

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

**Desarrollo de raíces laterales:
identificación de componentes
moleculares que median la respuesta a
Sortin2**

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

Director de Tesis:
Dr. Lorena Norambuena

Co-Director de Tesis
Dr. Tom Beeckman

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Michael Handford (Presidente)

Dr. Francisco Chávez

Dr. Rodrigo Gutiérrez

Dr. Gabriel León

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Emiliano,
Mi ojitos de carbón
Mi perita de almidón
Mi naricita de maní
Mi mejillitas de algodón
Qué pasa hijo?, no llores por favor
que me destrozas el corazón...
Te amamos

FINANCIAMIENTO

- Proyecto FONDECYT Regular 1120289. "Lateral root development; unraveling pathway which are independent of auxin transcriptional signaling". 2011-2015.
- Beca CONICYT Nacional, Marzo 2011- Agosto 2015.
- Gastos Operacionales para becarios CONICYT 21110627, 2013-2014.
- Beca Pasantías en el extranjero de la Universidad de Chile, Junio-Octubre 2013.
- Apoyo a visita de profesor extranjero MECESUP UCH0713, Mayo 2012
- Proyecto Fondef Valorización de Investigación en la Universidad (VIU) 110058. "Sistema modificador de la arquitectura radicular para plantas de importancia económica". Septiembre 2012 - Noviembre 2013.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Anatomía de la raíz principal y formación de las raíces laterales	4
Figura 2. Inducción de las raíces laterales por Sortin2.	38
Figura 3. Efecto de Sortin2 como inductor de la iniciación de las raíces laterales.	43
Figura 4. Localización de la acumulación de auxina mediante la respuesta transcripcional de los reporteros pDR5::GUS y pIAA2::GUS en raíces de plantas tratadas con Sortin2.	48
Figura 5. Efecto de Sortin2 en la señalización intracelular de auxina analizado <i>in vivo</i> por el reportero DII-VENUS.	51
Figura 6. Evaluación de los componentes moleculares de la señalización canónica de auxina requeridos en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2.	53
Figura 7. Sincronización del inicio de la formación de las raíces laterales en el sistema LRIS.	58
Figura 8. Curso temporal de la activación de pCYCB1 en raíces de plántulas pCYCB1;1::GUS tratadas con Sortin2 y NAA, usando el sistema LRIS.	62
Figura 9. Sortin2 induce la actividad mitótica específicamente en las células del periciclo.	64
Figura 10. Sortin2 induce la activación del regulador de diferenciación de células del periciclo pGATA23.	67
Figura 11. Esquema del diseño experimental del perfil transcriptómico mediante RNA-	

seq, en respuesta a tratamientos con Sortin2 y NAA.....	70
Figura 12. Análisis del perfil de expresión transcriptómico realizado mediante RNA-seq sobre raíces tratadas con Sortin2 ó NAA.	76
Figura 13. Diagrama de trabajo para el análisis de enriquecimiento de procesos biológicos y de sitios de unión de factores de transcripción (TFBS).	79
Figura 14. Enriquecimiento de procesos biológicos en genes diferencialmente expresados en respuesta a Sortin2 y en respuesta a NAA.	85
Figura 15. Enriquecimiento de procesos biológicos en genes diferencialmente expresados en respuesta a Sortin2, en respuesta a NAA y en respuesta tanto a Sortin2 como a NAA.	86
Figura 16. Enriquecimiento de sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) en la región regulatoria de genes diferencialmente expresados en respuesta a Sortin2, en respuesta a NAA y en respuesta tanto a Sortin2 como a NAA..	92
Figura 17. Identificación de componentes moleculares que participarían en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2.....	97
Figura 18. Comprobación de la linealidad del rango dinámico de la reacción de qRT-PCR.	101
Figura 19. Validación de los cambios transcripcionales detectados por RNA-seq mediante ensayos de qRT-PCR	103
Figura 20. Análisis de correlación de los cambios en los niveles de transcritos en respuesta a Sortin2, obtenidos mediante qRT-PCR y RNA-seq.	104
Figura 21. Cambios transcripcionales en respuesta a Sortin2 y a NAA de los genes de respuesta a SA y de los genes de respuesta y síntesis de JA.	107

Figura 22. Efecto de la aplicación de ácido salicílico en la formación de las raíces laterales.	110
Figura 23. Modelo de interacción de la vía utilizada para responder a Sortin2 con la vía de señalización canónica de auxina conducente a la formación de las raíces laterales (RL).	134

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> usadas en esta tesis.	16
Tabla II. Condiciones para el diseño de partidores usando el software Primers3	32
Tabla III. Lista de partidores para la amplificación de genes obtenidos por RNA-seq que serán validados por qRT-PCR.....	33
Tabla IV. Lista de partidores para amplificar genes normalizadores (<i>Housekeeping</i>)..	34
Tabla V. Lista de los TFBS que son identificados en la región reguladora de los genes "Sortin2", "NAA" y "Sortin2 \cap NAA" con un <i>p-value</i> < 0.01.....	93
Tabla VI. Procesos Biológicos de los <u>G</u> enes con una <u>P</u> utativa <u>P</u> articipación <u>E</u> n La Formación De <u>R</u> Aíces <u>L</u> aterales En Respuesta a <u>S</u> ortin2, GEPPERALS..	106
Tabla VII. Análisis de co-expresión para pares de genes entre los genes GEPPERALS.	108

INDICE DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
FINANCIAMIENTO.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE CONTENIDOS.....	ix
ABREVIATURAS.....	xv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUCCION.....	1
1.1 Formación de las raíces laterales (RL).	1
1.2 Regulación de la formación de las raíces laterales (RL).	5
1.3 Formación de raíces laterales por mecanismos independientes de la señalización canónica de auxina.	7
1.4 Inducción de las raíces laterales en respuesta a los tratamientos con Sortin2.	9
1.5 Hipótesis.	15
1.6 Objetivo General.	15
1.7 Objetivos específicos.	15

2 MATERIALES Y METODOS.....	16
2.1 Material biológico.....	16
2.2 Esterilización de las semillas.....	17
2.3 Cultivo de las plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.3.1 Crecimiento en presencia de ácido naftilftalámico (NPA).....	19
2.4 Tratamientos con Sortin2 y ácido naftalenacético (NAA).....	19
2.5 Tratamiento localizados con Sortin2 en la zona de ramificación de la raíz principal.....	20
2.6 Cuantificación de primordios de raíz lateral y de raíces laterales emergidas.....	21
2.7 Ensayo GUS; evaluación histoquímica de la actividad de la enzima β -glucoronidasa.....	22
2.8 Microscopía.....	23
2.8.1 Microscopia confocal.....	23
2.8.2 Microscopia de campo claro/Nomarski.....	23
2.9 Perfil de expresión global en raíces de plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i> sometidas a tratamientos con Sortin2 y NAA mediante RNA-seq.....	24
2.9.1 Obtención del material biológico.....	24
2.9.2 Extracción de RNA para RNA-seq.....	25
2.9.3 Preparación de librerías de cDNA y secuenciación masiva illumina Hiseq2000.....	26
2.9.4 Procedimiento de análisis bioinformática para la obtención de la expresión génica diferencial mediante RNA-seq.....	27
2.9.5 Procedimiento bioinformático para la obtención del enriquecimiento de procesos biológicos asociados a genes expresados diferencialmente.....	28

2.9.6 Procedimiento bioinformática para la obtención del enriquecimiento de la probabilidad de ocurrencia de los sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) en la región promotora de genes expresados diferencialmente.....	29
2.10 Validación mediante qRT-PCR de la expresión diferencial detectada mediante RNA-seq.	30
2.10.1 Extracción de RNA para qRT-PCR.	30
2.10.2 Síntesis de cDNA y verificación de cDNA por PCR.	31
2.10.3 Diseño de partidores para la amplificación mediante qRT-PCR.	32
2.10.4 Validación de partidores normalizadores (<i>housekeeping</i>).....	33
2.10.5 Condiciones del ensayo qRT-PCR.	34
2.10.6 Análisis de los datos obtenidos mediante qRT-PCR.	35
3 RESULTADOS	36
3.1 Objetivo 1. Estudio de la participación de la vía de señalización canónica de la hormona auxina en la inducción de raíces laterales por Sortin2.	36
3.1.1 Evaluación de la progresión espacio temporal de la inducción de raíces laterales por Sortin2.....	37
3.1.2 Formación <i>de novo</i> de las raíces laterales por inducción con Sortin2.....	41
3.1.3 Patrón de distribución de la respuesta a auxina en la raíz principal de plántulas de <i>Arabidopsis</i> en tratamientos con Sortin2	45
3.1.4 Sortin2 en la señalización intracelular de auxina reportado por DII-VENUS	49
3.1.5 Rol de la señalización canónica de auxina en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2.	52
3.2 Objetivo 2. Identificación de el (los) grupo(s) de genes que son regulados en	

tratamientos con Sortin2 mediante análisis de expresión génica global.	56
3.2.1 Sistema de inducción de raíces laterales (LRIS); sincronización de la actividad mitótica de las células del periciclo mediante NPA.....	57
3.2.2 Curso temporal de inducción de actividad mitótica temprana por Sortin2.	59
3.2.3 Sortin2 induce actividad mitótica de células del periciclo y activa marcadores de la iniciación de raíces laterales.	63
3.2.4 Perfil transcriptómico comparativo mediante RNA-seq de raíces primarias que fueron inducidas para la formación de las raíces laterales con Sortin2 y NAA....	68
3.2.5 Análisis del perfil de expresión en respuesta a NAA y Sortin2; desde la secuenciación masiva hasta la obtención de genes diferencialmente expresados.....	72
3.2.6 Caracterización del perfil transcriptómico inducido por Sortin2 mediante cuantificación del enriquecimiento de procesos biológicos entre los genes diferencialmente expresados.	77
3.2.7 Caracterización del perfil transcriptómico inducido por Sortin2 mediante el enriquecimiento de sitios de unión de factores de transcripción en la región reguladora de los genes diferencialmente expresados.....	87
3.2.8 Identificación de componentes moleculares que participarían en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2 mediante jerarquización piramidal. ..	95
3.2.9 Validación mediante qRT-PCR de los resultados del perfil transcriptómico global por RNA-seq.	98
3.3 Objetivo 3. Integración de la información acerca de los componentes moleculares que podrían ser importantes para la formación de las raíces laterales en respuesta	

a Sortin2.....	104
3.3.1 Efecto de la aplicación exógena de ácido salicílico en la formación de las raíces laterales.....	109
4 DISCUSION.....	112
4.1 Sortin2 induce la formación <i>de novo</i> de las raíces laterales (RL).....	112
4.1.1 Sortin2 estimula la expresión de marcadores de diferenciación celular.	112
4.1.2 Sortin2 induce iniciación de las raíces laterales.	113
4.2 Rol de la señalización canónica de auxina en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2.	117
4.2.1 Localización de la acumulación de auxina; homeostasis y transporte de auxina.....	117
4.2.2 Señalización intracelular de auxina.....	118
4.2.3 Requerimientos moleculares de la señalización canónica de auxina en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2.....	120
4.3 Cambios transcripcionales en respuesta a Sortin2.....	121
4.3.1 Perfil de expresión mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-seq).....	121
4.3.2 El número de genes de la respuesta transcripcional de Sortin2 es menor que la de NAA.....	122
4.3.3 Aproximaciones bioinformáticas para extraer información biológica del perfil transcriptómico comparativo entre Sortin2 y NAA.	123
4.3.4 Los procesos biológicos enriquecidos entre los genes DEG de respuesta a Sortin2 difieren de los asociados a los DEG de respuesta a NAA.....	124
4.3.5 Perfil transcriptómico común entre Sortin2 y NAA.	127

4.3.6 Características de los genes de expresión diferencial exclusivamente en respuesta a Sortin2	128
4.4 Sortin2 afecta una vía de señalización parcialmente diferente de la señalización canónica de auxina,	131
5 CONCLUSIONES.....	136
6 REFERENCIAS.....	138

ABREVIATURAS

DPI: Difenileno iodonium.

EGTA: Ácido tetraacético de etilenglicol.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

DMSO : Dimetilsulfóxido.

EDTA : Ácido etilen-diamino-tetra-acético.

GFP : Proteína fluorescente verde.

GUS : β -glucoronidasa IAA : ácido 3-indol acético.

MS : Medio basal de crecimiento Murashige and Skoog.

NAA : ácido 1-naftaleno acético.

X-Gluc: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-glucurónico.

DNA: Acido desoxirribonucleico.

RNA : Acido ribonucleico.

cDNA : Acido desoxirribonucleico codificante.

RNA-seq: Secuenciación masiva de RNA.

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo acoplado a la reacción de retrotranscripción.

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NPA: ácido N-1-naftiltalámico.

pCYCB1;1: Promotor endógeno del gen CYCB1;1.

pDR5: Promotor sintético inducible por auxina.

SAP: Placas de agar segmentado.

SCF: Complejo contenedor de las proteínas SKP, CULLIN y F-BOX

TAIR: The Arabidopsis Information Resource

WT: genotipo silvestre (*wild type*)

RESUMEN

El éxito biológico de las plantas yace en la captación de nutrientes a través de su sistema radicular estructurado postembrionariamente mediante la formación de raíces laterales. La hormona auxina es un regulador indispensable del proceso organogénico de la formación de las raíces laterales. La señalización canónica de esta hormona opera a través de la regulación transcripcional mediada por el complejo receptor de auxina SCF^{TIR1/AFB1,2,3} y la regulación transcripcional a través de los factores de transcripción de la familia ARF. El laboratorio de la Dra. Norambuena ha descrito a la molécula Sortin2 como un inductor de la formación de las raíces laterales. Las evidencias muestran que el mecanismo inducido por Sortin2 es independiente del transporte polarizado de auxina e incapaz de activar un reportero transcripcional de auxina.

Lo anterior permitió plantear la hipótesis de que Sortin2 podría inducir raíces laterales mediante un mecanismo particular y distinto de la señalización canónica de auxina. Para indagar en nuestro planteamiento, primero describimos detalladamente la respuesta a Sortin2, en términos de la formación de las raíces laterales, encontrado que este compuesto es capaz de inducir los eventos organogénicos tempranos, en particular la iniciación de raíces laterales. Consistentemente con nuestro planteamiento, Sortin2 induce la iniciación de las raíces laterales en ausencia de la activación de los reporteros transcripcionales de auxina pDR5 y pIAA2. La formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2 se produce mediante un mecanismo que

es independiente de la función molecular del receptor de auxina SCF^{TIR/AFB1,2}, y los factores de transcripción ARF7 y ARF19, que montan la respuesta a auxina en el desarrollo de las raíces laterales. Sin embargo, la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2, al igual que en respuesta a auxina, requiere la degradación de los represores de la señalización de auxina Aux/IAA, sugiriendo que existiría un perfil transcriptómico parcialmente diferente entre Sortin2 y auxina. En conjunto estos resultados indican un escenario molecular en la inducción de las las raíces laterales en respuesta a Sortin2, que es parcialmente diferente al de la señalización canónica de auxina.

Para indagar sobre el perfil transcriptómico que se monta en respuesta a Sortin2, se realizó un análisis de expresión global comparativo entre Sortin2 y la auxina NAA. Consistente con que ambos estímulos tienen requerimientos comunes y diferenciales, se encontraron perfiles de genes diferencialmente expresados que se sobrelapan parcialmente. En el grupo de genes diferencialmente expresados en respuesta a ambos estímulos se enriquecen procesos biológicos relacionados al fenómeno organogénico de la iniciación de las raíces laterales como la diferenciación celular y el crecimiento. Esto sugiere que estos genes formarían parte un repertorio transcriptómico común y necesario para la formación de las raíces laterales frente a ambos estímulos. Interesantemente, aquellos genes que formaron parte del perfil transcriptómico que se modificó exclusivamente en sólo uno de los dos estímulos, están asociados a procesos biológicos completamente diferentes, dando cuenta de que se estaría estableciendo una respuesta biológica diferente frente a estos estímulos. Así mismos, estos dos grupos de genes, también son muy diferentes respecto a los

elementos de cis-regulación que contienen, en particular, los sitios de unión a factores de transcripción en su región promotora. Estas diferencias de los programas transcripcionales montado por ambos estímulos biológicos parece estar replicando las diferencias que el mecanismo de acción de Sortin2 presenta frente a señalización canónica de auxina.

