo desde su punta (extremo apical) hasta el hipocotilo (extremo basal): la zona meristemática, la zona de elongación y la zona de diferenciación. En esta última zona, las células han adquirido diferentes destinos celulares para conformar las diferentes capas concéntricas que componen la raíz primaria, las cuales son de lo más interno a lo más externo: la estela o haz vascular, el periciclo, la endodermis, la corteza y la epidermis que es la capa celular más externa de la raíz primaria y que está en contacto con la rizósfera.

1.1.- Las raíces laterales: órganos post-embriónicos de la raíz primaria.

En la zona de diferenciación cerca de la punta de la raíz primaria, se desarrollan órganos post-embriónariamente. Estos nuevos órganos se denominan raíces laterales, los cuales junto con la raíz primaria y los pelos radiculares constituyen el sistema radicular vegetal cuya función principal es la captación de agua y nutrientes desde el suelo. En la especie modelo dicotiledónea *Arabidopsis thaliana*, la organogénesis de raíces laterales es un proceso fisiológico que sigue un patrón ordenado que origina un

nuevo órgano de manera regular y alternada en relación a la raíz primaria. La organogénesis de las raíces laterales ha sido subdividida en cuatro etapas principales consecutivas entre sí: **preiniciación o priming**, el cual es definido por un plan endógeno que depende de una oscilación génica que ocurre en la zona de diferenciación cercana a la zona de elongación, activando las células del periciclo adyacente a uno de los polos xilemáticos del haz vascular, destinándolas a ser células fundadoras de raíces laterales; la **iniciación**, fase en la que estas células fundadoras sufren una división asimétrica anticlinal o perpendicular al eje mayor de simetría de la raíz primaria, originándose un primordio de raíz lateral constituido de una capa de células; el **desarrollo del primordio**, donde este primordio adquiere entre 2 a 7 capas celulares por sucesivas divisiones anticlinales y periclinales; y la **emergencia**, fase en la que el primordio de raíz lateral penetra la última capa de la raíz primaria y emerge constituyendo una raíz lateral emergida (Casimiro, I. et al., 2001; Petricka J. et al., 2012). Como la raíz primaria crece y las células fundadoras resultantes prosiguen su desarrollo, entonces las raíces laterales se encuentran separadas y opuestas entre sí a lo largo de la raíz primaria. Para estudiar de mejor manera las diferentes etapas de la organogénesis de raíces laterales, se ha propuesto dos zonas *de facto* en la raíz primaria que son determinadas por el grado de desarrollo de las raíces laterales (Dubrowsky, J. & Forde, B., 2012): la **zona de formación de raíces laterales** que comprende la sección de raíz primaria en el que el proceso de desarrollo en las primeras etapas de la organogénesis de raíces laterales genera un primordio de raíz lateral. En términos prácticos, se determina entre el primer primordio detectado y la primera raíz lateral emergida observada más apicales. Por su parte la **zona de**

ramificación corresponde al sector de la raíz primaria donde los primordios iniciados y desarrollados en la zona de formación pueden emerger de la raíz primaria. (Dubrowsky, J. & Forde, B., 2012). Esta zona está comprendida desde la primera raíz lateral emergida en la región más apical de la raíz primaria y el inicio del hipocotilo de *Arabidopsis*.

1.2.- La fitohormona auxina como regulador de la organogénesis de las raíces laterales.

Uno de los grandes moduladores de la organogénesis de las raíces laterales es la fitohormona auxina. Se ha evidenciado que la aplicación de auxina de manera exógena provoca una inducción en la formación de raíces laterales (Torrey, J., 1950; Casimiro, I. et al., 2001), en concordancia con que mutantes sobreproductoras de auxina presentan una sobreproliferación de raíces laterales emergidas (Boerjan, W., et al., 1995; Delarue, M. et al., 1998). A su vez, la inhibición del transporte polar de auxina y la pérdida de función de diferentes facilitadores que median el transporte de esta hormona en la raíz primaria afectan la iniciación, el desarrollo del primordio y la emergencia de raíces laterales (Casimiro, I. et al., 2001; Marchant, A., et al., 2002; Dubrowsky, J. et al., 2008; Swarup, K., et al., 2008; Marhavy, P. et al., 2013).

Auxina es percibida por el receptor nuclear F-box TIR1 (parte del complejo E3 ubiquitín-ligasa SCF^{TIR1}) y sus homólogos AFBs (Kepinski, S. & Leyser, O., 2005) cuya interacción media la degradación dependiente del proteosoma de diversas proteínas de la familia AUX/IAA represoras transcripcionales de factores de transcripción ARFs (Gray, W. et al., 2001). Un aumento en la respuesta transcripcional dependiente de auxina en

ciertas células del periciclo precede a la iniciación conducente a una raíz lateral (Dubrovski J., et al., 2008), en concordancia con que la oscilación génica que es crítica en el *priming* requiere del receptor nuclear de auxina TIR1 y AFB2 influyendo en la formación endógena de primordios de raíces laterales (Xuan, W. et al., 2015). A su vez, la degradación de los AUX/IAA SLR/IAA14 e IAA28 es clave en la iniciación de raíces laterales (Fukaki, H. et al, 2005; De Rybel, B. et al., 2010), en concordancia con que dos ARFs ARF7 y ARF19 en conjunto son requeridas en la organogénesis endógena de raíces laterales (Okushima, Y. et al., 2007). Por lo tanto, la evidencia indica que la activación de SCF^{TIR1/AFBs} dependiente de auxina – cuyo flujo es modulado por su transporte polar - estimula los eventos tempranos de organogénesis de raíces laterales a través de la activación transcripcional dependiente de los módulos AUX/IAA – ARFs. Se propone que auxina dirige el plan endógeno de la organogénesis de raíces laterales.

1.3.- La organogénesis de las raíces laterales como un evento fisiológico modulable: evidencia de una vía independiente del complejo nuclear SCF^{TIR1/AFBs} en la inducción de la formación de raíces laterales.

Las plantas producen endógenamente raíces laterales de manera cíclica controlada por la vía de señalización que activa la percepción de auxina dependiente de SCF^{TIR1/AFBs} (Xuan, W. et al, 2015). Sin embargo, ellas pueden modificar su arquitectura radicular frente a cambios en el medioambiente como por ejemplo la disponibilidad de micro y macronutrientes o también el estrés osmótico (Lima, J. et al.; 2010; Gruber, B. et al., 2013). En este sentido, la modulación de la iniciación de raíces laterales por exceso de hierro y carencia de fósforo depende del transporte polar de auxina en

Arabidopsis (Miura, K. et al., 2011; Li, G. et al., 2015). En concordancia, la señalización dependiente de SCF^{TIR1/AFBs} es clave en la inducción de la organogénesis promovida por la carencia de fosfato, en el que este estímulo activa la respuesta transcripcional dependiente del aumento de auxina (Pérez-Torres, CA. et al., 2008; Miura, K. et al., 2011). Además, se ha vinculado a TAR2, una enzima que participa en la biosíntesis de auxina, como regulador de la inducción de la emergencia de raíces laterales provocada por la carencia de nitrógeno en su forma de amonio o nitrato (Ma, W. et al., 2014). Por lo tanto, se ha propuesto que los estímulos del medioambiente son integrados al plan endógeno de la organogénesis de raíces laterales mediante la vía de señalización dependiente de SCF^{TIR1/AFBs} para así modularla positiva o negativamente.

Sin embargo, se ha publicado evidencia que sugiere la existencia de una vía independiente de la activación transcripcional que estimula el receptor nuclear de auxina TIR1/AFBs que participa en la inducción de la organogénesis de las raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Un estímulo que promueve la formación *de novo* de raíces laterales es el estímulo mecánico, esto es, doblar al menos transitoriamente la raíz primaria (Richter, G. et al, 2009). Esta inducción de raíces laterales no requiere de TIR1 (Richter, G. et al, 2009). Es más, este estímulo es independiente de los componentes río abajo de la vía que activa SCF^{TIR1/AFBs}, ARF7/ARF19, para inducir la organogénesis de raíces laterales (Ditengou, F. et al., 2008). El aumento de la salinidad y la exposición a glucosa promueven la organogénesis de las raíces laterales en *Arabidopsis* que son independientes del receptor de auxina TIR1 y no dependen del transporte polar de auxina (Buwaneshwar, M. et al., 2009; Zolla, G. et al., 2010; datos

del laboratorio), sugiriendo que la formación de raíces laterales podría ser modulada por una vía donde serían dispensables el complejo SCF^{TIR1/AFBs}.

Hemos descrito en nuestro laboratorio al compuesto químico sintético Sortin2 como un inductor de la formación de raíces laterales que altera el tráfico de proteínas en *Arabidopsis thaliana* (Zouhar, J. et al., 2004; Pérez-Henríquez, P. et al., 2012). Sortin2 provoca una inducción de los primeros estadios de la organogénesis de primordios y esta inducción ocurre tanto en la zona de formación como en la de ramificación de raíces laterales (Morales-Herrera, S., 2015; Pérez-Henríquez, P., 2016). Es más, Sortin2 induce *de novo* y localmente la organogénesis de primordios (Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C. et al., en revisión), por lo que proponemos que la acción de Sortin2 promueve un evento previo a la iniciación de raíces laterales. La pérdida de función genética y química de TIR1/AFBs y el transporte polar de auxina no afectan esta organogénesis (Pérez-Henríquez, P. et al., 2012; Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C. et al., en revisión). Por lo tanto, Sortin2 revela una vía diferente al plan endógeno de formación de raíces laterales que participa en la inducción de la organogénesis de raíces laterales en *Arabidopsis*.

1.4.- El tráfico endocítico hacia la vacuola: un posible regulador de la organogénesis de raíces laterales por una vía independiente del complejo receptor nuclear de auxina.

Sortin2 induce la organogénesis de raíces laterales por una vía independiente de SCF^{TIR1/AFBs}. A su vez, existe evidencia que sugiere que el estímulo mecánico, el estrés salino y/o la exposición a glucosa promueven la organogénesis de raíces laterales por

esta vía distintiva al receptor nuclear de auxina, por lo que es posible que estos estímulos - incluido Sortin2 - compartan componentes celulares-moleculares que participen en esta vía que puede modular la organogénesis de raíces laterales en *Arabidopsis*.

Uno de los procesos celulares compartidos que induce el estímulo de glucosa y el estrés salino es el tráfico endocítico (Leshem, Y. et al., 2007; Pérez-Henríquez, P. et al., 2012; Urano, D. et al., 2013). El tráfico endocítico (Figura 1) es una de las rutas del sistema de endomembranas. Comienza con la endocitosis o internalización de componentes macromoleculares que se encuentran en el medio extracelular y/o integrados en la membrana plasmática. Estos componentes son invaginados y mediante vesículas son dirigidos a compartimentos intracelulares denominados endosomas tempranos/Red Trans-Golgi para posteriormente ser dirigidos a la vacuola a través de los endosomas tardíos/Cuerpos pre-vacuolares o ser reciclados a la membrana plasmática (Reyes, F. et al., 2011; Norambuena, L. & Tejos, R., 2017).

En específico, se ha mostrado que la endocitosis inducida por glucosa del putativo receptor de glucosa – AtRGS1 – incide en la respuesta a glucosa tanto a nivel transcripcional como fisiológica (Urano, D. et al., 2013). A su vez, un aumento de la salinidad induce el tráfico endocítico (Leshem, Y. et al., 2007; Baral, A. et al., 2015), en la que la alteración de esta vía de tráfico - ya sea por inhibidores químicos como por la pérdida de función de participantes de esta ruta de tráfico -afecta la respuesta fisiológica vegetal a la exposición crónica al estrés salino (Mazel, A. et al., 2004; Leshem, Y. et al., 2007; Tian, M. et al., 2015).

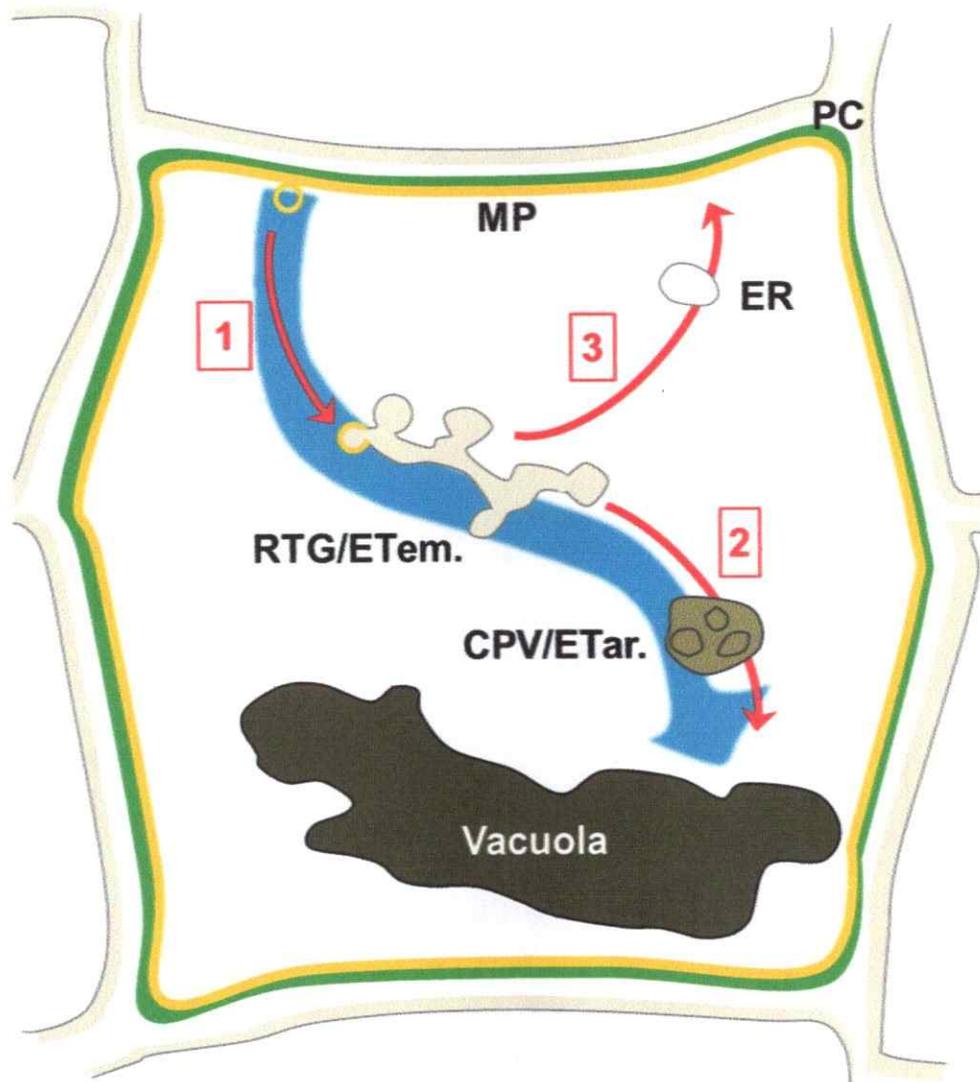


Figura 1. Tráfico endocítico hacia la vacuola en *Arabidopsis thaliana*. Representación esquemática que resume las rutas de tráfico más importantes que conforman el tráfico endocítico hacia la vacuola cuyo flujo es representado por la flecha curva celeste. Componentes residentes de la membrana plasmática (MP) son internalizados por endocitosis (1) y trafican hacia la Red Trans-Golgi (RTG) que posee naturaleza de endosomas tempranos (ETem.). Estos componentes pueden ser destinados hacia la vacuola (2) traficando a través de cuerpos pre-vacuolares o endosomas tardíos (CPV/ETar.) o ser devueltos a la membrana plasmática por la ruta del reciclaje endocítico (3) traficando a través de endosomas de reciclaje (ER). PC, pared celular. Figura modificada de Norambuena, L. & Tejos, R., 2017.

Es más, el estrés salino promueve la endocitosis de AtRGS1 (Colaneri, A. et al., 2014), lo que apoya a que el tráfico endocítico podría ser un proceso celular importante para una vía de señalización en común que modularía el estímulo de glucosa y el estrés salino. Sin embargo, no existe evidencia hasta el momento que vincule la organogénesis de raíces laterales promovida por ambos estímulos con el tráfico endocítico.

Por otra parte, existe un fuerte vínculo funcional entre el tráfico endocítico y la organogénesis de raíces laterales. La disminución del tráfico endocítico provocada tanto por la pérdida de función química como genética de componentes moleculares que participan en la endocitosis y en el reciclaje endocítico afecta negativamente la organogénesis de raíces laterales, lo cual se ha postulado como consecuencia de la pérdida de la polaridad de los facilitadores de auxina (Geldner, N. et al., 2003; Jaillais, Y. et al., 2007; Kleine-Vehn, J. et al., 2008; Okumura, K. et al., 2013; Wang, C., et al., 2013), lo cual afectaría el plan de organogénesis dependiente del receptor nuclear de auxina SCF^{TIR1/AFBs}. En contraste, en nuestro laboratorio hemos descrito que Sortin2 acelera el tráfico endocítico hacia la vacuola (Pérez-Henríquez, P. et al., 2012). Hemos ligado fuertemente este tráfico con la inducción de la organogénesis de las raíces laterales: al alterar química y genéticamente la aceleración del tráfico endocítico provocado por Sortin2 hemos correlacionado positivamente este efecto con la represión en la inducción de la organogénesis de raíces laterales promovidos por Sortin2 (Pérez-Henríquez, P. et al., 2012; Morales-Herrera, S. et al., 2017). En específico, hemos observado que la inhibición del tráfico endocítico hacia la vacuola provocada por Wortmanina (Emans, N. et al., 2002; Beck, M. et al., 2012), reprime completamente la

organogénesis de raíces laterales inducida por Sortin2, pero no la organogénesis debido al plan endógeno vegetal (Pérez-Henríquez, P. et al., 2012). Por lo tanto, se sugiere que la organogénesis de raíces laterales inducida por Sortin2 requiere de componentes moleculares que participen en el tráfico endocítico cuyas funciones sean alteradas por Wortmanina.

1.5.- Los Fosfatidilinosítoles fosfato y su participación en el tráfico endocítico en plantas.

A nivel molecular, se ha descrito a wortmanina como inhibidor de las actividades enzimáticas fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y fosfatidilinositol 4 -quinasa (PI4K) en diversas especies (Matsuoka, K. et al., 1995; Jung, J., et al., 2002; Delage, E. et al., 2012; Okazaki, K. et al., 2015). En *Arabidopsis* se ha descrito solo un gen, denominado *AtVPS34*, que codifica para una proteína que tiene actividad PI3K, mientras que existen doce genes que codifican para PI4K (Mueller-Roeber, B. & Pical, C., 2002; Lee, Y. et al., 2008). Estas dos actividades enzimáticas son distintas entre sí, pero catalizan la fosforilación del lípido fosfatidilinositol en uno de los residuos de inositol. La actividad PI3K lo fosforila en su posición -3, produciendo fosfatidilinosítole 3-fosfato (PI3P), mientras que la actividad PI4K fosforila el residuo de inositol en la posición -4, catalizando la formación de fosfatidilinosítole 4-fosfato (PI4P).

Aunque estructuralmente PI3P y PI4P son similares, se ha sugerido que sus funciones en *Arabidopsis* son distintas. Por una parte, PI3P presenta un enriquecimiento preferente en endosomas tardíos y en menor grado en el tonoplasto; en cambio, PI4P se encuentra enriquecido principalmente en la membrana plasmática y

en menor medida en la red Trans-Golgi/endosomas tempranos (Munnik, T. & Nielsen, E., 2011; Simon, M. et al., 2014). Estos lípidos participan en el tráfico de endomembranas, pero esta diferencia en el enriquecimiento en compartimientos subcelulares se ha relacionado con funciones distintivas entre sí. En el caso de PI3P ha sido vinculados al tráfico hacia la vacuola (Kim, D. et al., 2001; Kolb, C. et al., 2015) y a la biogénesis vacuolar (Lee, Y. et al., 2008; Zheng, J. et al., 2014). En contraste, proteínas PI4K con probada actividad PI4K (del tipo PI4KIII β) han sido implicadas en la funcionalidad de la red Trans Golgi, ya que se han localizado en este compartimiento y regulan su morfología participando en la secreción de componentes de la pared celular (Kang, B. et al., 2011). En este sentido, se ha propuesto que PI4P es regulador de la disposición de la placa celular que divide a las células y sus niveles modulan el crecimiento por la punta del pelo radicular (Preuss, M. et al., 2006; Thole, J. et al., 2008; Kang, B. et al., 2011), reflejo de su participación en el tráfico de endomembranas. Sin embargo y recientemente, la actividad PI4K ha sido implicada en la endocitosis que experimenta la subunidad catalítica del complejo proteico encargado de sintetizar celulosa en el apoplasto (Fujimoto, M. et al., 2015).

No hay antecedentes que vinculen los niveles de PI3P y PI4P con la organogénesis de raíces laterales, sin embargo estos lípidos participan en el tráfico endocítico hacia la vacuola, evento celular que determina la organogénesis de raíces laterales inducida por Sortin2. Por lo tanto, en conjunto con los antecedentes expuestos anteriormente, se propone que la actividad PI3K y la actividad PI4K que catalizan la producción de PI3P y PI4P, respectivamente, participan en la regulación del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2. Por lo tanto, PI3P y PI4P participarían

en esta vía independiente del receptor nuclear de auxina SCF^{TIR1/AFBs}, modulada por Sortin2 para inducir la organogénesis de las raíces laterales, en especial la de primordios.

2.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- Hipótesis

Sortin2 induce la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* por un mecanismo que depende del tráfico endocítico modulado por los niveles de los lípidos fosfatidilinositol -3-fosfato y fosfatidilinositol -4- fosfato.

2.2.- Objetivo general.

Evaluar la participación de los lípidos fosfatidilinositol 3-fosfato y fosfatidilinositol 4-fosfato en el tráfico endocítico hacia la vacuola que induce la formación de raíces laterales promovida por Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*.



2.3.- Objetivos específicos.

1.- Evaluar la participación de la actividad fosfatidilinositol 3-quinasa y fosfatidilinositol 4-quinasa en la formación de las raíces laterales inducida por Sortin2.

2.- Evaluar el papel fisiológico de la función de las fosfatidilinositol 3-quinasa y fosfatidilinositol 4-quinasas en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.

3.- Evaluar la participación del tráfico endocítico dependiente de los niveles de fosfatidilinositol 4-fosfato en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Material biológico vegetal.

En este trabajo se utilizó como modelo de estudio vegetal a *Arabidopsis thaliana* y su ecotipo Col-0 como plántulas silvestres. Líneas insercionales de T-DNA con pérdida de función de *AtVPS34* (*atvps34-1* o heterocigota de SALK_007281; Lee, Y. et al., 2008) y con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* (*pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* o doble homocigota de SALK_040479 y SALK_098069, respectivamente; Preuss, M. et al., 2006) se utilizaron en este trabajo doctoral. Además, se utilizaron líneas transgénicas génicamente estables que expresan el dominio de unión específico a PI3P (2xFYVE) y a PI4P (PH^{FAPP}) ambos fusionados a la proteína fluorescente amarilla bajo el promotor 35S (biosensor de PI3P: 2xFYVE-YFP y biosensor de PI4P: PH^{FAPP1}-YFP; Vermeer, J. et al., 2006; Munnik T. & Nielsen E., 2011; Simon, M. et al., 2014).

3.2.- Esterilización y crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron esterilizadas mediante dos métodos. Según el primer método, se lavaron las semillas en 1 mL de etanol 95% v/v por 5 minutos. Después de retirar esta solución, las semillas se resuspendieron en 1mL de una solución de etanol 70% v/v con Tritón®X-100 0,1% v/v por 15 minutos en agitación. Por último, se lavaron las semillas en agua estéril 4 veces, dejando las semillas en agua estéril. En el segundo método, las semillas fueron expuestas a gas cloro molecular durante 12 horas. El gas cloro se obtiene al hacer reaccionar 80 mL de solución de hipoclorito de sodio 4,9% p/v con 700 µL de ácido clorhídrico fumante (37% v/v) en un

vaso precipitado de vidrio. Este tratamiento se realizó en una caja cerrada dentro de una campana de extracción. Posteriormente, las semillas esterilizadas se ventilaron en una cámara de esterilidad durante 2 horas para finalmente dejarlas en agua estéril.

Las semillas estériles en agua estéril fueron expuestas durante un día a 4°C en oscuridad y luego sembradas una a una en hilera en placas cuadradas que contenían 50mL de medio de cultivo sólido MS-agar 0,5X [mioinositol 0,01% p/v, MES (ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico monohidrato) 0,05% p/v, sacarosa 1% p/v medio de cultivo Murashige y Skoog 0,22% p/v (Phytotechnology Laboratories #MS19), fitoagar 0,7% p/v (Phytotechnology Laboratories), ajustado a pH 5,7)]. Se tomó la precaución de sembrar en una misma placa las semillas silvestres y semillas mutantes para disminuir la variabilidad de los datos. La placa fue cerrada con cinta 3M que permite el intercambio gaseoso. Las plantas fueron crecidas verticalmente en incubadores que poseen condiciones controladas de temperatura (22°C), fotoperiodo (16 horas de luz/ 8 horas oscuridad) y luminosidad (aproximadamente 4000 lux).

Para obtener semillas de las líneas mutantes, transgénicas y de las plantas silvestres, las plantas parentales de 3 semanas de edad fueron traspasadas a un sustrato inerte. Cuando este sustrato inerte fue lana de roca, este soporte fue embebido en un medio de cultivo hidropónico 1X (Gibeaut, D., et al., 1997). Su versión 100X se compone de: KNO₃ 125 mM, Ca(NO₃)₂ 150 mM, MgSO₄ 75 mM, KH₂PO₄ 50 mM, KCl 5 mM, H₃BO₃ 5 mM, MnSO₄ 1 mM, ZnSO₄ 200 µM, CuSO₄ 150 µM, Na₂SiO₃ 10 mM y Sprint 330 7,7 mM [Fe quelado en DTPA (Ácido di-etilen-tri-amino-pentaacético)], ajustado a pH 5. Las plantas crecidas en cultivo hidropónico fueron regadas una vez por semana con esta solución. Cuando el sustrato inerte utilizado fue tierra prensada y

deshidratada (Jiffy), estas pastillas fueron rehidratadas con agua potable y puestas en vasos plásticos previamente al traspaso de las plantas, las cuales fueron regadas posteriormente con agua potable una vez por semana.

Luego de 4 a 6 semanas, las plantas con semillas maduras fueron cubiertas con un capuchón de papel y se les secó retirándoles la totalidad del medio hidropónico o el agua potable. Luego de que se secase la planta completa, se cosecharon las semillas mediante un cedazo con poros de 2mmx2mm. Las semillas limpias fueron guardadas en sobres de papel en oscuridad a temperatura ambiente. El material biológico no utilizado se almacenó en bolsas plásticas para posteriormente ser autoclavado y desechado.

3.3.- Cultivo de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens*.

Los cultivos de *Escherichia coli* cepa Mach 1 fueron crecidos a 37°C por 16 horas, aproximadamente en medio de cultivo Luria Broth (LB), el cual se compone de triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v y NaCl 0,8% p/v, además agar 1,6 % p/v para preparar cultivo sólido en placas de petri. Se utilizaron los siguientes antibióticos para seleccionar y crecer las células de *Escherichia coli* transformadas con los vectores correspondientes: Espectinomicina 100 µg/mL para seleccionar las células transformadas con el vector pCR8 y Kanamicina 50 µg/mL para los clones transformados con los vectores de expresión en plantas serie pGWB. Para crecer cultivos de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GW3101 se utilizó medio LB a 28°C por 2 días. Para seleccionar las células transformadas con los vectores de expresión en

plantas pGWB5, los cultivos fueron crecidos en medio LB con los antibióticos Rifampicina 10 µg/mL, Gentamicina 25 µg/mL y Kanamicina 50 µg/mL.

3.4.- Obtención de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* competentes y transformación.

Para obtener células quimiocompetentes de *Escherichia coli*, se inoculó 1 mL de cultivo de la cepa Mach1 en 250 mL de medio SOB, el cual se compone de triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgSO₄•7H₂O 10mM. Se creció el cultivo en agitación moderada hasta llegar a una densidad óptica de 0,3 ($\lambda=600\text{nm}$; D.O.₆₀₀), se centrifugó a 3.000 x g por 10 minutos a 4°C, descartándose el sobrenadante. Posteriormente, se agregó 40 mL de solución CCMB80 estéril incubándose en hielo por 20 minutos. La solución CCMB80 contiene Acetato de potasio (CH₃COOK) 10 mM, CaCl₂•2H₂O 80 mM, MnCl₂•4H₂O 20mM, MgCl₂•6H₂O 10mM, glicerol 10% v/v, pH 6,4. El cultivo se centrifugó a 2.000 x g por 8 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y al sedimento se agregó 20 mL de solución CCMB80, ajustándose a una D.O.₆₀₀ entre 1,0 a 1,5. Se incubó la suspensión en hielo por 20 minutos y se alicuotó en volúmenes de 100 µL para posteriormente ser guardados a -80°C.

Para transformar las células de *Escherichia coli* quimiocompetentes, un cultivo con células quimiocompetentes se le agregó 50 ng del vector y se incubó por 30 minutos a 4°C. Luego, se expuso a 42°C por 30 segundos y luego 2 minutos a 4°C y se le agregó 1 mL de medio LB sin antibióticos creciéndose a 37°C por una hora. Se centrifugó y se resuspendió el sedimento en 100 µL de LB líquido sin antibióticos.

Finalmente, se sembró el cultivo en placas de Petri con medio LB-agar con los correspondientes antibióticos para la selección de colonias transformantes.

Para obtener células quimiocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens*, se tomó 10 µL de un cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* cepa GW3101 conservado en glicerol 20% v/v a -80°C y se realizó un preinóculo en 100 mL de medio LB con los antibióticos Rifampicina 10 µg/mL y Gentamicina 25 µg/mL hasta que llegara a una D.O.₆₀₀ de 0,5. El cultivo se centrifugó por 20 minutos a 3.000 x g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2 mL de CaCl₂ 20 mM estéril. Se alicuotó el cultivo en volúmenes de 100 µL, se incubó en nitrógeno líquido para luego almacenarlas a -80°C.

La transformación de las células de *Agrobacterium tumefaciens* quimiocompetentes se realizó agregando entre 0,1 a 1 µg del vector de la serie pGWB5 purificado para posteriormente ser expuestas a nitrógeno líquido durante 5 minutos, descongelándose a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego, se les añadió 1 mL de medio LB sin antibióticos y se incubó a 28°C por 12 horas en agitación. Luego, se resuspendió el sedimento en 100 µL de LB líquido sin antibióticos y se sembró en placas con medio LB-agar y los correspondientes antibióticos para su selección, incubándose a 28°C por 2 días.

Para evaluar los resultados de la transformación, se utilizó en cada serie de transformación un control negativo con cepas quimiocompetentes sin transformar y un control positivo el cual consistió en utilizar una cepa transformada anteriormente capaz de crecer en el antibiótico de selección.

3.5.- Transformación estable en *Arabidopsis thaliana*.

Para transformar establemente en *Arabidopsis thaliana* se utilizó el método de inmersión floral (Clough, S. & Bent, A., 1998). Se preinoculó 10 µL de un cultivo conservado a -80°C de *Agrobacterium tumefaciens* en 2 mL de medio LB con los antibióticos de selección respectivos a 28°C por 12 horas. Se utilizó un cultivo que posee el vector pGBW5 y otro con el vector pGBW5 que porta la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1*. Luego, se inoculó el cultivo en 30 mL de medio LB, creciéndose hasta una D.O.₆₀₀ entre 1,5 a 2.

Se centrifugó el cultivo a 5.000 x g por 15 minutos descartándose el sobrenadante. El sedimento se agitó suavemente durante una hora en 15 mL de medio de infiltración, el cual se compone de sacarosa 5% p/v y Silwett L-77 0,02% v/v. Inflorescencias que contenían botones de flores en fase previa a su antesis de plantas silvestres y de la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* fueron sumergidas durante 5 a 10 segundos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens* transformado. Posteriormente, las plantas transformadas fueron colocadas por 16 a 24 horas en oscuridad para luego ser mantenidas en condiciones de crecimiento y obtener sus semillas. Las semillas desde sus vainas fueron limpiadas con cedazo, esterilizadas y seleccionadas sembrándolas en placas que contenían medio MS 0,5X-agar suplementadas con el antibiótico Higromicina-B 25 µg/mL.

3.6.- Extracción de DNA genómico vegetal.

Para extraer DNA genómico vegetal, se cortó un cotiledón de una plántula de 7 días de edad, se le colocó en un tubo de 1,5 mL en 200 µL de solución tampón de

extracción que contiene Tris pH 8,0 200 mM, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM y SDS 0,5% (p/v). Inmediatamente, el tejido vegetal se molió con un pistilo, se agregó 200 μ L más de solución tampón de extracción y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 minutos. A 300 μ L del sobrenadante se le adicionó 300 μ L de isopropanol (calidad analítica, Merck), se mezcló por inversión del tubo unas 6 a 8 veces, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 minutos. Se removió el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 μ L de etanol 70% v/v, centrifugando después a 14.000 rpm por 5 minutos. Luego, se removió el sobrenadante y se colocó el tubo boca abajo por una hora retirando la solución remanente. Finalmente, se resuspendió en 50 μ L de la solución consistente en Tris HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM. El DNA fue almacenado a -20°C para su posterior uso.

3.7.- Extracción de RNA vegetal y síntesis de cDNA.

Se extrajo RNA desde 50 a 100 mg de tejido tanto de hojas de roseta de plantas silvestres de 1 mes de edad como plántulas completas de 7 días de edad. Se siguió el protocolo detallado en el kit de extracción de RNA Aurum™ total RNA (Bio-Rad). El RNA purificado se almacenó en agua estéril pretratada con DiEtilPiroCarbonato (DEPC) 0,1% v/v, guardándose a -80°C. Se evaluó tanto la calidad del RNA purificado como su integridad. La calidad del RNA purificado se pesquizó por métodos espectrofotométricos, asegurándose que la concentración fuera mayor a 270 ng/ μ L y que los cuocientes de los valores de absorbancia 260 nm/280 nm y 260 nm/230 nm fueran entre 1,9 y 2,2 y entre 1,8 y 2,2, respectivamente. Estos valores sugieren que la purificación de RNA posee la calidad suficiente para trabajar con él en técnicas de PCR.

Para analizar la integridad del RNA purificado, se realizó una electroforesis denaturante. 1,5 µL de RNA con 1 µL de buffer de carga se calentó a 70°C por 10 minutos para después ser incubado a 4°C por 5 minutos. Luego se le agregó 0,5 µL de bromuro de etidio 10 mg/mL y se cargó en un gel de agarosa 1,5% p/v preparado con agua estéril pretratada con DEPC 0,1% v/v, MOPS 1x y formaldehído 1,11% v/v. Se sometió a electroforesis a 70 V por 45 minutos y posteriormente el RNA fue visualizado en un transiluminador SYNGENE modelo SYDR/2082.

Se sintetizó cDNA utilizando 2 µg de RNA, el cual fue pretratado con 1 U de DNAasa I en una solución tampón de la DNAasa I 1X, 20 U del inhibidor de la RNAasa RiboLock™, incubándose a 37°C por 30 minutos. Se finalizó la reacción al añadir 1 µL de EDTA 25 mM e incubándose a 65°C por 10 minutos. Se alicuotó el RNA libre de DNA genómico en dos tubos y se les añadió 1 µL de partidor OligoAP 500 µg/mL, incubándose a 70°C por 5 minutos. Inmediatamente después, se incubó en hielo por 5 minutos y después se les agregó la solución tampón de la transcriptasa reversa ImProm-II™ 5X, MgCl₂ 25 mM, una mezcla de dNTPs 10 mM de cada uno y 20 U del inhibidor de RNAasa RiboLock™. Solo a un tubo se le agregó la enzima transcriptasa reversa ImProm-II™ mientras que al otro se dejó como control de la reacción agregándosele agua. El volumen final de reacción fue de 20 µL. Se procedió con el siguiente protocolo de RT-PCR: 25°C por 5 minutos, luego 42°C por 60 minutos y finalmente 70°C por 15 minutos. El cDNA total resultante y su control negativo se guardaron a -20°C para su posterior uso. Se analizó la calidad del cDNA y la presencia de DNA genómico en el RNA purificado mediante una reacción de PCR utilizando

partidores que amplifican el/los genes que codifican para Actina: AtActin4AA89_5', CACACTTTCTACAATGAGCT y AtActin4AA320_3', GCAGTGATCTCTTTGCTCAT

3.8.- Genotipificación de la línea mutante *atvps34-1*.

Para detectar el inserto de T-DNA en cada una de las plántulas de *atvps34-1*, se realizó reacciones de PCR que contenían la siguiente mezcla: solución tampón 1X con MgCl₂, 0,5 U Paq5000TM DNA polimerasa (Stratagene), 0,2 mM dNTPs cada uno y 0,2 µM de los partidores 3K1-L, CATCACGAAGCTCATCCTGC; y LB1.3, ATTTTGCCGATTCGGAAC y 0,5 µL de DNA genómico en un volumen final de 20 µL. Se realizó el siguiente protocolo de PCR: 94°C por 5 minutos, después un ciclo compuesto por 94°C por 40 segundos, luego, 60°C por 40 segundos y finalmente, 72°C por 50 segundos, repetido 40 veces. Por último, se terminó con 72°C por 10 minutos para completar la elongación de los fragmentos.

Para determinar la presencia y tamaño del amplificado se realizó una electroforesis de cada muestra en geles de agarosa 1% p/v preparados con TAE 1X (Tris-base pH 8.0 40 mM, ácido acético glacial 19 mM y EDTA pH 8 1mM) y visualizándolos en el transiluminador.

3.9.- Amplificación y clonamiento de la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1*.

Para amplificar fielmente la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1* se utilizó cDNA proveniente de plántulas silvestres. Se realizó PCR que contenía solución tampón 1X final, 0,2 U Phusion (Thermo Scientific), 0,16 mM dNTPs cada uno y 0,2 µM de siguientes partidores: PI4KIIIb1-F, ATGCCGATGGGACGCTTTC; PI4KIIIb1-R,

CCACAATATTCCATTTAAGACCCG y 1 μ L de cDNA en un volumen final de 20 μ L. Se realizó el siguiente protocolo de PCR: 98°C por 1 minuto, después un ciclo compuesto por 98°C por 10 segundos, luego, 65°C por 30 segundos y finalmente, 72°C por 160 segundos. El ciclo fue repetido 40 veces. Por último, se finalizó la reacción con 72°C por 10 minutos de extensión de la polimerización. El producto de PCR fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa 1% p/v. La banda que corresponde por peso molecular a la secuencia codificante amplificada (alrededor de 3.500 bp) fue cortada desde el gel y purificada con el kit de purificación de DNA PCR Wizard® (Promega) según las indicaciones descritas por los fabricantes. La secuencia codificante de *PI4KIII β 1* fue ligada al vector de amplificación pCR8® (Invitrogen) según las indicaciones descritas por los fabricantes.

Para identificar colonias que fueron transformadas con los diferentes vectores utilizados, se realizó PCR amplificando el gen con los partidores PI4KIII β 1-F, ATGCCGATGGGACGCTTTC y 4KIII β 1-2691R, AGGACGTAACCAGAGGGGTAG. Como templado se utilizó 1 μ L de una picada de una colonia resistente al antibiótico de selección utilizado suspendida en 10 μ L de agua estéril.

Para la purificación de los vectores plasmidiales, las cepas de *Escherichia coli* transformantes en las que se detectó la presencia del vector mediante PCR se crecieron y luego se procedió a extraer el vector con el kit de purificación plasmidial AxyPrep (Axygen) según las indicaciones descritas por los fabricantes. La secuenciación de la secuencia codificante de *PI4KIII β 1* subclonada en vectores pCR8® con dirección sentido a los sitios de recombinación del vector fue realizada por MacroGen (<http://www.macrogen.com/>) utilizando los siguientes partidores: PI4KIII β 1-F,

ATGCCGATGGGACGCTTTC; 4KIII β 1-757F, CTCTTGAGGGACAGCAAAGG; 4KIII β 1-1398F, ACATCCCGAAGATGCAAAAC; 4KIII β 1-2691R, AGGACGTAACCAGAGGGGTAG y PI4KIII β 1-R, CCACAATATTCCATTTAAGACCCG.

El vector pCR8® que posee subclonada la secuencia codificante de *PI4KIII β 1* fue recombinado con el vector de expresión constitutiva en plantas pGWB5 incubándose ambos vectores con la enzima LR clonasa™ II (Invitrogen) por 210 minutos a temperatura ambiente para posteriormente terminar la reacción al adicionarse proteinasa K e incubarse a 37°C por 10 minutos.

Para corroborar la identidad de los vectores purificados se les realizó una digestión enzimática utilizando enzimas de restricción. En cada digestión se utilizó 5 μ L de DNA plasmidial, 2 U de la enzima de restricción a utilizar y buffer 1X suplementado por el fabricante (Fermentas) en un volumen final de 15 μ L, incubándose a 37°C por 16 horas. Posteriormente, la reacción se cargó en un gel de agarosa 1% p/v sometién dose a electroforesis (90V, 45 a 60 minutos) y visualizando los productos de la digestión en el transiluminador.

3.10.- Tratamientos de plántulas de *Arabidopsis thaliana* con compuestos quí micos.

En todos los tratamientos, las plántulas fueron incubadas con Sortin2 25 μ g/mL a menos que se especifique otra dosis y fotoactivado por 4 días de fotoperiodo 16hrs/8hrs preparadas en medio de cultivo MS líquido 0,5X con Dimetilsulfóxido (DMSO) 1% v/v. MS líquido 0,5X con Dimetilsulfóxido (DMSO) 1% v/v sin Sortin2 fue utilizada como condición control en los diferentes tratamientos.

Para evaluar la participación de inducción de la organogénesis de raíces laterales, plántulas de 7 días de edad fueron tratadas en 2,5 mL de Sortin2 25 µg/mL o NAA 1 µM. Para inhibir la actividad PI4K y/o PI3K, se realizó co-incubaciones con diferentes dosis de óxido de fenilarsina (PAO; Simon, M., et al., 2016), LY294002 (Jung, J., et al., 2002) o wortmanina (Wm; Matsuoka, K. et al., 1995; Delage, E. et al., 2012). Los tratamientos fueron realizados en placas plásticas de 6 pocillos, montándose cada condición en un pocillo, por 3 días en un incubador con condiciones controladas de temperatura, luz y fotoperiodo.

Para evaluar el rescate del fenotipo de la línea mutante *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* debido a la deficiencia de PI4P, se aplicó PI4P exógenamente a las plántulas *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2*, siguiendo las recomendaciones propuestas por Echelon Biosciences (<http://echelon-inc.com/>). 0,5 mg de PI4P (de cadena alifática de 16 C) se disolvió en 1 mL de una solución de Cloroformo: metanol: agua (1:2:0,8 v/v/v), mientras que 50 nmoles de "Carrier3" de naturaleza proteica el cual interactúa con PI4P y permite que PI4P sea internalizado en las células (Ozaki, S. et al., 2000; Zheng, J., et al., 2014) se disolvió en 100 µL de agua estéril (500 µM final). El lípido y el carrier fueron mezclados en un tubo de ensayo de vidrio tapado a 4°C por 60 minutos. Plántulas de 5 días de edad de la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* fueron tratadas con 0,75 mL de Sortin2. Se realizó co-incubaciones con PI4P:carrier3 15 µM final y la solución carrier3 15 µM final. A todos los tratamientos sin PI4P, se les añadió el volumen del solvente cloroformo: metanol: agua (1:2:0,8 % v/v/v) que contenía el volumen de la solución de PI4P utilizado. Los diferentes tratamientos fueron realizados en placas de 24 pocillos, montándose cada

tratamiento en un pocillo, por 5 días en condiciones controladas de temperatura, luz y fotoperiodo.

3.11.- Evaluación de la organogénesis de raíces laterales.

Para evaluar la arquitectura radicular, las plántulas fueron traspasadas a placas de 6 u 24 pocillos donde fueron incubadas en etanol 70% v/v en agitación suave por un día para después ser montadas sobre un portaobjeto rectangular (25,4 mm x 76,2 mm x 1 mm, Edlab) y bajo un cubreobjeto de vidrio (24 x 50 mm, Marienfeld no.1) utilizando dos gotas de ácido láctico 90% v/v (Merck) como material de montaje. Cada portaobjeto se dispuso en un ángulo de 45° por al menos un día para que el ácido láctico ocupara todo el espacio entre el cubreobjeto y el portaobjeto.

Las plántulas montadas en ácido láctico se observaron en un microscopio óptico Nikon E200 bajo un aumento de 200X. Se contó los eventos de primordios de raíces laterales en cada plántula (Mařamy, J. & Benfey, P. 1997). Además, se cuantificó los eventos de raíces laterales emergidas de cada plántula. Se tomó imágenes de cada uno de los portaobjetos donde las plántulas fueron montadas mediante un Scanner Epson V600 para medir el largo de la raíz principal de cada plántula mediante el programa computacional tpsDig v2.15. El número de órganos de la raíz, tanto primordios de raíz lateral como raíces laterales emergidas fue normalizado por el largo de la raíz primaria de cada plántula expresándose como la densidad de primordios de raíces laterales y la densidad de raíces laterales emergidas, respectivamente.

3.12.- Evaluación del tráfico endocítico.

Para evaluar la dinámica del tráfico endocítico hacia la vacuola, plántulas de 7 días de edad fueron incubadas en medio de cultivo MS líquido 0,5X con N-(3-trietilamoniopropil)-4-(6-(4-(dietilamino)fenil)hexatrienil)piridinio dibromuro (FM4-64, Invitrogen) 5 μ M durante 5 minutos en oscuridad a 4°C (tiempo cero). Luego, estas plántulas fueron tratadas en la condición control o con Sortin2 25 μ g/mL a temperatura ambiente hasta 120 minutos. Para evaluar la dinámica de la endocitosis, se tomaron imágenes a los 5, 30, 60, 90 y 120 minutos después del pulso de FM4-64.

3.13.- Evaluación del patrón de distribución subcelular de PI4P y PI3P.

Para evaluar la dinámica de los niveles de fosfatidilinositol monofosfatos, se utilizó plántulas transgénicas de la línea biosensora de PI3P, 2xFYVE-YFP (Vermeer, J. et al., 2006; Simon, M. et al., 2014) y la línea biosensora de PI4P, PH^{FAPP1}-YFP (Munnik T. & Nielsen E., 2011; Simon, M. et al., 2014) Se evaluó el patrón subcelular de distribución de los biosensores a 5, 30, 60, 90 y 120 minutos desde el inicio de los tratamientos control, con Sortin2 y con inhibidores de la actividad PI4K.

3.14.- Microscopía confocal y detección de marcadores fluorescentes.

Todas las imágenes fueron capturadas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510. El aumento utilizado en la captura de imágenes fue de 1600x visualizando las células de la epidermis de la zona meristemática de la raíz primaria de las plántulas.

Para visualizar la fluorescencia de FM4-64, se incidió en las plántulas un rayo láser de 543 nm y capturando la fluorescencia emitida con un filtro que rescata

longitudes de onda mayores a los 560 nm. Para visualizar la fluorescencia de YFP, se utilizó un láser de 488nm capturándose la fluorescencia emitida con un filtro que registra solo las longitudes de onda comprendidas entre los 505 nm y los 550 nm.

Para cuantificar la internalización de FM4-64 y el reclutamiento de los biosensores de los fosfatidilinositol monofosfatos a las membranas celulares en las imágenes obtenidas, se delimitó el borde celular de cada célula y el área celular, excluyendo el borde celular de manera manual (Simon, M. et al., 2014). La intensidad de fluorescencia de las áreas delimitadas fue cuantificada mediante el parámetro "Raw Integrated Density" utilizando el programa computacional FIJI (ImageJ v. 1.49i, <http://fiji.sc/Fiji>), generándose los valores de fluorescencia total celular (F.t.c.) y fluorescencia intracelular (F.i.), respectivamente. Además, se utilizó la herramienta "threshold" para cuantificar la fluorescencia de fondo o de *background* (F.c.). Por lo tanto, la fluorescencia de la membrana plasmática y la perteneciente a los compartimentos intracelulares se expresó en relación a la fluorescencia total celular de la siguiente manera:

$$F. \text{Membrana plasmática} = \frac{(F.t.c - F.i.)}{F.t.c.}$$

$$F. \text{compartimientos intracelulares} = \frac{F.i. - F.c.}{F.t.c.}$$

3.15.- Análisis de datos y pruebas estadísticas.

Los datos de densidad de eventos de raíces laterales; fluorescencia relativa de la membrana plasmática y fluorescencia relativa de los compartimentos intracelulares fueron graficados, analizados estadísticamente y contrastados mediante el programa computacional Graphpad Prism v.6.01®. Las pruebas estadísticas ocupadas para contrastar las diferencias entre las distintas condiciones fueron las siguientes: prueba t-student de dos colas, ANOVA de una vía con post – prueba de Tukey, ANOVA de dos vías con post-prueba de Tukey y Sidak; prueba de Kriskal-wallis con post-prueba de Dunn. Para todas las pruebas estadísticas, se consideró una diferencia como estadísticamente significativa entre dos grupos analizados si el error asociado al test estadístico es $p < 0,05$.

4.- RESULTADOS

4.1.- Evaluación de la participación de la actividad PI3K y PI4K en la formación de las raíces laterales inducida por Sortin2.

La organogénesis de las raíces laterales ha sido caracterizada en cuatro etapas temporales consecutivas: pre-iniciación, iniciación, desarrollo del primordio y emergencia, los cuales dan como resultado dos tipos de órganos: primordios de raíces laterales y el órgano funcional como tal, las raíces laterales emergidas. Es razonable pensar que cualquier perturbación que afecte significativamente alguna etapa del desarrollo de la formación de raíces laterales modifique la cantidad de primordios o la de raíces laterales emergidas en comparación a la situación control sin perturbación. Como estos órganos son el resultado de la progresión de las distintas etapas de la organogénesis de las raíces laterales, entonces los resultados de las cuantificaciones de los dos órganos de raíces laterales están ligados entre sí. Por lo tanto, las conclusiones a partir de la comparación que englobe las cuantificaciones de primordios y de raíces laterales emergidas solo por separado pueden ser incorrectas.

Por ejemplo, una perturbación causa un aumento en la formación de primordios y la disminución en la formación de raíces laterales emergidas ambos en comparación al control sin perturbar. Si analizamos solamente la formación de primordios, podríamos concluir que la formación de primordios está aumentada, lo cual puede ser erróneo ya que este aumento puede ser explicado por el efecto represor de la perturbación en la emergencia de raíces laterales. Para analizar esta disyuntiva, tenemos que considerar que el *priming* y la iniciación de raíces laterales son las etapas que determinan la cantidad de órganos nuevos de raíces laterales. Por lo tanto, la perturbación que

únicamente afecte la emergencia de raíces laterales, no debiera alterar la suma entre la cantidad de primordios y la de raíces laterales emergidas (o eventos totales) en comparación al control sin perturbar. Por ende en el ejemplo anterior, es necesario analizar qué pasa en la cuantificación de los eventos totales de raíces laterales: si observamos una disminución en comparación al control significa que la perturbación reprime la formación de primordios también; si no hay cambios, sugiere que la perturbación solo afecta la emergencia y si se observa un aumento, significa que la perturbación induce la formación de primordios.

Hemos sugerido que la participación del tráfico endocítico modulado por Sortin2 induce la formación de primordios de raíces laterales afectando un evento previo a la etapa de iniciación dentro de la organogénesis de las raíces laterales, explicando así la inducción local de primordios exclusivamente en la zona de la raíz primaria donde se aplicó este compuesto (Morales-Herrera, S., 2015; Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C. et al., en revisión). Para estudiar la participación de las actividades PI-quinásas en el desarrollo de las raíces laterales promovida por Sortin2, se utilizó inhibidores específicos de la actividad PI3K y PI4K en tratamientos de coincubación con Sortin2, teniendo en consideración tanto el efecto inductor de Sortin2 en la formación de primordios como el cuidado en la interpretación de los resultados que puede producir la inhibición de la actividad PI-quinásas en la formación de primordios, de raíces laterales emergidas y de los eventos totales de raíces laterales que dependen del plan endógeno de desarrollo.

Otro de los cuidados a considerar es a lo que se denomina "la condición sin perturbación". Como el objetivo es analizar si la actividad PI-quinasa participa en la

inducción de la formación de las raíces laterales promovida por Sortin2, entonces la condición sin perturbación en este caso es el tratamiento con Sortin2 sin los inhibidores químicos de la actividad PI-quinasa. Hay que considerar también que la estrategia experimental utilizada para estudiar la participación de las PI-quinasa en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2 puede influir en la formación de raíces laterales en la condición sin Sortin2 o desde ahora denominada formación endógena de raíces laterales. Por este motivo, se incluyó en el estudio la evaluación de la formación endógena de raíces laterales en condiciones de inhibición de la actividad PI-quinasa.

4.1.1.- Evaluación de la participación de la actividad PI4K en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.

Para estudiar la participación de la actividad PI4K en la formación de raíces laterales, se analizó la perturbación que provoca el inhibidor específico de la actividad PI4K, óxido de fenilarsina (Vermeer, J. et al., 2009), tanto en la formación endógena de raíces laterales como en la inducida por Sortin2 (Figura 2). Se ha reportado que concentraciones del orden de 10 a 20 μM de la droga es capaz de inhibir fuertemente la actividad PI4K (Simon, M. et al., 2016; Vermeer, J. et al., 2009). Por ende, se decidió realizar una dosis dependencia de este inhibidor utilizando 20 μM como la concentración máxima del ensayo.

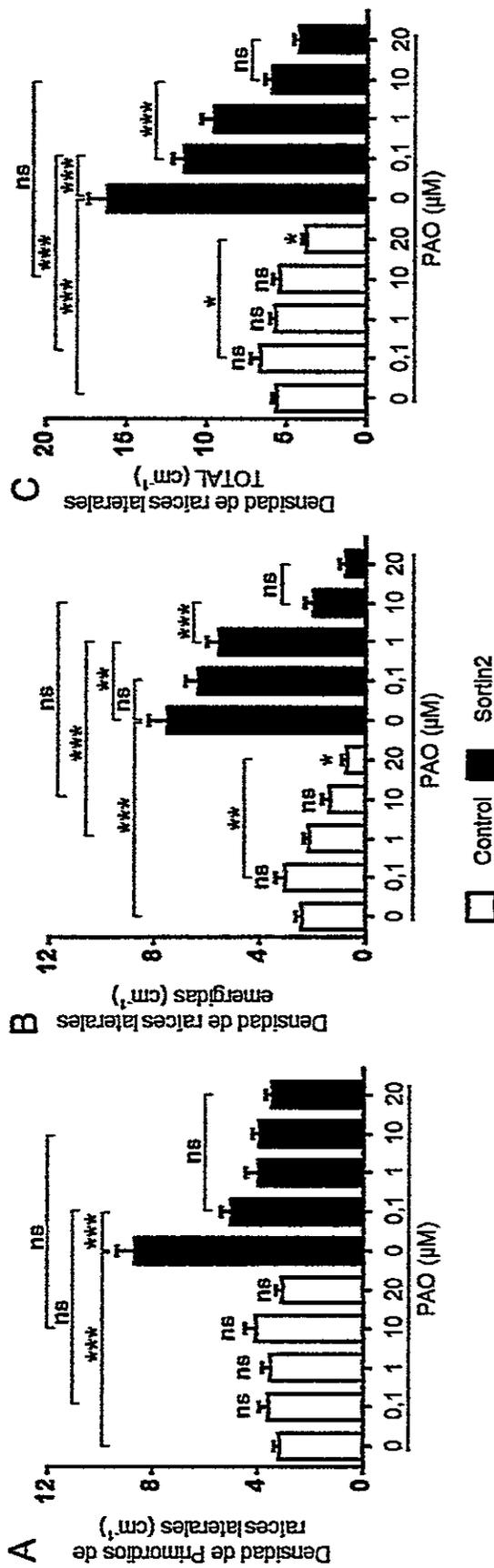


Figura 2. Efecto de la inhibición de la actividad PI4K en la formación de raíces laterales. Se muestra las densidades de primordios de raíces laterales (A), de raíces laterales emergidas (B) y de eventos totales de raíces laterales (C) de plántulas silvestres de 10 días. Estas plántulas fueron co-tratadas durante sus últimos tres días de crecimiento en un medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control, barras blancas) o Sortin2 25 μg/mL (barras negras) y diferentes dosis de óxido de fenilarsina (PAO). Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de dos vías con post-prueba de Sidak: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ns, cambio no significativo. La simbología sobre las barras se refiere a la comparación de la situación experimental con la situación control sin el inhibidor. Los resultados provienen de 15 a 23 plántulas por condición

Primero, al analizar la formación endógena de raíces laterales, en primera instancia se observa que solamente la mayor concentración utilizada de PAO provoca una disminución de aproximadamente la mitad de la densidad de raíces laterales emergidas en comparación al control sin el inhibidor. Esto sugiere que la actividad PI4K participa en la formación endógena de raíces laterales emergidas. Además, se observa que la densidad de primordios no experimenta cambios con respecto al control, sin embargo se registra una disminución significativa de los eventos totales de raíces laterales al comparar la mayor concentración utilizada de PAO con el control. Por lo tanto, esto sugiere que actividad PI4K participa también en la formación endógena de raíces laterales.

Con respecto a la formación de raíces laterales promovida por Sortin2, se observa que Sortin2 promueve una mayor densidad de primordios y de raíces laterales emergidas (Pérez-Henríquez, P. et al., 2012; Morales-Herrera, S., 2015). En específico, se observa que la dosis más baja utilizada de PAO reprime la formación de primordios inducidos por Sortin2 a un nivel similar a la formación endógena de primordios, lo cual se refleja en la densidad total de raíces laterales. Esto sugiere que la actividad PI4K es importante para la formación de primordios inducida por Sortin2. Esta diferencia en la sensibilidad a PAO entre la organogénesis de primordios inducida por Sortin2 y la del plan endógeno de raíces laterales, sugiere que ambos procesos contienen diferencias entre sí para constituir un primordio. También, se observa que existe una disminución significativa de la densidad de raíces laterales emergidas con respecto a su control sin inhibidor desde PAO 1 μ M. Esta represión es completa en PAO 10 y 20 μ M, es decir el nivel de raíces laterales emergidas inducida por Sortin2 es comparable a la del plan

endógeno. Esto sugiere que la organogénesis de raíces laterales inducida por Sortin2 requiere de la actividad PI4K ya que es crucial para inducir la formación de primordios.

4.1.2.- Evaluación *in vivo* del cambio de los niveles de fosfatidilinositol 4-fosfato provocado por Sortin2.

La actividad PI4K consiste en la fosforilación en la posición 4 del residuo de inositol del sustrato lipídico fosfatidilinositol para transformarlo a fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P). Como la formación de raíces laterales inducida por Sortin2, en especial la formación de primordios, requiere de la actividad PI4K (Figura 2) se evaluó si la acción de Sortin2 promueve un cambio al menos transitorio en los niveles de PI4P.

Para estudiar *in vivo* los niveles de PI4P, se utilizó la línea transgénica que expresa el gen que codifica para la proteína fluorescente amarilla fusionada al dominio proteico denominado PH (*pleckstrin homology*), dominio que interactúa específicamente con PI4P (YFP-PH^{FAPP}, Thole, J. et al., 2008; Vermeer, J. et al., 2009). Este biosensor es reclutado en las membranas donde se enriquece PI4P, por lo que se visualiza un aumento de la intensidad de fluorescencia reclutada en la membrana (Simon, M. et al., 2014). Con esta técnica se ha determinado que PI4P se encuentra enriquecido principalmente en la membrana plasmática y también en los endosomas tempranos/ red trans-Golgi en *Arabidopsis* (Vermeer, J. et al., 2009; Simon, M. et al., 2014). Primero que todo, se analizó si Sortin2 altera la localización subcelular del biosensor evaluando la intensidad de fluorescencia en los compartimentos donde se encuentra enriquecido PI4P durante un intervalo de tiempo de hasta dos horas de exposición a Sortin2 (Figura 3). En este intervalo de tiempo hemos registrado que Sortin2 puede acelerar el tráfico

endocítico hacia la vacuola en *Arabidopsis thaliana*. Se observa que la fluorescencia del biosensor presenta una localización subcelular preferentemente en la periferia celular y también en algunas estructuras punteadas en la condición control, correspondiéndose con lo reportado en la literatura (Vermeer, J. et al., 2009; Simon, M. et al., 2014). Además, existe una señal de fondo el cual ha sido atribuido a la población del biosensor que no está interactuando con el lípido y por lo tanto se encuentra libre en el citoplasma (Simon, M. et al., 2014).

Con respecto a la localización subcelular del biosensor bajo la exposición a Sortin2, se observa que la fluorescencia está localizada de manera similar a la situación control a lo largo del tiempo, lo cual sugiere que el reclutamiento del biosensor de PI4P bajo Sortin2 se efectúa en compartimentos similares a los descritos en la literatura (Vermeer, J. et al., 2009; Simon, M. et al., 2014). Interesantemente, se observa que la localización subcelular del biosensor bajo la exposición a Sortin2 presenta un aumento aparente en el número de estructuras de tipo endosomal en comparación al control en especial a 60 y 90 minutos de exposición a Sortin2. El aumento de la fluorescencia en estos compartimientos es de naturaleza transitoria, ya que a 120 minutos se observa que la distribución de la fluorescencia es comparable al tratamiento control.

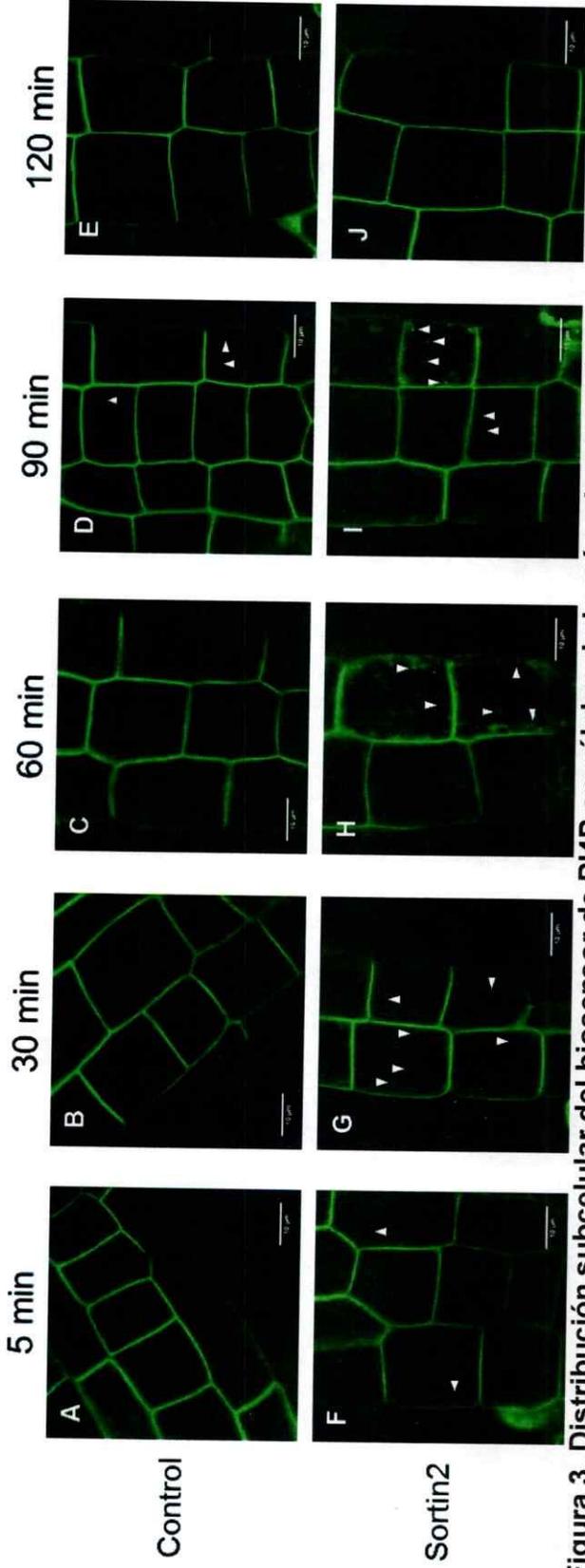


Figura 3. Distribución subcelular del biosensor de PI4P en células de la raíz primaria bajo la exposición a Sortin2. Se muestra imágenes representativas que registran la fluorescencia de células de la epidermis de la raíz primaria de plántulas de 7 días que acumulan el biosensor de PI4P, YFP-PH^{FAPP}. Las plántulas fueron expuestas a medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control; A-E) o Sortin2 25 μg/mL (Sortin2; F-J) por 5 (A y F), 30 (B y G), 60 (C y H), 90 (D e I) o 120 minutos (E y J). Las puntas de flecha señalan compartimientos intracelulares del tipo endosomal. Barra de tamaño: 10 μm.