Los genes cuyos niveles de transcritos son modificados solamente en respuesta a Sortin2, nos permitieron identificar componentes moleculares que participarían en la formación de las raíces laterales, como parte de un mecanismo parcialmente diferente a la señalización canónica de auxina. En función de varios criterios biológicos, basados en los análisis bioinformáticos, se seleccionaron Genes con una Putativa Participación en la Formación de Ráices Laterales en respuesta a Sortin2, que fueron denominados GEPPERALS. El análisis de la información funcional disponible en la literatura, para los genes GEPPERALS, reveló que una porción de ellos son genes cuyos niveles de transcritos se modifican en respuesta a la hormona ácido salicílico. Los genes GEPPERALS participarían en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2, río abajo de la señalización de ácido salicílico, ya que la hormona no es capaz de fenocopiar al efecto de Sortin2.

Los resultados de esta tesis sugieren que la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2 es parte del escenario de interacción molecular diferente a la señalización canónica de auxina. Los perfiles transcriptómicos frente a Sortin2 y a NAA, robustecieron esta propuesta, al encontrar grupos génicos que forman parte de una red transcripcional diferente asociada a procesos biológicos diferentes. Además, en esta tesis, se logró proponer participantes moleculares que podrían estar mediando

la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2, como parte de un mecanismo parcialmente diferente a la señalización canónica de auxina. La futura caracterización del rol que jugarían en la formación de las raíces laterales los genes GEPPERALS, que fueron propuestos en esta tesis, podría permitir encontrar un nuevo blanco de modulación de la estructura del sistema radicular, y por ende de la captación de nutrientes y del éxito biológico de las plantas.

ABSTRACT

The biological success relies in plant nutrient uptake through their root system, which is structured postembryonically. Hormone auxin is an essential regulator of the organogenic process of lateral root formation. The auxin canonical signaling operates through transcriptional regulation mediated by the auxin receptor complex $SCF^{TIR1/AFB1,2,3}$ and by transcription factors of the ARF family. Our laboratory have described Sortin2 as a lateral root formation inducer molecule. Evidence shows that the Sortin2 induction mechanism is independent of the polarized auxin transport and is unable to activate a transcriptional auxin reporter.

We therefore hypothesized that Sortin2 could induce lateral roots by a particular and distinct mechanism, different from canonical auxin signaling. To investigate our approach, we first describe in detail the Sortin2 response, in terms of the formation of lateral roots, which revealed that this compound is capable of inducing early organogenic events, including initiation of lateral roots. Consistent with our hypothesis, Sortin2 induces lateral root initiation in the absence of transcriptional activity the auxin reporter *pIAA2* and *pDR5*. The formation of lateral roots in response to Sortin2 occurs by a mechanism that is independent of the molecular function of the auxin receptor $SCF^{TIR1/AFB1,2,3}$ and the transcription factors ARF7 and ARF19 drivers of auxin response in developing lateral roots. However, the formation of lateral roots in response to Sortin2, and also in response to auxin, requires degradation auxin signaling repressors *Aux/IAA*, suggesting that there would be an overlapping profile between Sortin2 and

auxin response genes. Taken together these results indicate a molecular scenario of lateral root induction in response to Sortin2, which is partially different from the canonical auxin signaling.

To get insights about the transcriptome profile that is mounted in response to Sortin2, a comprehensive comparative expression analysis between Sortin2 and auxin NAA, was performed. Consistently with the fact that Sortin2 and NAA stimuli share both common and specific requirements we found that profiles of differentially expressed genes were partially overlapping. In the group of genes differentially expressed in response to both stimuli, biological processes related to organogenetic phenomenon of lateral root initiation such as cell differentiation and growth were enriched. This suggests that these genes are part of a common and necessary transcriptomic repertoire for the formation of lateral roots upon both stimuli. Interestingly, those genes that were modified exclusively in only one of the two stimuli are associated with completely different biological processes, reporting that different biological responses are been set up upon these stimuli. Moreover, these two groups of genes, are also very different regarding cis-regulatory elements, in particular, binding sites of transcription factors in their promoter region. This differences in transcriptional programs mounted on these two biological stimuli seems to be replicating the mechanistic differences between them.

The genes whose transcript levels are modified only in response to Sortin2, allowed us to identify molecular components that participate in the formation of lateral roots, as part of a partially different from the canonical auxin signaling mechanism. Depending on various biological criteria, based on bioinformatic analysis, were selected

GEnes with a Putative Participation in thE Root laterAL formation in response to Sortin2, whom we call GEPPERALS. The analysis of functional information available in the literature, for GEPPERALS genes revealed that a portion of them are genes whose transcript levels are modified in response to hormone salicylic acid. The GEPPERALS genes participate in the formation of lateral roots in response to Sortin2, downstream from salicylic acid signaling, since the hormone is unable to phenocopy Sortin2 effect.

The results of this thesis suggest that the formation of lateral roots in response to Sortin2 is part of a molecular scenario different from the canonical auxin signaling. Sortin2 and NAA transcriptomic profiles, strengthen that proposal, when finding gene groups that are part of a different transcriptional network associated with different biological processes. Furthermore, in this thesis, it was possible to propose molecular participants that could be mediating the formation of lateral roots in response to Sortin2, as part of a partially different from the canonical auxin signaling mechanism. The characterization of the role that GEPPERALS genes, which were proposed in this thesis, would play in the formation of lateral roots, could allow us to find a new target for modulating the structure of the root system, and hence nutrient uptake and biological plant success.

1 INTRODUCCION

1.1 Formación de las raíces laterales (RL).

Las plantas son organismos sésiles que presentan mecanismos de supervivencia basados en la modificación de su plan corporal postembrionariamente. La disposición tridimensional de las raíces de una planta, conocido como la arquitectura radicular, puede reestructurarse completamente modulando su crecimiento vertical u horizontal. El crecimiento vertical está determinado principalmente por el crecimiento de la raíz principal penetrando en el suelo. El horizontal, por otro lado, depende de la formación de las raíces laterales y adventicias que permiten la ramificación extendiéndose a la rizósfera. Las formación de las raíces laterales son el resultado de un plan interno de organogénesis que puede ser modulado por condiciones externas. Cambios en las condiciones del suelo inducen aumentos o disminuciones en la densidad de las raíces laterales (Malamy, 2005). Se conoce que los cambios de la densidad radicular se establecen a través de mecanismos de inhibición o inducción de la formación de las raíces laterales. La plasticidad que subyace a la formación de las raíces laterales facilita el estudio de los mecanismos moleculares que regulan estos procesos. En esta tesis se identificarán componentes moleculares que putativamente regularían la formación de las raíces laterales en respuesta a un estímulo inductor exógeno.

En la planta modelo dicotiledónea *Arabidopsis thaliana* se cuenta con un detallado conocimiento histológico y fisiológico acerca de la formación de las raíces laterales (Vermeer and Geldner, 2015; Vilches-Barro and Maizel, 2015). En un corte transversal de una raíz es posible identificar capas celulares concéntricas, cada una con identidad celular definida (Figura 1 A). Las raíces laterales se originan a partir de la capa celular llamada **periciclo**, ubicada en la porción interna de la raíz primaria (Casero et al., 1995; Dubrovsky et al., 2000). La raíz lateral que se forma desde la raíz principal es de primer orden. Además, el proceso de formación de raíz lateral se puede repetir en la raíz lateral de primer orden generando raíces laterales de segundo orden, y así sucesivamente. Por lo tanto, entender la regulación molecular responsable del proceso de la formación de las raíces laterales entregaría importantes antecedentes acerca de este factor que es tan importante en la determinación de la disposición tridimensional de sistema radicular de una planta.

La progresión temporal de la formación de una raíz lateral (Figura 1 B) se puede dividir en cuatro etapas: 1) definición de células fundadoras (*priming*) 2) Iniciación 3) Desarrollo del primordio de raíz lateral (*patterning*) y 4) Emergencia. Con una cierta periodicidad, durante la etapa de *priming*, se condiciona un grupo de células del periciclo que posteriormente se definirán como **células fundadoras** del primordio de la raíz lateral (De Smet et al., 2007; Moreno-Risueno et al., 2010b). Luego, ocurre el evento de **iniciación**, etapa en la que los núcleos de dos células fundadoras contiguas migran acercándose hacia entre ellos. Inmediatamente después de esta migración de núcleos, estas células presentan una serie de divisiones asimétricas anticlinales (sentido perpendicular al eje longitudinal de la raíz principal) generando un cúmulo de células más pequeñas que las adyacentes. Este grupo de células pequeñas constituyen el primordio de raíz lateral en estado I (De Rybel et al., 2010). Los pasos

siguientes constituyen el **desarrollo del primordio** (*patterning*). En el primordio en estado I se llevan a cabo varios ciclos de divisiones periclinales (sentido paralelo al eje de la raíz principal). Durante el desarrollo del primordio de la raíz lateral se determinan los elementos que permiten la reconstrucción de la misma anatomía que se observa en la raíz principal (Malamy and Benfey, 1997). El desarrollo del primordio va acompañado de la liberación de enzimas remodeladoras de la pared celular para poder atravesar las capas celulares periféricas de la raíz principal (Roycewicz and Malamy, 2014). Esto permite la **emergencia** del primordio de raíz lateral en un proceso donde la raíz lateral continua desarrollándose y abriéndose paso a través de la rizosfera.

Existe una progresión espacial en el desarrollo de los primordios hasta raíz lateral emergida, ya que, la formación de una raíz lateral ocurre de manera coordinada y paralela con el crecimiento de la raíz que le da origen. Una raíz aumenta de tamaño cuando nuevas células se están generando en la zona meristemática. Posteriormente estas células elongan y se diferencian conformando las zonas de elongación y diferenciación, respectivamente. (Verbelen et al., 2006). El desarrollo de cada evento de formación de raíz lateral progresa a medida que espacialmente se reposiciona en el contexto de la raíz que le da origen (Figura 1 B). El proceso de condicionar a las células fundadoras ocurre en la transición entre la zona meristemática y de elongación de la raíz primaria (Figura 1 B, morado). Mientras que en la zona de diferenciación, la raíz lateral se inicia (Figura 1 B, naranja) y el primordio se desarrolla hasta emerger (Figura 1 B, verde).

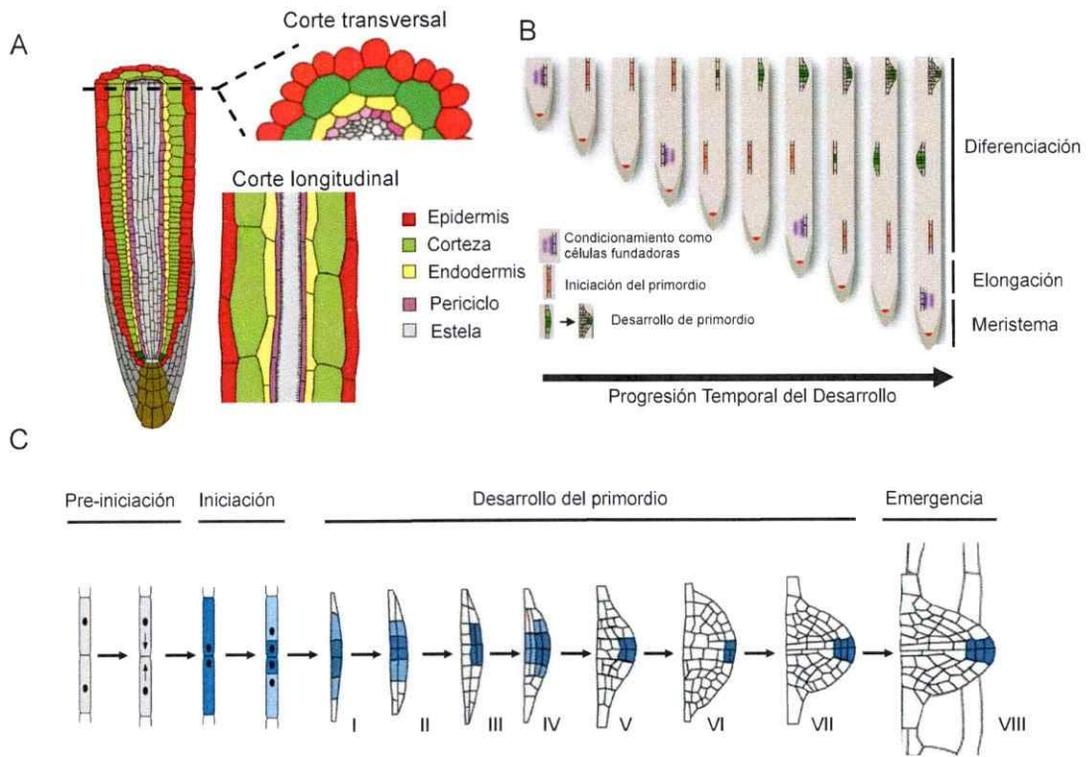


Figura 1. Anatomía de la raíz principal y formación de las raíces laterales

A. Esquema de un corte longitudinal de una raíz principal que describe las capas celulares que la constituyen. Desde la periferia al interior de la raíz principal se encuentran las capas denominadas epidermis, corteza, endodermis, periciclo y estela. Adaptado desde (Péret et al., 2009; Atkinson et al., 2014)

B. Esquema de la progresión espacial del desarrollo de una raíz lateral a lo largo de las distintas zonas de la raíz principal; diferenciación, elongación, meristema. Los primordios de raíz lateral están en un estado de desarrollo más avanzado a mayor distancia de la punta de la raíz principal. Adaptado desde (Overvoorde et al., 2010)

C. Esquema de la progresión temporal del desarrollo de una raíz lateral. Se esquematizan las etapas de pre-iniciación, iniciación, desarrollo del primordio y emergencia. Las etapas desarrollo del primordio y emergencia son enumeradas de acuerdo a la clasificación de (Malamy and Benfey, 1997). En el estadio VIII se observa la emergencia del primordio desde la raíz principal, estableciéndose como una raíz lateral emergida. Células fundadoras en gris. La gradiente de intensidad de color azul esquematiza la distribución de la respuesta transcripcional de hormona auxina durante cada una de las etapas. Adaptada desde (Péret et al., 2009; Atkinson et al., 2014)

1.2 Regulación de la formación de las raíces laterales (RL).

La formación de las raíces laterales es el resultado de la interacción de diversos elementos reguladores internos y externos. Uno de los principales reguladores de la formación de las raíces laterales es la hormona auxina. Se ha descrito que esta hormona participa en la formación de las raíces laterales integrando la información proveniente tanto de señales ambientales (Ruiz Herrera et al., 2015) como de otras hormonas vegetales (Lavenus et al., 2013). En efecto, cada paso de la formación de una raíz lateral, desde la iniciación hasta la emergencia, es caracterizada por una definida y particular distribución de la señal capturada a través del reportero transcripcional de respuesta a auxina, pDR5::GUS (Figura 1 C). Sin embargo, como se discutirá más adelante, el poder regulatorio de la hormona auxina parece no ser capaz de establecer, de manera autónoma, la compleja red de factores que regulan la organogénesis de una raíz lateral.

El condicionamiento de una futura célula fundadora (*priming*), antes del evento de iniciación de raíz lateral, se produce por un mecanismo de oscilación génica en la zona del meristema, que culmina formando un sitio de pre-ramificación (PBS) (De Smet et al., 2007; Moreno-Risueno et al., 2010b). Sin embargo, la aplicación local exógena de la hormona auxina conduce a la inducción de un PBS solamente cuando la aplicación coincide con la oscilación génica característica del *priming* (Moreno-Risueno et al., 2010b). Por otro lado, se ha descrito que previo al proceso de iniciación de una raíz lateral, se observa acumulación de la señal del reportero de auxina pDR5::GUS (Dubrovsky et al., 2008). Sin embargo, esa acumulación no es conducente a la iniciación de una raíz lateral en ausencia del factor ALF4, de función molecular

desconocida (DiDonato et al., 2004; Dubrovsky et al., 2008). Estos resultados sugieren que señales adicionales a auxina, son necesarias para la especificación de una célula fundadora. Por lo tanto, ha sido difícil encontrar la evidencia que demuestre una relación causal entre la señalización de la hormona auxina y la definición de células fundadoras de las raíces laterales (Chandler, 2011).

La iniciación de una raíz lateral, o sea, la división asimétrica de células del periciclo definidas como fundadoras, depende de señales moleculares provenientes del periciclo y también de la endodermis. La señalización de auxina dependiente de SHY2 en la endodermis es crucial para permitir la iniciación de una raíz lateral en el periciclo (Kumpf et al., 2013; Vermeer et al., 2014). Mutantes que tienen bloqueada, selectivamente en la endodermis, la señal de auxina dependiente de SHY2, muestran una completa inhibición de la iniciación de las raíces laterales (Vermeer et al., 2014). Tratamientos con auxina exógena no revierten los efectos de inhibir en la endodermis la vía dependiente de SHY2 (Vermeer et al., 2014). Esto sugiere que se requieren mecanismos paralelos o río abajo de auxina para lograr comunicar celularmente la información que conjuga el periciclo y la endodermis.