Para corroborar el cambio de los niveles de PI4P por la acción de Sortin2, se procedió a cuantificar la intensidad de fluorescencia localizada tanto en la membrana plasmática como en los compartimentos intracelulares, ambos en relación a la intensidad de fluorescencia total de las células a lo largo del tiempo (Figura 4). Con respecto a la membrana plasmática (Figura 4 A), se observa que la fluorescencia relativa varía a lo largo del tiempo en la situación control lo cual sugiere que el nivel de PI4P es dinámico. Además, se observa que la exposición a Sortin2 induce un aumento en la fluorescencia relativa en la membrana plasmática en comparación al control, alcanzando un valor máximo a los 30 minutos de exposición. Esto sugiere que la acción de Sortin2 promueve un aumento de los niveles de PI4P en la membrana plasmática. Sin embargo, este aumento es transitorio, ya que la fluorescencia relativa a 60 y 90 minutos en la condición de Sortin2 es menor tanto a sus controles temporales como al valor máximo registrado en la condición de Sortin2 (30 minutos). Con respecto a los compartimentos intracelulares (Figura 4 B), se observa que la fluorescencia relativa también varía a lo largo del tiempo analizado en la situación control, reforzando la idea de que el nivel de PI4P es dinámico. También, se observa el esperado aumento transitorio de la fluorescencia relativa en compartimentos intracelulares bajo la exposición a Sortin2 en comparación al control, alcanzando un valor máximo a los 90 minutos de exposición. Esto confirma que la acción de Sortin2 promueve un aumento de los niveles de PI4P en los compartimentos intracelulares, lo cual presenta un carácter transitorio ya que la fluorescencia relativa disminuye a los 120 minutos de exposición a Sortin2 a un nivel comparable a su control temporal.

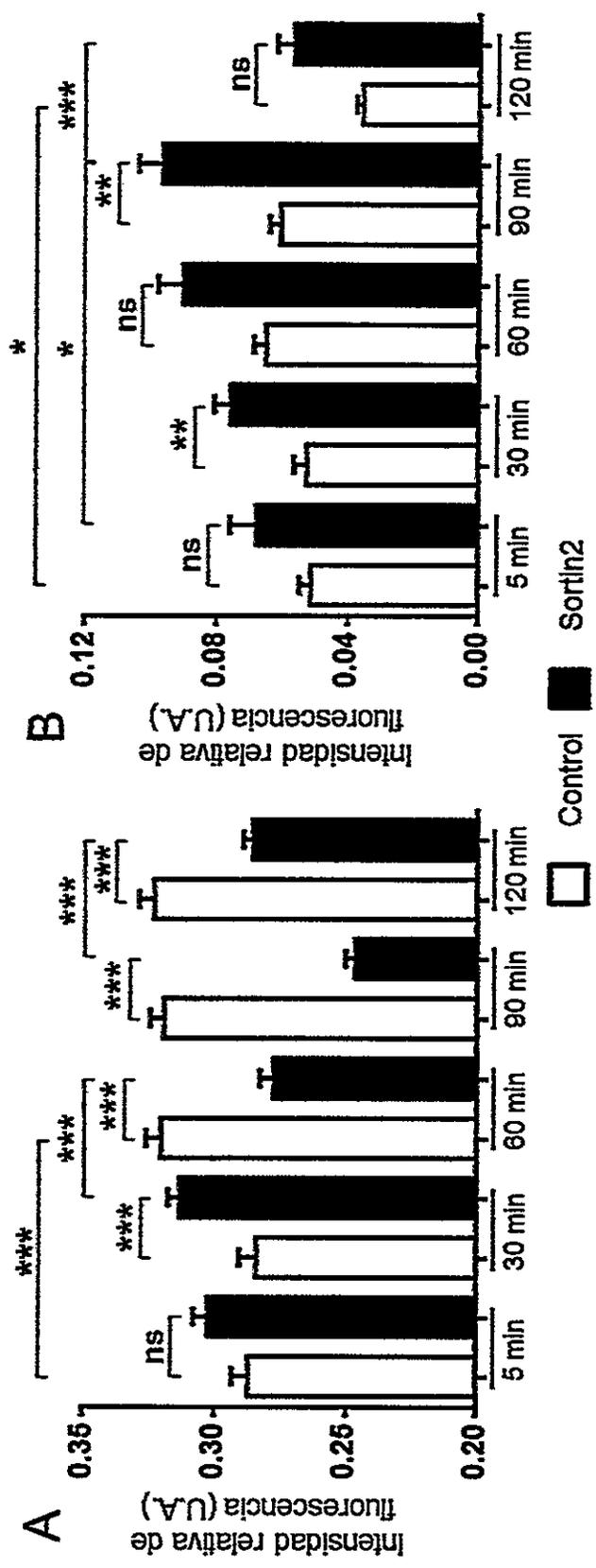


Figura 4. Cuantificación del reclutamiento del biosensor fluorescente de PI4P en la membrana plasmática y en compartimentos intracelulares en células de la raíz primaria bajo exposición a Sortin2. Se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia obtenida en la epidermis de la raíz primaria de plántulas YFP-PH¹FAPP intracelulares (B) relativa a la fluorescencia total celular en la epidermis de la raíz primaria de plántulas YFP-PH¹FAPP de 7 días expuestas al medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control, barras blancas) o Sortin2 25 µg/mL (barras negras) por 5, 30, 60, 90 y 120 minutos. Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de dos vías con post-prueba de Sidak (A) y prueba de Kruskal-Wallis con post-prueba de Dunn (B). * , p<0,05; ** , p<0,01; * , p<0,001; ns, cambio no significativo. Los resultados provienen de 58 a 96 células epidermales por condición control y de 58 a 132 células epidermales por condición con Sortin2**

Por lo tanto, se sugiere que la acción de Sortin2 provoca un aumento transitorio del nivel de PI4P en la membrana plasmática y en compartimientos intracelulares, membranas donde este lípido está enriquecido normalmente, aunque la temporalidad de este aumento transitorio es distinto entre estos dos compartimientos.

Para evaluar si la actividad PI4K es la responsable en el cambio de los niveles de PI4P promovido *in vivo* por Sortin2, se preincubó plántulas YFP-PH^{FAPP} con el inhibidor de la actividad PI4K, PAO, exponiéndolas posteriormente a Sortin2 manteniendo la inhibición química durante un intervalo de tiempo de hasta dos horas de coincubación. Para mantener inhibida la actividad PI4K se utilizó PAO 20 μ M (Figura 5), ya que existen reportes de que una dosis similar inhibe fuertemente la actividad PI4K (Okazaki, K. et al., 2015), lo cual se corresponde con la represión observada en la formación de raíces laterales (Figura 2). Se observa que PAO 20 μ M provoca una pérdida completa de la localización subcelular del biosensor en membranas, especialmente en la membrana plasmática en todos los tiempos analizados en la situación control (Figura 5). Esto sugiere una disminución drástica de los niveles de PI4P en las membranas subcelulares – al menos a un nivel menor a la concentración crítica en el que el biosensor es capaz de interactuar con el lípido -, lo cual indica que PAO 20 μ M inhibe drásticamente *in vivo* la actividad PI4K. Además, este resultado sugiere que la actividad PI4K es necesaria para mantener los niveles de PI4P en las membranas subcelulares. Por otra parte, se observa que Sortin2 no es capaz de revertir la pérdida de la localización subcelular del biosensor en membranas provocado por la inhibición de la actividad PI4K en los tiempos analizados (Figura 5). Esto sugiere que la actividad PI4K también es requerida para el aumento de los niveles de PI4P promovido por Sortin2.

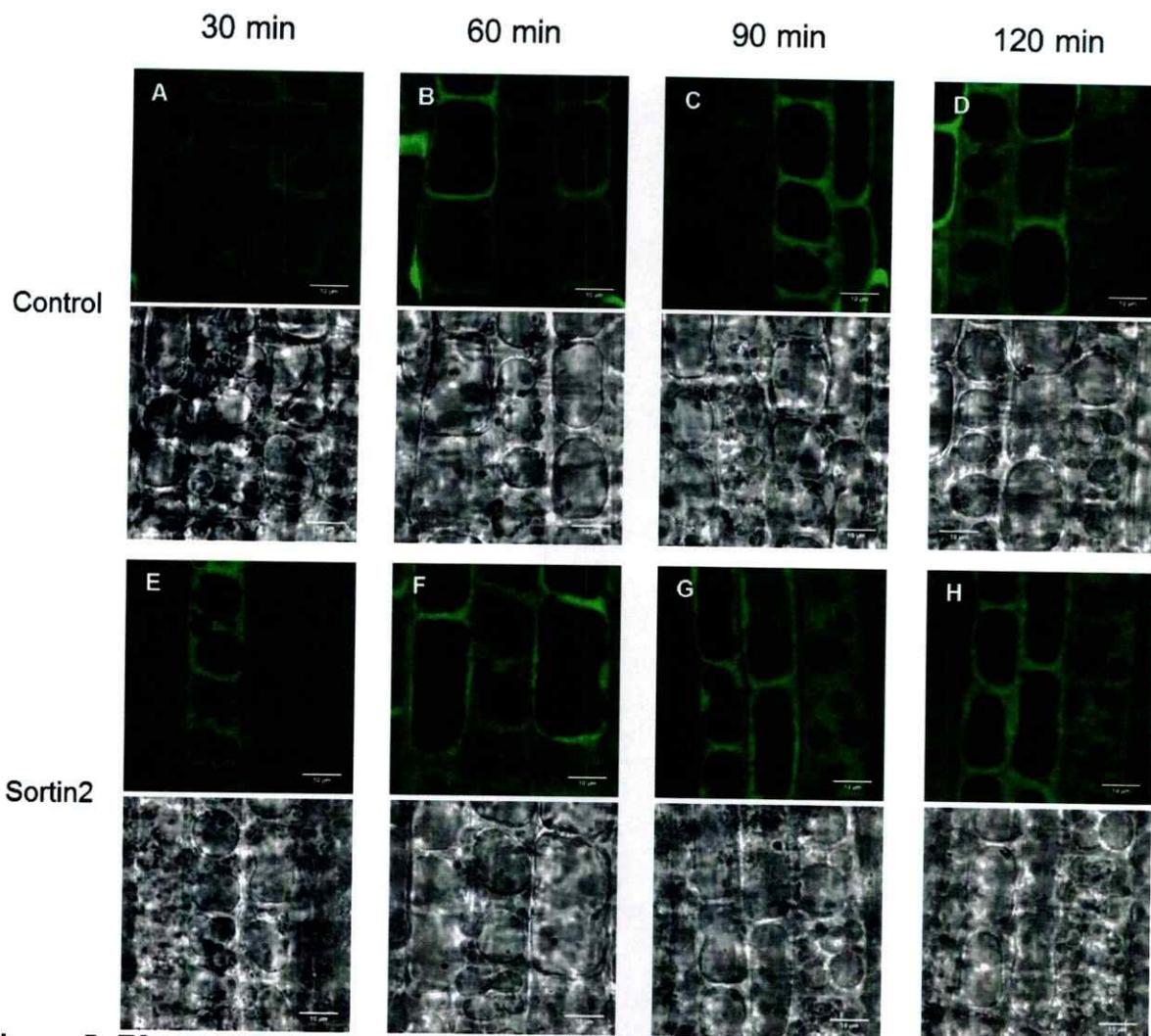


Figura 5. Efecto de la inhibición de la actividad PI4K en la distribución subcelular del biosensor de PI4P en células de la raíz primaria expuesta a Sortin2. Se muestra imágenes representativas que registran la fluorescencia de células de la epidermis de la raíz primaria de plántulas YFP-PH^{FAPP} de 7 días. Las plántulas fueron tratadas con PAO 20 μ M por 60 minutos para ser co-incubadas posteriormente con el inhibidor y el medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control; A-D) o Sortin2 25 μ g/mL (Sortin2; E-H) por 30 (A y E), 60 (B y F), 90 (C e G) y 120 minutos (D y H). Cada imagen está acompañada por su imagen de campo claro. Barra de tamaño: 10 μ m.

La formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2 es extraordinariamente sensible a la acción de PAO. La concentración de PAO más baja utilizada es suficiente para reprimir la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2 (Figura 2), por lo que permite discriminar la formación endógena de primordios de la inducida por Sortin2. Entonces para estudiar la importancia de la actividad PI4K que afecta solo la formación de primordios inducida por Sortin2 ahora a nivel celular, se evaluó el cambio que provoca Sortin2 tanto de localización como de intensidad de la fluorescencia asociada al biosensor de PI4P en plántulas YFP-PH^{FAPP} pretratadas con PAO 0,1 μ M y co-incubadas posteriormente con Sortin2 (Figura 6). Se observa que la fluorescencia asociada al biosensor se localiza en la membrana plasmática a todos los tiempos analizados en la situación control, de manera similar a lo observado en la condición sin inhibición de la actividad PI4K (Figura 3 control). Esto indica que PAO 0,1 μ M no afecta completamente la actividad PI4K *in vivo*. En contraste, se observa que PAO 0,1 μ M provoca una ausencia aparente del aumento de la fluorescencia asociada al biosensor en estructuras subcelulares punteadas provocado por la acción de Sortin2, en especial a 60 y 90 minutos de coincubación. Esto sugiere que la actividad PI4K que es crucial para la formación de primordios de raíces laterales inducido por Sortin2 también es necesaria para que se promueva el aumento de los niveles de PI4P en los compartimentos intracelulares.

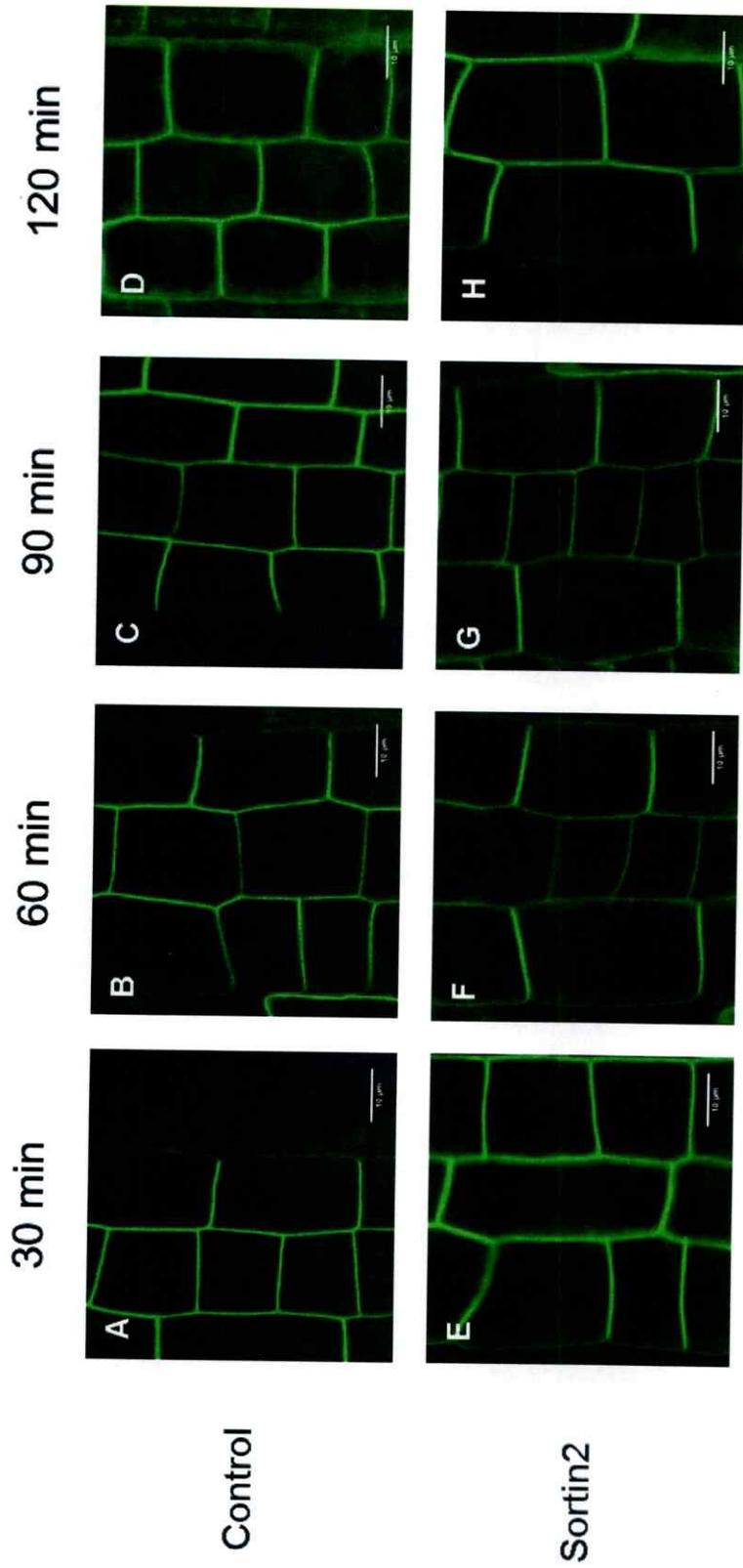


Figura 6. Efecto de la inhibición de la actividad PI4K que reprime la formación de primordios inducida por Sortin2 en la distribución subcelular del biosensor de PI4P. Se muestra imágenes representativas que registran la fluorescencia de células de la epidermis de la raíz primaria de plántulas YFP-PH^{FAPP} de 7 días. Las plántulas fueron tratadas con PAO 0,1 μ M por 60 minutos para ser co incubadas posteriormente con el inhibidor y el medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control; A-D) o Sortin2 25 μ g/mL (Sortin2; E-H) por 30 (A y E), 60 (B y F), 90 (C e G) y 120 minutos (D y H). Barra de tamaño: 10 μ m.

Para corroborar la importancia de la actividad PI4K sensible a PAO 0,1 μM en el aumento del nivel de PI4P por la acción de Sortin2, se procedió a cuantificar la intensidad de fluorescencia localizada tanto en la membrana plasmática como en los compartimentos intracelulares, relativa a la intensidad de fluorescencia total celular (Figura 7). Con respecto a la membrana plasmática (Figura 7 A), se observa que la fluorescencia relativa no varía a lo largo del tiempo analizado en la situación control, lo cual sugiere que la actividad PI4K sensible a PAO 0,1 μM participaría en la regulación del nivel endógeno de PI4P. Además, PAO 0,1 μM reprime el aumento de la fluorescencia relativa inducida por Sortin2 en comparación a su control a los 30 minutos, sin embargo la caída de la intensidad de fluorescencia aún persiste a tiempos posteriores. Con respecto a los compartimentos intracelulares (Figura 7 B), se observa que PAO 0,1 μM también inhibe el aumento de la intensidad de fluorescencia relativa asociada al biosensor inducido por Sortin2 en comparación a su control, pero aún se conserva la variación de la fluorescencia a lo largo del tiempo en la situación control e interesantemente se observa una ligera caída significativa de la intensidad de fluorescencia a 120 minutos de coincubación en comparación a 60 minutos de coincubación. Este comportamiento es similar a lo analizado en la membrana plasmática, por lo tanto sugiere fuertemente que la actividad PI4K sensible a PAO 0,1 μM – y crucial para la formación de primordios de raíces laterales inducido por Sortin2 – es importante para el aumento del nivel de PI4P inducido por Sortin2 en ambos compartimentos subcelulares. Sin embargo, esta actividad enzimática no participaría en la regulación del nivel de PI4P que sucede después del aumento temprano promovido por Sortin2.

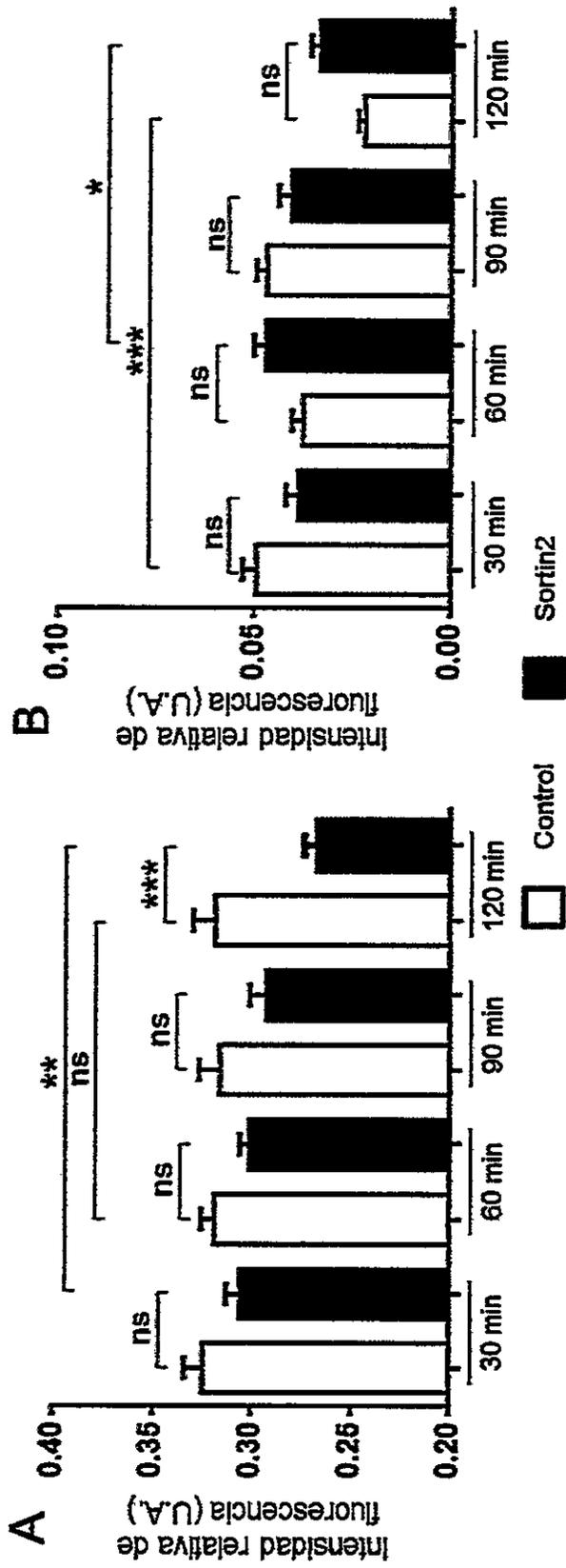


Figura 7. Cuantificación del reclutamiento del biosensor fluorescente de PI4P en la membrana plasmática y en los compartimentos intracelulares al inhibir la actividad PI4K en células de la raíz primaria bajo exposición a Sortin2. Se muestra la cuantificación de la intensidad de fluorescencia localizada en la membrana plasmática (A) y en compartimentos intracelulares (B) relativa a la fluorescencia de la célula en la epidermis de la raíz primaria de YFP-PH^{FAPP} de 7 días. Estas plántulas fueron tratadas con PAO 0,1 μ M por 60 minutos para después ser co-incubadas con el inhibidor y el medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control, barras blancas) o Sortin2 25 μ g/mL (barras negras) por 30, 60, 90 y 120 minutos. Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de dos vías con post-prueba de Sidak; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, ns, cambio no significativo. Los resultados provienen de 23 a 35 células epidermales por condición sin Sortin2 y de 23 a 39 células epidermales por condición con Sortin2

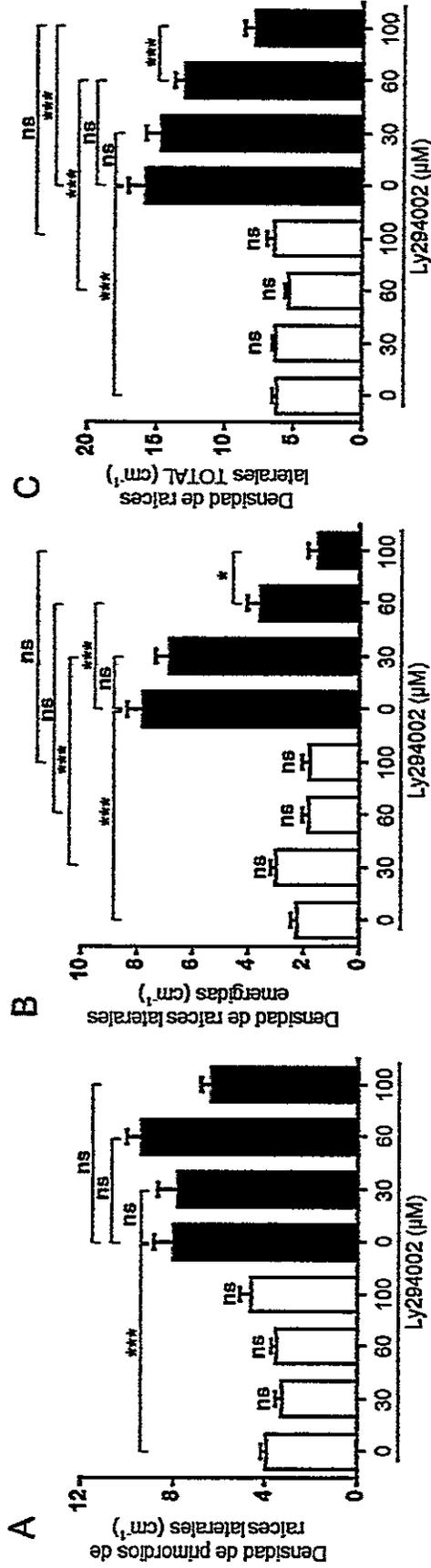
4.1.3.- Evaluación de la participación de la actividad PI3K en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.

Se ha sugerido que la actividad PI4K es crucial para la formación de primordios de raíces laterales promovida por Sortin2 y coherentemente es requerida para el aumento transitorio de los niveles de PI4P promovido por Sortin2. Para estudiar si la actividad PI3K participa en la formación de raíces laterales, se analizó el efecto que causa inhibidores selectivos de la actividad PI3K tanto en la formación endógena de raíces laterales como en la inducida por Sortin2.

Los inhibidores utilizados son LY294002 y Wortmanina (Vlahos, C. et al., 1994; Jung, J. et al., 2002; Delage, E. et al., 2012), sin embargo en ambas drogas la especificidad a PI3K presenta dosis-dependencia. Se ha reportado que LY294002 solo inhibe la actividad PI3K (Vlahos, C. et al., 1994; Jung, J. et al., 2002) y de hecho, presenta efectos fisiológicos en *Arabidopsis thaliana* a concentraciones menores de 30 μM [Lee, Y. et al., 2008 (2)], pero recientemente se ha reportado que LY294002 50 μM o una mayor concentración repercute negativamente en el nivel celular de PI4P, lo cual sugiere que afecta también la actividad PI4K en *Arabidopsis thaliana* (Okazaki, K. et al., 2015). En relación a wortmanina, se ha documentado que la inhibición de la actividad PI3K comienza a ser afectada en concentraciones submicromolares de la droga, mientras que a una concentración mayor a 10 μM comienza a afectar también la actividad PI4K (Matsuoka, K. et al., 1995; Delage, E. et al., 2012). Por lo tanto, se tomó la decisión de analizar tanto la formación endógena de raíces laterales como la inducida por Sortin2 en diferentes dosis de LY294002 y wortmanina que abarcaran

concentraciones que presentan especificidad a la actividad PI3K y concentraciones que inhiben a ambas actividades PI-quinasa (Figuras 8 y 9).

Al analizar la perturbación que causa LY294002 en la formación endógena de raíces laterales (Figura 8), se observa que la droga no afecta en ninguna concentración utilizada la densidad de primordios ni la de raíces laterales emergidas en comparación a la condición control, lo cual es coherente con que no se observe cambios significativos en la densidad de eventos totales de raíces laterales. Esto sugiere que la actividad PI3K no participa en la formación endógena de raíces laterales. Con respecto a la formación de raíces laterales promovida por Sortin2, se observa que todas las condiciones con LY294002 presentan una densidad de primordios de raíces laterales comparable a su control sin inhibidor (Figura 8 A). Sin embargo, se observa que las condiciones con LY294002 60 y 100 μM presentan una disminución significativa en la densidad de raíces laterales con respecto a su control sin inhibidor a un nivel similar al presentado en la formación endógena de raíces laterales emergidas (Figura 8 B). Esto repercute en que LY294002 100 μM provoca una disminución completa de los eventos totales de raíces laterales promovido por Sortin2 (Figura 8 C). Por lo tanto, se sugiere que LY294002 100 μM afecta la formación de primordios y la de raíces laterales emergidas inducida por Sortin2. No obstante, LY294002 reprime la formación de raíces laterales inducida por Sortin2 en concentraciones de la droga que inhibe también la actividad PI4K, por lo tanto la participación de la actividad PI3K en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2 no es posible sugerirla.



□ Control ■ Sortin2

Figura 8. Efecto de LY294002 en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2. Se muestra las densidades de primordios de raíces laterales (A), de raíces laterales emergidas (B) y de los eventos totales de raíces laterales (C) de plántulas silvestres de 10 días. Estas plántulas fueron co-tratadas durante sus últimos tres días de crecimiento con un medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control, barras blancas) o Sortin2 25 μg/mL (barras negras) y con diferentes dosis de LY294002. Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de una vía con post-prueba de Sidak: *, p<0,05; ***, p<0,001; ns, cambio no significativo. La simbología sobre las barras se refiere a la comparación de la situación experimental con la situación control sin LY294002. Los resultados provienen de 14 a 18 plántulas por condición Control y de 14 a 20 plántulas por condición con Sortin2.

Al analizar el efecto que provoca Wortmanina en la formación endógena de raíces laterales (Figura 9), se observa que la densidad de primordios, raíces laterales emergidas y en consecuencia, la de los eventos totales de raíces laterales en las diferentes condiciones con el inhibidor es comparable al control sin inhibidor. Este resultado ratifica que la participación de la actividad PI3K sería dispensable en la formación endógena de raíces laterales. Con respecto a la formación de raíces laterales promovida por Sortin2, se observa que tanto la densidad de primordios, la de raíces laterales emergidas y la de los eventos totales de raíces laterales en las concentraciones menores utilizadas de wortmanina (1 y 5 μM) son comparables al de su control sin inhibidor. Sin embargo, se observa una disminución significativa en la producción de primordios y raíces laterales emergidas inducida por Sortin2 de las condiciones con las concentraciones mayores de wortmanina - en especial la de 33 μM - en comparación a Sortin2 sin el inhibidor (Figura 9 A y 9 B). Esto repercute en que Wortmanina 33 μM provoca una represión completa de la formación de raíces laterales totales promovida por Sortin2 (Figura 9 C). Sin embargo, y al igual que al utilizar LY204002, como la formación de raíces laterales inducida por Sortin2 es reprimida en concentraciones de wortmanina que inhibe a la actividad PI3K, pero también a la actividad PI4K, los datos no permiten concluir si la actividad PI3K participa en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.

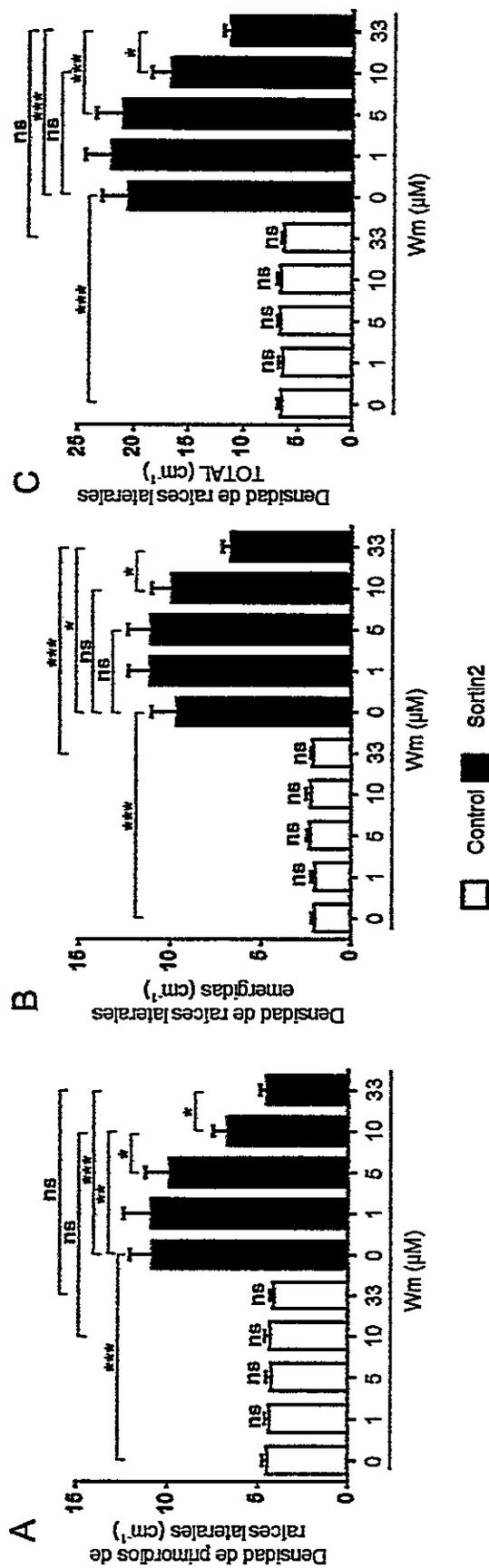


Figura 9. Efecto de wortmanina en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2. Se muestra las densidades de primordios de raíces laterales (A), de raíces laterales emergidas (B) y de eventos totales de raíces laterales (C) de plántulas silvestres de 10 días. Estas plántulas fueron co-tratadas durante sus últimos tres días de crecimiento con un medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control, barras blancas) o Sortin2 25 µg/mL (barras negras) y con diferentes concentraciones de Wortmanina (Wm). Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de dos vías con post-prueba de Sidak: *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; n.s, cambio no significativo. La simbología sobre las barras se refiere a la comparación de la situación experimental con la situación control sin el inhibidor. Los resultados provienen de 13 a 14 plántulas por condición control y de 11 a 14 plántulas por condición con Sortin2.

4.1.4.- Evaluación *in vivo* del cambio de los niveles de fosfatidilinositol 3-fosfato provocado por Sortin2.

La actividad PI3K consiste en la producción de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) debido a la fosforilación de fosfatidilinositol en la posición 3 de su residuo de inositol. Los datos obtenidos previamente no son concluyentes para sugerir o rechazar la participación de la actividad PI3K en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2. Aun así, se procedió a evaluar si Sortin2 induce un cambio en los niveles de PI3P. Entonces, se procedió a realizar una estrategia similar al estudio del cambio del nivel de PI4P frente a Sortin2, utilizando la línea transgénica que expresa el gen que codifica para la proteína fluorescente amarilla fusionada al dominio proteico denominado FYVE (acrónimo de Fab 1, YOTB, Vac 1 y EEA1, proteínas pertenecientes a *Saccharomyces cerevisiae* que poseen este dominio y que interactúan específicamente con PI3P (FYVE se encuentra repetido una vez en tándem, YFP-2xFYVE; Thole, J. et al., 2008; Simon, M. et al., 2014).

Se ha determinado que PI3P está enriquecido principalmente en endosomas tardíos/cuerpos pre-vacuolares y en menor medida en la membrana de la vacuola en *Arabidopsis thaliana* (Simon, M. et al., 2014). Por lo tanto, se realizó un estudio preliminar analizando cualitativamente si la acción de Sortin2 cambia la localización subcelular del biosensor en comparación al control durante un intervalo de tiempo de dos horas de exposición a Sortin2 (Figura 10). Primero que todo, se observa en los diferentes tiempos de la condición control que la mayor parte de la fluorescencia asociada al biosensor se encuentra enriquecida en estructuras punteadas en apariencia de mayor tamaño que lo observado en la línea transgénica YFP-PH^{FAPP} y sin detectar la

señal en la periferia celular, lo cual es concordante con lo descrito en la literatura (Simon, M. et al., 2014). Con respecto a la localización subcelular del biosensor bajo la exposición a Sortin2, se observa que la fluorescencia asociada al biosensor está aún asociada a las estructuras punteadas que están presentes en la situación control, pero interesantemente se observa nuevas estructuras tipo anillo en los diferentes tiempos analizados, las cuales co-localizan con el borde de estructuras tipo vacuola observadas en el campo claro. Esto sugiere que estas estructuras tipo anillo corresponden a tonoplasto. Por lo tanto, estos resultados sugieren que Sortin2 provocaría al menos un aumento del nivel de PI3P en el tonoplasto.

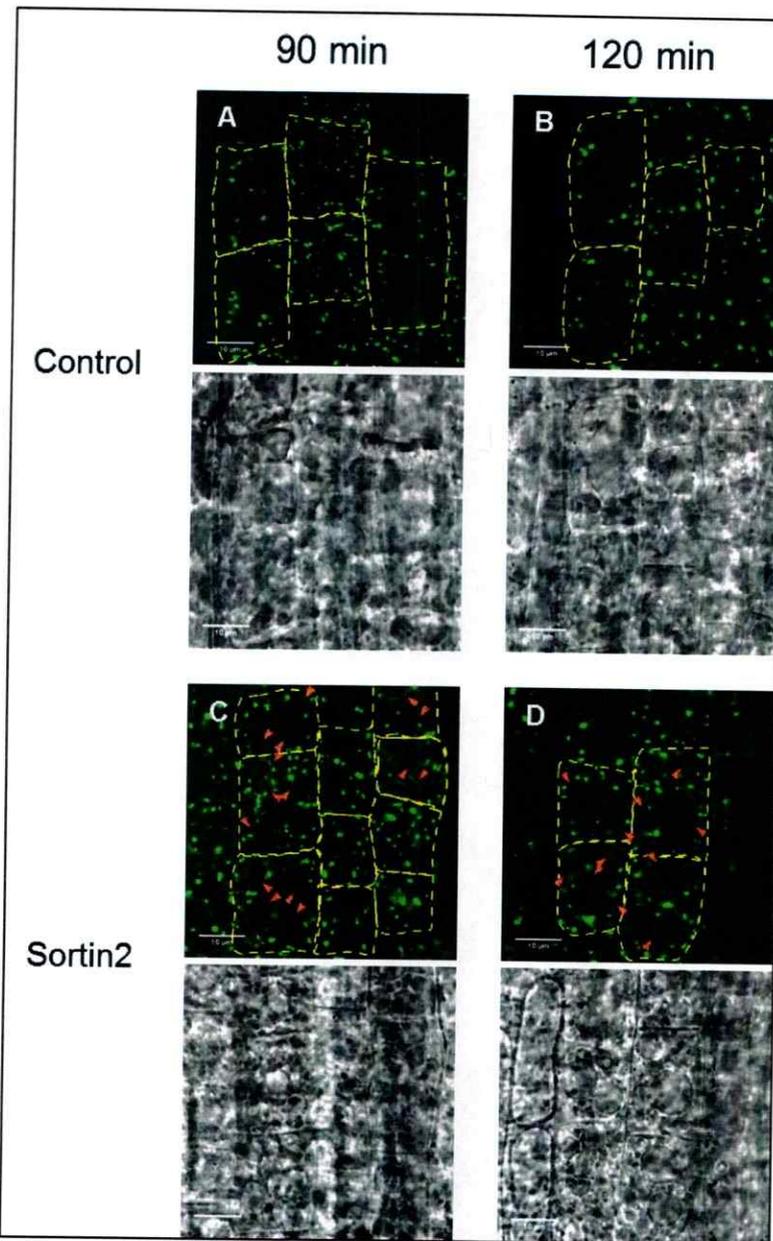


Figura 10. Distribución subcelular del biosensor de PI3P en células de la raíz primaria de *Arabidopsis* bajo la exposición a Sortin2. Se muestra imágenes representativas que registran la fluorescencia de células de la epidermis de la raíz primaria de plántulas de 7 días que acumulan el biosensor de PI3P, YFP-2xFYVE. Las plántulas fueron expuestas a medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control; A-B) o Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sortin2; C-D) por 90 (A y C) o 120 minutos (B y D). Cada imagen está acompañada por su respectiva imagen de campo claro. Se ha delimitado el límite celular de algunas células para facilitar su observación. Las puntas de flecha rojas apuntan a estructuras anulares YFP positivas que co-localizan con estructuras tipo vacuola observadas en la respectiva imagen de campo claro. Barra de tamaño: 10 μm .

4.2.- Evaluación del papel fisiológico de la función de la fosfatidilinositol 3-quinasa y las fosfatidilinositol 4-quinasa en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.

4.2.1.- Evaluación de la participación de la subfamilia *PI4KIIIβ* de las PI4K en la formación de raíces laterales.

En el capítulo anterior se sugirió que la actividad PI4K participa en la formación de raíces laterales. En específico, esta actividad es crucial en la formación de primordios inducida por Sortin2. Sin embargo, se ha reportado que la actividad PI4K está codificada por 12 genes en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Mueller-Roeber, B. & Pical, C., 2002), lo cual aparentemente impone una dificultad para el estudio de las PI4K mediante la pérdida de función debido a la posible redundancia en la función de estos 12 productos proteicos. Hasta el momento, se ha descrito que tres productos génicos presentan actividad PI4K: *PI4KIIIα1*, *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* (Delage, E. et al., 2012). Sin embargo, de estos tres, solo la función de la subfamilia *PI4KIIIβ* ha sido reportada que participa en el tejido radicular en *Arabidopsis thaliana*: se ha descrito que *PI4KIIIα1* participa en la biogénesis del cloroplasto (Okasaki, K. et al., 2015), mientras que la subfamilia *PI4KIIIβ* impacta en el crecimiento por la punta del pelo radicular y participa en la disposición de la placa celular en las células de la raíz primaria, razón por la cual puede explicar la severa disminución de tamaño de la raíz primaria de las plántulas con pérdida de función de la subfamilia *PI4KIIIβ* con respecto a la de las plántulas silvestres (*pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2*; Preuss, M. et al., 2006; Figura 11 A y B).

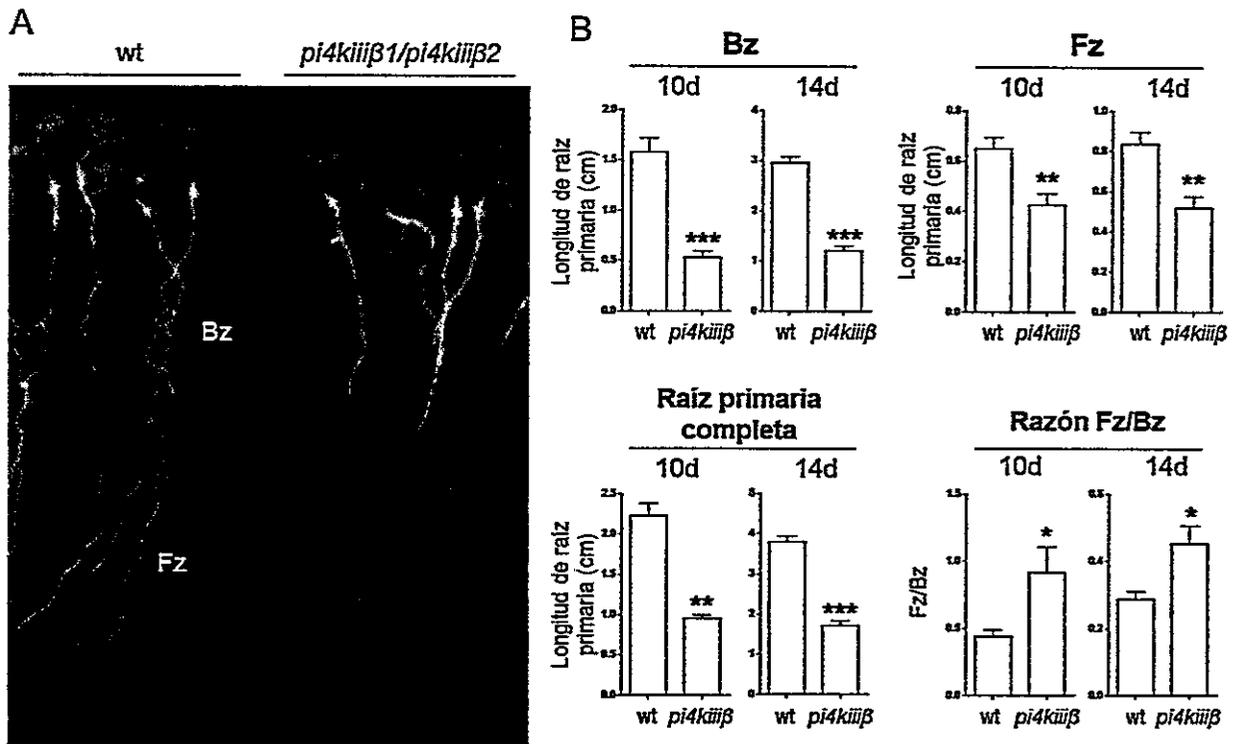


Figura 11. Evaluación del fenotipo de la raíz primaria de la línea con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2*. Se muestra plántulas de 10 días de la línea con pérdida de función de la subfamilia *PI4KIIIβ* (*pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2*) comparadas con plántulas silvestres Ecotipo Col-0 (wt) (A). Barra de tamaño: 1 cm. Se cuantificó la longitud de dos zonas de la raíz primaria de plántulas silvestres y *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* de 10 (10d) y 14 días (14d) crecidas en medio de cultivo sólido: la zona de ramificación de raíces laterales (*branching zone*; Bz) y la zona de formación de raíces laterales (*formation zone*; Fz) (B). El análisis estadístico se realizó mediante t-student de dos colas: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. Los resultados provienen de 9 a 11 plántulas por condición.

Esta línea mutante presenta un inserto de T-DNA en las secuencia codificante de los genes *PI4KIIIβ1* (At5g64070) y *PI4KIIIβ2* (At5g09350). Esta interrupción debido los T-DNA es homocigota para ambos genes provocando la disminución drástica de los transcritos de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* (Preuss, M. et al., 2006).

Debido a la carencia de publicaciones que vinculen la función de alguna de las PI4K con la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*, se analizó el impacto de la falta de función de *PI4KIIIβ* en la formación endógena de las raíces laterales. Para estudiarla con un poco más de profundidad, se implementó la sugerencia documentada en Dubrowsky, J. & Forde, B., 2012, en el cual proponen cuantificar la formación de primordios y raíces laterales emergidas en las dos zonas de la raíz primaria con respecto a la organogénesis de raíces laterales. Primero, la **zona de formación de raíces laterales (Fz)** es la sección de la raíz primaria que comprende entre el primordio y la raíz lateral emergida más apical, por ende al cuantificar los primordios en esta zona permite separar pulcramente su formación de la interferencia provocada por la emergencia de raíces laterales. Segundo, la **zona de ramificación (Bz)** es la sección de la raíz primaria comprendida entre la raíz lateral emergida más apical y el inicio del hipocotilo - donde los primordios iniciados y desarrollados en la zona de formación pueden emerger de la raíz primaria. Coherentemente, se observa que las dos zonas de la raíz primaria en la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* son de menor longitud que las de las plántulas silvestres y este rasgo se mantiene a una edad posterior de las plántulas (Figura 11 B). Es más, se encontró que las plántulas mutantes presentan una zona de formación de raíces laterales de mayor longitud en relación a su zona de ramificación, comparadas con la de las plantas silvestres (Figura 11 B), lo cual podría alterar la

cuantificación de los eventos debido a la distribución diferencial de estas zonas con respecto a las plantas silvestres. Esta evidencia valida la estrategia de cuantificar los eventos de raíces laterales en estas dos zonas de la raíz primaria.

Primero que todo, se observa que la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* presenta una mayor densidad de primordios en comparación a las plántulas silvestres, tanto en la zona de formación como en la zona de ramificación de raíces laterales, lo cual se mantiene a los 14 días de edad (Figura 12 A). Esto sugiere que la formación de primordios está aumentada en la línea mutante *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2*. Por su parte, la densidad de raíces laterales emergidas en *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* es comparable a lo observado en las plantas silvestres de 10 días de edad en la zona de ramificación, sin embargo presenta un aumento significativo a los 14 días de edad (Figura 12 B). Por ende, es improbable que el aumento de la densidad de los primordios en *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* se deba a un defecto en la emergencia, sino más bien a un aumento neto de la formación de primordios, lo cual se reafirma con la mayor densidad de eventos totales de raíces laterales en la zona de ramificación de la línea mutante al compararlo con las plántulas silvestre tanto a los 10 como a los 14 días de edad (Figura 12 C). Por lo tanto, se sugiere que la subfamilia *PI4KIIIβ*, *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* participa en la formación endógena de primordios de raíces laterales como un regulador negativo, en contraste con que su participación parece ser dispensable en la formación endógena de raíces laterales emergidas.

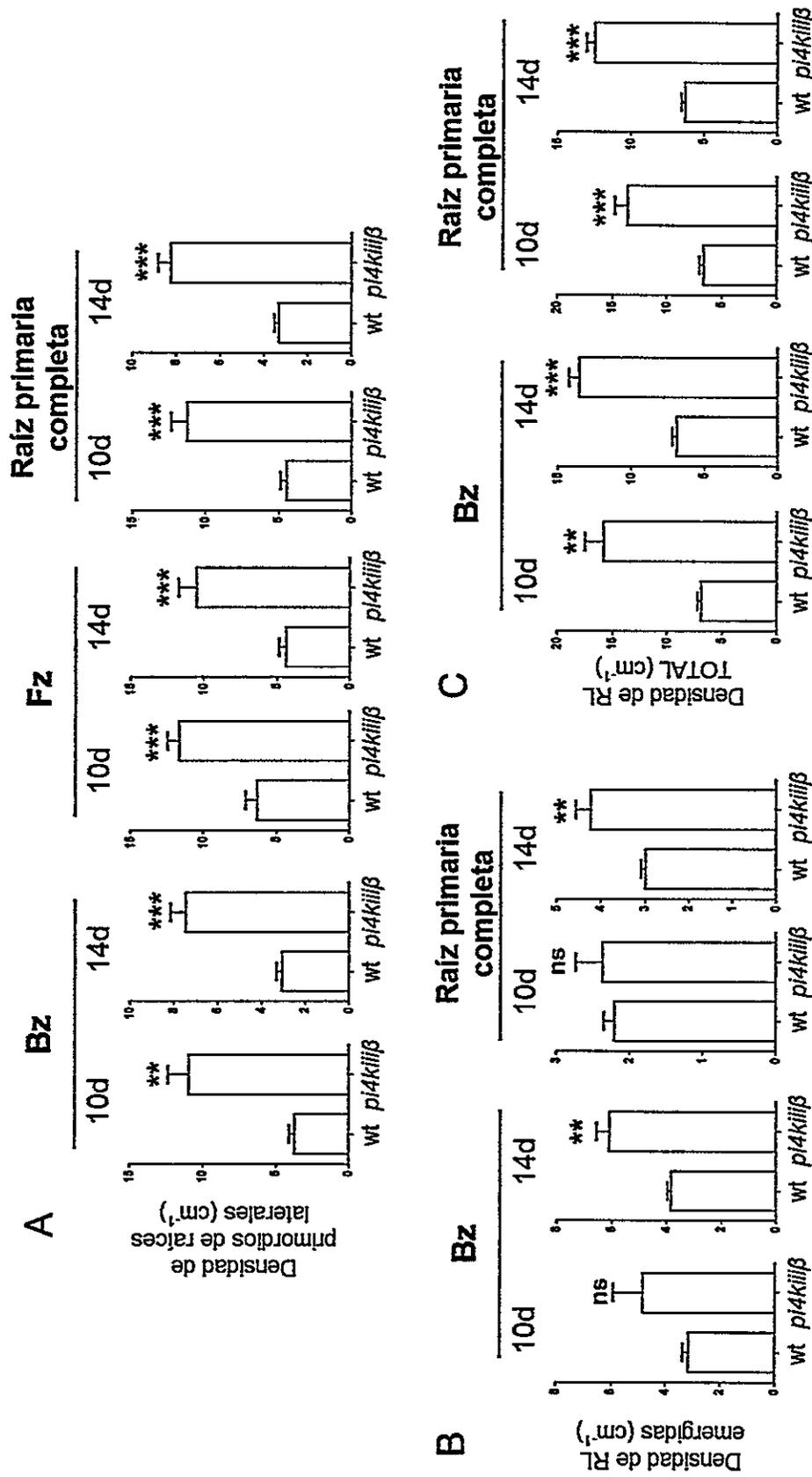


Figura 12. Evaluación de la formación de raíces laterales de la línea con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2*. Se muestra las densidades de primordios (A), de raíces laterales emergidas (B) y de eventos totales de raíces laterales (C) tanto en la zona de ramificación (Bz), de la zona de formación (Fz) de la raíz primaria y la raíz primaria completa de plántulas silvestres Ecotipo Col-0 (wt) y de *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* (wt) y de *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* de 10 y 14 días crecidas en medio de cultivo MS sólido. Se analizó estadísticamente los resultados mediante prueba t-student de dos colas: **, p<0,01; ***, p<0,001; ns, cambio no significativo. Los resultados provienen de 9 a 11 plántulas por condición.

La pérdida de función de la subfamilia *PI4KIIIβ* incrementa la formación de raíces laterales, debido exclusivamente a su impacto en la formación de primordios. Por lo tanto, se estudió la importancia de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2, analizando la respuesta a Sortin2 en la formación de raíces laterales (Figura 13). Para ello, se relativizó la densidad de los eventos de raíces laterales inducida por Sortin2 con respecto a su respectiva densidad de eventos endógenos de raíces laterales.

Se observa que Sortin2 promueve la formación de primordios y de raíces laterales emergidas en las plantas silvestres de manera dosis dependiente (Figura 13). Sin embargo, la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* presenta una nula respuesta en la formación de primordios inducida por Sortin2 en todas las dosis usadas (Figura 13 A). Esto sugiere que la línea mutante *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* es insensible a la formación de primordios promovida por Sortin2. En contraste, existe una respuesta mayor a Sortin2 de la línea mutante en la formación de raíces laterales emergidas que la de las plantas silvestres en todas las dosis usadas (Figura 13 B). Aun así, se observa una menor inducción de eventos totales de raíces laterales asociada a la acción de Sortin2 en la línea mutante en comparación a las plantas silvestres (Figura 13 C). Estos resultados indican que la línea mutante es menos sensible que las plantas silvestres a la inducción de Sortin2 en la formación de raíces laterales debido a la insensibilidad en la inducción de la formación de primordios. Por lo tanto, se sugiere que la función de *PI4KIIIβ* es crucial para la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2.

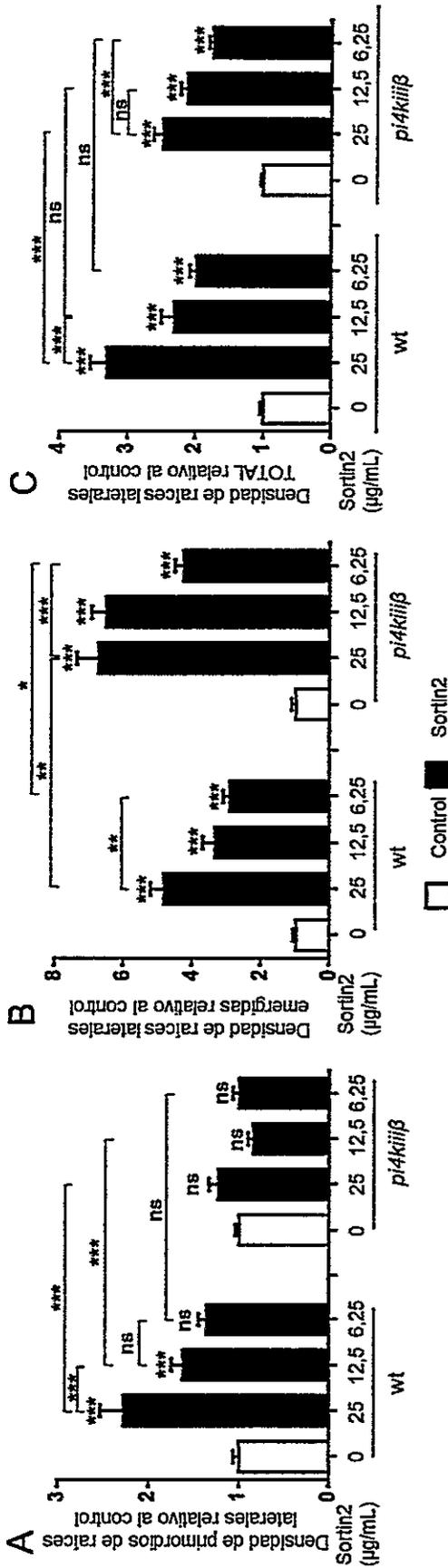


Figura 13. Respuesta de la línea con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* a la inducción de raíces laterales promovida por Sortin2. Se muestra las densidades de primordios de raíces laterales (A), de raíces laterales emergidas (B) y de eventos totales de raíces laterales (C) de plántulas silvestres Ecotipo Col-0 (wt) y de la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* (*pi4kiiiβ*) de 10 días. Estas plántulas fueron tratadas durante los últimos tres días de crecimiento en un medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control, barras blancas) o con Sortin2 a 25, 12,5 o 6,25µg/mL (barras negras). Los resultados son mostrados con respecto a la condición sin Sortin2. Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de dos vías, post-prueba de Sidak: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ns, cambio no significativo. La simbología sobre las barras se refiere a la comparación entre esta situación experimental y su control sin Sortin2. Los resultados provienen de 16 a 33 plántulas por condición.

La insensibilidad a la formación de primordios inducida por Sortin2 observada en la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2*, se podría explicar por una formación endógena de primordios incrementada, por ende puede que este proceso esté saturado y no pueda responder a algún estímulo que promueva la formación de primordios. Para pesquisar si la línea mutante presenta defectos en la formación de primordios inducidos por algún agente externo, se estudió la respuesta en la formación de raíces laterales en *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* que causa la aplicación exógena de la auxina NAA (Figura 14).

Se observa que NAA promueve la formación de primordios y raíces laterales emergidas en las plántulas silvestres. Sin embargo, y en contraste con la Figura 12, la línea mutante responde positivamente a la formación de primordios inducidos por la auxina exógena, aunque en menor magnitud que lo observado en la respuesta de las plántulas silvestres (Figura 14 A). Esto indica que la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* aún posee la capacidad de promover nuevos eventos de raíces laterales, por lo que refuerza la importancia crucial de la subfamilia PI4KIIIβ en la formación de primordios inducidos por Sortin2. También, este resultado sugiere que PI4KIIIβ participa en la formación de primordios inducido por la auxina exógena NAA. Por otra parte, se observa que la línea mutante presenta una hipersensibilidad en la respuesta a la formación de raíces laterales emergidas inducida por la auxina exógena (Figura 14 B), de similar manera que lo observado en la formación de raíces laterales emergidas inducida por Sortin2 (Figura 13 B). Este resultado sugiere que la hipersensibilidad observada en la respuesta de *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* a Sortin2 en la formación de las raíces laterales emergidas no es específica, o sea no dependería del estímulo en sí mismo.

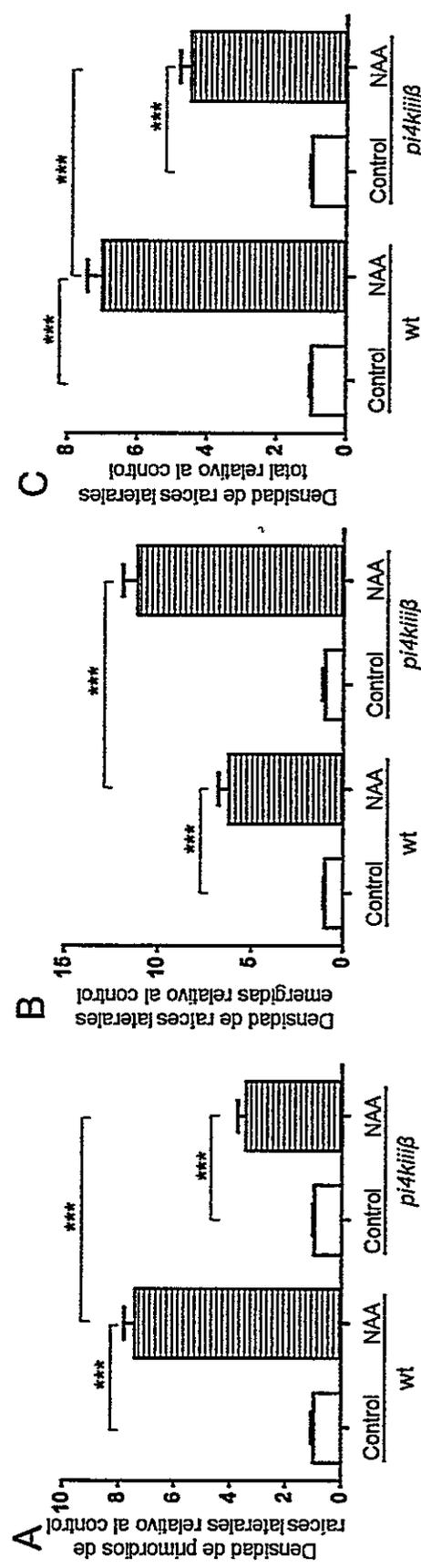


Figura 14. Respuesta de la línea con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* a la inducción de raíces laterales promovida por la aplicación exógena de la auxina NAA. Se muestra la densidad de primordios de raíces laterales (A), raíces laterales emergidas (B) y eventos totales de raíces laterales (C) de plántulas silvestres Ecotipo Col-0 (wt) y *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2 (pi4kiiiβ)* de 10 días. Estas plántulas fueron incubadas en medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control) o NAA 1mM durante los últimos tres días de crecimiento. Los resultados son mostrados como la densidad con respecto a la condición sin NAA. Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de dos vías con post-prueba de Sidak: *, $p < 0,001$. Los resultados provienen de 10 a 20 plántulas por condición.**

La pérdida de función de la subfamilia *PI4KIIIβ* provoca una disminución en el nivel de PI4P en planta completa, lo cual es coherente con la comprobada actividad PI4K que posee *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* (Delage, E. et al., 2012). Por ende, se hipotetiza que la disminución en el nivel de PI4P registrado en la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* causa los defectos en la formación endógena de primordios y en la inducida por Sortin2. Para evaluar si PI4P es importante en la formación de raíces laterales, se estudió tanto la formación endógena como la inducida por Sortin2 en *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* aplicando PI4P de manera exógena. Antes de analizar los resultados, cabe señalar que los fosfatidilinositol fosfato aplicados exógenamente son incubados con un agente proteico o carrier que interactúa con el lípido y facilita la internalización al organismo vegetal (Zheng, J. et al., 2014; Xu, N. et al., 2011; Echelon Biosciences Inc.). Por lo tanto, es recomendado un control adicional al del solvente: el carrier sin el lípido en el tratamiento (Figura 15).

Con respecto a la formación endógena de raíces laterales, se puede observar que la línea mutante presenta una menor densidad de primordios al ser expuesta al complejo Carrier:PI4P en comparación a las condiciones control tanto sin el carrier proteico como en presencia del carrier (Figura 15 A). Esto se ve reflejado en la disminución significativa de la densidad total de raíces laterales al comparar la condición Carrier:PI4P con sus controles, ya que la densidad de raíces laterales emergidas bajo la exposición al complejo carrier:PI4P es comparable a sus controles (Figura 15 B y C).