No obstante las plantas ocupan mecanismos organogénicos multifactoriales, que utilizarían más componentes regulatorios además de auxina, es indudable que esta hormona ocupa un lugar central en relación a la formación de las raíces laterales (De Smet et al., 2012). Está bien establecido que auxina tiene tres niveles de regulación; distribución ó transporte, homeostasis y señalización intracelular (Chapman and Estelle, 2009). El transporte de auxina es mediado por facilitadores de auxina en la membrana (Grunewald and Friml, 2010). La homeostasis de auxina es el equilibrio entre diversas vías de síntesis y otras tantas de conjugación con otras moléculas, para reserva o degradación. Por último, respecto a la señalización intracelular de auxina, se

ha descrito una vía de señalización intracelular canónica que ha sido altamente caracterizada. Una vez que auxina ingresa a la célula es reconocida por receptores de la familia TIR1/AFBs, que junto a otras proteínas, forman el complejo SCF^{TIR1}. La unión de auxina al receptor induce la activación enzimática E3 ubiquitina ligasa del complejo SCF^{TIR1} (Kepinski and Leyser, 2005; Tan et al., 2007; Calderon-Villalobos et al., 2010). Esta activación induce la degradación mediada por proteosoma de proteínas de la familia génica Aux/IAA (Gray et al., 2001). La proteína F-box TIR1 es quien otorga especificidad de la ubiquitinación de las proteínas Aux/IAA, lo que libera la represión que estas ejercen sobre miembros de la familia de factores de transcripción ARF (Tan et al., 2007; Mockaitis and Estelle, 2008). Así, finalmente, los factores ARF modulan la transcripción de genes blancos de la señalización de auxina. Algunos miembros particulares de las familias Aux/IAA y ARF son claves para la inducción de los eventos de iniciación de las raíces laterales (Fukaki and Tasaka, 2002; Okushima et al., 2007). Componentes moleculares como IAA14/SLR y los factores de transcripción ARF7 y ARF19, conforman un denominado "módulo de la señalización intracelular canónica de auxina". La diversidad de las combinaciones moleculares posibles en la señalización intracelular de auxina posibilitan un resultado transcripcional acorde para las necesidades de los distintos procesos biológicos que son regulados por auxina.

1.3 Formación de las raíces laterales por mecanismos independientes de la señalización canónica de auxina.

En general, alteraciones en la función de componentes moleculares de la vía de señalización de auxina disminuyen o inclusive carecen completamente de las raíces

laterales. Sin embargo, como se discutió anteriormente, cada vez hay más evidencias que muestran mecanismos alternativos o complementarios a la señalización canónica de auxina capaces de inducir los eventos tempranos de la formación de las raíces laterales (Chandler, 2011).

Estímulos mecánicos, ya sea por estimulación gravitrópica o mecánica inducen la iniciación de las raíces laterales (Ditengou et al., 2008; Richter et al., 2009). No se conocen a la fecha mecanoreceptores en plantas (Haswell et al., 2008; Monshausen and Gilroy, 2009). Así, se ha intentado explicar este efecto mecano-inductivo aludiendo a la relocalización polar que se observa de los transportadores de auxina AUX1 y PIN1 (Laskowski et al., 2008). Sin embargo, las mutantes de pérdida de función *pin1* y *aux1* son sensibles a estímulos mecánicos (Ditengou et al., 2008; Laskowski et al., 2008), sugiriendo que la respuesta a estos estímulos mecánicos no está mediada por la relocalización de estos transportadores. Los eventos mecano-inductivos se caracterizan por acumulaciones transitorias del señalizador intracelular Ca^{+2} , que participaría activamente en la estimulación mecánica, ya que tratamientos con inhibidores del transporte de calcio hacia el interior de la célula como $LaCl_3$, impiden la inducción mecánica de las raíces laterales (Richter et al., 2009). Tal vez parte de este mecanismo de señalización también es utilizado por la planta para responder a la remoción de la punta de la raíz principal, ya que el estímulo de cercenamiento, también produce un aumento del número de las raíces laterales (Torrey, 1950). Consistente con una vía de señalización alternativa a la canónica de auxina, que promueva la formación de las raíces laterales, se ha demostrado que la respuesta al cercenamiento de la punta de la raíz principal, es independiente de actividad de los factores de transcripción ARF7 y ARF19 (Ditengou et al., 2008).

Además, se ha identificado recientemente que las proteínas ARABIDILLO1 y 2

promueven la formación de las raíces laterales. Las proteínas ARABIDILLO son los homólogos, en plantas, de Armadillo/b-catenina (Coates et al., 2006), que son proteínas que participan en diferenciación y proliferación celular (Li et al., 2008). Las plantas mutantes *Arabidillo* tienen menos raíces laterales, mientras que las líneas sobreexpresoras del gene que codifica a ARABIDILLO, tienen un notable aumento del número de las raíces laterales.(Coates et al., 2006; Nibau et al., 2011). Como parte del mecanismo de señalización, ARABIDILLO se degrada. Sin embargo, se ha caracterizado que auxina no es capaz de inducir esta degradación (Nibau et al., 2011). Esto sugiere que la degradación de ARABIDILLO es un evento río arriba o paralelo a la señalización de auxina que promueve la formación de las raíces laterales (Nibau et al., 2011).

Por lo tanto, a pesar del importante rol de auxina en la formación de las raíces laterales, existe evidencia para proponer que existen vías distintas a la clásicamente estudiada para iniciar procesos de formación de las raíces laterales, cuyos reguladores moleculares se desconocen en la actualidad.

1.4 Inducción de las raíces laterales en respuesta a los tratamientos con Sortin2.

En el laboratorio de la Dra. Norambuena, se ha estudiado el efecto celular y fisiológico de un compuesto sintético biomodulador denominado Sortin2 (Pérez-Henríquez, 2009; Pérez-Henríquez, 2010; Pérez-Henríquez et al., 2012; Rubilar, 2013; Morales, 2015). Plantas de *Arabidopsis thaliana* tratadas con esta molécula, presentan un notorio aumento en el número de las raíces laterales (Pérez-Henríquez, 2010;

Pérez-Henríquez et al., 2012). La inducción de las raíces laterales alcanza niveles similares a los que se alcanzan luego de aplicación exógena de la auxina NAA. Además, los análisis usando el marcador pCYCB1;1::GUS, que permite visualizar los eventos tempranos de desarrollo de primordios, sugieren que Sortin2 actúa en etapas tempranas de la formación de las raíces laterales (Pérez-Henríquez et al., 2012).

Se conoce una gran cantidad de pequeñas moléculas bioactivas, en su mayoría son moléculas con actividad inhibidora de algún procesos celular (Hicks and Raikhel, 2012). Sin embargo, Sortin2, es un activador de procesos celulares. Ha sido descrito que a nivel sub-celular, Sortin2, aumenta la tasa de endocitosis de componentes desde la membrana plasmática hacia el interior celular (Pérez-Henríquez et al., 2012). Proteínas localizadas en membrana plasmática como la acuaporina PIP2A, el facilitador de auxina PIN2 y el receptor de brasinosteroides BRI1 son endocitadas en tratamientos con Sortin2 (Pérez-Henríquez, 2010). Sortin2 también provoca otras notorias modificaciones en el desarrollo de la plántulas tratadas, ya que inhibe la respuesta gravitrópica y disminuye el largo de la raíz principal (Pérez-Henríquez, 2010). La respuesta gravitrópica depende de la degradación asimétrica de facilitadores auxina entre los bordes superior e inferior de la raíz acostada, para establecer un flujo asimétrico de auxina (Kleine-Vehn et al., 2008). En tratamientos con Sortin2 se activa la ruta de internalización de PIN2 de manera simétrica entre las caras superior e inferior de la raíz, sugiriendo que Sortin2 inhibe la respuesta gravitrópica al acelerar la endocitosis del facilitador PIN2 (Pérez-Henríquez, 2010).

En la formación de las raíces laterales, la actividad inductora de la endocitosis de Sortin2 también juega un papel importante. En efecto, cuando se inhibe farmacológicamente la endocitosis, se inhibe el aumento del número de las raíces laterales que provoca Sortin2 (Pérez-Henríquez et al., 2012). Esto revela un rol de la

endocitosis en la formación de las raíces laterales inducida por Sortin2. Una acelerada endocitosis promueve la internalización de componentes de la membrana plasmática hacia compartimentos celulares como los endosomas. Los endosomas podrían ser un componente instrumental en la formación de las raíces laterales como un medio de transducción de una señal que culmine en un programa organogénico (Raikhel and Hicks, 2007; Zastrow and Sorkin, 2007; Murphy et al., 2009).

La formación de las raíces laterales es un fenómeno complejo que requiere establecer un set amplio de ejecutores moleculares. Los sistemas vivos suelen utilizar el establecimiento de un programa de expresión génica que les permite disponer de todos los ejecutores moleculares necesarios para una determinada tarea. La responsabilidad del establecimiento de un programa génico subyace a la función molecular de los factores de transcripción.

En el laboratorio de la Dra. Norambuena se ha caracterizado la función del factor de transcripción bZIP25 que regula negativamente a la endocitosis. La mutante pérdida de función *bzip25* de este factor transcripcional induce una endocitosis acelerada (Pizarro, 2015). Interesantemente, la endocitosis acelerada en la mutante *bzip25* está acompañada de una mayor densidad de las raíces laterales sumando evidencia a la formación de las raíces laterales mediante aceleración de endocitosis (Pizarro, 2015). Además, evidenciando que la formación de las raíces laterales se puede modular cambiando la expresión génica que es regulada por tan solo un factor de transcripción.

El crucial rol de expresión génica en la formación de las raíces laterales, ha sido el sustento para tomar aproximaciones transcriptómicas en el estudio de la formación de las raíces laterales. Los estudios transcriptómicos a la fecha se han focalizado en etapas tempranas de la formación de las raíces laterales, antes de la iniciación. Un

gran avance metodológico para estas aproximaciones transcriptómicas se obtuvo en plántulas de *Arabidopsis* con el establecimiento de un sistema que permitiera que todas las células del periciclo entraran sincrónicamente a la etapa de iniciación de la formación de las raíces laterales; el sistema de inducción de raíces laterales, LRIS (Himanen et al., 2004). El sistema LRIS induce iniciación aplicando auxina exógenamente a las plántulas. Varios perfiles transcriptómicos se han realizado a la fecha, todos utilizando como inductor de la iniciación de las raíces laterales a la hormona auxina (Himanen et al., 2004; Vanneste et al., 2005a; De Smet et al., 2008). Se ha logrado compilar la información (Parizot et al., 2010) y también se ha logrado obtener derivaciones teóricas útiles para formular nuevas hipótesis, a partir de esta gran cantidad de información transcriptómica (Parizot et al., 2012). Además, la descripción de importantes factores reguladores de la formación de las raíces laterales como GATA23 (De Rybel et al., 2010) o ACR4 (De Smet et al., 2008) provienen de este tipo de estudios. No obstante, toda la información obtenida es el resultado de todo aquello que la hormona auxina pueda activar cuando es aplicada exógenamente. Por lo tanto, se deberán utilizar otro tipo de aproximaciones para poder indagar acerca de los mecanismos de iniciación de las raíces laterales que actúen de manera paralela o río arriba de la hormona auxina.

En una búsqueda masiva de moléculas pequeñas que promueven la formación de las raíces laterales, se encontró a la molécula naxillin. Naxillin activa la señalización de auxina en el meristemo basal, ya que activa la degradación de proteínas Aux/IAA y al reportero pDR5::GUS. La molécula naxillin aplicada exógenamente, de acuerdo a un estudio transcriptómico, activa a un set génico de aproximadamente 500 genes que participarían en la formación de las raíces laterales por efecto de esta droga (De Rybel et al., 2012). Naxillin es un ejemplo que demuestra la poderosa herramienta biológica

que hay detrás del uso de pequeñas moléculas aplicadas exógenamente (Audenaert et al., 2013).

En general en esta tesis se explotará la utilidad biológica de la bioactividad de Sortin2, como una molécula pequeña de aplicación exógena, para el estudio de la formación de las raíces laterales. En particular porque nuestros estudios revelan que Sortin2 estimula la aparición de las raíces laterales en un contexto molecular característico y con sustanciales diferencias al mecanismo usado por auxina. Sortin2 induce mayor índice de las raíces laterales aún en presencia del inhibidor del transporte de auxina, NPA (Pérez-Henríquez et al., 2012). NPA en cambio inhibe completamente la actividad de la auxina endógena, ya que plántulas en presencia de NPA carecen completamente de raíces laterales (Himanen et al., 2004). Adicionalmente, el reportero transcripcional de auxina, pDR5:GUS, en tratamientos con Sortin2, se mantiene similar a condiciones control. Sin embargo, cantidades micromolares de auxina exógena inducen una alta actividad de este reportero (Pérez-Henríquez et al., 2012). Por último, la estabilidad de proteínas Aux/IAA, que decae rápidamente en tratamientos con auxina exógena, se mantiene en niveles similares al control, en plantas tratadas con Sortin2. Por lo tanto, la molécula Sortin2, posee una utilidad biológica que se respalda en las diferencias mecanístico-moleculares que habría durante la inducción de la formación de las raíces laterales, respecto de otras moléculas como auxina y/o naxilina.

En particular en esta tesis, se abordarán al menos dos aspectos 1) la descripción de la bioactividad de Sortin2 como un inductor de las raíces laterales y 2) la validación de que Sortin2 actúa mediante un mecanismo distinto a la señalización canónica de auxina. En detalle, se abordarán la temporalidad y la espacialidad de la inducción de las raíces laterales por Sortin2. También se evaluará el rol que le cabría a



la señalización de auxina en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2, mediante análisis de reporteros de auxina y mutantes en su señalización. Así mismo, basados en las características singulares de Sortin2, y mediante estrategia transcriptómica RNA-seq, se evaluará comparativamente los perfiles de expresión en respuesta a la auxina NAA y a Sortin2. Se identificarán y jerarquizarán componentes moleculares que participarían putativamente en el mecanismo de formación de las raíces laterales por efecto de Sortin2, a partir de los genes cuyos niveles de transcritos fueron modificados exclusivamente por Sortin2.

1.5 Hipótesis.

Sortin2 estimula la formación de las raíces laterales mediante una ruta alternativa a la señalización canónica de auxina.

1.6 Objetivo General.

Identificar componentes moleculares que participan en el mecanismo de formación de las raíces laterales por efecto de Sortin2

1.7 Objetivos específicos.

Objetivo 1. Estudio de la participación de la vía de señalización canónica de la hormona auxina en la inducción de las raíces laterales por Sortin2.

Objetivo 2. Identificación de el (los) grupo(s) de genes que son regulados en tratamientos con Sortin2 mediante análisis de expresión génica global.

Objetivo 3. Integración de la información acerca de los componentes moleculares que podrían ser importantes para la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Material biológico.

Arabidopsis thaliana fue el modelo biológico de estudio para todos los experimentos realizados en esta tesis, ya que es una planta modelo cuyas ventajas han sido ampliamente discutidas en la literatura científica (Leonelli, 2007; Koornneef and Meinke, 2010; Krämer, 2015). Las líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* de la Tabla I fueron facilitadas por los respectivos laboratorios en donde se generaron y forman parte del banco de semillas del laboratorio de la Dr. Lorena Norambuena, Universidad de Chile, Chile y/o del Dr. Tom Beeckman, Universidad de Gent, Bélgica.

Tabla I. Líneas de *Arabidopsis thaliana* usadas en esta tesis.