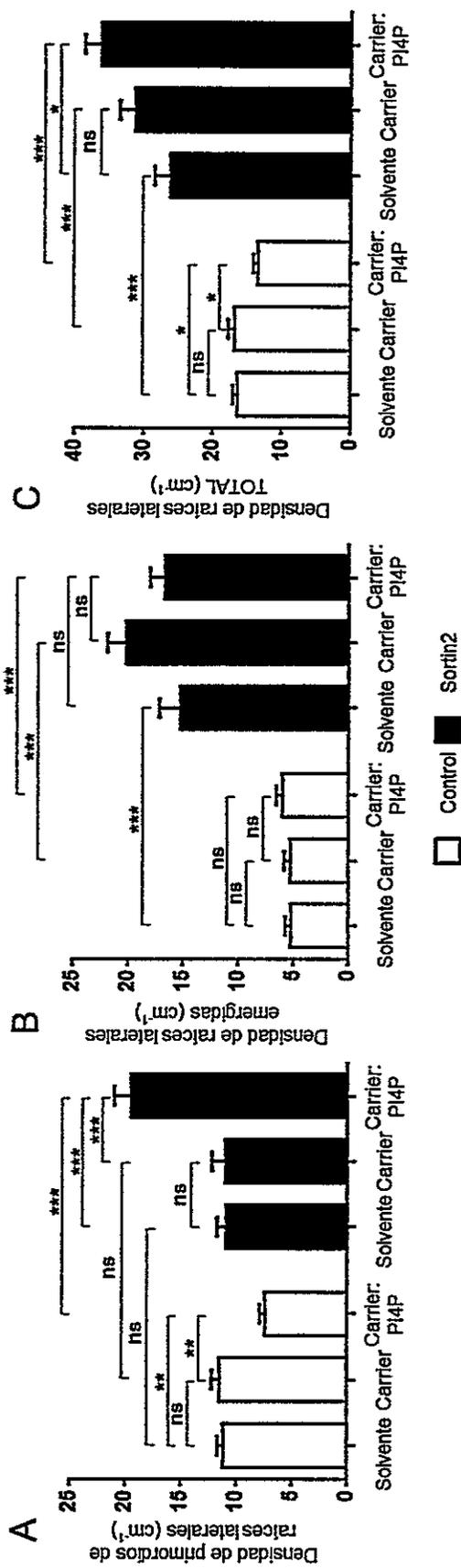


Figura 15. Rescate del defecto de la línea mutante con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* al administrar exógenamente PI4P. Se muestra las densidades de primordios de raíces laterales (A), de raíces laterales emergidas (B) y de eventos totales de raíces laterales (C) de plántulas de la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* de 10 días. Estas plántulas fueron incubadas durante los últimos cinco días de crecimiento en un medio de cultivo líquido 1% DMSO v/v (Control, barras blancas) o Sortin2 25µg/mL (barras negras). Además, se le adicionó una solución de CHCl₃:CH₃OH:H₂O (1:2:0,8 v/v) 2,86% v/v (Solvente), la proteína Carrier 3 15 µM (Carrier) más la solución de CHCl₃:CH₃OH:H₂O o el complejo Carrier 3:PI4P 15 µM (Carrier:PI4P). Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de dos vías con post-prueba de Sidak: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ns, cambio no significativo. Los resultados provienen de 14 a 25 plántulas por condición.

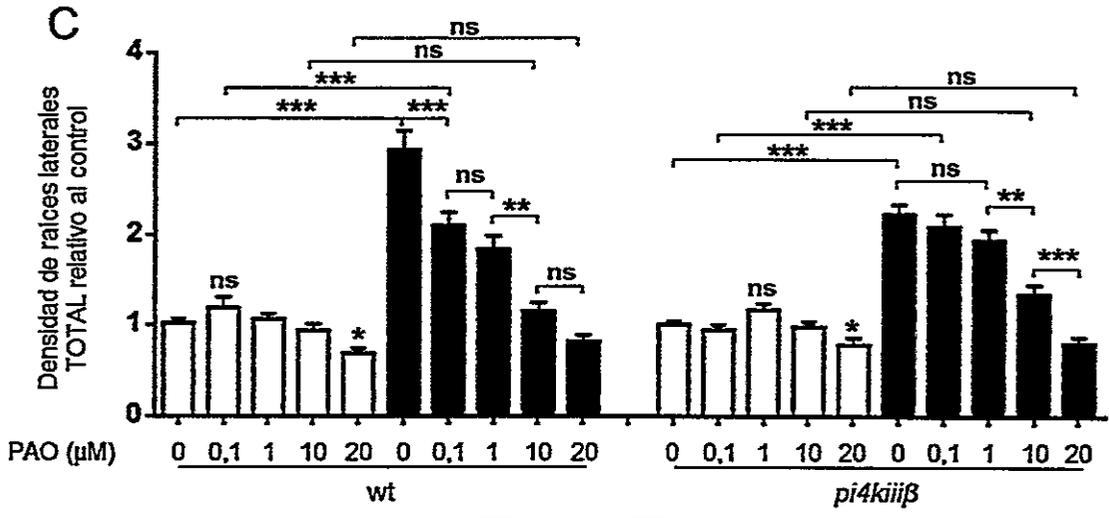
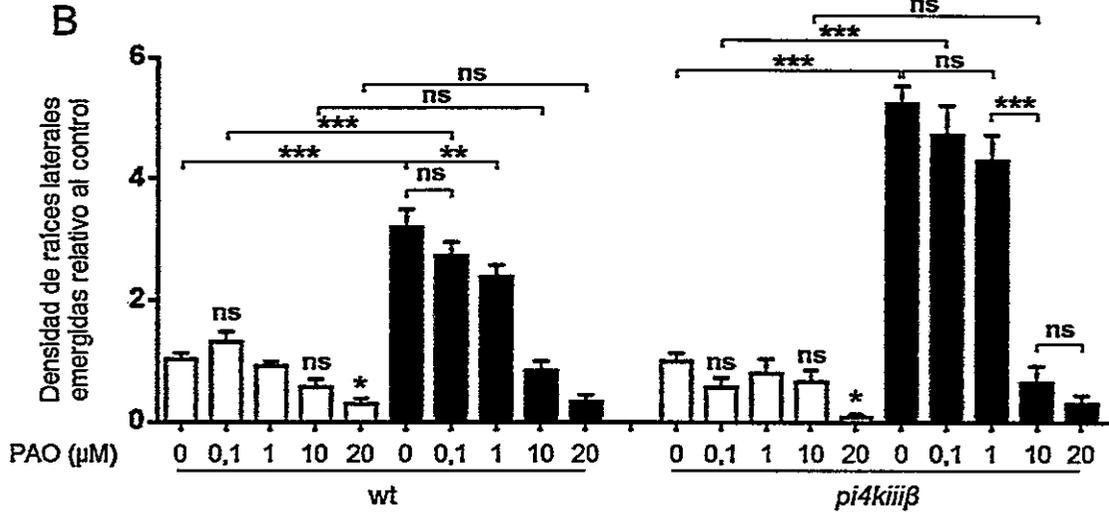
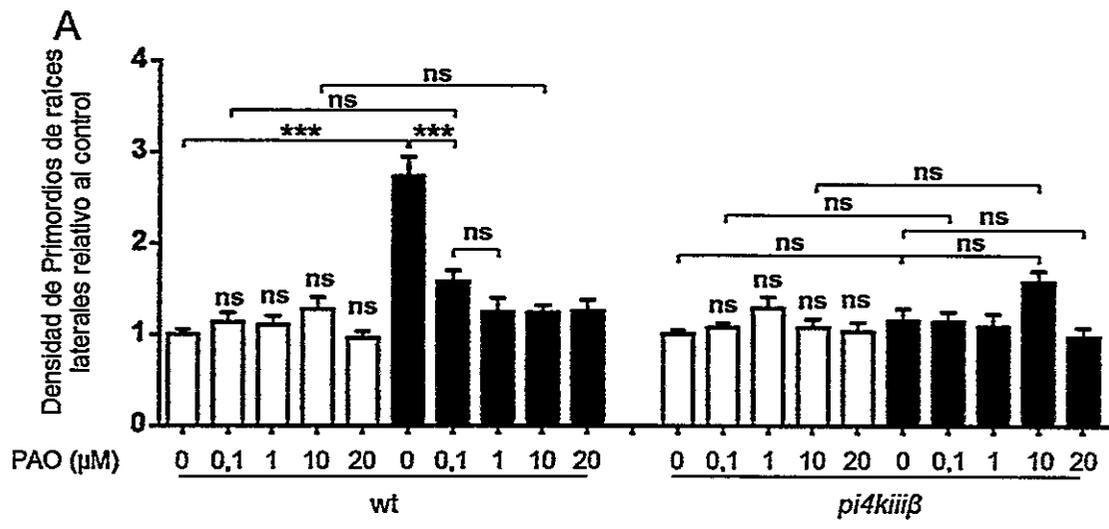
Estos resultados revelan que la adición exógena de PI4P impacta específicamente en la formación endógena de primordios, rescatando su incremento en la línea mutante *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2*. Esto sugiere que la disminución crónica de PI4P es un factor importante en regulación de la formación endógena de primordios de raíces laterales.

Con respecto a la formación de raíces laterales inducida por Sortin2, se observa que la densidad de primordios de la línea mutante en las condiciones controles (ausencia y presencia del Carrier proteico) son comparables a la formación endógena de primordios sin PI4P, evidenciando la nula respuesta de *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* a Sortin2 en la formación de primordios. En contraste, existe un significativo incremento en la densidad de primordios bajo la condición con PI4P en comparación a sus controles y también con respecto a la formación endógena de primordios con PI4P (Figura 15 A). Esto se refleja en un incremento significativo de la densidad de eventos totales ya que la formación de raíces laterales emergidas bajo la exposición de PI4P es comparable a su control (Figura 15 B y C). Estos resultados indican que la adición exógena de PI4P afecta la formación de primordios inducida por Sortin2, rescatando la insensibilidad de *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* a Sortin2, sugiriendo que el nivel de PI4P regulado por la subfamilia *PI4KIIIβ* es importante en la acción de Sortin2 para promover la formación de primordios.

En *Arabidopsis thaliana* existen 12 genes que codifican para un producto génico con una posible actividad PI4K. En este trabajo se determinó *in vivo* que PAO 20 μM inhibe drásticamente sino completamente la actividad PI4K, en contraste, PAO 0,1 μM es capaz de inhibir la actividad PI4K que es importante para que una planta silvestre

sea capaz de responder a Sortin2 induciendo primordios de raíces laterales (Figura 2 A). Como la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* presenta una pérdida de función de la subfamilia *PI4KIIIβ*, entonces se pesquisó si esta pérdida de función provoca una alteración en la sensibilidad al inhibidor de la actividad PI4K en la formación de raíces laterales. Para ello, se le comparó con la sensibilidad reportada en las plantas silvestres (Figura 16), utilizándose la densidad de eventos de raíces laterales frente a la exposición a las diferentes dosis de PAO, pero relativizándose por su densidad de eventos de raíces laterales obtenida en la condición sin inhibidor de la actividad PI4K.

Con respecto a la formación endógena de raíces laterales, se observa que la densidad de primordios en la línea mutante no es afectada por el inhibidor de la actividad PI4K en ninguna de sus dosis; este comportamiento es similar a lo observado en las plantas silvestres (Figura 16 A). Además, la línea mutante presenta una disminución de la densidad de raíces laterales emergidas solo bajo la exposición de PAO 20 μ M (Figura 16 B), no obstante como la densidad total de raíces laterales aun disminuye en esta dosis de PAO (Figura 16 C), se sugiere que la formación endógena de primordios y de raíces laterales emergidas son comprometidas al inhibir la actividad PI4K drásticamente. Este comportamiento es similar al observado en las plantas silvestres, por lo que revela que la línea mutante presenta una sensibilidad similar a las plantas silvestres en cuanto a la inhibición drástica de la actividad PI4K. Esto sugiere que la actividad PI4K que participa en la formación endógena de raíces laterales no corresponde solo a la subfamilia *PI4KIIIβ*.



□ Control ■ Soritin2

Figura 16. Sensibilidad de la formación de raíces laterales en la línea con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* frente a la inhibición de la actividad PI4K. Se muestra las densidades de primordios de raíces laterales (A), de raíces laterales emergidas (B) y de eventos totales de raíces laterales (C) de plántulas silvestres Ecotipo Col-0 (wt) y de la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* (*pi4kiiiβ*) de 10 días. Estas plántulas fueron co-tratadas durante los últimos tres días de crecimiento en un medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control, barras blancas) o con Sortin2 25 µg/mL (barras negras) y con diferentes dosis de óxido de fenilarsina (PAO). Los resultados son mostrados como la densidad con respecto a la condición Control sin inhibidor. Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de dos vías con post-prueba de Sidak: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ns, cambio no significativo. La simbología sobre las barras se refiere a la comparación entre esta situación experimental y la condición Control sin inhibidor. Los resultados provienen de 14 a 23 plántulas silvestres por condición y de 11 a 22 plántulas *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* por condición.

Con respecto a la formación de raíces laterales inducida por Sortin2, se observa que la línea mutante es insensible a la inducción de primordios promovido por Sortin2 y la densidad de primordios en todas las dosis de PAO es comparable a su condición sin inhibidor (Figura 16 A). Además, se observa que la formación de raíces laterales emergidas bajo PAO 1 μ M es comparable al control sin inhibidor (solo Sortin2), lo cual es distinto a lo presentado en las plantas silvestres donde se observa una disminución significativa con respecto al control sin inhibidor (Figura 16 B). A mayores dosis de PAO, la formación de raíces laterales emergidas en la línea mutante disminuye drásticamente a niveles comparables a la formación endógena, característica compartida con la sensibilidad presentada en las plantas silvestres. En resumen, la densidad total de raíces laterales en PAO 0,1 μ M y 1 μ M es comparable a su control sin inhibidor (Figura 16 C), por lo que refleja que estas dosis de PAO no afectan la formación de primordios inducida por Sortin2 en la línea mutante, a diferencia de las plantas silvestres que presentan comprometida la formación de primordios inducida por Sortin2 en estas dosis del inhibidor de PI4K. Por ende, estos resultados revelan que la línea mutante presenta una menor sensibilidad a la acción de PAO en la formación endógena de primordios y de raíces laterales emergidas inducida por Sortin2 con respecto a la de las plantas silvestres. En específico, se observa la menor sensibilidad en PAO 0,1 y 1 μ M, perdiéndose en dosis más altas del inhibidor. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la actividad PI4K que es suficiente para regular la formación de raíces laterales inducida por Sortin2 correspondería a la subfamilia *PI4KIII β* , robusteciendo el papel fundamental de *PI4KIII β* en especial en la formación de primordios inducida por Sortin2.

Por último, para corroborar que la función de la subfamilia PI4KIII β es la responsable de la regulación en la formación de las raíces laterales tanto en la formación endógena como la inducida por Sortin2, se planteó sobreexpresar PI4KIII β 1 y/o PI4KIII β 2 establemente en la línea pi4kiii β 1/pi4kiii β 2 de manera de evaluar el rescate en la formación de raíces laterales en estas líneas transgénicas, en especial en la formación de primordios. Por lo tanto, lo primero fue amplificar fidedignamente la secuencia codificante de ambas quinasas. Se obtuvo un amplificado de PI4KIII β 1 que pesa entre 3.000 a 3.500 pb (Figura 17 A), lo cual corresponde a lo esperado para la secuencia codificante completa de PI4KIII β 1, la cual es de 3.366pb. Para corroborar que este amplificado corresponde a la secuencia codificante completa de PI4KIII β 1, este amplificado fue digerido enzimáticamente con la enzima de restricción EcoRV. Se identificó tres productos de la digestión cuyos pesos son entre 1.500 y 2.000 pb, sobre 1.000pb y entre 500 y 750 pb, pesos que se asemejan a los productos de la digestión *in silico* de PI4KIII β 1 por EcoRV (Figura 17 A; Tabla 1). Con respecto a PI4KIII β 2, no fue posible obtener algún amplificado de su secuencia codificante, por lo cual solo se continuó con PI4KIII β 1. Esta secuencia codificante fue ingresada mediante Tecnología Gateway (Invitrogen) al vector de amplificación pCR8, generándose el vector pCR8-PI4KIII β 1 (pCR8- β 1). Para detectar el vector pCR8-PI4KIII β 1 que posee la secuencia codificante en sentido con respecto a los sitios de recombinación de pCR8, el vector purificado de colonias de *Escherichia coli* seleccionadas fue digerido enzimáticamente por EcoRV. Se observa que la digestión enzimática del DNA plasmidial de algunos clones (representado por c.1) resultó en tres productos que pesan entre 4.000 y 5.000 pb, sobre los 1.000pb y menos de 750 pb, respectivamente. Estos pesos son similares

a los productos de la digestión *in silico* de pCR8-*PI4KIIIβ1* en el que *PI4KIIIβ1* se encuentra en sentido (Figura 17 B; Tabla 2). También fue digerido el DNA plasmidial de clones (c.2) en el que cada uno de los tres productos de digestión corresponden a bandas de aproximadamente entre 3.000 y 3.500pb, menor que 2.000 pb y sobre 1.000 pb, respectivamente. Estos pesos se asemejan a los productos de la digestión *in silico* de pCR8-*PI4KIIIβ1* en el que *PI4KIIIβ1* se encuentra en antisentido con respecto al vector pCR8 (Figura 17 B, Tabla 2). Después, la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1* en sentido con respecto a pCR8-*PI4KIIIβ1* fue secuenciada en su completa extensión, determinándose que es idéntica a la publicada en la base de datos TAIR.

El vector pCR8-*PI4KIIIβ1* en sentido fue recombinado con el vector de expresión constitutiva en plantas pGWB5 que posee el gen que codifica para la proteína fluorescente verde (eGFP) posicionado río abajo de *PI4KIIIβ1*, generándose el vector pGWB5-*PI4KIIIβ1* (5 – β1). Para detectar el vector pGWB5-*PI4KIIIβ1* en sentido con respecto a eGFP, el vector proveniente de las colonias de *Escherichia coli* seleccionadas, fue digerido enzimáticamente por HindIII. Se observa que la digestión enzimática del DNA plasmidial resultó en tres productos que pesan más de 10.000pb, menor que 3.000pb y mayor a 500pb, respectivamente. Estos pesos son compatibles con los productos de la digestión *in silico* de pGWB5-*PI4KIIIβ1* en el que *PI4KIIIβ1* se encuentra en sentido a eGFP (Figura 17 C, Tabla 3).

Las colonias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con pGWB5-*PI4KIIIβ1* que fueron resistentes a kanamicina, gentamicina y rifampicina se les detectó la presencia *PI4KIIIβ1* por PCR (Figura 17 D). La colonia 1 presenta una banda de peso similar al control positivo. En este control se utilizó como templado el vector pGWB5-

PI4KIIIβ1. Esto indica que se obtuvieron colonias de *Agrobacterium tumefaciens* que fueron efectivamente transformadas por el vector pGWB5-*PI4KIIIβ1*. Con estas cepas, se transformaron flores de plantas silvestres y de la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2*. Actualmente, se está seleccionando las plántulas transformantes de *PI4KIIIβ1-eGFP* mediante su esperada resistencia a higromicina.

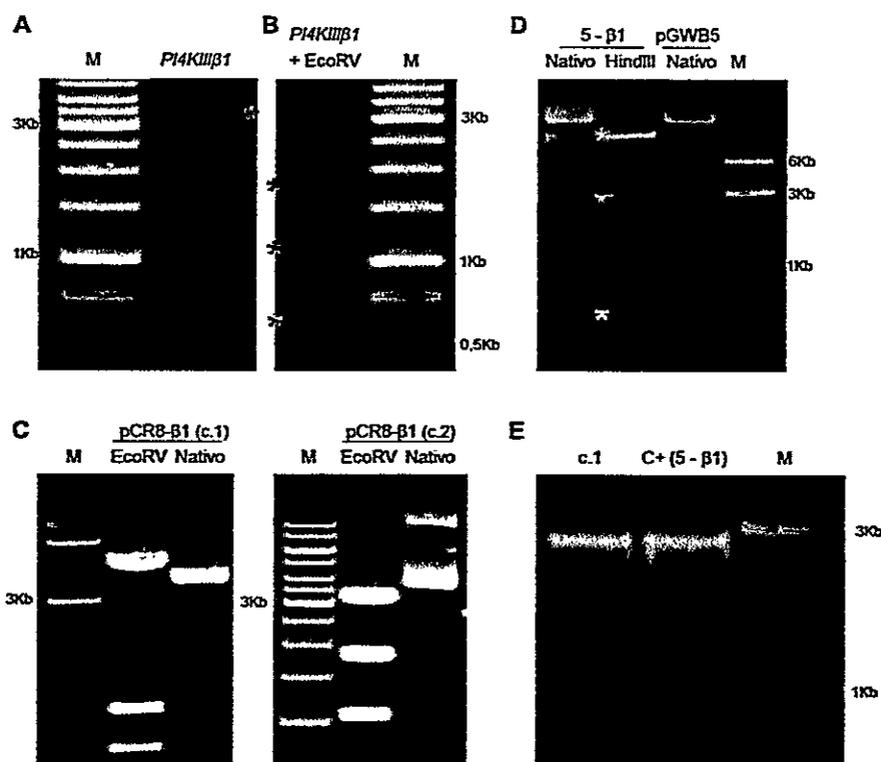


Figura 17. Amplificación y subclonación de la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1* en los vectores de amplificación en bacterias y de expresión constitutiva en plantas. A. Amplificación de la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1*. Se señala con asterisco una banda de 3.000 a 3.500 pb que corresponde al tamaño esperado. B. Patrón de restricción de la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1* al ser digerida por EcoRV. Se observa la presencia de 3 productos de los tamaños: entre 1.500 a 2.000pb, sobre 1.000pb y entre 500 a 750 pb, los cuales corresponden a lo esperado (Tabla I). C. Patrón de restricción del vector pCR8 que posee subclonado la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1* (pCR8-β1) en dirección sentido (c.1) y antisentido (c.2) con respecto a los sitios de recombinación de pCR8 al ser digerido por EcoRV (Tabla II): en c.1 se detecta tres productos de tamaños entre 4.000 a 5.000 pb, sobre 1.000 y alrededor de 750 pb; en contraste en c.2 se detecta tres productos de tamaños entre 3.000pb a 3.500pb, bajo los 2.000pb y sobre 1.000pb. D. Patrón de restricción del vector de expresión constitutiva en plantas, pGWB5, que contiene subclonada la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1* en dirección sentido con respecto a la proteína fluorescente verde contenida en pGWB5 (5 - β1) al ser digerido por HindIII (Tabla III). Se observan tres productos de tamaños: sobre 10.000pb, bajo los 3.000pb y sobre 500pb. E. Identificación de colonias de *Agrobacterium tumefaciens* transformadas con el vector 5-β1. C+, Vector 5-β1 purificado. M, Marcador de peso molecular de ADN; Nativo, vector sin digerir; Kb, kilobases. En A, B y D, los asteriscos señalan la detección de un fragmento de ADN.

Tabla I. Patrón de digestión esperado de la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1*.

Secuencia codificante completa (bp)	Digestión con EcoRV (bp)
3.366	1.710
	1.066
	590

Se indica los tamaños esperados de la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1* y los productos de su digestión al ser procesado por EcoRV.

Tabla II. Patrón de digestión esperado del vector pCR8-*PI4KIIIβ1*.

pCR8- <i>PI4KIIIβ1</i> sin digerir (bp)	Digestión con EcoRV - <i>PI4KIIIβ1</i> en sentido (bp)	Digestión con EcoRV - <i>PI4KIIIβ1</i> en antisentido (bp)
6.182	4.399	3.279
	1.066	1.837
	717	1.066

Se indica los tamaños esperados de los productos de la digestión del vector de amplificación pCR8 que posee subclonada la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1* y los productos de su digestión al ser procesado por EcoRV si es que *PI4KIIIβ1* se hallara tanto en configuración sentido como en antisentido con respecto a los sitios de recombinación de pCR8.

Tabla III. Patrón de digestión esperado del vector pGWB5-*PI4KIIIβ1*.

pGWB5- <i>PI4KIIIβ1</i> sin digerir (bp)	Digestión con EcoRV - <i>PI4KIIIβ1</i> en sentido (bp)	Digestión con EcoRV - <i>PI4KIIIβ1</i> en antisentido (bp)
19.677	16.251	17.379
	2.846	1.718
	580	580

Se indica los tamaños esperados de los productos de la digestión del vector de expresión constitutiva en plantas, pGWB5, que posee subclonada la secuencia codificante de *PI4KIIIβ1* y los productos de su digestión al ser procesado por HindIII si es que *PI4KIIIβ1* se hallará tanto en configuración sentido como en antisentido con respecto al gen que codifica para la proteína fluorescente verde.

4.2.2- Evaluación de la participación de *AtVPS34*, gen que codifica para la fosfatidilinositol 3-quinasa, en la formación de raíces laterales.

A diferencia de la actividad PI4K, se ha descrito que la actividad PI3K es codificada por solo un gen en *Arabidopsis thaliana*, denominado *AtVPS34* (Lee, Y. et al., 2008; Welters, P. et al., 1994). Se ha descrito que *AtVPS34* es esencial para el crecimiento vegetal y regula la biogénesis vacuolar del polen, lo cual se propone como causa que explica la letalidad gametofítica masculina en plantas con pérdida de función de *AtVPS34* (Lee, Y. et al., 2008; Welters, P. et al., 1994).

No existen en la actualidad estudios que vinculen la función de *AtVPS34* con la formación de raíces laterales, por lo que se estudió en primera instancia si su falta de función afecta la formación endógena de raíces laterales. Para ello, se utilizó la línea con pérdida de función de *AtVPS34*, *atvps34-1* (Leshem, Y. et al., 2007; Lee, Y. et al., 2008 (2)). Sin embargo, como la pérdida de función completa de *AtVPS34* causa letalidad gametofítica, el alelo mutante segrega (Figura 18 A) y por ende las plantas mutantes solo son heterocigotas para la inserción de T-DNA que caracteriza al alelo *atvps34-1*. Se ha descrito que las plántulas heterocigotas (*atvps34-1 +/-*) presentan un fenotipo comparable a las plantas silvestre y a las plántulas segregantes que no poseen la inserción de T-DNA (*atvps34-1 +/+*) tanto en la polaridad del pelo radicular como en el tamaño de la raíz primaria a lo largo del tiempo (Lee, Y. et al., 2008 (2), Figura 18 B), pero son más resistentes a la inducción de la endocitosis promovida por el estrés salino (Leshem, Y. et al., 2007).

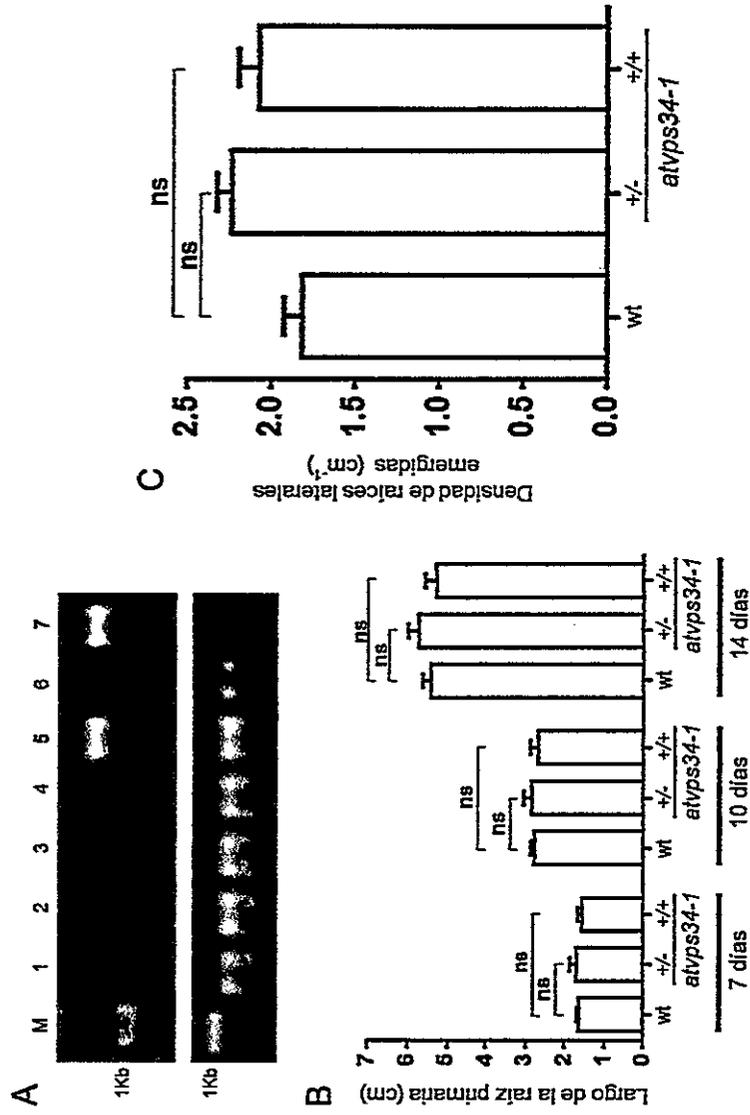


Figura 18. Evaluación de la arquitectura radicular de la línea heterocigota de pérdida de función del gen que codifica para una PI3K, AtVPS34. (A) Se identificó plántulas que presentan la inserción de T-DNA que interrumpe el gen *AtVPS34* que define la línea mutante *atyps34-1*. En números rojos se destaca el genotipo heterocigoto para esta inserción de T-DNA. Como control de la calidad del ADN genómico se amplificó un fragmento del gen de actina (panel inferior). M, marcador de peso molecular de DNA. **(B-C)** Se cuantificó la longitud de la raíz primaria (B) y la densidad de raíces laterales emergidas (C) de plántulas silvestres (*wt*) y de plántulas segregantes de la línea *atyps34-1* ya sea heterocigota (+/-) o que no poseen la inserción de T-DNA (+/+). La longitud de la raíz primaria fue cuantificada en plántulas de 7, 10 y 14 días, mientras que la densidad de raíces laterales emergidas se realizó en plántulas de 14 días. Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de una vía con post-prueba de Tukey: n.s, cambio no significativo. En B y C, los resultados provienen de 18 plántulas silvestres, 8 plántulas *atyps34-1* +/- y 12 plántulas *atyps34-1* +/+.

Entonces, con respecto a la formación endógena de raíces laterales, se observa que la densidad de primordios raíces laterales en la línea heterocigota de *atvps34-1* es similar a las plantas silvestres y a las plántulas *atvps34-1* sin inserción de T-DNA (Figuras 19 A). Además, la densidad de raíces laterales emergidas también es comparable al observado en las plantas silvestres y en las plántulas *atvps34-1* sin inserción de T-DNA, característica que se mantiene a tiempos posteriores (Figuras 18 C y 19). Por lo tanto, estos resultados revelan que la pérdida de función parcial de *AtVPS34* no es capaz de alterar la formación endógena de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*, lo cual sugiere que la participación de *AtVPS34* no es crucial en la formación endógena de raíces laterales.

Con respecto a la formación de raíces laterales promovida por Sortin2, se observa que la densidad de primordios es menor que lo presentado en las plantas silvestres y a las segregantes *atvps34-1 +/+* (Figura 19 A). Ésta disminución se ve reflejada en la densidad total de raíces laterales, ya que la densidad de raíces laterales emergidas de las plántulas heterocigotas es comparable tanto a la de las plantas silvestres como a las segregantes sin el inserto de T-DNA (Figura 19 B y C). Estos resultados revelan que las plántulas con pérdida de función parcial de *AtVPS34* son menos sensibles a la inducción de primordios promovida por Sortin2, lo cual sugiere que *AtVPS34* participa en la formación de primordios inducida por Sortin2.

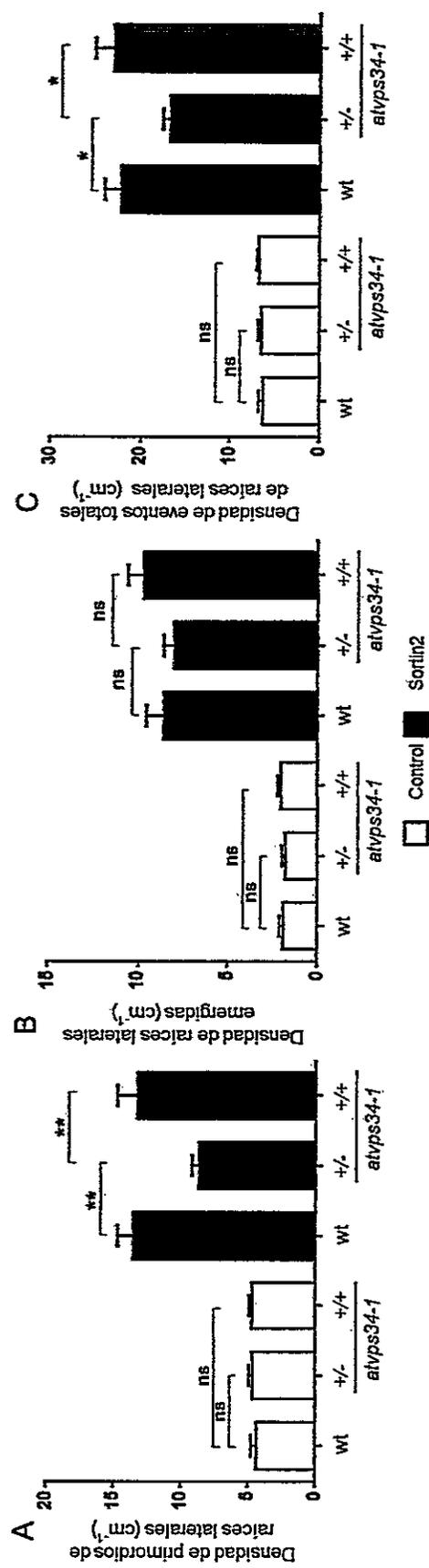


Figura 19. Evaluación de la inducción de raíces laterales promovida por Sortin2 en la línea con pérdida de función de AtVPS34. Se muestra la densidad de primordios de raíces laterales (A), de raíces laterales emergidas (B) y de eventos totales de raíces laterales (C) de plántulas de 10 días tanto silvestres (wt) como plántulas segregantes de *atvps34-1* heterocigotas (+/-) y que no poseen la inserción de T-DNA (+/+). Estas plántulas fueron incubadas en medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control, barras blancas) o Sortin2 25µg/mL (barras negras) durante los últimos tres días de crecimiento. Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba de Kruskal-Wallis con post-prueba de Dunn: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ns, cambio no significativo. Los resultados provienen de 13 a 19 plántulas silvestres, 23 a 27 plántulas *atvps34-1 +/-*, 23 plántulas *atvps34-1 +/+*.

4.3.- Evaluación de la participación del tráfico endocítico dependiente de los niveles de fosfatidilinositol 4-fosfato en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2.

4.3.1.- Evaluación de la importancia de la actividad PI4K en el tráfico endocítico inducido por la acción de Sortin2.

En este trabajo se ha vinculado la actividad PI4K y los niveles de PI4P con la formación endógena de raíces laterales y la inducida por Sortin2. De hecho, en este trabajo se ha sugerido que la actividad PI4K es necesaria para el aumento del nivel de PI4P inducido transitoriamente por la acción de Sortin2 (Figuras 5-7). Además, se ha sugerido que el tráfico endocítico es un evento importante para la formación de raíces laterales inducida por Sortin2 (Pérez-Henríquez, P. et al., 2012). Por lo tanto, se planteó si la actividad PI4K participa en el tráfico endocítico hacia la vacuola.

Para ello, primero se analizó la progresión temporal de la internalización del trazador endocítico fluorescente FM4-64 (Bolte, S. et al., 2004) en células de plantas silvestres bajo la exposición a Sortin2. Se comparó con la internalización de FM4-64 exhibida en las plántulas que se inhibió la actividad PI4K que participa en la acción de Sortin2 por medio de una pre-incubación con PAO 0,1 μ M (Figura 20).

Se observa que el trazador endocítico está localizado en la periferia celular y en cuerpos intracelulares tanto a 5, 30 y a los 60 minutos en la condición control (Figura 20 A-C). Se ha descrito que la periferia celular corresponde a la membrana plasmática y los cuerpos intracelulares, a los endosomas. Desde los 90 minutos alcanza el tonoplasto (Figura 20 D y E).

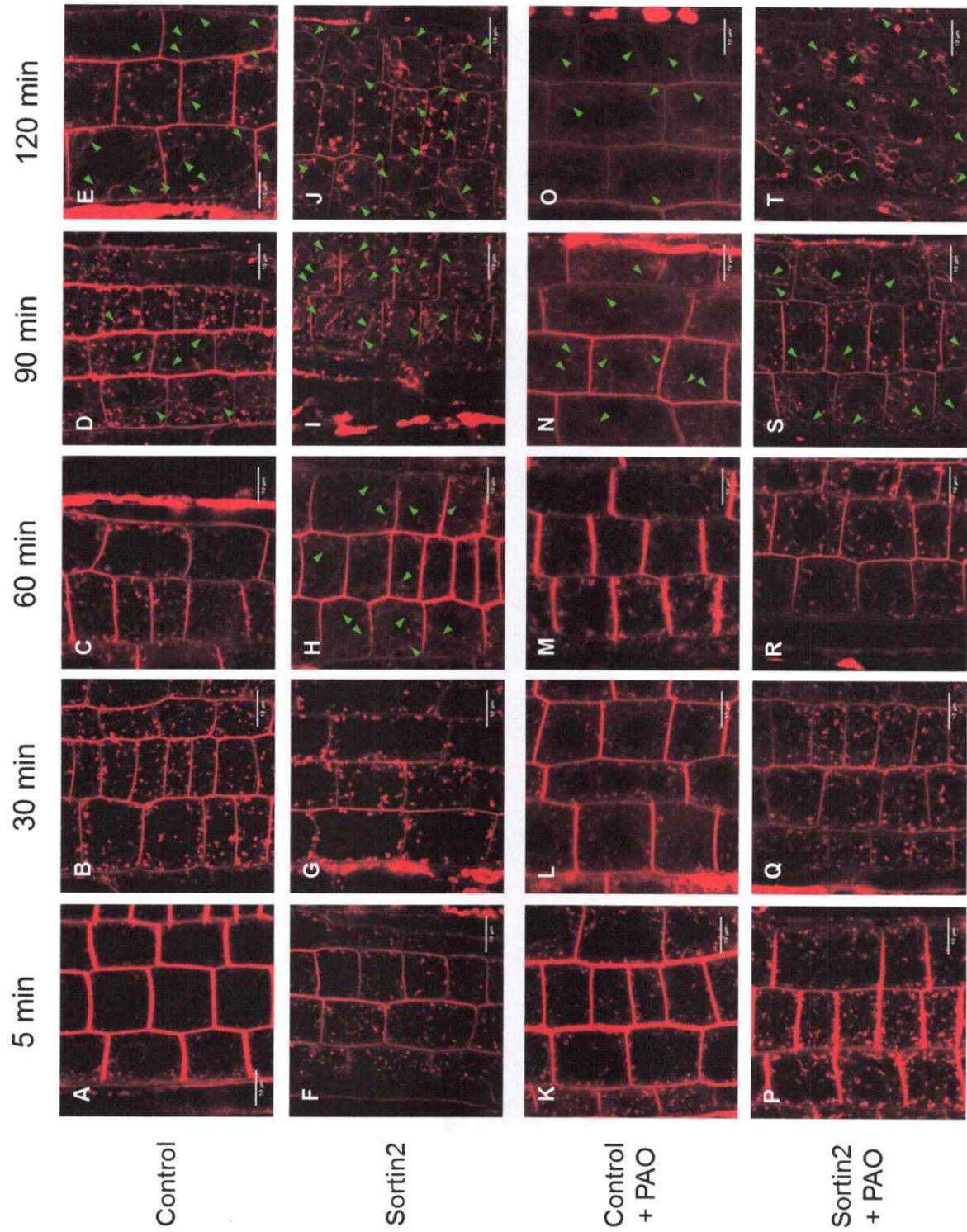


Figura 20. Efecto en el tráfico endocítico hacia la vacuola al inhibir la actividad PI4K que reprime la formación de primordios inducida por Sortin2. Se muestra imágenes representativas de la cinética del trazador endocítico FM4-64 en las células de la epidermis de la raíz primaria de plántulas silvestres de 7 días. Las plántulas fueron expuestas por 5 minutos a FM4-64 5µM (tiempo 0) para después ser tratadas en el medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control; A-E) o con Sortin2 25 µg/mL (Sortin2; F-J), capturándose imágenes a 5 (A, F, K y P), 30 (B, G, L y Q), 60 (C, H, M y R), 90 (D, I, N y S) y 120 minutos (E, J, O y T) después del pulso de FM4-64. Además y previamente, plántulas fueron pre-tratadas en PAO 0,1 µM por 60 minutos, el cual se mantuvo posteriormente en el tratamiento control (Control + PAO; K-O) y en el de Sortin2 (Sortin2 + PAO; P-T). Los triángulos verdes señalan la localización de FM4-64 en el tonoplasto detectado por el trazador endocítico. Barra de tamaño: 10 µm.

En comparación, el patrón de periferia celular y de cuerpos intracelulares se mantiene en la condición con Sortin2, pero el patrón de membrana intracelular es observado desde los 60 minutos (Figura 20 F-J). Este resultado respalda que Sortin2 acelera el tráfico endocítico hacia la vacuola (Pérez-Henríquez, P. et al., 2012). Al inhibir la actividad PI4K, se aprecia que el trazador endocítico es internalizado en cuerpos endosomales desde los 5 minutos de exposición al tratamiento donde el patrón de membrana intracelular es detectado desde los 90 minutos (Figura 20 K-O). Este comportamiento es comparable a situación control sin el inhibidor, lo cual sugiere que PAO 0,1 μ M no afecta el tráfico endocítico hacia la vacuola de carácter endógeno. Al inhibir la actividad PI4K en la condición con Sortin2, los cuerpos intracelulares se observan en toda la progresión temporal, pero el tonoplasto es detectado desde los 90 minutos de exposición (Figura 20 P-T), en contraste con la condición con Sortin2 sin el inhibidor. Este resultado evidencia un posible defecto de la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 que es causado por la inhibición de la actividad PI4K.

Para corroborar la importancia de la actividad PI4K sensible a PAO 0,1 μ M en el tráfico endocítico hacia la vacuola, se cuantificó la presencia del trazador endocítico en el tonoplasto en relación al total de células epidérmicas de la raíz primaria en cada tiempo analizado como reflejo de la velocidad de este tráfico (Figura 21 A y B). Primero que todo, el trazador endocítico alcanza el tonoplasto en la mayoría de las células desde los 90 minutos en la situación control, registrándose la mayor alza en el parámetro entre los 60 y 90 minutos de progresión temporal (Figura 21 A). En contraste, FM4-64 se localiza en el tonoplasto desde los 60 minutos en la mayoría de las células

epidérmicas expuestas a Sortin2, lo cual es un aumento significativo con respecto a la situación control (Figura 21 A). Además, se registró la mayor alza del parámetro entre los 30 y 60 minutos de tratamiento. En ambas condiciones, el trazador se encuentra en el tonoplasto marginalmente a los 5 y 30 minutos; en cambio, a los 120 minutos se le detecta en el tonoplasto en casi todas las células. Estos resultados corroboran que Sortin2 acelera el tráfico endocítico hacia la vacuola con respecto a la condición control o endógena. Al inhibir la actividad PI4K, se observa que desde los 90 minutos el tonoplasto es detectado en la mayoría de las células de la epidermis, aunque en un porcentaje menor que la condición control sin el inhibidor (Figura 21 B). También, el mayor incremento en este parámetro se registra entre los 60 a 90 minutos de tratamiento, donde a los 120 minutos se observa que el tonoplasto es detectado en casi todas las células (Figura 21 B). Estas características son similares a la situación control sin el inhibidor, por lo que se sugiere que la inhibición de la actividad PI4K no afecta mayormente el tráfico endocítico endógeno hacia la vacuola. Al inhibir la actividad PI4K en presencia de Sortin2, se observa que a los 60 minutos el porcentaje de células con tonoplasto positivo baja del 50% - aunque es significativamente mayor que la situación control - por lo que el tiempo más temprano donde se observa la mayoría de células en las que se les detecta el tonoplasto es a los 90 minutos (Figura 21 B). Además, el mayor incremento en el parámetro se registra entre los 60 a 90 minutos de tratamiento (Figura 21 B). Estas características reflejan que la inhibición de la actividad PI4K retrasa el tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2.

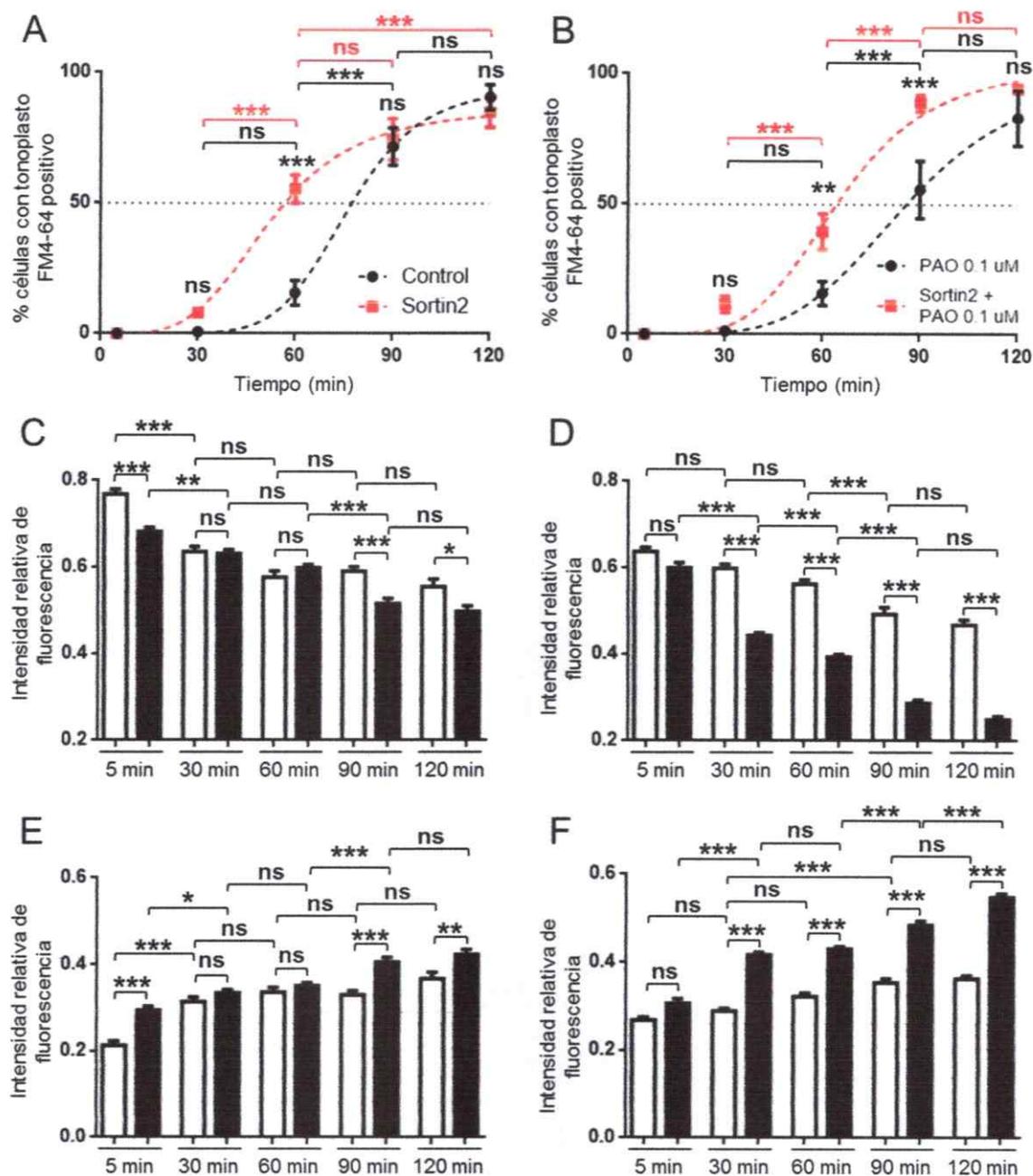


Figura 21. Cuantificación de la cinética del tráfico endocítico gatillado por Sortin2 al inhibir la actividad PI4K que reprime la formación de primordios inducida por Sortin2. Se muestra la cuantificación de la internalización de FM4-64 a 5, 30, 60, 90 y 120 minutos después del pulso de FM4-64 (tiempo 0) en las células de la epidermis de la raíz primaria de plántulas silvestres de 7 días. En específico, se muestra la cuantificación porcentual de células en las que se detecta FM4-64 en el tonoplasto (A y B) y las intensidades de fluorescencia de FM4-64 localizada en la membrana plasmática (C y D) y en los compartimentos intracelulares (E y F) relativa a

la fluorescencia total de las células epidermales de la raíz primaria. Las plántulas fueron incubadas en el medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control en A o barras blancas en C y E) o con Sortin2 25 µg/mL (Sortin2 en A o barras negras en C y E). Además, plántulas fueron pre-tratadas en PAO 0,1 µM por 60 minutos, el cual se mantuvo posteriormente en el tratamiento control (Control + PAO en B o barras blancas D y F) y en el de Sortin2 (Sortin2 + PAO en B o barras negras en D y F). Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de una vía con post-prueba de Sidak: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$, ns, cambio no significativo. Los resultados provienen de 74 a 143 células epidermales en la condición Control; de 168 a 267 células epidermales en la condición Sortin2; de 107 a 168 células epidermales en la condición Control + PAO y de 144 a 381 células epidermales en la condición Sortin2 + PAO.

Para profundizar el análisis, los datos obtenidos de esta cuantificación fueron utilizados para elaborar una regresión no lineal. El mejor ajuste obtenido para todas las condiciones fue el de una función sigmoidea (Figura 21 A y B; R^2 condición control: 0.907; R^2 condición Sortin2: 0.808; R^2 condición PAO: 0.722; R^2 condición PAO + Sortin2: 0.766). Con este modelo se calculó el tiempo en el cual el trazador endocítico alcanzaría el tonoplasto en el 50% de las células ($t_{1/2}$) en cada una de las condiciones. En la condición control, el $t_{1/2}$ es de 76 minutos mientras que con Sortin2 el $t_{1/2}$ calculado es de 52 minutos. Se realizó un test estadístico donde fue rechazada la hipótesis de que ambos $t_{1/2}$ fueran iguales ($p=0,0044$), lo cual reafirma que Sortin2 acelera el tráfico endocítico hacia la vacuola. Al inhibir la actividad PI4K, el $t_{1/2}$ es de 85 minutos, sin embargo en la condición con Sortin2, su $t_{1/2}$ se incrementa a 65 minutos con respecto a la situación sin el inhibidor. Al comparar ambos parámetros no se pudo rechazar la hipótesis de que ambos $t_{1/2}$ fueran iguales ($p=0,0989$), por lo tanto esto robustece que la inhibición de la actividad PI4K que participa en la organogénesis de primordios afecta en la aceleración del tráfico endocítico ambos inducidos por Sortin2. Reuniendo todos estos datos, se sugiere que la actividad PI4K que es crucial para la formación de primordios inducida por Sortin2 participa en el tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2.

La internalización aparente del trazador endocítico depende de la endocitosis de membrana plasmática, su posterior reciclaje endocítico que redirige parte del flujo de membrana desde los endosomas tempranos a la membrana plasmática y el tráfico neto hacia la vacuola desde los endosomas tempranos que deja las membranas inaccesibles al reciclaje endocítico (Figura 1). Para evaluar con un poco más de detalle la

participación de la actividad PI4K en la endocitosis y el reciclaje endocítico se evaluó la internalización aparente del trazador endocítico al inhibir la actividad PI4K. Esto se realizó por medio de la cuantificación de la intensidad de fluorescencia del trazador localizado tanto en la membrana plasmática como en compartimentos intracelulares, ambos normalizados a la intensidad de fluorescencia total de las células a lo largo del tiempo (Figura 21 C - F). En la condición control, se observa que la internalización aparente de FM4-64 aumenta hasta llegar a un equilibrio desde los 30 minutos del curso temporal (Figura 21 C-D). Este aumento dependería exclusivamente de la acción de la endocitosis; en cambio, el equilibrio puede ser explicado por la acción del reciclaje endocítico en la internalización aparente de FM4-64. Por ende, el estudio de la internalización aparente de FM4-64 hasta los 30 minutos permitiría el análisis de la participación de la endocitosis en la internalización del trazador endocítico minimizando el aporte del reciclaje endocítico en ella.

Se observa que Sortin2 aumenta significativamente la internalización de FM4-64 a 5 minutos de exposición en comparación al control. Esto sugiere que Sortin2 promueve la endocitosis. Además, a lo largo del tiempo va aumentando su internalización aparente registrándose un aumento significativo a 90 y 120 minutos en comparación al control (Figura 21 C y D). Esto es coherente con que Sortin2 induce la aceleración del tráfico hacia la vacuola, dirigiendo parte del flujo de membrana a compartimientos inaccesibles al reciclaje endocítico.

Al inhibir la actividad PI4K, se observa que la internalización del trazador en esta condición sin Sortin2 presenta un comportamiento bastante similar a la condición control sin el inhibidor. Además, la inhibición de la actividad PI4K no reprime el aumento

de la internalización del trazador promovido por la acción de Sortin2 en tiempos previos al equilibrio observado en la situación control (Figura 21 E-F). Esto sugiere que la actividad PI4K que regula la organogénesis de primordios no participaría en la endocitosis promovida por la acción de Sortin2. Sin embargo, el equilibrio de la internalización del trazador endocítico en Sortin2 se pierde al inhibir la actividad PI4K que reprime la formación de primordios inducida por Sortin2, aumentando sostenidamente a lo largo del tiempo analizado y con respecto a la situación con PAO 0.1 μ M (Figura 21 E-F). El tráfico endocítico hacia la vacuola promovida por Sortin2 está comprometido por la dosis utilizada del inhibidor de PI4K, por lo que no explica el aumento de la internalización aparente del trazador endocítico. Por lo tanto, sugiere primero que el reciclaje endocítico podría estar regulando activamente el tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2. Y segundo, la actividad PI4K que es importante en la formación de primordios inducida por Sortin2 podría participar positivamente en el reciclaje endocítico.

También, se evaluó el tráfico endocítico al inhibir drásticamente la actividad PI4K mediante la utilización de PAO 20 μ M (Figura 22), que afecta la formación endógena de raíces laterales y la inducida por la acción de Sortin2. Al inhibir drásticamente la actividad PI4K, se observa que el trazador endocítico permanece en la membrana plasmática en el tratamiento control y prácticamente no es internalizado a lo largo del curso temporal (Figura 22 A - E). Esto sugiere que la actividad PI4K es requerida para que la endocitosis pueda progresar. Además, se observa que el trazador endocítico permanece mayoritariamente en la membrana plasmática en la condición con Sortin2.

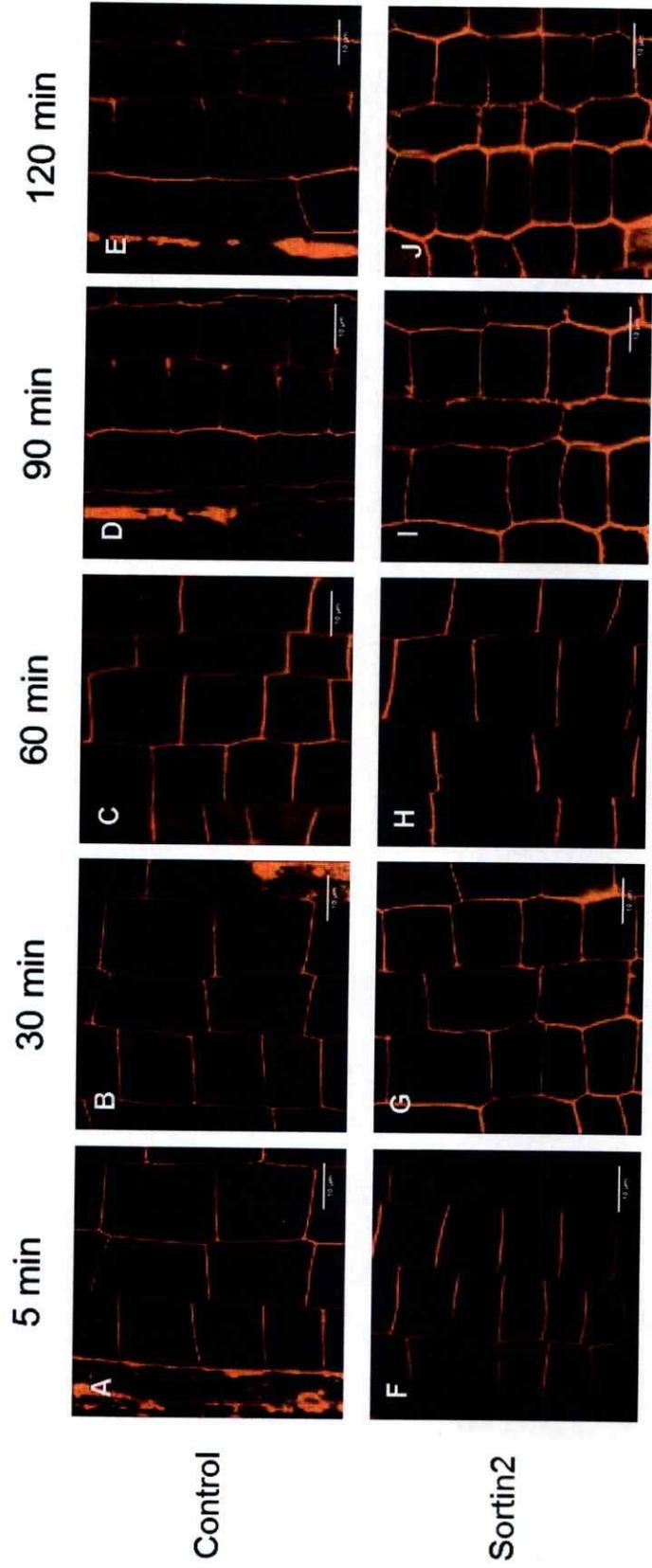


Figura 22. Efecto en el tráfico endocítico hacia la vacuola al bloquear la actividad PI4K. Se muestra imágenes representativas que registran la cinética del trazador endocítico FM4-64 en las células de la epidermis de la raíz primaria de plántulas silvestres de 7 días. Las plántulas fueron pre-tratadas en PAO 0,1 μM por 60 minutos, el cual se mantuvo después del pulso de 5 minutos a FM4-64 5 μM (tiempo 0) en el medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control; A-E) o con Sortin2 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sortin2; F-J). Todos los tratamientos se evaluaron a los 5 (A y F), 30 (B y G), 60 (C y H), 90 (D e I) y 120 minutos (E y J) después del pulso del pulso de FM4-64. Barra de tamaño: 10 μm

Existe presencia de cuerpos intracelulares, pero la mayoría están cercanos a la membrana plasmática (Figura 22 F - J). Esto indica que la acción de Sortin2 no es capaz de revertir la represión del tráfico endocítico causado por la inhibición drástica de la actividad PI4K. Por lo tanto, se sugiere que la actividad PI4K es requerida también en la acción de Sortin2 para estimular el tráfico endocítico hacia la vacuola.

4.3.2.- Evaluación de la participación de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* en el tráfico endocítico inducido por Sortin2.

En este trabajo se ha vinculado la participación de la subfamilia PI4KIIIβ como un regulador negativo de la formación endógena de primordios de raíces laterales y al mismo tiempo como un participante molecular crucial en la formación de primordios inducida por Sortin2. Para dilucidar si la función de la subfamilia PI4KIIIβ en la formación de raíces laterales se sustenta por su efecto en el tráfico endocítico hacia la vacuola, se estudió la progresión del trazador endocítico a lo largo del tiempo en la línea con pérdida de función de *PI4KIIIβ* tanto en la condición control como frente al estímulo de Sortin2 (Figura 23). Se observa que el trazador endocítico se encuentra mayoritariamente en la membrana plasmática a los 5 y 30 minutos de tratamiento control (Figura 23 A y B), detectándose una menor población de cuerpos de naturaleza endosomal al compararlo con lo presentado en las plántulas silvestres a tiempos tempranos. Interesantemente, desde los 60 minutos, el trazador es detectado en el tonoplasto, tiempo más temprano que lo observado en plantas silvestres en la condición control (Figura 23 C-E). Estos resultados sugieren que la pérdida de función de *PI4KIIIβ* altera el tráfico endocítico hacia la vacuola, acelerándolo.

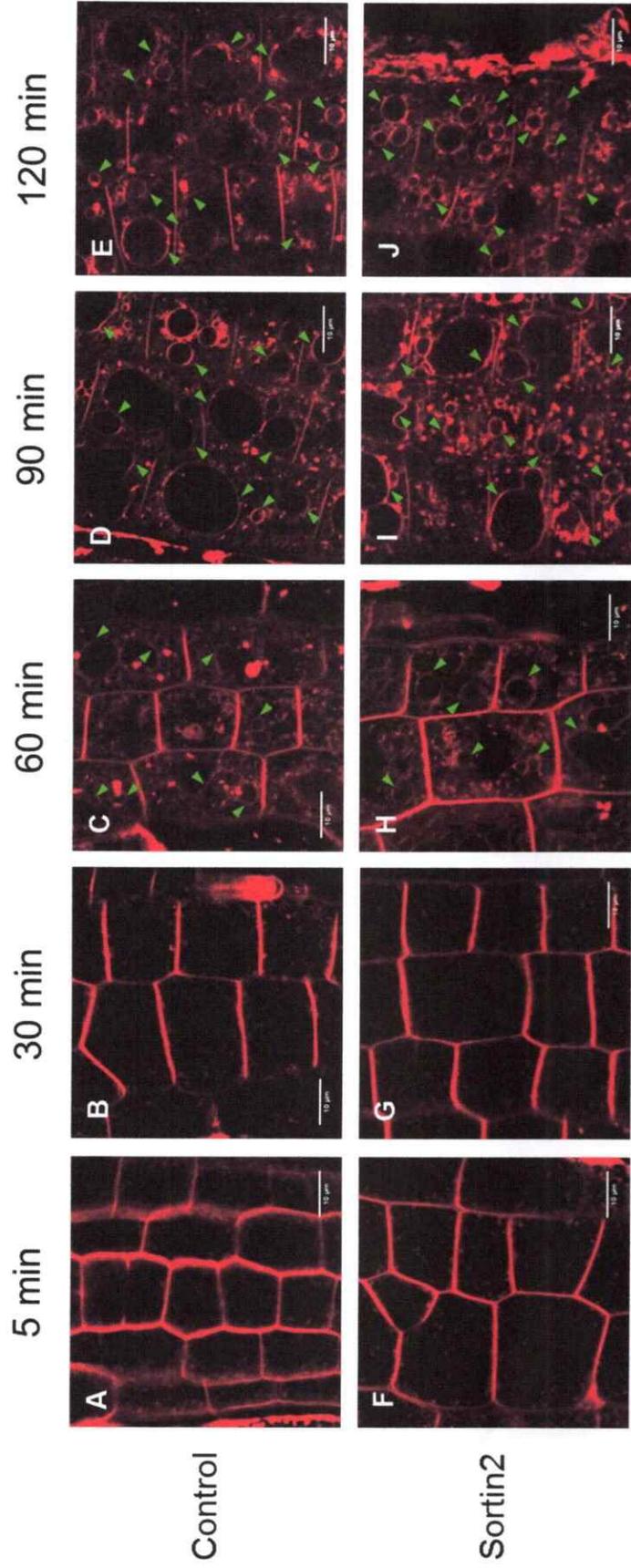


Figura 23. Evaluación del tráfico endocítico hacia la vacuola gatillado por Sortin2 en la línea con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2*. Se muestra imágenes representativas que registran la cinética del trazador endocítico FM4-64 en las células de la epidermis de la raíz primaria de plántulas de la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* de 7 días. Las plántulas fueron expuestas por 5 minutos a FM4-64 5μM (tiempo 0) para después ser tratadas con el medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control; A-E) o con Sortin2 (Sortin2; F-J) durante 5 (A y F), 30 (B y G), 60 (C y H), 90 (D e I) y 120 minutos (E y J) después del pulso de FM4-64. Los triángulos verdes señalan la localización de FM4-64 en el tonoplasto detectado por el trazador endocítico. Barra de tamaño: 10 μm.