Nombre	Descripción	Referencia
pDR5::GUS	Reportero transcripcional de la respuesta a auxina basado en promotor sintético pDR5.	(Ulmasov et al., 1997)
pIAA2::GUS	Reportero transcripcional de la respuesta a auxina basado en promotor endógeno pIAA2.	(Swarup et al., 2001)
35S::DII:VENUS	Reportero de la señalización intracelular de auxina	(Brunoud et al., 2012)
pCYCB1;1::GUS	Reportero transcripcional del gen de ciclo celular CYCB1; permite identificar actividad mitótica	(Ferreira et al., 1994)
pIAA28::GUS	Reportero transcripcional IAA28, un miembro de la familia Aux/IAA	(Rogg et al., 2001)
pGATA23::GUS	Reportero transcripcional del factor de transcripción GATA23; marcado de	(De Rybel et al., 2010)
tir1/afb1,2,3	Mutante pérdida de función del receptor de auxina TIR1, AFB1, AFB2 y AFB3	(Dharmasiri et al., 2005b)
axr1-12	Mutante pérdida de función de un activador del complejo SCF ^{TIR1/AFB1,2,3}	(Lincoln et al., 1990)

<i>iaa28-1</i>	Mutante ganancia de función; codifica para una proteína IAA28 que no puede recibir las señales que inducen su degradación.	(Rogg et al., 2001)
<i>slr-1</i>	Mutante ganancia de función; codifica para una proteína SLR que no puede recibir las señales que inducen su degradación	(Fukaki and Tasaka, 2002)
<i>arf7arf19</i>	Mutante pérdida de función de dos factores de transcripción de la familia ARF	(Okushima et al., 2007)

2.2 Esterilización de las semillas.

Las semillas de *Arabidopsis thaliana* fueron esterilizadas mediante protocolos estándares, ya sea en fase líquida, con detergente TX100 (Pérez-Henríquez, 2010) ó en fase gas. Para la esterilización con fase vapor, se depositaron 100-200 semillas en tubos de 2 mL. Se dispusieron los tubos en un contenedor de disecación, dentro de una campana de extracción de aire. Dentro del disecador se colocó un vaso precipitado con 100 mL de Hipoclorito de Sodio 4 % v/v. Se depositó cuidadosamente 0,7 mL de HCl concentrado sobre este. Se cerró el disecador rápidamente, ya que el gas que se libera por la mezcla de cloro con HCl, es tóxico. Las semillas fueron incubadas durante 15 h. Posteriormente, aún dentro de la campana de extracción de aire, se retiró el vaso precipitado con la mezcla hipoclorito de sodio-HCl y se descartó el contenido. Finalmente, se dispusieron las semillas dentro de una cámara de flujo laminar durante 2 h. Se cerraron los tubos con las semillas en su interior y se almacenaron hasta su uso. Se almacenaron las semillas al menos durante 48 h a 4 °C, para inducir la estratificación que permite sincronizar la germinación de las semillas.

2.3 Cultivo de las plántulas de *Arabidopsis thaliana*.

Las semillas de las líneas transgénicas y mutantes de *Arabidopsis thaliana* de la sección 2.1 fueron germinadas y crecidas en placas de cultivo. Las placas se dispusieron verticalmente para que las plántulas crecieran en la superficie del medio sólido de cultivo de plantas (MS 0,5X [PhytoTechnology Laboratories®, Número de catálogo M519], sacarosa 1 % m/v, fitoagar 0,8 % m/v [Agar Plant TC, PhytoTechnology Laboratories®, Número de catálogo A111], 0,01 % mioinositol m/v, MES 0,05 % m/v, pH 5.7). El crecimiento de las plántulas en placas de disposición vertical permitió manipular las plántulas y trasladarlas a nuevas condiciones de cultivo para realizar los tratamientos detallados en la sección 2.4

Las semillas fueron sembradas sobre el medio sólido mediante una micropipeta graduando en 1 μ L, si es que éstas fueron esterilizadas en fase líquida. Si las semillas fueron esterilizadas en fase gas, se dispusieron sobre el medio sólido mediante un mondadientes estéril.

Las semillas se dispusieron en medio sólido de cultivo de plantas y luego las placas con las semillas fueron dispuestas en una cámara de crecimiento a 22 °C, con un fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad) y a una intensidad lumínica de 6.000 lux. Las plántulas fueron crecidas durante 5 días después de la germinación. Las plántulas fueron utilizadas en la sección de resultados 3.1.

2.3.1 Crecimiento en presencia de ácido naftilftalámico (NPA)

Se prepararon placas con medio sólido de cultivo de plantas conteniendo ácido naftilftalámico (NPA) a concentración de 10 μM , diluyendo un stock de 10 mM (disuelto en DMSO). Se agregó DMSO a la preparación hasta alcanzar la concentración 1% v/v de DMSO. Posteriormente se dispuso sobre el medio sólido una malla porosa de nylon con un tamaño de poro de 20 μm (www.prosep.be, Número de Catálogo 03.20/TY). La malla fue previamente cortada en trozos de 10 cm x 10 cm y esterilizadas envueltas en papel de aluminio dentro de una vaso precipitado.

Las placas con las semillas dispuestas sobre la malla fueron dispuestas en una cámara de crecimiento a 21 °C, con luz continua a una intensidad lumínica de 6.000 lux. Las plántulas fueron crecidas durante 3 días después de la germinación. Las plántulas crecidas en ausencia de NPA fueron utilizadas en la sección de resultados 3.2. En la sección 3.2.1 se crecieron plántulas en ausencia de NPA, pero manteniendo todas las otras condiciones de crecimiento descritas en esta sección.

2.4 Tratamientos con Sortin2 y ácido naftalenacético (NAA).

Los tratamientos con Sortin2 y con la auxina sintética ácido naftalenacético (NAA), se realizaron tanto en medio sólido como en medio líquido. El medio líquido contiene los mismo componentes que el medio sólido descrito en la sección 2.2, excepto el fitoagar.

Los tratamientos con Sortin2 se realizaron a 25 $\mu\text{g/mL}$ (58 μM), diluyendo una solución stock de 20 mg/mL (disuelto en DMSO) en medio sólido o líquido, según el

experimento. Se agregó DMSO a la preparación hasta alcanzar la concentración 1% v/v de DMSO. En ambos casos, la preparación conteniendo Sortin2 a 25µg/mL se dispuso durante 96 horas a 6000 lux de intensidad lumínica en fotoperiodo de 16/8 (luz/oscuridad), para la fotoactivación de Sortin2.

Los tratamientos con NAA se realizaron a 10 µM, diluyendo un stock de 10mM (disuelto en DMSO) en medio sólido o líquido, según fue necesario. Se agregó DMSO a la preparación hasta alcanzar la concentración 1% v/v de DMSO.

La condición Control para los experimentos realizados tanto en medio sólido como líquido fue DMSO 1% v.v. La concentración final 1% v/v de DMSO no afecta el desarrollo de las plántulas (Zohuar y Col., 2004).

2.5 Tratamiento localizados con Sortin2 en la zona de ramificación de la raíz principal.

Para realizar un tratamiento de Sortin2 localizado en un porción de la raíz principal, se usaron placas de agar segregado, SAP (Zhang and Forde, 2000; Giehl et al., 2012). Las placas SAP fueron preparadas en medio de cultivo sólido donde se removió una franja de 1.5 cm del agar y posteriormente se rellenó con medio sólido conteniendo Sortin2. Se cortó una franja delgada de 2-3 mm de medio sólido, en los límites superior e inferior, donde hacen contacto los medios de composición diferente. La franja de 2-3 mm no es rellenada. El espacio de aire que separó a los medios de composición diferente, evitó la difusión de Sortin2. Se repitieron los pasos para preparar la placa control del tratamiento, pero rellenando la franja con medio sin Sortin2. Las plántulas fueron trasladadas a las placas SAP y fueron dispuestas

horizontalmente hasta cuando se cuantificó el número de raíces laterales.

2.6 Cuantificación de primordios de raíz lateral y de las raíces laterales emergidas.

El número de primordios y de raíces laterales emergidas se obtuvo mediante observación de las plántulas bajo microscopio. La preparación de las plántulas se realizó montando las plántulas en ácido láctico (Merck, Num Cat. 100366) para el aclaramiento del tejido. Para obtener un aclaramiento aún mayor que el logrado con ácido láctico, de manera de diferenciar primordios en estadios tempranos, se utilizó el método de aclaramiento descrito en Malamy y Benfey, 1997.

El índice de las raíces laterales o de primordios se obtiene dividiendo la cantidad de éstos, por el largo de la raíz principal. El largo de la raíz principal se obtuvo, usando las herramientas de cuantificación del programa computacional ImageJ 1.40 (Wayne Rasband, NIH, USA), desde imágenes digitalizadas, de las placas de cultivo ó preparaciones microscópicas, obtenidas con el escáner EPSON V600 o V700.

Para identificar y medir por separado el largo de la zona de ramificación de las raíces laterales y la zona de formación de las raíces laterales, dentro de la raíz principal, se procedió a: 1) montar las plántulas en ácido láctico 2) marcar sobre el cubreobjeto el lugar donde se observó la raíz lateral emergida más cercana a la punta 3) cuantificar como se describe en el párrafo anterior. La zona de ramificación de la raíz principal se consideró desde la marca hasta el hipocotilo, mientras que, la zona de formación se consideró desde la marca hasta la punta de la raíz principal (Dubrovsky and Forde, 2012).

2.7 Ensayo GUS; evaluación histoquímica de la actividad de la enzima β -glucoronidasa.

La enzima reportera β -glucoronidasa (GUS) modifica al compuesto X-Gluc y forma un compuesto insoluble de color azul más ácido glucurónico incoloro. Plántulas incubadas con X-Gluc incorporan este sustrato al interior celular permitiendo la actividad enzimática de GUS. Las líneas transgénicas que utilizan el reportero GUS en esta tesis, fueron enlistadas en la sección 2.1. El ensayo de la actividad de la enzima GUS, se realizó con plántulas entre 5-7 días post-siembra, después de un determinado tratamiento. Luego del tratamiento, las plántulas fueron trasladadas cuidadosamente a aproximadamente 2 mL de la solución reveladora que contiene el sustrato X-gluc (X-gluc 1 mg/mL, tampón de fosfato de sodio 0,1 M pH 7, EDTA 10 mM pH 8, TX-100 0,1 % v/v, K-ferricianida 2 mM, K-ferrocianida 2 mM). Posteriormente, las plántulas fueron incubadas a 37 °C, en la solución reveladora, durante el tiempo apropiado (Jefferson et al., 1987). El tiempo apropiado de revelación dependió de la línea reportera utilizada, ya que está determinado por la cantidad y el tejido en donde la enzima GUS se logra acumular. El tiempo apropiado para la revelación de GUS es de 5 min para la línea pGATA23::GUS, 2 horas para pCYCB1;1::GUS, y 3 horas para la línea pDR5::GUS, pIAA2::GUS y pIAA28::GUS. La línea pDR5::GUS fue revelada por 35 min para los experimentos con plántulas germinadas en NPA.

2.8 Microscopía.

2.8.1 Microscopia confocal.

Para los experimentos con la línea 35S::DII:VENUS se usó el microscopio confocal Zeiss LSM 510 y LSM710. Se usó el laser de excitación 488 y el rango 505-530 nm para capturar la fluorescencia. Al momento de capturar las imágenes se enfocó la capa confocal más externa, de manera de capturar células pertenecientes a la capa epidermal de la raíz. Se midió la intensidad de fluorescencia en 50 núcleos celulares, por cada raíz analizada, dibujando una región de interés (ROI) circular alrededor de cada núcleo. Se analizaron 3-6 imágenes representativas por cada condición. Se analizó la intensidad de fluorescencia de fondo (*background*), capturando al menos 10 ROI de un tamaño similar al de los núcleos. La intensidad de fluorescencia nuclear fue corregida por la fluorescencia de fondo a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Fluorescencia}_{\text{corregida}} = \text{Fluorescencia}_{\text{absoluta}} - (\text{Área}_{\text{ROI}} * \text{Promedio de la fluorescencia}_{\text{background}})$$

La cuantificación de las imágenes se realizó con Imagej v1.4 (Wayne Rasband, NIH, USA) y el análisis de los datos de fluorescencia en una hoja de cálculos estándar.

2.8.2 Microscopia de campo claro/Nomarski.

Las imágenes de microscopía fueron tomadas con el microscopio Zeiss IX70. Para microscopía de Nomarsky, también llamada microscopia de contraste diferencial (DIC), se utilizó un microscopio Olympus BX51. La reconstrucción de las imágenes se

realizó manualmente con el programa Macnification v1.8, Orbicule® ó automáticamente con la herramienta *photomerge* de Photoshop CS5®.

2.9 Perfil de expresión global en raíces de plántulas de *Arabidopsis thaliana* sometidas a tratamientos con Sortin2 y NAA mediante RNA-seq.

2.9.1 Obtención del material biológico.

Se crecieron ~200 plántulas silvestre ecotipo Col-0 como es descrito en la sección 2.3.1, en presencia de NPA 10 μ M sobre una malla de nylon. Se traslado cada malla con ~200 plántulas a tratamiento en medio sólido Control, a tratamiento en presencia de Sortin2 y a un tercer tratamiento en presencia de NAA. Las placas de tratamiento fueron preparadas como es descrito en la sección 2.4. La transferencia de la malla a la placas de tratamiento, inició el tratamiento simultáneamente para todas las plántulas. Posteriormente, se removieron todas las plántulas que crecieron con su raíz despegada del medio sólido. Aproximadamente, un 50% de las plántulas es removido. Así, se aseguró que todas las plántulas consideradas para la obtención del material biológico se desarrollaron en contacto con el medio con NPA, y que por lo tanto, tendrían completamente inhibida la formación de las raíces laterales. Posteriormente, se incubaron las plántulas, en las mismas condiciones en fueron crecidas, hasta completar 6h en los tratamientos. Luego del tratamiento por 6h, se removió con un bisturí, plántula por plántula, la parte aérea y 1-2 mm de la punta de la raíz. Se recolectó, con una micropinza, ~100 raíces principales, cuya punta había sido removida. Se realizaron 6 réplicas biológicas para cada tratamiento Control, en

presencia de Sortin2 y en presencia de NAA. Finalmente, las muestras recolectadas fueron sometidas a extracción de RNA como se describe en la siguiente sección . Las muestras con mejor calidad de RNA fueron utilizadas para la preparación de librerías cDNA y secuenciación masiva con Illumina HiSeq2000 (ver sección 2.9.2 a 2.9.4).

2.9.2 Extracción de RNA para RNA-seq.

Se colectaron muestras en tubos de 2 mL, previamente cargados con 3 bolas metálicas de 4 mm de diámetro. Se taparon los tubos y se depositaron en nitrógeno líquido. El tejido de las muestras fue molido en un molino criogénico (Retsch®, CryoMill) que agita los tubos con las bolas metálicas durante 1 min. a 20.000 RPM. Se agregó 1 mL de Trizol (TRI Reagent®, MRC inc., Número de Catálogo TR-118) e incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 200uL de cloroformo y se mezcló por 15 min en un vortex. Se incubó por 3 min. Luego, se centrifugaron los tubos a 4°C por 15 min a 12.000g. Se transfirió la fase acuosa a tubos de 1.5 mL previamente enfriados. Se precipitó el RNA añadiendo 500 µL de isopropanol. Se mezcló e incubo por 10 min. Se centrifugó por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado con 1 mL de etanol 75% v/v y se mezcló en un vortex. Se centrifugó a 7.500g por 5 min a 4°C. Se descartó en sobrenadante cuidando de no descartar el precipitado. Se secó por 30 min. Se agregó al precipitado 40µL de agua libre de nucleasas. Posteriormente, se realizó una eliminación de contaminación por DNA, mediante un tratamiento con DNAasa (DNAse kit, Roche, Número de Catálogo 04716728001), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se realizó una limpieza de RNA (RNAeasy mini kit, Qiagen®, Número de Catálogo 74106), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se cuantificó el RNA total por espectrofotometría (Nanodrop™ ND 1000), midiendo a una longitud de onda de 260 nm. Se evaluaron los parámetros de pureza del RNA midiendo la absorbancia de las muestras a 230 y 280 nm. La absorbancia a 280 nm indica la presencia de proteínas en la muestra, mientras que absorbancia a 230 nm indica la presencia de compuestos residuales del tipo fenólicos. Así, se obtuvieron los índices de calidad 260/280 y 260/230. La calidad del RNA se consideró apropiada para los experimentos cuando los valores de ambos índices están entre 1.8 y 2.2.

Las muestras de RNA fueron enviadas a la compañía de secuenciación masiva GATC inc., Alemania, donde se evaluó nuevamente la calidad de las muestras de RNA mediante BioAnalyzer 2100 (Aligent Technologies, USA). En el electroferograma resultante se evaluó la presencia clara de un pico que represente los RNA más abundantes 18S y 26S y se calculó el valor para el número de integridad del RNA (RIN, *RNA Integrity Number*). Los valores de RIN fueron mayor a 8 para las réplicas de los tratamientos Sortin2 y NAA y mayor que 6 para las replicas de los tratamientos Control. En respuesta a este análisis, se descartó una replica biológica para el tratamiento con NAA, por lo que sólo se realizó preparación de cDNA y secuenciación en dos réplicas. Se secuenciaron tres replicas biológicas para cada uno de los tratamientos Control y Sortin2.

2.9.3 Preparación de librerías de cDNA y secuenciación masiva illumina Hiseq2000.

La compañía GATC inc., procedió a la preparación de librerías de cDNA y a su posterior secuenciación masiva. Las librerías de cDNA para la secuenciación se

prepararon de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se aisló el mRNA poli-A desde el RNA total usando bolas magnéticas de poli-T. Se fragmentó el mRNA y se generaron fragmentos de cDNA hebra simple aleatoriamente usando partidores aleatorios. Se amplificaron los fragmentos mediante PCR sobre los adaptadores específicos. Se secuenciaron los productos en Illumina HiSeq2000 para obtener lecturas de 50pb en lectura simple (*50bp, single read*). La obtención de las secuencias a partir de la fluorescencia se realizó con programas incorporados a la líneas de trabajo del equipo de secuenciación. GATC inc., entregó los resultados de las secuencias en archivos de formato *fastq*, con sus respectivos valores de calidad de secuenciación.

2.9.4 Procedimiento de análisis bioinformática para la obtención de la expresión génica diferencial mediante RNA-seq.

El análisis desde las lecturas para cada librería hasta la obtención de las veces de cambio de los transcritos, fue realizado por el Dr. Boris Parizot, con la ayuda del Dr. Qian Chen, miembros del laboratorio del Dr. Tom Beeckman. Los archivos *fastq* fueron ingresaron a la plataforma informática *open source Galaxy* (<http://galaxyproject.org>). Se usó FastQC para seleccionar las lecturas con un probabilidad sobre un 99.9% de que hayan sido correctamente leídas (*puntaje de calidad* ≥ 20 , en escala Phred). Mediante FastQC trimmer, se removieron los nucleótidos con un puntaje de calidad menor a 10, en el extremo 3' de la lectura. Se buscaron los sitios de alineamiento de cada lectura, contra la información genómica de *Arabidopsis thaliana*, TAIR10 con el programa GSNAP (Wu and Nacu, 2010). Se obtuvo la cantidad de lecturas que alinean en cada gen, mediante el software HTSeq (Anders et al., 2015). Se usó en HTSeq el modo "intersección estricto", es decir sólo se consideraron alineamientos contra la región

codificante de un gen. Se obtuvieron los conteos por millón (CPM) normalizados, mediante el método de normalización TMM (Robinson and Oshlack, 2010) usando el programa edgeR (Robinson et al., 2010), que es parte de la plataforma *open source* Bioconductor (Gentleman et al., 2004). Se obtuvo expresión diferencial, p-value y FDR, usando el programa edgeR. Se transformaron los valores de expresión diferencial desde escala logarítmica a escala lineal mediante hojas de cálculo estándar, lo que se denominó veces de cambio (VC).

2.9.5 Procedimiento bioinformático para la obtención del enriquecimiento de procesos biológicos asociados a genes expresados diferencialmente.

Primero, se separaron los genes diferencialmente expresados (DEG) en aquellos cuyos niveles de transcritos cambiaron positivamente (DEG+) de los modificados negativamente (DEG-). Se seleccionaron los genes que cumpliera con la restricción de su valor asociado $FDR \leq 0.05$. Se seleccionaron los genes cuya expresión diferencial en escala lineal fuera $VC \geq 2$ para los DEG+, mientras que para los DEG- se seleccionaron aquellos genes con un valor $VC \leq -2$.

Se ingresaron los identificadores génicos en la plataforma *online* para asignar la ontología a cada uno de los genes en *GoTermMapper* (Boyle et al., 2004) de Princeton University <http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermMapper>. Se seleccionó solamente el aspecto Procesos Biológicos de la ontología. Se seleccionó en opciones avanzadas de la plataforma, un archivo de ontología génica reducido (*GO slim*s) generada específicamente para análisis en plantas que se obtuvo desde <http://geneontology.org/page/download-ontology>. Las versiones reducidas de ontología génica *GO slim*s dan una visión general de el contenido ontológico sin entrar en los

términos ontológicos más específicos.

Los resultados de la asignación de ontologías a cada gen, fueron utilizados para obtener valores de enriquecimiento mediante la siguiente fórmula:

$$\text{ENRIQUECIMIENTO} = \frac{\frac{\text{N}^\circ \text{ de genes en la lista asignados en cada término GO}}{\text{N}^\circ \text{ de genes en la lista}}}{\frac{\text{N}^\circ \text{ genes del genoma asignados en cada término GO}}{\text{N}^\circ \text{ de genes en el genoma}}}$$

Los datos para obtener los valores de enriquecimiento fueron procesados y graficados en una hoja de cálculo estándar.

El procedimiento se repitió usando no dos sino tres grupos génicos que derivan de la intersección entre los genes de respuesta a Sortin2 y a NAA. La intersección se realiza con un generador de diagramas de Venn que se encuentra disponible como plataforma web en <http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>. Los tres grupos génicos son denominados (2) "Sortin2", para aquellos que modifican sus niveles de transcritos en tratamientos con Sortin2 y no con NAA (3) "NAA", para aquellos que modifican sus niveles de transcritos en tratamientos con NAA y no con Sortin2 y (4) "Sortin2 \cap NAA", para aquellos que modifican sus niveles de transcritos en tratamientos con NAA y con Sortin2.

2.9.6 Procedimiento bioinformática para la obtención del enriquecimiento de la probabilidad de ocurrencia de los sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) en la región promotora de genes expresados diferencialmente.

Se ingresaron los identificadores génicos de los miembros de los tres grupos

génico "Sortin2", "NAA" y "Sortin2 \cap NAA" en la plataforma PSCAN (Zambelli et al., 2009). Este análisis se realizó independientemente tanto para los genes DEG- como DEG+. Se seleccionó el organismo *Arabidopsis thaliana*, la base de datos de motivos JASPAR y un largo de 1000 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Se solicitaron los datos en formato texto en el hipervínculo "view text results". Los datos de *z-score*, para todos los TFBS obtenidos como resultados, son graficados en Microsoft Excel®. Se filtraron los TFBS sobre-representados con un *p-value* < 0.01 para construir lista de los TFBS que son identificados en la región reguladora de los genes "Sortin2", "NAA" y "Sortin2 \cap NAA" de la Tabla V de esta tesis. La intersección de los TFBS sobre-representados en cada grupo génico de se realizó con el generador de diagramas de Venn disponible en <http://www.pangloss.com/seidel/Protocols/venn.cgi>.

Para inspeccionar el puntaje que obtuvo cada uno de los genes analizados, se seleccionó el hipervínculo "report occurrences" en la hoja de resultados hipervinculada a cada motivo TFBS.

2.10 Validación mediante qRT-PCR de la expresión diferencial detectada mediante RNA-seq.

2.10.1 Extracción de RNA para qRT-PCR.

Se siguió el procedimiento de la sección 2.9.2 con algunas modificaciones en los implementos utilizados. Se extrajo RNA con el kit de extracción de RNA *Invitrap® Spin Plant RNA Mini* (Invitex, Número de Catálogo 1064100400), siguiendo las

instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se realizó posteriormente un tratamiento con DNAasa (Thermo Scientific, Número de Catálogo EN0521), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

2.10.2 Síntesis de cDNA y verificación de cDNA por PCR.

Se mezcló 500 ng de RNA total con 2,5 μ L de oligo AP y se realizó la reacción de retrotranscripción con la sistema ImProm-II® *Reverse Transcriptase* (Promega, Número de Catalogo M289A). La reacción fue de un volumen final de 50 μ L conteniendo 1X de buffer de la enzima Improm-II, enzima ImPronII™ según recomendaciones del fabricante, 0,5 mM de dNTPs (stock de 10 mM), 1,5 mM de MgCl₂ (stock de 25mM) y 40 u del inhibidor de RNAsa RiboLock™ (Stock de 40 u/ μ L).

Se verificó la calidad del cDNA mediante PCR, amplificado el gen de actina, usando los siguientes partidores: (Actina-f) 5' GCAGTGATCTCTTTGCTCAT 3' y (Actina-r) 5' CACACTTTCTACAATGAGCT 3'. El PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ L conteniendo 1X del buffer de la enzima ADN Polimerasa Paq5000 (Agilent Technologies®, Número de Catálogo 600684), 0,2 mM de dNTPs (stock de 10 mM), 0,2 mM de cada partidador (stock 10 μ M), 0,1 U de la enzima ADN polimerasa Paq5000 (stock de 5U/ μ L), 10 ng de cDNA y agua nanopura hasta completar 25 μ L. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador BIORAD T100 *Thermal Cycler*, con un programa que consideró 35 ciclos de 30 segundos para la denaturación a 95°C, 30 segundos para la hibridación a 55°C y 60 segundos para la extensión a 72°C.

2.10.3 Diseño de partidores para la amplificación mediante qRT-PCR.

El diseño de partidores se realizó con el software Primer3, de acceso a través de la página web <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. Se siguieron las recomendaciones para diseñar partidores descritos en la literatura (Thornton and Basu, 2011). En la tabla II se resumen los parámetros más importantes para definir las condiciones más apropiadas para el diseño de partidores con el software Primer3.

Tabla II. Condiciones para el diseño de partidores usando el software Primers3

Parámetro	Rango de los valores	Valor óptimo
Tamaño de los productos	80 - 150 (pb)	120 pB
Tamaño de los partidores	20 - 28 (pb)	25 pB
Tm del partididor	60 - 70 (°C)	64 °C
Contenido de GC del partididor	40 - 80 (%)	65%
Auto-complementariedad máxima		* 2

* Si no se obtienen partidores, se incrementa al valor en 1 hasta encontrar partidores.

Posteriormente, se verificaron los parámetros termodinámicos de interacción para cada par de partidores en <http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>. Se ingresó la secuencia de los partidores en la plataforma *online* y se consideraron los umbrales que esta plataforma sugiere para cada parámetro termodinámico. Si validaron los partidores cuyos valores termodinámicos de interacción cumplen con: Formación de Horquillas (*Hairpin*) $\Delta G \geq -3$, Dímeros del propio partididor (*Self-Dimer*) $\Delta G \geq -6$, Dímeros entre partidores (*Cross-Dimer*) $\Delta G \geq -6$.

Finalmente, se comprobó la especificidad de los partidores mediante un Primer-BLAST en la plataforma disponible *online* en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome, usando como base de datos a todas las

secuencias de plantas disponibles. Se consideró específico al partidador si los resultados del BLAST entregan solamente al gen para el cuál fue diseñado ó sus parálogos.

Los partidores que diseñados en Primer3 que cumplieron con las restricciones termodinámicas y que son específicos para el gen, cuyos niveles de transcritos se quiere analizar, están enlistados en la tabla III.

Tabla III. Lista de partidores para la amplificación de genes obtenidos por RNA-seq que serán validados por qRT-PCR.

Gene	*Frag.	Nombre	Secuencia del Partidor	N° Nt	Tm
AT2G40750	104	WRKY54-F	TGGAGATTCCGGTGAGAGTAAGAAG	25	64.1
		WRKY54-R	TAGCTTCCACGATCCTTGTATGTGA	25	64.1
AT3G56400	135	WRKY70-F	ATACTTGAGGACGCATTTTCTTGGA	25	64.2
		WRKY70-R	AACCTTCTGGACTTGCTTTGTTGC	24	65.0
AT5G64810	148	WRKY51-F	AGAGGGTAGAGAGAGATGGTGACGA	25	63.9
		WRKY51-R	CGAAGAAGAGAGTGTGGTTCCAGT	25	64.2
AT1G66600	128	WRKY63-F	TTCTCCTAATCGTCAACCACACCAT	25	64.9
		WRKY63-R	TGGGGGAATCATCTCTGTAAATCTC	25	63.7
AT1G02230	140	NAC004-F	TCGTTTACAGCCAAGAATTACAGA	25	64.2
		NAC004-R	TGCTCATCACCATCATTATTCAACC	25	64.2
AT5G45110	139	NPR3v1-F	GTCCAATCACTTCTCATCAAGCTCA	25	64.0
		NPR3v1-R	TGGAACACCATCAACAATGATCTCT	25	64.0
	117	NPR3v2-F	AAAACAGCTAAAGGGCGTGAATCTA	25	63.4
		NPR3v2-R	AGGCATAGAAATGGAACACATTGGT	25	63.9
AT1G64280	154	NPR1-F	TGCAATTGCTCTCCAACAGCTTCG	25	63.4
		NPR1-R	GCGGCTAAAGCGCTCTTGAAGAAA	25	63.9
AT4G19660	144	NPR4-F	GCAAAATCAATGGCCGGTTTAC	22	64.6
		NPR4-R	ATATGGAAATGTGGGACGTGAGG	23	64.2
AT5G08790	128	ATAF2-F	CTGTGATGTGCCAGAGAGAAGAGTC	25	63.9
		ATAF2-R	TGAAAGAACAAGAATGTGCCTGCTA	25	64.3
AT5G65210	140	TGA1-F	AACTCGACATCGTGAACCAACGTA	24	65.0
		TGA1-R	TCAGCAGCAACCCCTCTATTTATTC	25	63.8
AT5G10030	137	TGA4-F	ATGTCAACAAGCAGAAGATGCGTTA	25	64.2
		TGA4-R	CCTCCAATCTCTCCATAGCACAAGT	25	64.0

* Frag.; corresponde al tamaño en pares de bases del fragmento amplificado.

2.10.4 Validación de partidores normalizadores (*housekeeping*).

Los partidores para amplificar los genes normalizadores fueron recolectados desde el banco de partidores del laboratorio de la Dra. Norambuena. Se realizó una selección de los mejores genes normalizadores para estas condiciones experimentales

particulares. Para esto, primero se seleccionaron aquellos genes de menor variación dentro de los datos obtenidos del RNA-seq. Posteriormente, para los 5 genes seleccionados se evaluó la variación experimental que presentaron estos genes normalizadores mediante el programa NormFinder (Andersen et al., 2004; Mestdagh et al., 2009). Normfinder opera como un complemento (*plug-in*) de Microsoft Excel® y utilizó los datos provenientes de un experimento de qRT-PCR para designar valores de estabilidad de los genes. En la tabla IV se enlistan genes normalizadores de acuerdo a estos dos criterios.

Tabla IV. Lista de partidores para amplificar genes normalizadores (*Housekeeping*).

Gene ID	*Frag.	Nombre	Secuencia del Partidor	Num. Nt.	Tm
AT5G46630	64	Clathrin-F	TCGATTGCTTGGTTTGAAGAT	22	54.9
		Clathrin-R	TCTGCACTTAGCGTGGACTCTGTTTG	26	60.7
AT3G48750	133	qCDKA_Fw	ATTGCGTATTGCCACTCTCATAGG	24	57.0
		qCDKA_Rv	TCCTGACAGGGATACCGAATGC	22	58.7
AT4G34270	61	TIP41-like-F	GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA	24	55.0
		TIP41-like-R	TCAACTGGATACCCCTTTCGCA	21	56.3
AT4G16100	75	qUNK1_Fw	GGAGATTAAGCAACCTGAGGAGTG	24	57.1
		qUNK1_Rv	GTGGTGGTGGTGGAGGAGAC	20	60.0
AT1G13320	115	PP2A-F	GATACTTTGTCGTGTGTTGTCTT	23	61.2
		PP2A-R	CAAATACGCCCAACGAACAA	20	61.4
AT4G05320	137	Ubiquitin10-F	ACCAGCAGCGTCTCATCTT	19	60.2
		Ubiquitin10-R	GCATAACAGAGACGAGATTTAGAA	24	60.5
AT3G18780	181	Actina2-F	GCTTCTCCATTTGTTTGTTTCAT	23	60.7
		Actina2-R	GGAATAAAGAGGCATCAATTCTGA	23	61.1
AT5G60390	73	qEEF1A4_Fw	CTGGAGGTTTTGAGGCTGGTAT	22	56.9
		qEEF1A4_Rv	CCAAGGGTGAAAGCAAGAAGA	21	55.3
AT3G62250	186	UBQ5-F	GACGCTTCATCTCGTCC	17	52.8
		UBQ5-R	CCACAGGTTGCCTTAG	16	55.8
AT3G13920	231	eIF4A-F	ACTGACCTCTTAGCTCG	17	50.4
		eIF4A-R	CAGATCGGCCACGTTT	16	53.3

*Frag., corresponde al tamaño en pares de bases del fragmento amplificado.