Además, se observa la presencia de cuerpos intracelulares de tamaño mayor que los de naturaleza endosomal detectados en las plantas silvestres y a 30 minutos del curso temporal en la línea con pérdida de función de *PI4KIIIβ* (Figura 23 A-E). Estos cuerpos intracelulares de mayor tamaño puede ser reflejo del defecto reportado en los compartimientos endosomales en la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* (Kang, B. et al., 2011). Con respecto a la condición con Sortin2, se observa que la inducción temprana de la internalización del trazador endocítico registrado en las plántulas silvestres no se aprecia ya que FM4-64 se detecta preferentemente en la membrana plasmática a 5 y 30 minutos de tratamiento, similar a la situación control (Figura 23 F y G). Además, se detecta el trazador en el tonoplasto desde los 60 minutos, tiempo similar que lo reportado en la condición control (Figura 23 H-J). También se registra los cuerpos intracelulares de mayor tamaño. Estos resultados indican que la línea mutante con pérdida de función de *PI4KIIIβ* es insensible a la acción de Sortin2 a nivel del tráfico endocítico hacia la vacuola.

Para corroborar la importancia de *PI4KIIIβ* en el tráfico endocítico hacia la vacuola, se cuantificó la detección del tonoplasto en relación al total de células epidérmicas de la raíz primaria de la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* a lo largo del tratamiento (Figura 24 A). Se observa que efectivamente el trazador endocítico alcanza el tonoplasto en la mayoría de las células desde los 60 minutos en la situación control, registrándose la mayor alza en este parámetro entre 30 a 60 minutos de progresión temporal (Figura 24 A). Esto representa una aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola en la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* con respecto a lo reportado en las plántulas silvestres.

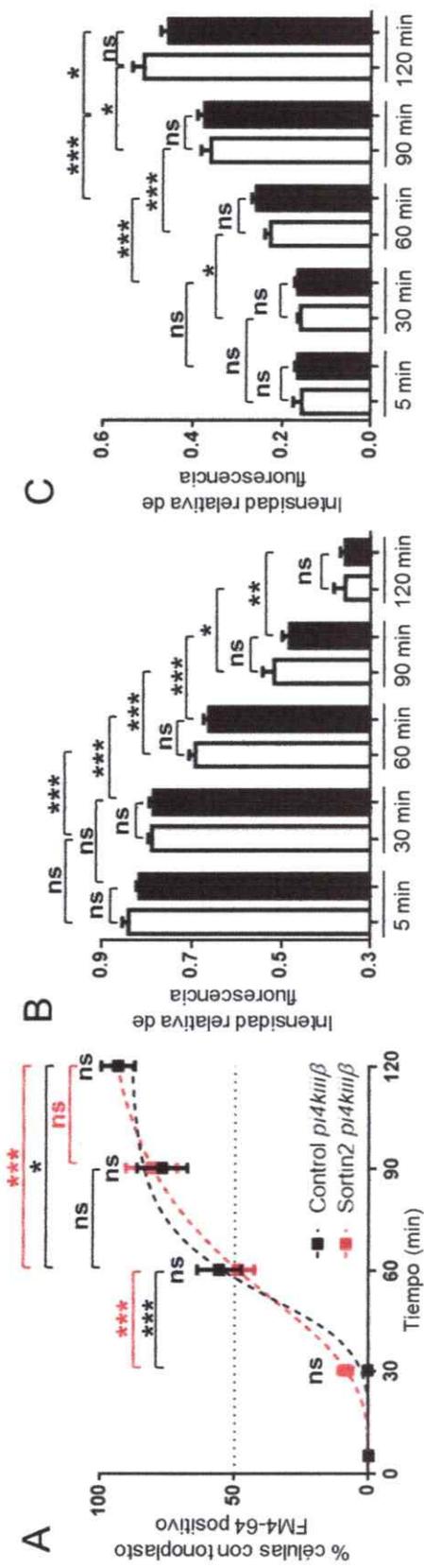


Figura 24. Cuantificación de la cinética del tráfico endocítico gatillado por Sortin2 en la línea con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2*. Se muestra la cuantificación de la internalización de FM4-64 a 5, 30, 60, 90 y 120 minutos después del pulso de FM4-64 (tiempo 0) en las células de la epidermis de la raíz primaria de plántulas de la línea *pi4kiiiβ1/pi4kiiiβ2* (*pi4kiiiβ*) de 7 días. En específico, se muestra la cuantificación porcentual de células en las que se detecta FM4-64 en el tonoplasto (A y B) y las intensidades de fluorescencia de FM4-64 localizada en la membrana plasmática (C y D) y en los compartimentos intracelulares (E y F) relativa a la fluorescencia total de las células epidermales de la raíz primaria. Las plántulas fueron incubadas en el medio de cultivo líquido con DMSO 1% v/v (Control en A o barras blancas en B y C) o con Sortin2 25 µg/mL (Sortin2 en A o barras negras en B y C). Se analizó los resultados estadísticamente mediante prueba ANOVA de una vía con post-prueba de Sidak: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001, ns, cambio no significativo. Los resultados provienen de 47 a 130 células epidermales en la condición Control y de 120 a 203 células epidermales en la condición Sortin2.

Además, ningún tiempo analizado presenta alguna diferencia significativa en la detección del marcador en el tonoplasto al comparar la condición con Sortin2 y la situación control (Figura 24 A). De hecho el $t_{1/2}$ calculado en la condición control y Sortin2 son similares entre sí ($t_{1/2}$ control, 55 minutos; $t_{1/2}$ Sortin2: 62 minutos; $p=0,3454$). Esto corrobora que la mutante con pérdida de función de *PI4KIII β* es insensible a Sortin2 en la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola.

También, se evaluó la internalización del trazador endocítico en la línea *pi4kiii β 1/pi4kiii β 2* (Figura 24 B y C). En la condición control, se observa que el aumento de la internalización del trazador endocítico que se registra entre los 5 y 30 minutos en las plantas silvestres, no es registrada en las plántulas *pi4kiii β 1/pi4kiii β 2*. Esto sugiere que la pérdida de función de *PI4KIII β* afecta la endocitosis endógena. En contraste, el aumento de la internalización del trazador endocítico es sostenida desde los 60 minutos hasta el final del tratamiento (Figura 24 B y C). Por otra parte, la progresión temporal de la internalización del trazador endocítico en la condición con Sortin2 es similar a la condición control (Figura 24 B y C). Estos resultados refuerzan que la mutante con pérdida de función de *PI4KIII β* es insensible a la acción de Sortin2 dentro del tráfico endocítico hacia la vacuola.

Por lo tanto y reuniendo toda esta investigación, se sugiere que *PI4KIII β* participa como un regulador positivo de la endocitosis y a la vez uno negativo del posterior tráfico hacia la vacuola. En contraste, *PI4KIII β* es crucial para la aceleración del tráfico endocítico inducido por Sortin2, incluida la endocitosis. Por ende, apoya a que el tráfico endocítico hacia la vacuola es un evento celular importante en la formación de primordios de raíces laterales en donde *PI4KIII β* juega un rol esencial.

5.- DISCUSIÓN

El efecto de Sortin2 en la organogénesis de raíces laterales se explica por la capacidad de este compuesto de inducir un evento previo a la activación de las células fundadoras de raíces laterales (Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C. et al, en revisión). Este aumento en el número de células fundadoras de raíces laterales se traduce en un aumento en el número de primordios de raíces laterales, los cuales posteriormente emergen desde la raíz primaria (Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C. et al., en revisión). En este trabajo hemos evaluado el rol de la actividad PI3K y PI4K y de sus productos PI3P y PI4P en la organogénesis de raíces laterales inducida por Sortin2, particularmente observando el efecto de Sortin2 en condiciones de pérdida de función de estas proteínas. Hemos encontrado que la actividad PI4K que participa en el aumento del nivel de PI4P promovido por Sortin2 es crucial para la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2. También encontramos que la actividad PI3K participaría en la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2, posiblemente aumentando los niveles de PI3P en el tonoplasto.

La aplicación de Sortin2 en plántulas promueve un aumento de los niveles de PI3P y PI4P en las membranas de compartimientos intracelulares de las células de la raíz primaria. Interesantemente, el aumento del nivel de estos fosfatidilinosítoles fosfatos debido a la acción de Sortin2 se produce en compartimientos subcelulares que presentan un patrón de distribución celular similar a lo descrito en Arabidopsis (Simon, M. et al., 2014). Esto es, el tonoplasto para el caso de PI3P mientras que el aumento de los niveles de PI4P se localizaría en la membrana plasmática y en la Red Trans-Golgi (RTG). Como Sortin2 induce el nivel de PI3P en membranas de compartimientos donde

se encuentra enriquecido este lípido, entonces se espera que el aumento de PI3P se registre también en los compartimientos pre-vacuolares (CPV), lo cual requiere de más análisis. La inducción del nivel de PI3P y PI4P apoya la participación de las enzimas PI3K y PI4K en el mecanismo de acción de Sortin2.

La inhibición genética de la función de *AtVPS34* - único gen que codifica para una proteína con actividad PI3K en *Arabidopsis* y esencial para su desarrollo (Welters, P. et al., 1994; Lee, Y. et al., 2008) - sugiere que la actividad PI3K controlada por *AtVPS34* participa en la formación de primordios de raíces laterales promovida por Sortin2. La actividad PI3K es importante en la inducción del tráfico endocítico hacia la vacuola (Leshem, Y. et al., 2007; Kleine-Vehn, J. et al., 2008) y PI3P participa en la maduración endosomal que media el tráfico desde RTG hacia la vacuola (Kim, D. et al., 2001; Singh, M. et al., 2014), por lo que es consistente que PI3P participe en el tráfico endocítico que controla la formación de nuevos primordios inducida por Sortin2 (Figura 26). No obstante, la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2 no es afectada por Wortmanina y Ly294002 en dosis que reprimen específica pero no completamente la actividad PI3K y por ende disminuye el nivel de PI3P (Matsuoka, K. et al., 1995; Joo, J. et al., 2005). Al aumentar la dosis, estos inhibidores reprimen la inducción de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2, las que corresponden a dosis en las que son capaces de inhibir la actividad PI3K y PI4K. Esto sugiere que la importancia de la actividad PI4K es mayor comparativamente a la de la actividad PI3K en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2. Esto es consistente con que incluso la dosis más baja utilizada del inhibidor específico de PI4K, PAO 0,1 μM , reprime completamente tanto la formación de primordios de raíces laterales como el

aumento de PI4P en la membrana plasmática y en RTG promovido por la acción de Sortin2.

En específico, de los 12 genes que codificarían para enzimas con actividad PI4K de *Arabidopsis* (Mueller-Roeber, B. & Pical, C., 2002) hemos vinculado dos de ellos, *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2*, como esenciales en la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2. Los productos génicos de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* efectivamente tienen actividad enzimática y se expresan en la raíz primaria siendo consistente con su función en este órgano (Delage, E. et al., 2012). Sortin2 no induce la formación de primordios de raíces laterales en la línea mutante con pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2*, fenotipo que se recupera al adicionar exógenamente PI4P. Esta evidencia corrobora que el nivel de PI4P es crucial en la formación de primordios inducido por Sortin2. Esta misma evidencia sugiere que las enzimas *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* no serían los blancos moleculares del compuesto Sortin2 debido a que aún en la carencia de estas dos proteínas, el compuesto químico es capaz de ejecutar su acción en la formación de primordios de raíces laterales. Por ende, el blanco molecular de Sortin2, aún desconocido estaría a nivel de PI4P o río arriba de la acción de estas PI4Ks.

La dosis de PAO 0,1 μ M afecta ostensiblemente la inducción del nivel de PI4P promovido por Sortin2 que impacta en la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2. Sin embargo, la insensibilidad a la represión de PAO 0,1 μ M en la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2 en la pérdida de función de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* sugiere que esta dosis de PAO afecta específicamente la actividad PI4K dada por *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2*. Por lo tanto, el aumento de PI4P

provocado por la acción de Sortin2 en la membrana plasmática y en RTG podría ser regulado por PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 para inducir la formación de primordios de raíces laterales (Figura 26). En este sentido, PI4KIII β 1 se ha localizado en RTG, pero no en la membrana plasmática (Preuss, M et al., 2006; Kang, B. et al., 2011). Por lo que PI4KIII β 2 podría ser la responsable de aumentar el nivel de PI4P en la membrana plasmática, aunque es posible que la acción de Sortin2 induzca el reclutamiento ambas quinasas en los dos compartimientos promoviendo su actividad.

En este trabajo se ha sugerido que Sortin2 induce la endocitosis y que en conjunto PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 participan en ella. La inhibición genética sugiere que la endocitosis mediada por la actividad de PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 participa negativamente en la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2, sin embargo la inhibición química muestra que la endocitosis mediada por la actividad de PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 aparentemente no participaría en la formación de primordios inducida por Sortin2. Esta discrepancia hace imposible establecer el rol de la endocitosis en la formación de primordios inducida por Sortin2. En contraste, proponemos que la aceleración del tráfico endocítico – desde RTG/endosomas tempranos a vacuola regulado por PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 es un factor importante en la formación de primordios de raíces laterales. Esto es apoyado por que la pérdida de función genética de PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 provoca la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola fenocopiando el efecto de Sortin2 en la formación de primordios de raíces laterales. Esto sucede aun cuando la doble mutante PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 tiene un menor nivel de PI4P que las plantas silvestres (Delage, E. et al., 2012). Además, la inhibición química de PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 reprime la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola

promovido por Sortin2 que disminuye completamente la formación de primordios de raíces laterales inducido por Sortin2. Es más, este compuesto químico es incapaz de inducir tanto la dinámica del tráfico endocítico como la formación de primordios de raíces laterales en la línea mutante con pérdida de función de PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2, lo que se explicaría por la dependencia de Sortin2 de un nivel óptimo de PI4P para efectuar la aceleración del tráfico endocítico.

Sin embargo, esta aceleración no dependería completamente de PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2, ya que la inhibición química de PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 no reprime completamente la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola promovido por Sortin2. Se ha mostrado que existen al menos tres rutas de tráfico desde el RTG hacia la vacuola en Arabidopsis las que se ejecutan involucrando actores moleculares que permiten diferenciar estas vías (Ebine, K., et al., 2014). Por lo tanto, es probable que PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 regulen alguna/s de esta/s vía/s de tráfico que sea en particular el importante para la inducción de la formación de nuevos primordios de raíces laterales. En nuestro laboratorio hemos encontrado que Sortin2 induce el reclutamiento de la GTPasa monomérica RABF2b o ARA7 en Arabidopsis a compartimientos del tipo endosomal (Morales-Herrera, S., 2017). Las proteínas RABs se ubican en el citoplasma las que al activarse se asocian a la membrana blanco mediando el tráfico vesicular (Rehman, R. & Di Sansebastiano, G., 2014). En específico, ARA7 está localizada en endosomas tempranos (RTG), tardíos (compartimientos pre-vacuolares) y la vacuola participando en la maduración endosomal hacia la vacuola y definiendo una de las rutas del tráfico hacia la vacuola desde el RTG (Ebine, K. et al., 2011; Ebine, K., et al., 2014; Singh, M. et al., 2014). Por lo tanto, sería muy interesante determinar específicamente

la/s vía/s de tráfico desde el RTG hacia la vacuola que induce Sortin2 y en especial determinar la participación de la actividad PI4K en la ruta de tráfico hacia la vacuola que es regulada por ARA7 enfocando el estudio en su vinculación con la inducción de la formación de primordios de raíces laterales (Figura 25).

Hemos sugerido que el tráfico endocítico hacia la vacuola regulado por PI4P catalizado por las actividades PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 es crítico para inducir la formación de primordios de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Se ha demostrado que PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 interactúan con otra proteína RAB - denominada RABA4b - en su estado activo unido a GTP (Preuss, M. et al., 2006), con lo cual los autores proponen que PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 son proteínas efectoras de RABA4b, por lo que esta RAB modularía su actividad quinasa. Es importante evaluar si RABA4b es requerido en la acción celular y en la formación de primordios de raíces laterales, ya que esta GTPasa monomérica puede ser un candidato para ser el blanco molecular de Sortin2.

PI4P es una molécula que interactúa con proteínas que contienen dominios de unión a lípidos, reclutándolas a membranas donde se enriquece localmente el lípido (Heilmann, I., 2016). Como Sortin2 induce un aumento en el nivel de PI4P en la membrana plasmática y compartimientos tipo RTG, se predice que proteínas que interactúan con PI4P serían reclutadas a ellos. Se ha descrito que el dominio conocido como *Plekstrin homolog* (PH) es un dominio proteico de unión a fosfatidilinositoles, en especial PI4P (Thole, J. et al., 2008).

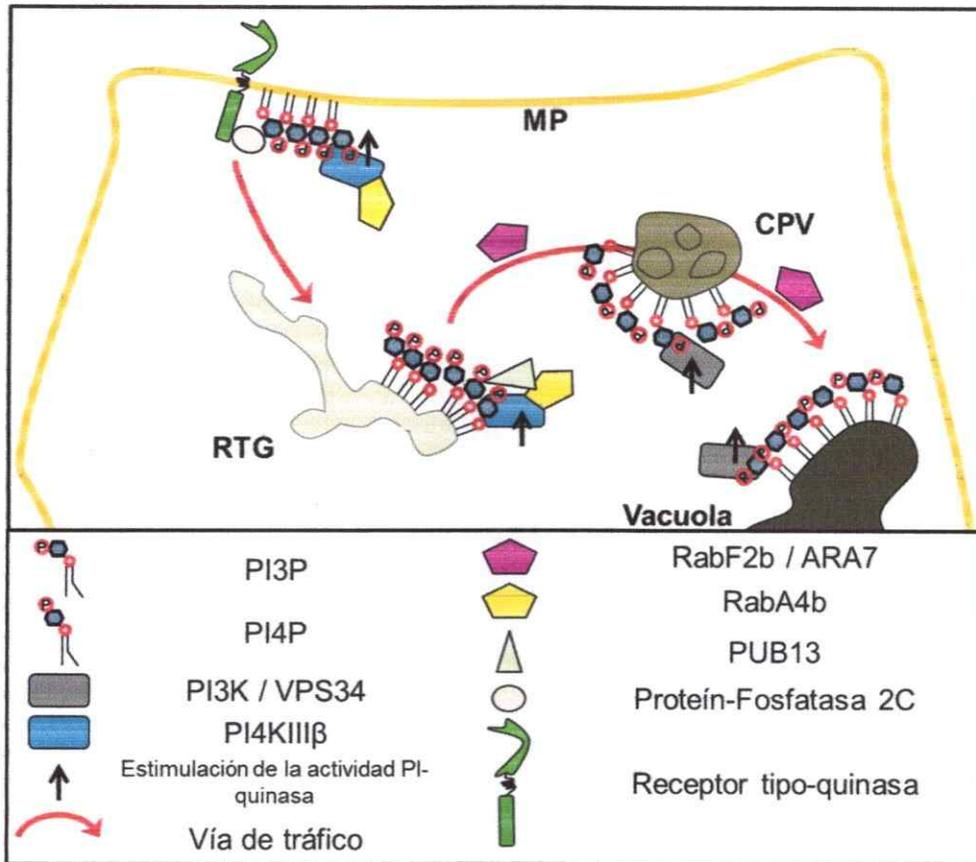


Figura 25. Modelo de trabajo: posibles factores que participarían en el tráfico endocítico hacia la vacuola modulado por fosfatidilinositolo fosfato que estimula la formación de primordios inducida por Sortin2. Sortin2 induce la activación de PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2, reclutándose en la membrana plasmática (MP) y en la Red Trans-Golgi (RTG), aumentando el nivel de PI4P en estos compartimientos. A su vez, aumenta el nivel de PI3P en el tonoplasto y probablemente en los cuerpos pre-vacuolares (CPV) que dependería de VPS34. Estos eventos inducen el tráfico endocítico hacia la vacuola que es requerido para promover la formación de primordios de raíces laterales. La activación de PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2 podría ser dependiente de la activación de RabA4b. Componentes de la membrana plasmática como receptores tipo quinasa CLV1 o ACR4 podrían ser internalizados por el tráfico endocítico hacia la vacuola modulando su señalización asociada. En su endocitosis participarían proteín-Fosfatasa tipo 2C que son activadas por PI4P como POL1. Para su destinación hacia la vacuola participaría E3 ubiquitín ligasas interactuantes con PI4P como PUB13 y el tráfico asociado a ARA7.

Según la base de datos UNIPROT, existen 20 proteínas con dominio PH; INTERPRO reporta 94 secuencias proteicas en *Arabidopsis thaliana* que contienen un putativo dominio PH (código IPR001849), por lo tanto podría ser un filtro a considerar para descubrir nuevos participantes en la formación de primordios promovido por el tráfico endocítico regulado por PI4P. Sin embargo, un dominio proteico PH predicho no asegura interacción a PI4P, como sucede con el dominio PH de la proteína PLC proveniente del ser humano, el cual interactúa específicamente con PI(4,5)P₂ (Simon, M. et al. 2014). Por lo tanto, hay que ser riguroso al proponer la participación de proteínas que presentan en su secuencia estos dominios proteicos.

Por otra parte, una de las proteínas que interactúa *in vitro* con PI4P y otros fosfatidilinositoles mediante un dominio proteico distinto a PH es PUB13 (PLANT U-BOX13), proteína que posee actividad Ubiquitin E3 ligasa (Mudgil, Y. et al. 2004). PUB13 también interactúa con RABA4b en su estado activo, lo cual es concordante con su localización en RTG (Antignani, V. et al., 2015). Se ha propuesto que la interacción entre RABA4b, PUB13 y PI4KIIIβ1 en conjunto con otras proteínas reclutadas por la interacción con PI4P, conformarían un microdominio en RTG que participaría en redirigir el tráfico de proteínas hacia endosomas tardíos/compartimientos prevacuolares (Antignani, V. et al., 2015; Beck, M. et al., 2012). Este modelo se ajusta a nuestra propuesta donde el tráfico endocítico hacia la vacuola, dependiente de la actividad PI4KIIIβ1 y de PI4KIIIβ1, es importante para inducir la formación de primordios de raíces laterales (Figura 25). Sería interesante estudiar si PUB13 participa en este proceso, teniendo en cuenta también las diferentes proteínas que contengan este novedoso dominio de unión a fosfatidilinositoles tipo ARM.

Otras proteínas que interactúan con PI4P son Polstergeist (POL) y su proteína homóloga Polstergeist-like 1 (PLL1). Estas proteínas se localizan en la membrana plasmática, poseen actividad proteín-fosfatasa tipo 2C siendo reguladores clave de la identidad del meristema floral, foliar y radicular, dependiente de los factores de transcripción tipo WUSWOX (Song, S. et al., 2008; Gagne, J. & Clark, S., 2010). En específico, POL/PLL1 son reguladores que promueven la activación transcripcional de WOX5 en el meristema radicular de la raíz primaria (Song, S. et al., 2008), la cual es afectada negativamente por la vía de señalización dependiente del receptor tipo quinasa de membrana plasmática denominado CLV1 y su ligando CLE40 (Hobe, M. et al., 2003; Stahl, Y. et al., 2009). PI4P aumenta la actividad proteín-fosfatasa de POL/PLL1 (Gagne, J. & Clark, S., 2010), por lo que atenuaría la vía de señalización CLE40/CLV1. Interesantemente, el receptor tipo quinasa ACR4 que regula negativamente la formación de primordios de raíces laterales, es requerido en la vía de señalización CLE40/CLV1 en la mantención del meristema radicular, interactuando físicamente con CLV1 (De Smet, I. et al., 2008; Stahl, Y. et al., 2009; Stahl, Y. et al., 2013). Además, se ha mostrado que CLV1 es internalizado, traficando hacia la vacuola lítica de manera CLV3-dependiente (un péptido homólogo a CLE40) provocando la disminución de la abundancia de CLV1 en la membrana plasmática (Nimchuk, Z. et al., 2011). Por lo tanto, el tráfico endocítico hacia la vacuola dependiente de PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2 podría regular la formación de raíces laterales a través de la vía de señalización CLE40/CLV1/ACR4 donde la activación de POL dependiente de PI4P podría modular la internalización del complejo CLV1-ACR4 (Figura 25). En este sentido, existe indicios de que la localización de ACR4 en la membrana plasmática depende de

su estado de fosforilación (Yue, K. et al., 2016). En este modelo, es crucial determinar si WOX5 u otro factor de transcripción tipo WOX es requerido en la formación de primordios inducido por Sortin2.

También, se ha descrito que el redirigimiento del tráfico de CLV1 hacia la vacuola requiere de VT111, Qb-SNARE que media esta ruta de tráfico interactuando con la Qa-SNARE SYP22 (Ebine, K. et al., 2008; Ebine, K. et al., 2011; Nimchuk, Z. et al., 2011). Existe evidencia de que SYP22 y VT111 requieren de RABF2b para regular el tráfico hacia la vacuola (Ebine, K. et al., 2014). Como hemos detectado que la acción de Sortin2 induce tempranamente el reclutamiento de ARA7/RABF2b en membranas intracelulares (Morales-Herrera, S., 2017), su activación podría ser un factor importante en el tráfico endocítico hacia la vacuola regulado por PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 para inducir la formación de primordios de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* (Figura 25), aunque no es claro cómo PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 en RTG promovería molecularmente el reclutamiento de RABF2b a endosomas tempranos y promover el tráfico endocítico hacia la vacuola.

Por otra parte, hemos caracterizado la acción de Sortin2 como un estímulo que induce la organogénesis *de novo* induciendo la activación de células fundadoras de raíces laterales (Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C. et al., en revisión). Por lo tanto, se propone que PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 serían clave para activar las células fundadoras de raíces laterales desembocando en la inducción de la formación de primordios de raíces laterales promovido por Sortin2. Sería importante estudiar la dependencia de la actividad PI4K en la activación de reguladores moleculares tempranos de la activación de células fundadoras como el factor de transcripción

GATA23 o la proteína MAKR4. Esta proteína asociada a membrana se acumula en la membrana plasmática de las células fundadoras antes del evento de división celular que marca la iniciación de una raíz lateral para generar un primordio (Xuan, W. et al., 2015). PI4P podría regular su función en la formación de primordios inducida por Sortin2, ya que este lípido es requerido para la correcta localización de MAKR4 en la membrana plasmática interactuando físicamente con él (Simon et al., 2016).

El metabolismo de los fosfatidilfosfatos (PIs) es complejo y muy dinámico. Los PIs son sintetizados y rápidamente utilizados por quinasas, fosfatasas y/o utilizados por lipasas (Boss, W. & Im, Y., 2012; Heilmann, I., 2016; Figura 26). El aumento del nivel de PI4P se produce a pocos minutos de la aplicación de Sortin2 en las plántulas. Este aumento inducido por Sortin2 sería controlado por la actividad de PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2, ya que la inhibición química de PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2 reprime el aumento del nivel de PI4P. Es importante corroborarlo en la línea mutante con pérdida de función de PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2.

Por otro lado, posterior al aumento de PI4P inducido por Sortin2 se produce una disminución de sus niveles tanto en la membrana plasmática como en RTG, la cual no dependería de la actividad PI4K. En este escenario se propone que PI4P podría ser utilizado como sustrato para la síntesis de otros lípidos río abajo dentro del metabolismo de PIs (Figura 26), contribuyendo con los niveles de los productos que podrían participar en la formación de primordios de raíces laterales. Uno de estos lípidos es PI(4,5)P₂. Este es sintetizado a partir de la fosforilación de PI4P por la actividad PI4P 5-quinasa (Munnik, T. & Nielsen, E., 2011; Heilmann, I., 2016; Figura 26).

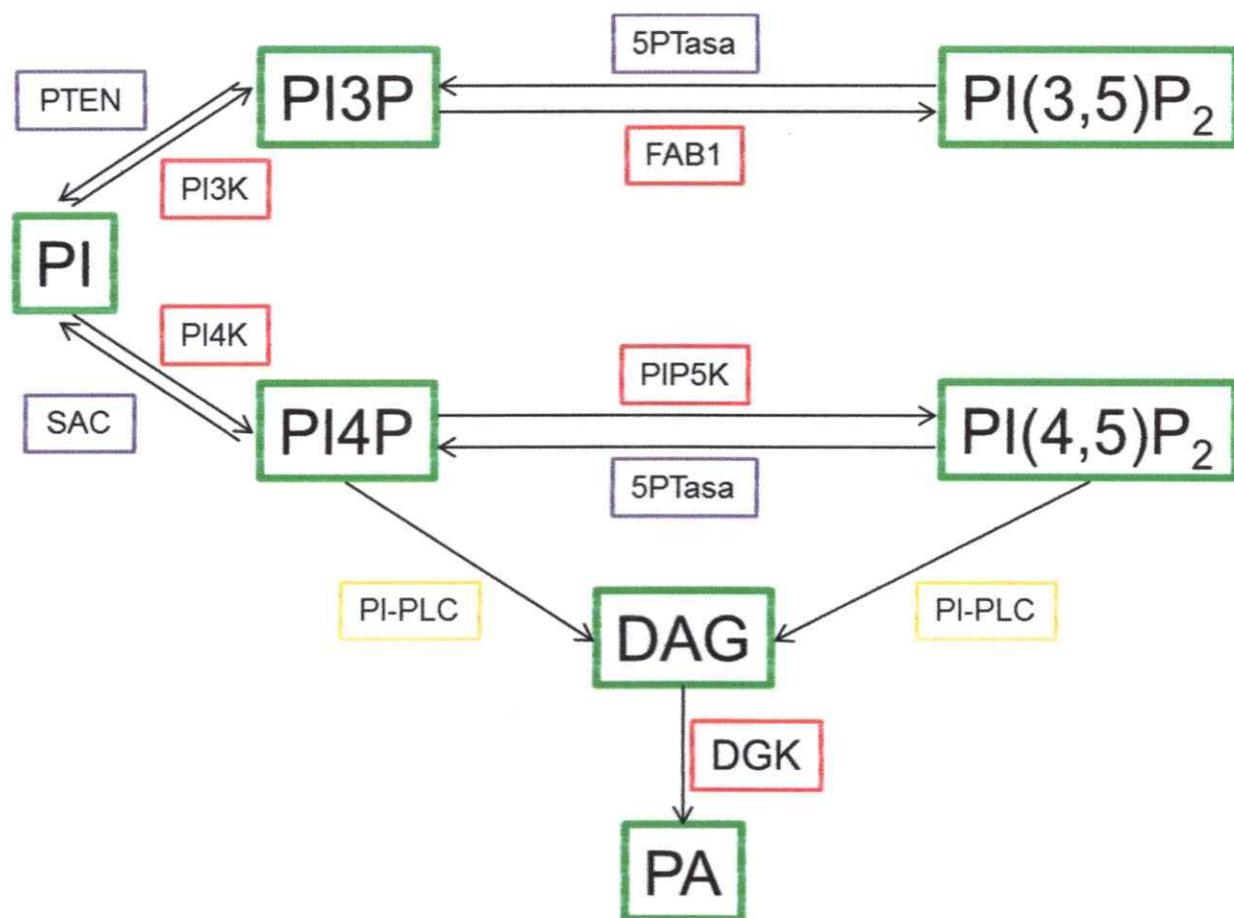


Figura 26. Metabolismo de Fosfatidilinosítoles descrito en plantas. Representación esquemática que muestra los lípidos que son incluidos dentro de este metabolismo en plantas (encerrados en cajas verdes) y su relación sustrato-producto el cual es determinado por las diferentes actividades enzimáticas implicadas en este metabolismo. Entre las actividades que participan se cuentan las actividades quinasa (encerradas en cajas rojas), actividades fosfatasa (encerradas en cajas moradas) y la fosfolipasa C (PI-PLC, encerrada en caja amarilla). 5PTasa, 5-fosfatasa; DAG, diacilglicerol; DGK, diacilglicerol quinasa; FAB1, fosfatidilinositol 3-fosfato 5-quinasa; PA, ácido fosfatídico; PIP5K, fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa; PTEN, fosfatidilinositol 3-fosfato fosfatasa; SAC, fosfatidilinositol 4-fosfato fosfatasa.