2.10.5 Condiciones del ensayo qRT-PCR.

Las reacciones de qRT-PCR se realizaron empleando el kit Brilliant III Ultra-Fast SYBR®-Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies®, Número de Catálogo

600882). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de reacción 20 μ L conteniendo 1X de Master Mix (Taq DNA polimerasa, dNTPs, MgCl₂ y la sonda SYBR Green), 0,25 μ M de cada partidor (stock de 10 μ M), 0,45 nM de la sonda ROX incluida en el kit (desde un stock diluido a 30 nM), 2,5 ng de cDNA, agua nanopura libre de nucleasas hasta completar volumen final. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mx3000P (Stratagene) con un programa que consideró 60 ciclos compuestos por un primer paso de 15' de denaturación a 94° y un segundo paso de 60 segundos para hibridación y extensión. Alternativamente, las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de reacción de 5 μ L en un equipo ROCHE LC 480., con las mismas condiciones en el programa de termociclado.

2.10.6 Análisis de los datos obtenidos mediante qRT-PCR.

Los datos de la reacción de qRT-PCR fueron exportados desde el software MXPro® anexo al equipo Stratagene. Posteriormente, los datos fueron importados al programa qBase (Hellemans et al., 2007) para calcular la expresión diferencial en relación a los genes normalizadores. El software qBASE incorpora un algoritmo que puede considerar varios normalizadores simultáneamente (Hellemans et al., 2007). Se utilizaron todos los genes normalizadores seleccionados en la sección 2.10.5. Los valores de eficiencia para cada par de partidores fue calculado mediante el software LinRegPCR, siguiendo las instrucciones de uso descritas en la literatura (Ruijter et al., 2009; Ruijter and Ramakers, 2012). Los valores de expresión diferencial fueron relativizados a la condición Control, mediante división de los valores obtenidos en una hoja de cálculo estándar. Se utilizó la fórmula estándar en las ciencias experimentales para la propagación del error (Ku, 1966).

3 RESULTADOS

3.1 Objetivo 1. Estudio de la participación de la vía de señalización canónica de la hormona auxina en la inducción de las raíces laterales por Sortin2.

Todos los fenómenos biológicos, en especial procesos complejos del tipo organogénico, se desarrollan dentro de un marco regulatorio. En particular, acerca del desarrollo de las raíces laterales, se han caracterizado aspectos fundamentales de la regulación espaciotemporal, hormonal y genético-molecular. Estos tres aspectos de regulación están íntimamente relacionados y son altamente interdependientes. Siendo Sortin2 un compuesto químico que incrementa el número de las raíces laterales, le pareció fundamental a los autores entender ciertos aspectos del efecto de Sortin2 en el contexto de los anteriormente mencionados aspectos de regulación del desarrollo de las raíces laterales.

En este capítulo de resultados del objetivo 1 de esta tesis (sección 3.1), se discutirá primero el marco espaciotemporal en el que se observa el fenómeno de inducción de las raíces laterales por Sortin2. Luego se ampliará la discusión hacia la regulación hormonal, y finalmente se discutirán los resultados obtenidos con herramientas genéticas.

3.1.1 Evaluación de la progresión espacio temporal de la inducción de las raíces laterales por Sortin2.

En relación a la regulación temporal del desarrollo de las raíces laterales es posible observar el desarrollo de un primordio de raíz lateral, desde el estadio más temprano hasta el más tardío (Figura 1 C), en el transcurso de aproximadamente 24 horas (Péret et al., 2012). Además, se ha reportado previamente, la inducción de un mayor número de raíces laterales en las plántulas sometidas a tratamientos con Sortin2 durante 72 h (Pérez-Henríquez et al., 2012). En base a estos antecedentes, se evaluó la progresión temporal de la inducción de las raíces laterales en respuesta a Sortin2.

La línea reportera de actividad mitótica pCYCB1;1::GUS es una excelente herramienta para evidenciar eventos de naturaleza organogénica como la formación de las raíces laterales. Se evaluó la progresión temporal del efecto de Sortin2 mediante el uso de plántulas pCYCB1;1::GUS. Se evaluaron los eventos organogénicos, a 24, 48 y 72 h de inducción con Sortin2, que mostraran actividad del reportero pCYCB1;1::GUS, lo que se le denominó eventos CYCB1+. Los resultados mostraron que en tratamientos de 24 h con Sortin2, el número de eventos CYCB1+, considerando tanto primordios como raíces laterales emergidas, es aproximadamente un 50% mayor frente al tratamiento control (Figura 2 A). El efecto de Sortin2 se mantuvo en aumento en tratamientos más prolongados de 48 y 72 h, llegando hasta casi duplicar la densidad de primordios y raíces laterales emergidas, que se observa en condiciones control (Figura 2 A). Esto indicó que el efecto de Sortin2 sobre la formación de las raíces laterales es un fenómeno que puede ser detectado más tempranamente de lo que había sido reportado previamente (Pérez-Henríquez et al., 2012)

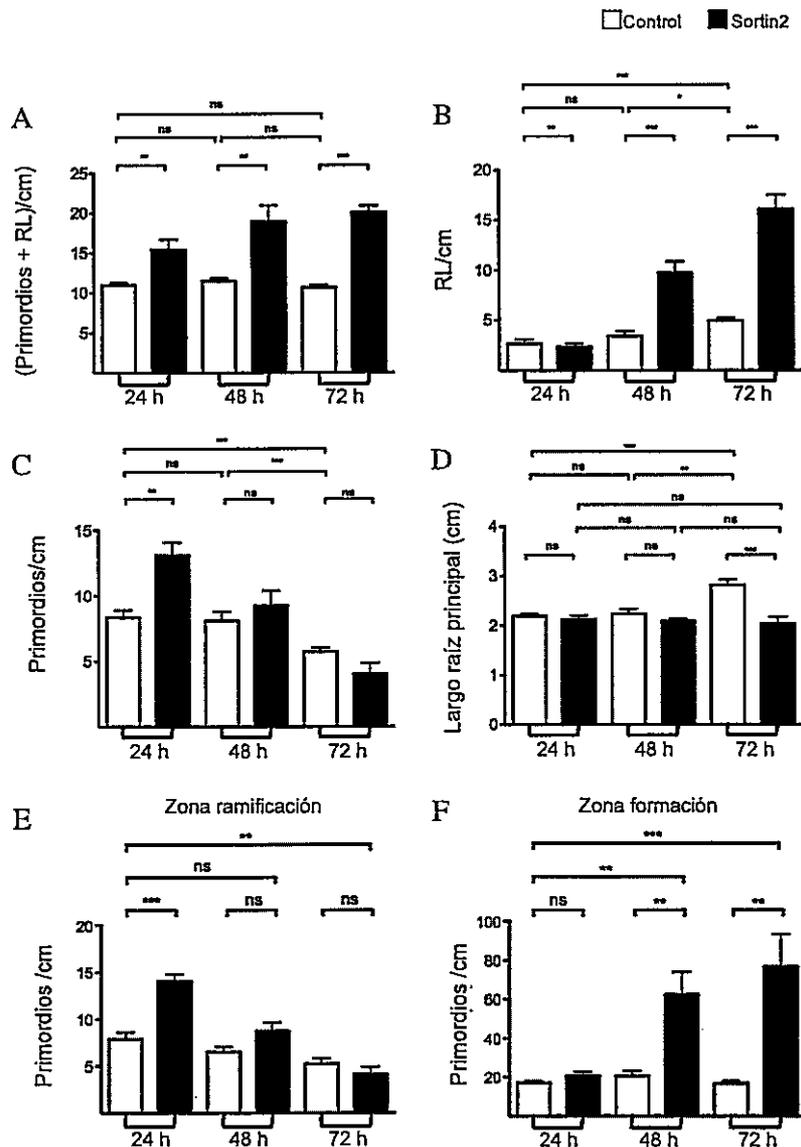


Figura 2. Inducción de las raíces laterales por Sortin2.

Plántulas transgénicas de la línea reportera de actividad mitótica pCYCB1;1::GUS de 7 días fueron tratadas por 24, 48 y 72 h en condiciones Control (DMSO 1%) y Sortin2 (25 µg/mL). Luego, los primordios y/o raíces laterales emergidas de cada una de las plantas fueron cuantificados. La densidad de primordios y/o raíces laterales se calcula considerando el largo de la raíz principal completa o bien el largo de la zona de ramificación ó formación, según corresponda. n=14 en dos experimentos independientes.

Análisis estadístico con test *t*-student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

A. Densidad de primordios más raíces laterales emergidas (RL).

B. Densidad de las raíces laterales emergidas.

C. Densidad de primordios.

D. Largo de la raíz principal.

E. Densidad de primordios de raíz lateral en la zona de ramificación.

F. Densidad de primordios de raíz lateral en la zona de formación.

Interesantes conclusiones se obtuvieron al analizar por separado la inducción de primordios y raíces emergidas para cada punto del análisis de progresión temporal. La Figura 2 B muestra que la densidad de las raíces laterales emergidas en las plantas sometidas al tratamiento control aumentó al progresar hasta las 72 horas de tratamiento. Esta tendencia a aumentar con el tiempo de tratamiento, se observó también en plantas incubadas con Sortin2, alcanzando un número aproximadamente de tres veces más en Sortin2 que en las condiciones control a las 72 horas de tratamiento. La densidad de primordios a las 24 horas (Figura 2 C), fue mayor en los tratamientos con Sortin2 que en condiciones control, lo que indicaría que Sortin2 estimula la formación de nuevos primordios entre las 0 y 24 horas de tratamiento. Sin embargo, en tiempos posteriores esta inducción decayó hasta valores similares a las condiciones control, lo que se explicaría por la progresión de estos primordios en las raíces laterales emergidas. Por otro lado, las plántulas sometidas a tratamiento con Sortin2 mostraron inhibición del crecimiento de la raíz principal. Interesantemente, el efecto se logra detectar cuantitativamente a las 72 horas de tratamiento con Sortin2 (Figura 2 D). Este antecedente sugirió que la inhibición del largo de la raíz principal por efecto de Sortin2, no jugaría un rol sobre el efecto inductor de la densidad de primordios que se observa durante las primeras 48 horas de tratamiento (Figura 2 C).

En relación a la regulación espacial del desarrollo de las raíces laterales, se ha

descrito la progresión de las etapas del desarrollo de una raíz lateral en función de la posición en la que se encuentra a lo largo de la raíz principal. Cercano a la punta de la raíz principal se localiza la zona de formación de primordios, mientras que, en la zona más alejada, se ubica la zona de ramificación, donde emergen las raíces laterales iniciadas en la zona de formación. Para entender el efecto de Sortin2 en el contexto de estos principios de regulación espacial del desarrollo de las raíces laterales, se cuantificó la densidad de primordios, tanto en la zona de formación como en la de emergencia. Sortin2 produjo un aumento de la densidad de primordios en la zona de ramificación, un fenómeno que se observó rápidamente a las 24 h y que disminuyó al aumentar el tiempo de tratamiento (Figura 2 E). De este antecedente se puede desprender que los eventos moleculares que conducirían a este fenómeno de inducción de los primordios, ocurren antes de las 24h. Además, la disminución de la densidad de los primordios, es coherente con una progresión de estos primordios hacia raíces laterales emergidas. Por otro lado, en la zona de formación se observó un aumento de la densidad de los primordios a las 48 horas de tratamiento. El aumento de la densidad de los primordios por efecto de Sortin2 se observó un poco más tardíamente en la zona de formación que en la zona de ramificación (Figura 2 F). Este resultado sugirió una mayor disposición a seguir un programa organogénico, es respuesta a Sortin2, por parte de las células localizadas en la zona de ramificación que de aquellas localizadas en la zona de formación.

En resumen, la evaluación de la progresión espacio temporal de la inducción de las raíces laterales por efecto de Sortin2 reveló que los tratamientos con este compuesto químico aumentó la densidad de los primordios que ya son posibles de detectar a las 24h. También, que induce un aumento en la densidad de primordios en zonas de la raíz principal donde no se esperaría aparición de nuevos primordios (la

zona de ramificación). Un aumento de la densidad de primordios en la zona de ramificación puede producirse por la generación de nuevos primordios o por la reanudación de primordios que han sido iniciados pero arrestados, en alguna etapa temprana del desarrollo. En la siguiente sección de la tesis se aporta evidencia que sugiere la generación de primordios "nuevos" en tratamientos con Sortin2. Además, más adelante en la tesis se mostrará que tratamientos con Sortin2 induce un aumento del número de primordios incluso en plantas que carecen completamente de primordios iniciados, sugiriendo fuertemente que la planta forma primordios *de novo* en respuesta a Sortin2 (ver sección 3.2.2).

3.1.2 Formación *de novo* de las raíces laterales por inducción con Sortin2.

En los últimos años, se ha recolectado evidencia que propone que en la formación de una raíz lateral, existe un fenómeno de definición celular solo en aquellas células del periciclo que son fundadoras de una raíz lateral (De Smet et al., 2007; Moreno-Risueno and Benfey, 2011). Se propone que estas células fundadoras de raíz lateral poseen una información distinta a sus vecinas, la que estaría dada por oscilaciones génicas y hormonales, en particular de auxina, en la punta de la raíz principal (De Smet et al., 2007; Moreno-Risueno et al., 2010a; Moreno-Risueno and Benfey, 2011).

El aumento de la densidad de primordios por efecto de Sortin2, en la zona de formación y ramificación de la raíz principal, indica que se generaron más células fundadoras de raíz lateral en tratamiento con Sortin2 que en condiciones control, lo que podría explicarse porque Sortin2 induciría una definición de las células del periciclo como células fundadoras. Se decidió poner a prueba esto mediante una estrategia de

tratamiento localizado de Sortin2 sobre zonas de la raíz principal que son lejanas al lugar donde se especifican las células fundadoras, o sea lejanas a la punta de la raíz principal (zona proximal). Para esto, se utilizaron placas de agar segmentado (SAP), una aproximación experimental que permite exponer de manera localizada a una raíz principal a diferentes medios en el que es sustentada. Se generaron placas SAP con medios sólidos en donde sólo una determinada porción de la raíz principal tuvo contacto con Sortin2. En las placas SAP, los medios de distinta composición, no tienen contacto entre sí, ya que están separados por una columna de aire, lo que se previene la difusión de la molécula de Sortin2, a través del medio de cultivo (Figura 3 A). Una mayor densidad de raíces en tratamientos con Sortin2, que en condiciones control, sugerirían que el tratamiento Sortin2 logra redefinir más células, que las que determina el programa de desarrollo interno, como células fundadoras de raíz lateral. Como se puede observar en la Figura 3 B, Sortin2 aplicado localmente en la zona proximal indujo una densidad de raíces laterales mayor que en las condiciones control a los 3 y 6 días de tratamiento. El aumento de la densidad de las raíces laterales se podría explicar si Sortin2 produce una redefinición en algunas células de la zona proximal a una célula fundadora de raíz lateral. Este experimento fue llevado a cabo con la colaboración de Stefanía Morales, estudiante de pregrado de la carrera Ingeniería en Biotecnología Molecular, en el transcurso de una unidad de Investigación. Este resultado nos sugirió, al igual que los resultados de la sección 3.1.1, un efecto de Sortin2 actuando sobre etapas tempranas de la formación de las raíces laterales, iniciación o pre-iniciación.

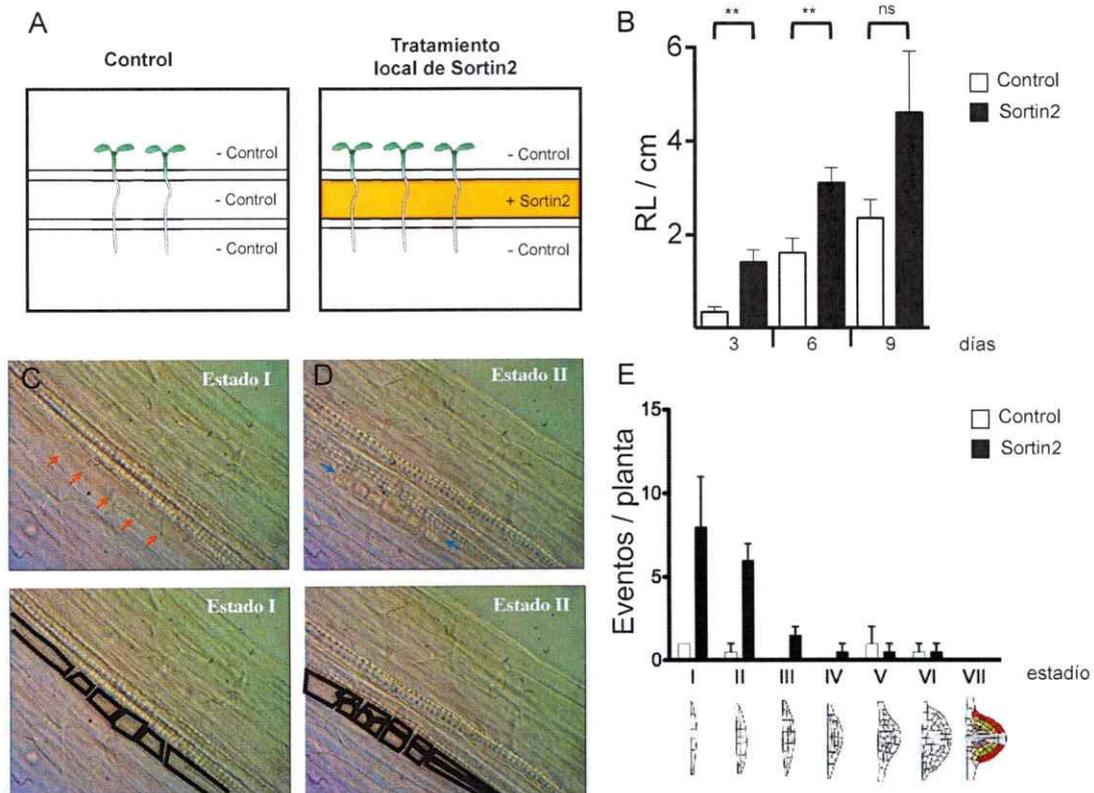


Figura 3. Efecto de Sortin2 como inductor de la iniciación de las raíces laterales.

(A-B) Plántulas de *Arabidopsis* de tipo silvestre Col-0 de 7 días fueron transferidas por 3, 6, 9 días a placas de agar segregado (SAP) donde la franja central tenía presencia (+Sortin2) o ausencia (Control). Las placas SAP fueron dispuestas horizontalmente hasta el día de la cuantificación, para evitar el contacto entre las franjas con medio semisólido y así mantener la columna de aire que las separa (A-B).

(D-E) Plántulas de *Arabidopsis* de tipo silvestre Col-0 de 7 días fueron tratadas por 24 h en medio líquido en condiciones Control (DMSO 1%) y en condiciones Sortin2 con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El tejido radicular fue aclarado utilizando el protocolo de Malamy y Benfey, 1997.

A. Esquema de las placas de agar segmentado (SAP).

B. Densidad de las raíces laterales emergidas (RL) en plántulas en tratamiento control y en tratamiento local con Sortin2, cuantificados después de la transferencia a placas SAP del esquema en A.

C. *Arriba*, primordio en estado I de una planta tratada con Sortin2 por 24 h. Flechas rojas demarcan los sitios de división celular asimétrica anticlinal de células del periciclo. *Abajo*, esquema del primordio estado I en líneas negras para facilitar la identificación del

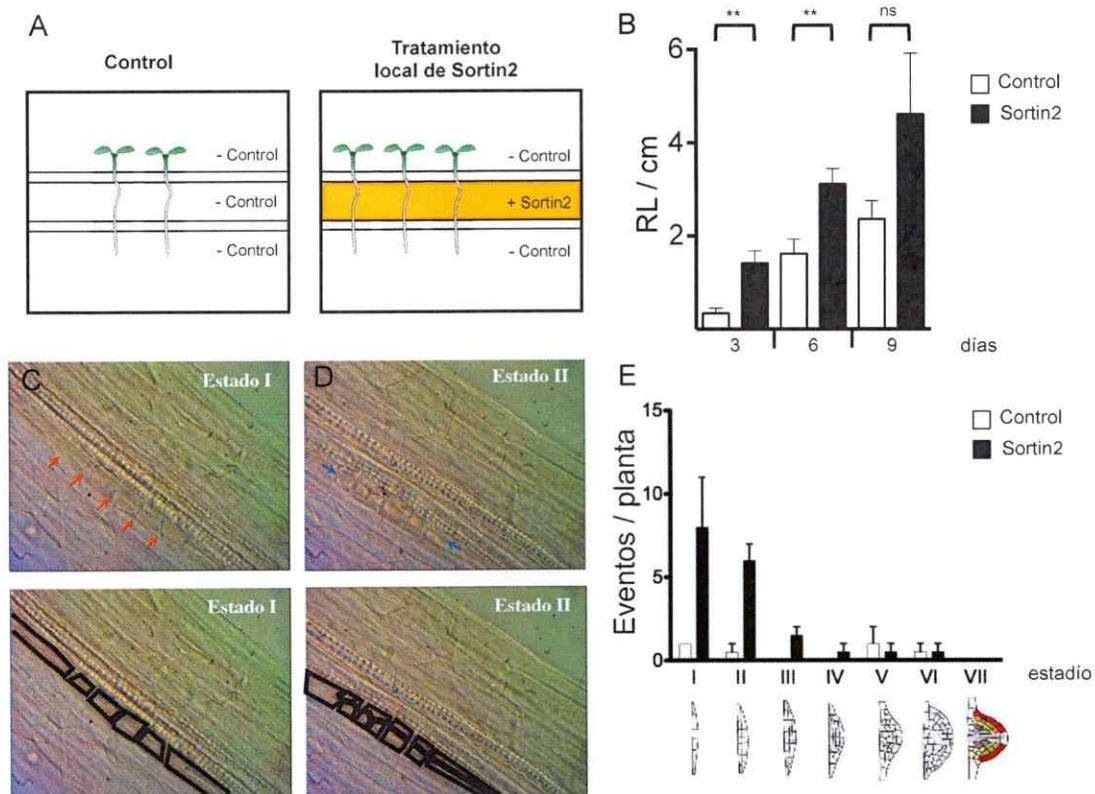


Figura 3. Efecto de Sortin2 como inductor de la iniciación de las raíces laterales.

(A-B) Plántulas de Arabidopsis de tipo silvestre Col-0 de 7 días fueron transferidas por 3, 6, 9 días a placas de agar segmentado (SAP) donde la franja central tenía presencia (+Sortin2) o ausencia (Control). Las placas SAP fueron dispuestas horizontalmente hasta el día de la cuantificación, para evitar el contacto entre las franjas con medio semisólido y así mantener la columna de aire que las separa (A-B).

(D-E) Plántulas de Arabidopsis de tipo silvestre Col-0 de 7 días fueron tratadas por 24 h en medio líquido en condiciones Control (DMSO 1%) y en condiciones Sortin2 con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El tejido radicular fue aclarado utilizando el protocolo de Malamy y Benfey, 1997.

A. Esquema de las placas de agar segmentado (SAP).

B. Densidad de las raíces laterales emergidas (RL) en plántulas en tratamiento control y en tratamiento local con Sortin2, cuantificados después de la transferencia a placas SAP del esquema en A.

C. *Arriba*, primordio en estado I de una planta tratada con Sortin2 por 24 h. Flechas rojas demarcan los sitios de división celular asimétrica anticlinal de células del periciclo. *Abajo*, esquema del primordio estado I en líneas negras para facilitar la identificación del

primordio.

D. Arriba, primordio en estado II de una planta tratado con Sortin2 por 24 h. Flechas azules demarcan el sentido y el sitio de ocurrencia de la división periclinal de las células del primordio estado I. *Abajo*, esquema del primordio estado I en líneas negras para facilitar la identificación del primordio.

E. Número de primordios en cada estadio de desarrollo, desde el estadio I hasta el VII.

Si Sortin2 estimula nuevos eventos de iniciación, se esperaría que en los tratamientos, se pudiera detectar un mayor número, respecto a condiciones control, de primordios en etapas tempranas de desarrollo. Para probar esto, se decidió cuantificar la frecuencia en la que se encuentran los distintos estadios de desarrollo de primordio en plántulas sometidas a tratamientos de 24 h con Sortin2.

Como no es tarea fácil resolver, clasificar y cuantificar, mediante microscopía, entre las distintas etapas de desarrollo de un primordio, se realizó, primero que todo, una evaluación comparativa de varios métodos de aclaramiento también junto a Stefania Morales. Para todos los protocolos, es necesario aclarar el tejido de raíz principal y luego visualizarlos por microscopía Nomarski o por microscopía de contraste de fase (Beeckman and Engler, 1994; Malamy and Benfey, 1997; Dubrovsky et al., 2009). Se logró determinar, que con el propósito de distinguir entre los diferentes estadios tempranos del desarrollo de primordios, el método más efectivo es el propuesto por Malamy y Benfey, 1997.

Los métodos de aclaramiento de tejido permiten transparentar el contenido celular de los tejidos periféricos a los primordios, permitiendo detectar de manera mucho más clara, primordios en estados tempranos, como el estado I y II. Es posible visualizar, por ejemplo, el estadio de primordio I que corresponde a un pequeño número de células del periciclo que se están dividiendo (flechas rojas en Figura 3 C y

E). Las células del primordio estado I, determinan mediante divisiones periclinales (flecha azul en Figura 3 B y D) una segunda capa celular que caracteriza al estado II de desarrollo de primordio. La Figura 3 D muestra un esquema sobre el primordio estado II para ayudar a la detección de la morfología del primordio en estado II.

La aplicación de los métodos de aclaramiento permitieron cuantificar y clasificar los primordios que se distinguían en plantas después de someterlas a 24 h de tratamiento con Sortin2. La cuantificación que se muestra en la Figura 3 E, reveló un notorio aumento de primordios en etapas tempranas (estado I-IV) en las plántulas tratadas con Sortin2 comparadas a las tratadas en condiciones control (DMSO 1%). Es importante notar que fue posible identificar igual cantidad de primordios en estadios de desarrollo más avanzados (etapa V-VII) tanto en el tratamiento con Sortin2 como en la condición control. Esto último, sugirió un efecto de Sortin2 sobre la iniciación de nuevos primordios y apoya que lo que se observó en la sección 3.1.1, no sería causado por un efecto sobre una reanudación de primordios detenidos o una aceleración de la velocidad con la que se desarrollan primordios ya iniciados.

3.1.3 Patrón de distribución de la respuesta a auxina en la raíz principal de plántulas de Arabidopsis en tratamientos con Sortin2

Luego de la regulación espacio-temporal del desarrollo de las raíces laterales, se puede identificar un segundo eje importante de regulación que es la regulación hormonal. La iniciación de las raíces laterales es un proceso complejo que está controlado por múltiples factores. Uno de los factores cruciales es la acción regulatoria de la hormona auxina. Se ha propuesto a auxina como un morfógeno en plantas y por lo tanto, los niveles hormonales constituyen un componente de su acción, que además

debe ser integrado con la localización de la hormona en los tejidos a evaluar y la sensibilidad de percepción que esas células tienen (Bhalerao and Bennett, 2003; Wells et al., 2013).

Se ha reportado previamente que la respuesta transcripcional de auxina permanece inalterada en tratamientos con Sortin2, mediante experimentos que consideraron a la plántula completa (Pérez-Henríquez et al., 2012). Es importante mantener en mente que, sin alterar la cantidad total de respuesta transcripcional de auxina, Sortin2 pudiera generar una inducción de las raíces laterales mediante una modificación de la localización de la acumulación de la hormona auxina a lo largo de la raíz principal. Por lo tanto, en el contexto del interés de esta tesis sobre la formación de las raíces laterales, se decidió observar la localización de la acumulación de la hormona auxina, específicamente en la raíz principal, frente a tratamientos con Sortin2. La señal reportada por los sensores transcripcionales de auxina, como pDR5::GUS y pIAA2::GUS, correlaciona positivamente con el contenido de auxina (Casimiro et al., 2001; Marchant et al., 2002), y por lo tanto fueron usados para inferir la localización de la acumulación de la hormona auxina a lo largo de la raíz principal.

Existe abundante evidencia en la literatura que indica que es posible visualizar una acumulación local de auxina en los eventos de iniciación de las raíces laterales en la zona de diferenciación de la raíz principal (Dubrovsky et al., 2008; Benková et al., 2009). En relación a lo anterior, en la Figura 4 A y D se puede observar que en la zona de diferenciación, usando los marcadores pDR5::GUS y pIAA2::GUS, tratamientos con Sortin2 no indujeron cambios de la localización de la acumulación de auxina en comparación a la condición control. Importante notar que es posible reportar alteraciones en la localización de la acumulación de auxina con estos reporteros de auxina, ya que se demostró, con un compuesto inhibidor del transporte de auxina, NPA,

una completamente alterada localización de la acumulación de auxina (flechas rojas, Figura 4 A y D). Por supuesto, ambos reporteros, sensibles a auxina, mostraron una localización ubicua de la acumulación de auxina cuándo las plantas fueron tratadas con NAA exógeno 1 μ M (Figura 4 A y E). Estos resultados, en conjunto, apoyan la conclusión de que los primordios inducidos por acción de Sortin2 en la zona de emergencia, son el resultado de un proceso que no involucra una alteración de la respuesta a auxina reportada por los marcadores pDR5:GUS o pIAA2:GUS.

El rol de la hormona auxina en la punta de la raíz principal ha sido altamente estudiado. Oscilación de expresión génica y hormonal en la punta de la raíz, comandan la definición que reciben algunas células, para iniciar un programa organogénico en la madurez celular, o sea cuando se localizan en la zona de diferenciación de la raíz principal. Interesantemente, Sortin2 no provoca cambios en la localización de la acumulación de la hormona auxina en la punta de la raíz principal, como se puede ver analizando el reportero pDR5::GUS (Figura 3 B y C). Sin embargo, el reportero pIAA2::GUS, que posee una mayor sensibilidad de detección que pDR5::GUS (De Smet et al., 2007), revela que plantas tratadas con Sortin2 presentaron una localización de la acumulación de auxina en capas celulares que no se revelan en condiciones control (Figura 3 E). Presumiblemente, la señal pIAA2::GUS obtenida en el tratamiento con Sortin2 abarca capas celulares como la endodermis o corteza.

pDR5::GUS

pIAA2::GUS

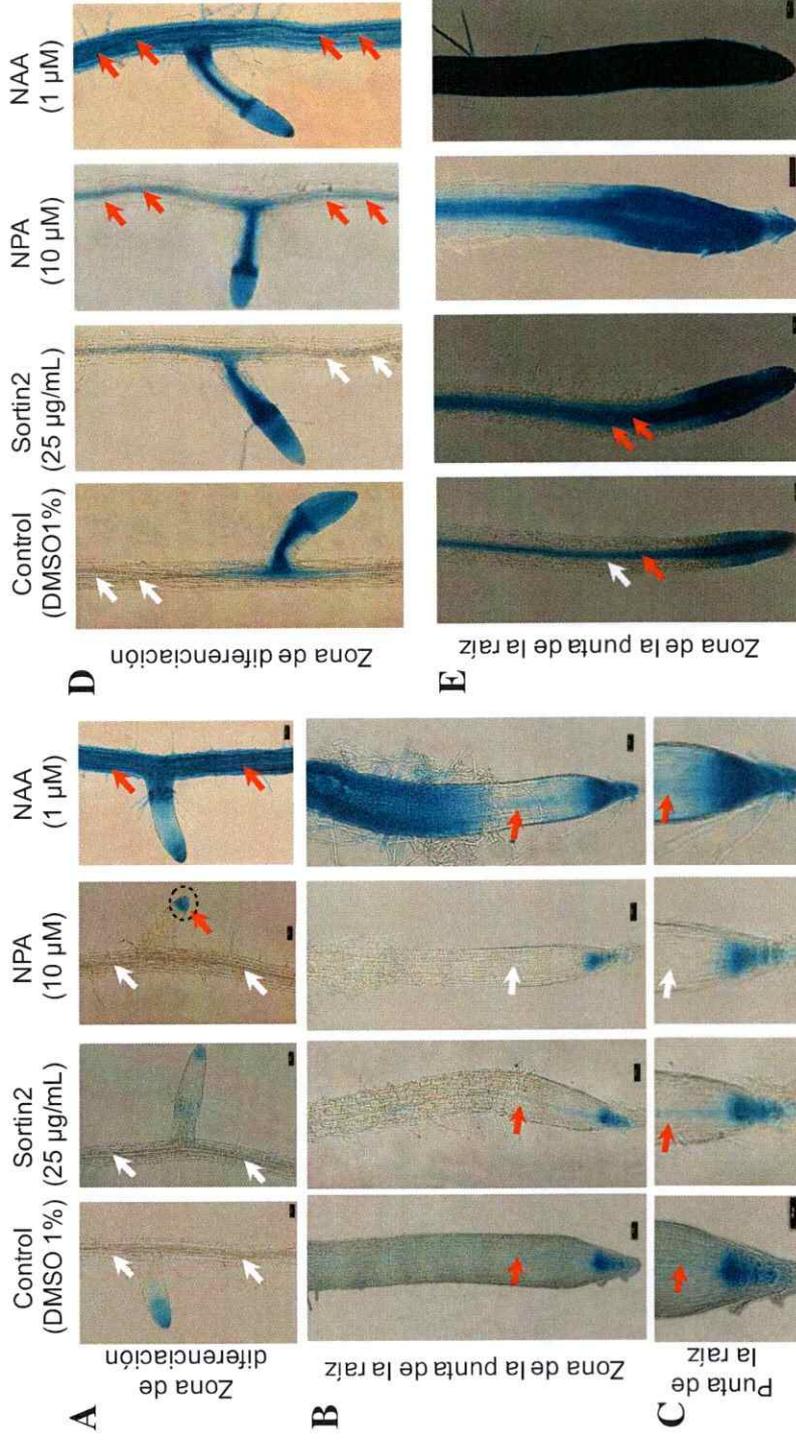


Figura 4. Localización de la acumulación de auxina mediante la respuesta transcripcional de los reporteros pDR5::GUS y pIAA2::GUS en raíces de plantas tratadas con Sortin2.