La actividad PI4P 5-quinasa y el nivel de PI(4,5)P₂ aumenta en la membrana plasmática y en membranas intracelulares frente a diferentes estímulos (Im, Y. et al., 2007; Van Leeuwen, W. et al., 2007; Mishkind, M. et al., 2009;) acompañado de la disminución del nivel de PI4P (König, S. et al., 2008). Por lo tanto, la actividad PI4P 5-quinasa podría contribuir a la disminución del nivel de PI4P en la membrana plasmática y en RTG que se produce al estimular con Sortin2. En específico, la actividad PI4P 5-quinasa esta codificada por 11 genes PIPK (PIPK1 - PIPK11; Heilmann, I., 2016). Se ha determinado genéticamente que PIPK1 y PIPK2 participan positivamente en la endocitosis de las células de la raíz primaria de Arabidopsis (Ischebeck, T. et al., 2013; Tejos, R. et al., 2014), en concordancia con lo que se ha determinado para PI4KIIIβ1 y PI4KIIIβ2 en este trabajo. En la mutante con pérdida de función de PIPK1 y PIPK2 disminuye notoriamente el nivel de PI(4,5)P₂ provocando un aumento de sus sustratos PI4P y PI (Ischebeck, T. et al., 2013). Por lo tanto, el estudio de la participación de estas PIPK en la formación de primordios de raíces laterales promovida por Sortin2 entregaría evidencia de si la acción de Sortin2 depende del rol de PI4P como componente importante en este proceso o bien como sustrato impactando en el metabolismo de los PIs.

Otro metabolito importante río abajo de PI4P, dentro del metabolismo de PIs, es el ácido fosfatídico (PA). Este lípido está catalizado por la acción conjunta de la fosfolipasa C (PLC) que cataliza la producción de Diacilglicerol (DAG) a partir de PI(4,5)P₂ o PI4P para después participar la actividad DAG quinasa (DGK) que fosforila a DAG y catalizar la producción de PA (Boss, W. & Im, Y., 2012; Heilmann, I., 2016; Figura 26). Se ha descrito que PA funciona como un segundo mensajero en plantas, ya

que sus niveles aumentan transitoriamente frente a diversos estímulos y se ha mostrado que interactúa y modula una miríada de proteínas blanco en respuesta a diversos estímulos (McLoughlin, F. & Testerink, C., 2013). También, PA participa positivamente en la endocitosis (Li, G. & Xue, H., 2007). Por lo tanto, PA podría ser la clave molecular que vincule la aceleración del tráfico endocítico con la formación de nuevos primordios de raíces laterales inducida por Sortin2.

La acción de Sortin2 revela una vía independiente del complejo receptor nuclear de auxina SCF^{TIR1/AFBs} que participa en la inducción de la formación de primordios de raíces laterales en *Arabidopsis* (Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C. et al., en revisión). En este sentido, la formación endógena de primordios y la inducida por Sortin2 pueden ser diferenciadas según la sensibilidad al inhibidor de PI4K, apoyando que ambos procesos son diferentes o bien serían activados de manera distinta. En este escenario, la pregunta es ¿qué estimula el plan de organogénesis regulado por Sortin2? Es posible que algunos estímulos del medio ambiente puedan modular este mecanismo para inducir la formación de nuevos primordios de raíces laterales. Si esto es así, los mecanismos inducidos por los estímulos del medio ambiente debieran compartir componentes cruciales que regulen el mecanismo inducido por Sortin2.

Uno de los estímulos que presenta reminiscencias a la acción de Sortin2 en la inducción de la formación de primordios de raíces laterales es el estímulo de glucosa. El tráfico endocítico inducido por glucosa incide en la respuesta que las plantas montan para adaptarse a los efectos de su exposición crónica (Urano, D. et al., 2013), sin embargo no existe aún un vínculo que relacione el rol de este tráfico inducido por

glucosa y su efecto en la organogénesis de raíces laterales. En este sentido, en el contexto de nuestro trabajo sería importante determinar si la actividad PI4K participa en el tráfico endocítico de RGS1 que se ha planteado como es el posible receptor de glucosa (Johnston, C. et al., 2007) y si esto tiene impacto en la formación de primordios de raíces laterales inducida por el estímulo de glucosa. Se ha propuesto que la endocitosis de RSG1 desacopla la inhibición que causa la proteína activadora de GTPasa en la subunidad α de proteína G heterotrimérica, por lo que activaría su señalización asociada (Johnston, C. et al., 2007; Urano, D. et al., 2013). Por lo tanto, sería también interesante evaluar la participación de la proteína G heterotrimérica en la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2. En este sentido, la subunidad α participa positivamente en la formación de primordios mientras que las subunidades β y γ han sido propuestos como reguladores negativos de la organogénesis de raíces laterales (Chen, J. et al., 2006; Trusov, Y. et al., 2007).

Recientemente, hemos vinculado que la entrada de calcio desde el apoplasto es un evento crucial para la formación de primordios de raíces laterales inducido por Sortin2, de similar manera que el inducido por el estímulo mecánico (Richter, G. et al, 2009; Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C. et al., en revisión;). Es importante establecer si la actividad PI4K participa en la formación de primordios de raíces laterales inducida por el estímulo mecánico.

El estímulo mecánico promueve un aumento transitorio de ion calcio citoplasmático en la capa del periciclo (Richter, G. et al, 2009), lo cual se sugiere en la acción de Sortin2 para inducir la formación de primordios de raíces laterales (Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C. et al., en revisión). El aumento transitorio de calcio

citoplasmático es una característica que muchos estímulos inducen, sin embargo se ha postulado que la dinámica de este cambio es estímulo-específico y que codificaría información de importancia para la transducción del estímulo que lo gatilló (Batistic, O. & Kudla, J., 2012). Por lo tanto, es importante comparar la dinámica de ión calcio inducida por el estímulo mecánico y Sortin2 para inducir la formación de primordios de raíces laterales y si este aumento de ión calcio citoplasmático depende de la actividad PI4K. También, el rol crucial del ión calcio en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2 implica que la señalización que es regulada por este ión debiese ser activada por estos estímulos. En plantas, existen más de 100 proteínas que interactúan con el ión calcio citoplasmático y modula su función en Arabidopsis, entre ellas, las calmodulinas y proteínas tipo calmodulina que se unen a sus blancos con dependencia a calcio. También se ha descrito proteínas tipo quinasas las que son activadas, ya sea por su interacción directa con el ión (CDPKs) o por la interacción con proteínas que unen el ión (complejo CBL-CIPK) (Batistic, O. & Kudla, J., 2012). Sería importante pesquisar cuáles de estas proteínas que participan en la señalización de calcio participa en la formación de primordios de raíces laterales promovida por la acción de Sortin2 y si esta función es importante en respuesta al estímulo mecánico.

Por último, en este trabajo se sugiere que el tráfico endocítico hacia la vacuola - regulado por la actividad PI4K de *PI4KIIIβ1* y *PI4KIIIβ2* - es necesario en la formación de primordios de raíces laterales inducido por Sortin2. Es crucial investigar si la entrada de calcio desde el apoplasto y la inducción del tráfico endocítico son eventos ligados entre sí y así proponer si estos eventos celulares son parte o no de una misma vía de señalización que impacta en la formación de primordios de raíces laterales.

6.- CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral se concluye referido a la participación de PI4K y PI3K en mecanismo de acción de Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*:

- Sortin2 induce un cambio temporal en la abundancia de PI4P en la membrana plasmática y en compartimientos intracelulares tipo TGN. El incremento de PI4P es regulado por la actividad PI4K que es esencial en la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2.

- La actividad PI4K participa en el tráfico endocítico hacia la vacuola mediado por Sortin2.

- En particular, de los 12 genes que codifican para PI4K en *Arabidopsis*, la actividad de PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 es esencial en la aceleración del tráfico endocítico hacia la vacuola inducido por Sortin2 controlando la formación de primordios de raíces laterales inducida por Sortin2.

- La actividad PI3K comandada por AtVPS34 participa en la formación de raíces laterales inducida por Sortin2 posiblemente regulando la abundancia de PI3P en el tonoplasto.

Además, sobre la participación de PI4K y PI3K en el plan endógeno de desarrollo de *Arabidopsis thaliana* concluimos que:

- Las enzimas PI4KIII β 1 y PI4KIII β 2 participan como regulador negativo de la formación de primordios de raíces laterales regulando negativamente el tráfico endocítico hacia la vacuola.

- La actividad PI3K es dispensable en la formación endógena de raíces laterales.

Por lo tanto, proponemos que el plan endógeno y la acción de Sortin2 tendrían mecanismos distintos para inducir la organogénesis de raíces laterales. En particular, se propone que la abundancia de PI4P sería un factor clave en la formación *de novo* de primordios promovido por el tráfico endocítico hacia la vacuola inducida por Sortin2. En contraste, PI4P reprime la formación endógena de raíces laterales por la regulación negativa que ejerce en el tráfico endocítico hacia la vacuola.

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Antignani, V., Klocko, A., Bak, G., Chandrasekaran, S., Dunivin, T. & Nielsen, E. (2015). Recruitment of PLANT U-BOX13 and the PI4K β 1/ β 2 Phosphatidylinositol-4 Kinases by the Small GTPase RabA4B Plays Important Roles during Salicylic Acid-Mediated Plant Defense Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*. 27:243-261.
2. Baral, A., Irani, N., Fujimoto, M., Nakano, A., Mayor, S. & Mathew, M. (2015). Salt-Induced remodeling of Spatially Restricted Clathrin- Independent Endocytic Pathways in Arabidopsis Root. *Plant Cell*. 27: 1297–1315.
3. Batistič, O. & Kudla, J. (2012). Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim. Biophys. Acta*. 1820: 1283–1293.
4. Beck, M., Zhou, J., Faulkner, C., MacLean, D., Robatzek, S. (2012). Spatio-temporal cellular dynamics of the Arabidopsis flagellin receptor reveal activation status-dependent endosomal sorting. *Plant Cell*. 24: 4205-4219.
5. 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: 1405-1419.
6. Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N.D., & Satiat-Jeunemaitre, B. (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J. Microscopy*. 214: 159–173.
7. Boss W. & Im, Y. (2012). Phosphoinositide signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:409–429.
8. Buwaneshwar, M., Singh, M., Aggrawal, P. & Laxmi, A. (2009). Glucose and Auxin Signaling Interaction in Controlling Arabidopsis thaliana Seedlings Root Growth and Development. *PLoS one*. 4: e4502.
9. Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P. and Bennett, M. (2001). Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *Plant Cell*. 13: 843–852.
10. Chen, J., Gao, Y. & Jones, A. (2006). Differential Roles of Arabidopsis Heterotrimeric G-Protein Subunits in Modulating Cell Division in Roots. *Plant Physiol*. 141: 887–897.
11. Clough, S. & Bent, A. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J*. 16: 735-743.

12. Colaneri, A., Tunc-Ozdemir, M., Huang, J. & Jones, A. (2014). Growth attenuation under saline stress is mediated by the heterotrimeric G protein complex. *BMC Plant Biol.* 14:129.
13. De Rybel, B., Vassileva, V., Parizot, B., Demeulenaere, M., Grunewald, W., Audenaert, D., Van Campenhout, J., Overvoorde, P., Jansen, L., Vanneste, S., Möller, B., Wilson, M., Holman, T., Van Isterdael, G., Brunoud, G., Vuylsteke, M., Vernoux, T., De Veylder, L., Inzé, D., Weijers, D., Bennett, M., Beeckman, T. (2010). A novel aux/IAA28 signaling cascade activates GATA23-dependent specification of lateral root founder cell identity. *Curr. Biol.* 20:1697-706.
14. De Smet, I., Vassileva, V., De Rybel, B., Levesque, M., Grunewald, W., Van Damme, D., Van Noorden, G., Naudts, M., Van Isterdael, G., De Clercq, R., Wang, J., Meuli, N., Vanneste, S., Friml, J., Hilson, P., Jürgens, G., Ingram, G., Inzé, D., Benfey, P. & Beeckman, T. (2008). Receptor-Like Kinase ACR4 Restricts Formative Cell Divisions in the Arabidopsis Root. *Science.* 322: 594-597.
15. Delage, E., Ruelland, E., Guillas, I., Zachowski, A. & Puyaubert, J. (2012). Arabidopsis Type-III Phosphatidylinositol 4-Kinases $\beta 1$ and $\beta 2$ are Upstream of the Phospholipase C Pathway Triggered by Cold Exposure. *Plant Cell Physiol.* 53: 565-576.
16. Delarue, M., Prinsen, E., Onckelen, H. V., Caboche, M., & Bellini, C. (1998). Sur2 mutations of *Arabidopsis thaliana* define a new locus involved in the control of auxin homeostasis. *Plant J.* 14: 603-611.
17. Ditengou, F., Teale, W., Kochersperger, P., Flittner, K., Kneuper, I., van der Graaff, E., Nziengui, H., Pinosa, F., Li, X., Nitschke, R., Laux, T. & Palme, K. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 18818-18823.
18. Dubrovsky, J., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J. & Benkova E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 8790-8794.
19. Dubrovsky J. & Forde B. (2012). Quantitative analysis of lateral root development: pitfalls and how to avoid them. *Plant Cell.* 24: 4-14.
20. Ebine, K., Okatani, Y., Uemura, T., Goh, T., Shoda, K., Niihama, M., Morita, M., Spitzer, C., Otegui, M., Nakano, A. & Ueda, T. (2008). A SNARE Complex Unique to Seed Plants Is Required for Protein Storage Vacuole Biogenesis and Seed Development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 20: 3006-3021.

21. Ebine, E., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, M., Thordal-Christensen, H., Tsutsumi, N., Nakano, A. & Ueda, T. (2011). A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat Cell Biol.* 13: 853-859.
22. Ebine, K., Inoue, T., Ito, J., Ito, E., Uemura, T., Goh, T., Abe, H., Sato, K., Nakano, A. & Ueda, T. (2014). Plant Vacuolar Trafficking Occurs through Distinctly Regulated Pathways. *Curr. Biol.* 24: 1375–1382.
23. Emans, N., Zimmermann, S., Fischer, R. (2002). Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *Plant Cell.* 14: 71-86.
24. Fujimoto, M., Suda, Y., Vernhettes, S., Nakano, A., Ueda, T. (2015). Phosphatidylinositol 3-kinase and 4-kinase have distinct roles in intracellular trafficking of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 56: 287-298.
25. Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A. & Tasaka, M. (2005). Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44: 382–395.
26. Gagne, J. & Clark, S. (2010). The *Arabidopsis* Stem Cell Factor POLTERGEIST Is Membrane Localized and Phospholipid Stimulated. *Plant Cell.* 22: 729-743.
27. 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: 219 – 230.
28. Gibeaut, D., Hulett, J., Cramer, G. & Seemann, J. (1997). Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol.* 115: 317–319.
29. Gray, W., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. & Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature.* 414: 271-276.
30. Gruber, B., Giehl, R., Friedel, S., von Wirén, N. (2013). Plasticity of the *Arabidopsis* root system under nutrient deficiencies. *Plant Physiol.* 163: 161-179.
31. Heilmann, I. (2016). Phosphoinositide signaling in plant development. *Development.* 143: 2044-2055.

32. Hobe, M., Müller, R., Grünewald, M., Brand, U., Simon, R. (2003). Loss of CLE40, a protein functionally equivalent to the stem cell restricting signal CLV3, enhances root waving in Arabidopsis. *Dev. Genes Evol.* 213: 371–381.
33. Ischebeck, T., Werner, S., Krishnamoorthy, P., Lerche, J., Meijón, M., Stenzel, I., Löffke, C., Wiessner, T., Im, Y., Y. Perera, I., Iven, T., Feussner, I. Busch, W., Boss, W, Teichmann, T., Hause, B., Persson, S. & Heilmann, I. (2013). Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Influences PIN Polarization by Controlling Clathrin-Mediated Membrane Trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell.* 25: 4894–4911.
34. Im, Y., Davis, A., Perera, I., Johannes, E., Allen, N. & Boss W. (2007). The N-terminal Membrane Occupation and Recognition Nexus Domain of Arabidopsis Phosphatidylinositol Phosphate Kinase 1 Regulates Enzyme Activity. *J Biol. Chem.* 282: 5443–5452.
35. Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miège, C., Rollin, C. & Gaude, T. (2007). AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis. *Nature.* 443: 106–109.
36. Johnston, C., Taylor, J., Gao, Y., Kimple, A., Grigston, J., Chen, J., Siderovski, D., Jones, A. & Willard, F. (2007). GTPase acceleration as the rate-limiting step in Arabidopsis G protein-coupled sugar signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104: 17317–17322.
37. Joo, J., Yoo, H., Hwang, I., Lee, J., Nam, K. & Bae, Y. (2005). Auxin-induced reactive oxygen species production requires the activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *FEBS Lett.* 579: 1243–1248.
38. Jung, J., Kim, Y. Kwak, J., Hwang, J., Young, J., Schroeder, J., Hwang, I. & Lee, Y. (2002). Phosphatidylinositol 3- and 4-Phosphate Are Required for Normal Stomatal Movements. *Plant Cell.* 14: 2399–2412.
39. Kang, B., Nielsen, E., Preuss, M., Mastronarde, D., Staehelin, L. (2011). Electron tomography of RabA4b- and PI-4K β 1-labeled trans-Golgi network compartments in Arabidopsis. *Traffic.* 12: 313–329.
40. Kepinski, S., & Leyser, L. (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature.* 435: 446–451.
41. Kim, D., Eu, Y., Yoo, C., Kim, Y., Pih, K., Jin, J., Kim, S., Stenmark, H., Hwang, I. (2001). Trafficking of Phosphatidylinositol 3-Phosphate from the trans-Golgi Network to the Lumen of the Central Vacuole in Plant Cells. *Plant Cell.* 13: 287–301.

42. Kleine-Vehn, J., Dhonukshe, P., Sauer, M., Brewer, P., Wisniewska, J., Paciorek, T., Benková, E. & Friml, J. (2008). ARF GEF-Dependent Transcytosis and Polar Delivery of PIN Auxin Carriers in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 18: 526 – 531.
43. Kolb, C., Nagel, M., Kalinowska, K., Hagmann, J., Ichikawa, M., Anzenberger, F., Alkofer, A., Sato, M., Braun, P., Isono, E. (2015). FYVE1 is essential for vacuole biogenesis and intracellular trafficking in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 167: 1361-1373.
44. König, S., Ischebeck, I., Lerche, J., Stenzel, I. & Heilmann, I. (2008). Salt-stress-induced association of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate with clathrin-coated vesicles in plants. *Biochem. J.* 415: 387–399.
45. Lee, Y., Kim, E., Choi, Y., Hwang, I., Staiger, C., Chung, Y., Lee, Y. (2008). The Arabidopsis Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Important for Pollen Development. *Plant Physiol.* 147: 1886-1897.
46. Lee, Y., Bak, G., Choi, Y., Chuang, W., Cho, H. & Lee, Y. (2008, [2]). Roles of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Root Hair Growth. *Plant Physiol.* 147: 624–635.
47. Leshem, Y., Seri, L. & Levine, A. (2007). Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance. *Plant J.* 51: 185–197.
48. Li, G. & Xue, H. (2007). Arabidopsis PLD ζ 2 Regulates Vesicle Trafficking and Is Required for Auxin Response. *Plant Cell.* 19: 281–295.
49. Li, G., Song, H., Li, B., Kronzucker, H., Shi, W. (2015). Auxin Resistant1 and PIN-FORMED2 Protect Lateral Root Formation in Arabidopsis under Iron Stress. *Plant Physiol.* 169: 2608-2623.
50. Lima, J., Kojima, S., Takahashi, H., & von Wirén, N. (2010). Ammonium triggers lateral root branching in Arabidopsis in an AMMONIUM TRANSPORTER1;3-dependent manner. *Plant Cell.* 22, 3621–3633.
51. Ma, W., Li, J., Qu, B., He, X., Zhao, X., Li, B., Fu, X. & Tong, Y. (2014). Auxin biosynthetic gene TAR2 is involved in low nitrogen-mediated reprogramming of root architecture in Arabidopsis. *Plant J.* 78: 70–79.
52. Malamy, J. & Benfey, P. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development.* 124: 33-44.
53. Marchant, A., Bhalerao, B., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P., Bennett, M. & Sandberg, G. (2002). AUX1 Promotes Lateral Root Formation by Facilitating

- Indole-3-Acetic Acid Distribution between Sink and Source Tissues in the Arabidopsis Seedling. *Plant Cell*. 14: 589-597.
54. Marhavý, P., Vanstraelen, M., De Rybel, B., Zhaojun, D., Bennett, M., Beeckman, T. & Benková, E. (2013). Auxin reflux between the endodermis and pericycle promotes lateral root initiation. *EMBO J*. 32: 149–158.
55. Matsuoka, K., Bassham, D.C., Raikhel, N.V., & Nakamura, K. (1995). Different sensitivity to Wortmannin of two vacuolar sorting signals indicates the presence of distinct sorting machineries in tobacco cells. *J. Cell Biol.* 130: 1307–1318.
56. Mazel, A., Leshem, Y., Tiwari, B.S. & Levine, A. (2004). Induction of Salt and Osmotic Stress tolerance by Overexpression of an Intracellular Vesicle Trafficking Protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol.* 134: 118 – 128.
57. McLoughlin F. & Testerink, C. (2013). Phosphatidic acid, a versatile water-stress signal in roots. *Front Plant Sci.* 4: 525.
58. Mishkind, M., Vermeer, J., Darwish, E. & Munnik, T. (2009). Heat stress activates phospholipase D and triggers PIP2 accumulation at the plasma membrane and nucleus. *Plant J.* 60: 10–21.
59. Miura, K., et al. (2011). SIZ1 regulation of phosphate starvation-induced root architecture remodeling involves the control of auxin accumulation. *Plant Physiol.* 155, 1000–1012.
60. Morales-Herrera, S. (2015). Estudio del mecanismo inductor de Sortin2 en la organogénesis de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Seminario de título de Ingeniería en Biotecnología molecular; Facultad de Ciencias; Universidad de Chile.
61. Morales-Herrera, S. (2017). Estudio del rol del tráfico endocítico en la diferenciación de las células del periciclo a células fundadoras de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas; Facultad de Ciencias; Universidad de Chile.
62. Morales-Herrera, S., Rubilar-Hernández, C., Pérez-Henríquez, P. & Norambuena, L. Endocytic trafficking targets lateral root founder cell specification inducing de novo lateral root organogenesis in *A. thaliana*. En revisión.
63. Mudgil, Y., Shiu, S., Stone, S., Salt, J. & Goring, D. (2004). A Large Complement of the Predicted Arabidopsis ARM Repeat Proteins Are Members of the U-Box E3 Ubiquitin Ligase Family. *Plant Physiol.*, 134: 59-66.

64. Mueller-Roeber, B. & Pical, C. (2002). Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant Physiol.* 130: 22-46.
65. Munnik, T. & Nielsen, E. (2011). Green light for polyphosphoinositide signals in plants. *Curr. Op. Plant Biol.* 14: 489 – 497.
66. Nimchuk, Z., Tarr, P, Ohno, C., Qu, X. & Meyerowitz, E. (2011). Plant Stem Cell Signaling Involves Ligand-Dependent Trafficking of the CLAVATA1 Receptor Kinase. *Curr. Biol.* 21: 345–352.
67. Norambuena, L. & Tejos, R. (2017). Chemical Genetic Dissection of Membrane Trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 68.
68. Okazaki, K., Miyagishima, S., Wada, H. (2015). Phosphatidylinositol 4-Phosphate Negatively Regulates Chloroplast Division in Arabidopsis. *Plant Cell.* 27: 663-674.
69. Okumura, K., Goh, T., Toyokura, K., Kasahara, H., Takebayashi, Y. Mimura, T., Kamiya, Y., & Fukaki, H. (2013). GNOM/FEWER ROOTS is required for the Establishment of an Auxin Response Maximum for Arabidopsis Lateral Root Initiation. *Plant Cell Physiol.* 54: 406–417.
70. Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A. & Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *Plant Cell.* 19: 118–130.
71. Ozaki, S., DeWald, D., Shope, J., Chen, J. & Prestwich, G. (2000). Intracellular delivery of phosphoinositides and inositol phosphates using polyamine carriers. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97: 11286–11291.
72. 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: 1195 – 1209.
73. Pérez-Henríquez, P. (2016). Identificación de componentes moleculares que median la respuesta a Sortin2. Tesis de doctorado con mención en Biología molecular, celular y neurociencias; Facultad de Ciencias; Universidad de Chile.
74. Pérez-Torres, C., López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M. & Herrera-Estrella, L. (2008). Phosphate availability alters lateral root development in Arabidopsis by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell.* 20: 3258 - 3272.
75. Petricka, J., Winter, C. & Benfey, P. (2012). Control of Arabidopsis root development. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 24.1-24.28.

76. Preuss, M., Schmitz, A., Thole, J., Bonner, H., Otegui, M. & Nielsen, E. (2006). A role for the RabA4b effector protein PI-4K β 1 in polarized expansion of root hair cells in *Arabidopsis thaliana*. *J. Cell Biol.* 172: 991 – 998.
77. Rehman, R. & Di Sansebastiano, G. (2014). Plant Rab GTPases in Membrane Trafficking and Signalling. *Plant signaling: understanding the molecular crosstalk*, Chapter 3: 51-73. Springer India.
78. Reyes, F., Buono, R. & Otegui, M. (2011). Plant endosomal trafficking pathways. *Curr. Op plant Biol.* 14: 666–673.
79. Richter, G., Monshausen, G., Krol, A. & Gilroy, S. (2009). Mechanical Stimuli Modulate Lateral Root Organogenesis. *Plant Physiol.* 151: 1855-1866.
80. Simon, M., Platre, M., Assil, S., van Wijk, R., Chen, W., Chory, J., Dreux, M., Munnik, T. & Jaillais Y. (2014). A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in *Arabidopsis*. *Plant J.* 77: 322 – 337.
81. Simon, M., Platre, M., Marquès-Bueno, M., Armengot, L., Stanislas, T., Bayle, V., Caillaud, M & Jaillais, Y. (2016). A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. *Nat. plants.* 2: 16089.
82. Singh, M., Krüger, F., Beckmann, H., Brumm, S., Vermeer, J., Munnik, T., Mayer, U., Stierhof, Y., Grefen, C., Schumacher, K. & Jürgens, G. (2014). Protein Delivery to Vacuole Requires SAND Protein-Dependent Rab GTPase Conversion for MVB-Vacuole Fusion. *Curr. Biol.* 24: 1383–1389.
83. Song, S., Hoffhuis, H., Lee, M. & Clark, S. (2008). Key Divisions in the Early *Arabidopsis* Embryo Require POL and PLL1 Phosphatases to Establish the Root Stem Cell Organizer and Vascular Axis. *Dev. Cell.* 15: 98–109.
84. Stahl, Y., Wink, R., Ingram, G. & Simon, R. (2009). A Signaling Module Controlling the Stem Cell Niche in *Arabidopsis* Root Meristems. *Curr. Biol.* 19: 909-914.
85. Stahl, Y., Grabowski, S., Bleckmann, A., Kühnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Karine Gustavo Pinto, K., Kirschner, G., Schmid, J., Wink, R., Hülseswede, A., Suren Felekyan, S., Seidel, C. & Simon, R. (2013). Moderation of *Arabidopsis* Root Stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 Receptor Kinase Complexes. *Curr. Biol.* 23: 362–371.
86. Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., De Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M., Carrier, D., James, N.,

- Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., Patel, K., Jones, J., Taylor, C., Schachtman, D., May, S., Sandberg, G., Benfey, P., Friml, J., Kerr, I., Beeckman, T., Laplaze, L. & Bennett, M (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat. Cell Biol.* 10: 946-954.
87. Tejos, R., Sauer, M., Vanneste, S., Palacios-Gomez, M., Li, H., Heilmann, M., van Wijk, R., Vermeer, J., Heilmann, I., Munnik, T. & Friml, J. (2014). Bipolar Plasma Membrane Distribution of Phosphoinositides and Their Requirement for Auxin-Mediated Cell Polarity and Patterning in Arabidopsis. *Plant Cell.* 26: 2114-2128.
88. Thole, J., Vermeer, J., Zhang, Y., Gadella, T., Nielsen, E. (2008). ROOT HAIR DEFECTIVE4 Encodes a Phosphatidylinositol-4-Phosphate Phosphatase Required for Proper Root Hair Development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 20: 381-395.
89. Tian, M., Lou, L., Liu, L., Yu, F., Zhao, Q., Zhang, H., Wu, Y., Tang, S., Xia, R., Zhu, B., Serino, G. & Xie, Q. (2015). The RING finger E3 ligase STRF1 is involved in membrane trafficking and modulates salt-stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 82: 81-92.
90. Torrey, J. (1950). The Induction of Lateral Roots by Indoleacetic Acid and Root Decapitation. *Am. J. Botany.* 37: 257-264.
91. Trusov, Y., Rookes, J., Tilbrook, K., Chakravorty, D., Mason, M., Anderson, D., Chen, J., Jones, A. & Botella, J. (2007). Heterotrimeric G Protein γ Subunits Provide Functional Selectivity in G $\beta\gamma$ Dimer Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell.* 19:1235-1250.
92. Urano, D., Phan, N., Jones, J., Yang, J., Huang, J., Gringston, J., Taylor, J. & Jones, A. (2013). Endocytosis of the seven-transmembrane RGS1 protein activates G-protein-coupled signaling in Arabidopsis. *Nat. Cell Biol.* 14: 1079 - 1088.
93. Van Leeuwen, W., Vermeer, J., Gadella, T. & Munnik, T. (2007). Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole Arabidopsis seedlings. *Plant J.* 52: 1014-1026.
94. Vermeer, J., van Leeuwen, W., Tobeña-Santamaria, R., Laxalt, A., Jones, D., Divecha, N., Gadella, T. & Munnik, T. (2006). Visualization of PtdIns3P dynamics in living plant cells. *Plant J.* 47: 687-700.

95. Vermeer, J., Thole, J., Goedhart, J., Nielsen, E., Munnik, T. & Gadella, T. (2009). Imaging phosphatidylinositol 4-phosphate dynamics in plant cells. *Plant J.* 57: 356–372.
96. Vlahos, C., Matter, W., Hui, K., Brown, R. (1994). A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269: 5241-5248.
97. 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: 499 – 516.
98. Welters, P., Takegawao, K., Emr, S. & Chrispeels, M. (1994). *AtVPS34*, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11398-11402.
99. Xu, N., Gao, X., Zhao, X., Zhu, D., Zhou, L. & Zhang, X. (2011). Arabidopsis *AtVPS15* is essential for pollen development and germination through modulating phosphatidylinositol 3-phosphate formation. *Plant Mol. Biol.* 77: 251–260.
100. Xuan, W., Audenaert, D., Parizot, B., Möller, B., Njo, M., De Rybel, B., De Rop, G., Van Isterdael, G., Mähönen, M., Vanneste, S., & Beeckman, T. (2015). *Curr. Biol.* 25: 1381–1388.
101. Yue, K., Sandal, P. Williams, E., Murphy, E., Stes, E., Nikonorova, N., Ramakrishna, P., Czyzewicz, N., Montero-Morales, L., Kumpf, R., Lin, Z., van de Cotte, B., Iqbal, M., Van Bel, M., Van De Slijke, M., Meyer, M., Gadeyne, A., Cyril Zipfel, C., De Jaeger, G., Van Montagua, M., Van Damme, D., Gevaert, K., Raoc, G., Beeckman, T., & De Smet, I. (2016). PP2A-3 interacts with ACR4 and regulates formative cell division in the Arabidopsis root. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 113: 1447–1452.
102. Zheng, J., Han, S., Rodriguez-Welsh, M. & Rojas-Pierce, M. (2014). Homotypic Vacuole Fusion Requires VTI11 and Is Regulated by Phosphoinositides. *Mol. Plant.* 7: 1026-1040.
103. Zolla, G., Heimer, Y. & Barak, S. (2010). Mild salinity stimulates a stress-induced morphogenic response in *Arabidopsis thaliana* roots. *J. Exp. Bot.* 61: 211-224.
104. Zouhar, J., Hicks, G. & Raikhel, N. (2004). Sorting inhibitors (Sortins): Chemical compounds to study vacuolar sorting in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 9497-9501.