Plántulas de las líneas reporteras pDR5::GUS y pIAA2::GUS de 7 días fueron tratadas por 24 horas en tratamientos control, Sortin2 25 µg/mL, NPA 10 µM y NAA 1µM. El nivel de actividad de pDR5 y pIAA2 es evaluada con revelación histológica de GUS. Barra = 100 µm, n=12. Flecha roja indica acumulación local de auxina y flecha blanca indica ausencia de acumulación local de auxina.

A-C. Localización de la acumulación auxina inferida por la actividad transcripcional del reportero pDR5::GUS en la zona de diferenciación de la raíz principal (A), en la zona de la punta de la raíz principal (B), en la punta de la raíz (C).

D-E. Localización de la acumulación auxina inferida por la actividad transcripcional del reportero pIAA2::GUS en la zona de diferenciación de la raíz principal (D), en la zona de la punta de la raíz principal (E).

3.1.4 Sortin2 en la señalización intracelular de auxina reportado por DII-VENUS.

En este trabajo se ha mostrado que la molécula Sortin2 no modifica la localización de acumulación de auxina en la punta de la raíz (ver sección 3.1.3). También se conoce que tampoco modifica los niveles de respuesta transcripcional de auxina (Pérez-Henríquez et al., 2012). Sin embargo, se desconoce, el nivel de incidencia que Sortin2 podría tener sobre la señalización intracelular de auxina.

La señalización intracelular de auxina involucra eventos moleculares desde la percepción de la hormona hasta la expresión coordinada de genes efectores. El receptor SCF^{TIR1-AFB1-3} media la degradación de las proteínas Aux/IAA (Dharmasiri et al., 2005a), liberando la represión que ejercen los factores de transcripción ARF, reguladores de la expresión de genes de respuesta a auxina. Se han generado varios reporteros de la señalización de auxina en base a la degradación de proteínas Aux/IAA, necesaria para la activación de la señalización (Wells et al., 2013). La línea transgénica 35S::DII:VENUS expresa constitutivamente el dominio de degradación de IAA28, un miembro de la familia génica Aux/IAA, fusionado a la proteína fluorescente VENUS. Además, la construcción génica contiene una señal de localización nuclear que destina al producto génico al núcleo celular. La línea 35S::DII:VENUS es nombrado frecuentemente en la literatura como DII-VENUS y es reconocido como el más sensible reportero de la actividad de la señalización intracelular de auxina disponible en la actualidad. DII-VENUS permite analizar *in vivo* la respuesta que genera algún estímulo (Rahman et al., 2010; Brunoud et al., 2012). La fluorescencia del reportero indica la presencia de proteína acumulada resultante de la activación constitutiva del gen que lo codifica. La ausencia de la fluorescencia indica la degradación de la proteína, reportando así la activación de la señalización intracelular

de auxina.

Primero, se validó la capacidad reportera de DII-VENUS. Pusimos a prueba su sensibilidad para reportar los cambios en la señalización de auxina que se generan durante el reposicionamiento gravitacional de las raíces. Mediante un simple experimento de estímulo gravitacional, se observó que la fluorescencia en la zona de la punta de la raíz, en plántulas de la línea reportera DII-VENUS, cayó aproximadamente un 20%, cuando se trata por 1h en medio líquido en posición horizontal respecto a plántulas en posición normal de crecimiento, es decir vertical (Figura 5 A-C). Este resultado indica que DII-VENUS reportó la activación de la señalización intracelular de auxina debido al reposicionamiento gravitacional de las raíces, consistentemente con lo descrito en la literatura (Band et al., 2012).

Luego, usando al reportero DII-VENUS, se evaluó el efecto de Sortin2 en interferir en la señalización intracelular de auxina. Como se puede observar en las imágenes (Figura 5 D-E), al comparar el tratamiento Sortin2 con su control, se observó que no hay variación en la abundancia de DII-VENUS en la punta de la raíz principal. Mientras que, en los tratamientos con auxina NAA 1 μ M, la fluorescencia del reportero desaparece casi por completo. Se puede observar en la cuantificación que la fluorescencia en tratamiento con auxina, cayó más de 5 veces respecto al control (Figura 5 G). La degradación de la proteína DII-VENUS, medida por fluorescencia, indicaría que se activó la señalización intracelular de auxina, en respuesta a NAA exógeno, pero no en respuesta a Sortin2 (Figura 5 D-G).

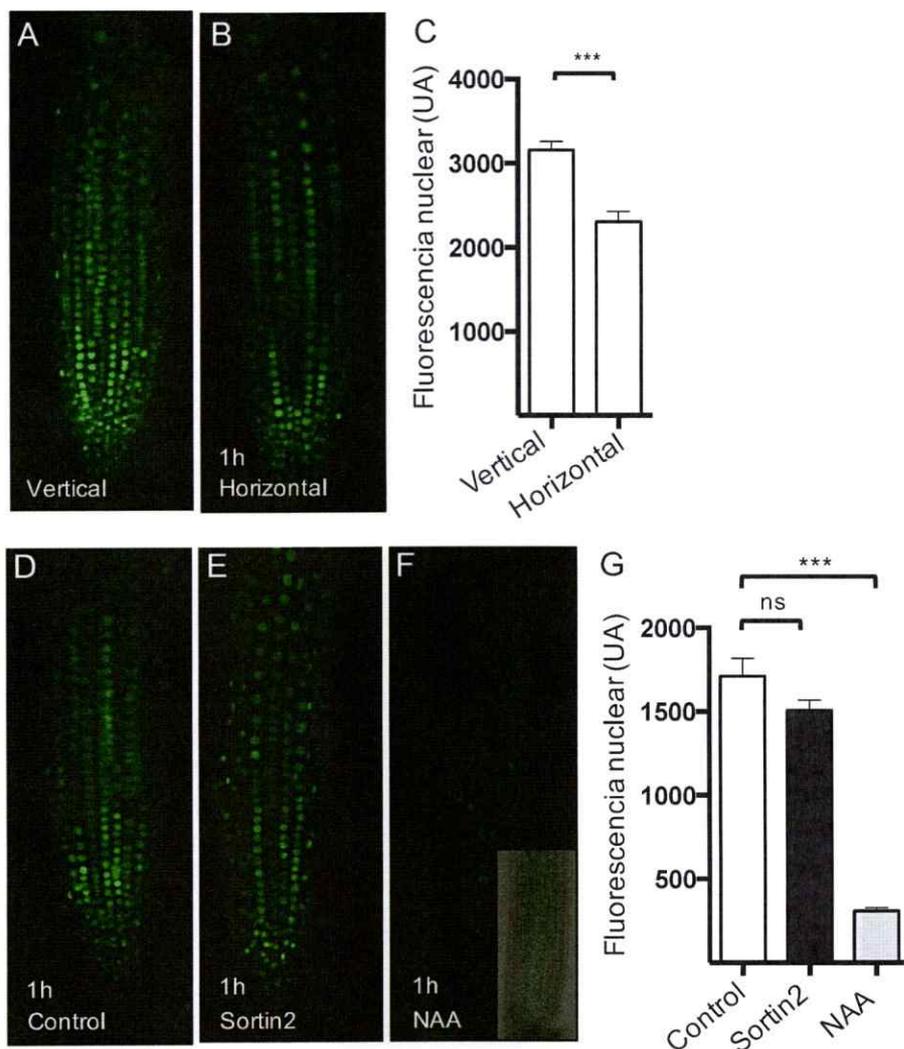


Figura 5. Efecto de Sortin2 en la señalización intracelular de auxina analizado *in vivo* por el reportero DII-VENUS.

Plántulas de 7 días de la línea reportera DII-VENUS fueron observadas directamente desde su posición vertical de crecimiento (A) ó después de 1 h de estimulación gravitrópica (B). La cuantificación de la fluorescencia nuclear de 50 células epidermales fue cuantificada en al menos 3 imágenes y fue corregida por la fluorescencia de fondo ó ruido, en las imágenes A y B (C). Después de tratamientos por 1h en posición horizontal, se observaron las condiciones control (D) Sortin2 25µg/mL, (E) y NAA 1µM (F). La cuantificación de la fluorescencia con localización nuclear de 50 células epidermales fue evaluada en al menos 6 imágenes y fue corregida por la fluorescencia de fondo, en las imágenes de D-F (G).

Análisis estadístico con t-student, ns = $P > 0.05$, * = $P \leq 0.05$, ** = $P \leq 0.01$, *** = $P \leq 0.001$.

3.1.5 Rol de la señalización canónica de auxina en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2.

Hasta el momento se ha mostrado que Sortin2 induce la formación de las raíces laterales estimulando la iniciación de nuevos eventos organogénicos. Además, Sortin2 actuaría sin alterar la localización de la acumulación de auxina a lo largo de la raíz principal medida en base a la respuesta transcripcional de pDR5 y pIAA2 (Figura 4). Consistentemente con esto, Sortin2 no activa la señalización intracelular de auxina, de acuerdo al reportero DII-VENUS (Figura 5). Se desconoce, sin embargo, cuáles son los requerimientos moleculares, relacionados a la señalización intracelular de auxina, que Sortin2 tiene para producir una inducción de organogénesis de las raíces laterales. Para indagar sobre esta interrogante pusimos a prueba la efectividad de Sortin2 en plantas con una función molecular defectuosa en la señalización intracelular de auxina a nivel del receptor de auxina, del represor transcripcional Aux/IAA y del factor de transcripción ARF, respectivamente.

A nivel de receptor se analizó a la mutante cuádruple *tir1/afb1,2,3* (Dharmasiri et al., 2005b), que posee pérdida de función del receptor TIR1 y de sus tres parálogos AFB1, AFB2 y AFB3, miembros claves del complejo receptor SCF^{TIR1/AFBs}. La mutante *tir1/afb1,2,3* posee una sensibilidad disminuida a auxina exógena como inductor de la formación de las raíces laterales (Dharmasiri et al., 2005b). Sin embargo, la mutante *tir1/afb1,2,3* respondió en los mismos niveles que plantas silvestres a la inducción las raíces laterales por Sortin2 (Figura 6 A).

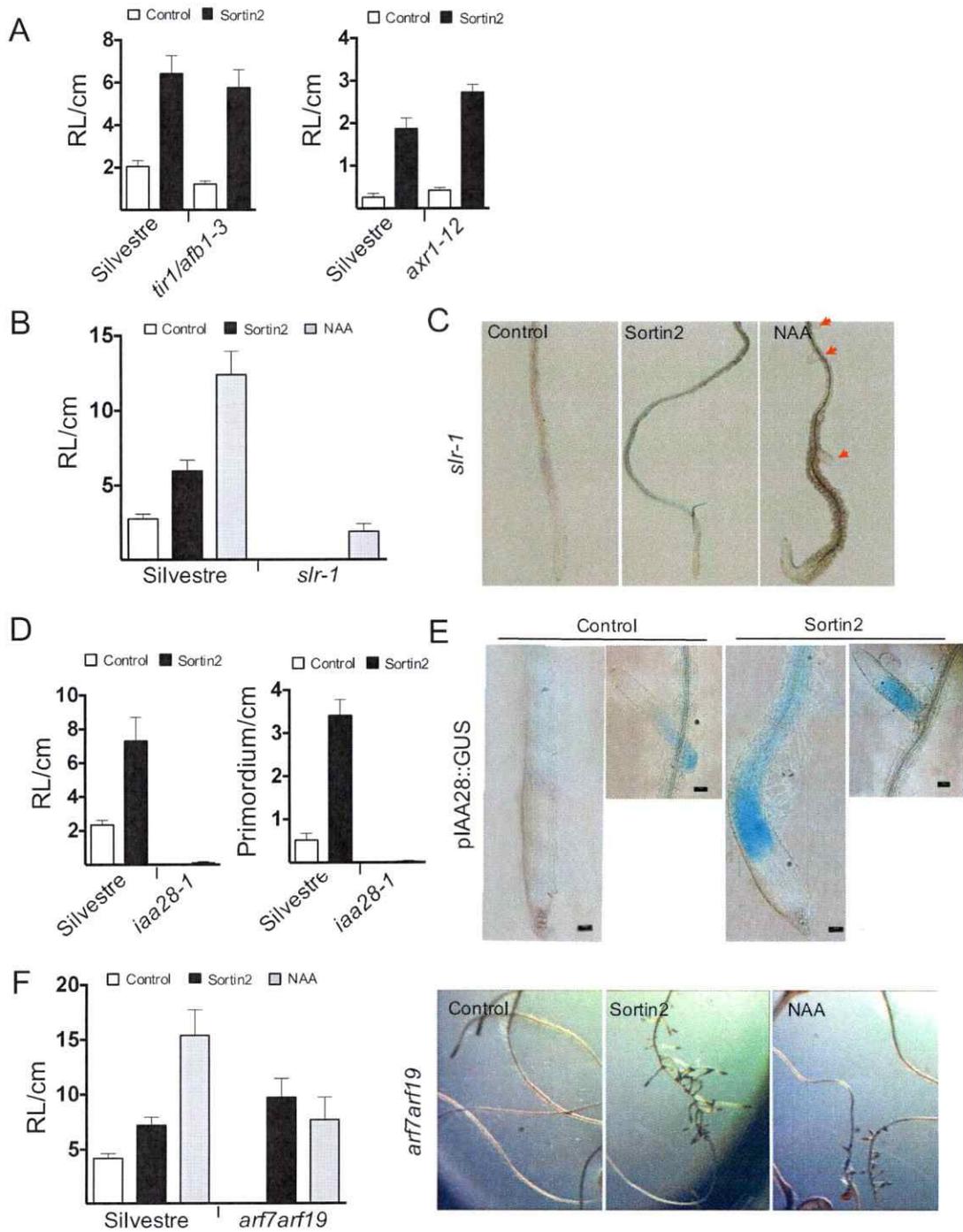


Figura 6. Evaluación de los componentes moleculares de la señalización canónica de auxina requeridos en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2.

Plántulas mutantes *tir1/afb1,2,3*, *axr1-12*, *slr1* e *iaa28-1* y la línea reportera transcripcional pIAA28::GUS de 7 días fueron tratadas en medio líquido para posteriormente cuantificar la densidad de primordios, raíces laterales y/o revelar histológicamente la actividad de GUS.

A. Densidad de las raíces laterales en la mutante *axr1-12* y *tir1/afb1,2,3* comparado con la planta silvestre Col-0. n = 36 y n = 21, respectivamente

B. Densidad de las raíces laterales en la mutante ganancia de función *slr1* y de la planta silvestre Col-0 tratadas por 3 días en condiciones control, Sortin2 25 µg/mL y NAA 1µM. n = 12

C. Zona de la punta de la raíz principal de la mutante ganancia de función *slr1* tratadas como en B. Flechas rojas indican presencia de raíces laterales emergidas.

D. Densidad de las raíces laterales (izquierda) y densidad de primordios (derecha) en la mutante ganancia de función *iaa28-1* y en planta silvestre ecotipo Ws, tratadas por 4 días en condiciones control y Sortin2 25 µg/mL. n = 12 plántulas por condición.

E. Zona de la punta de la raíz principal de plántulas del reportero transcripcional pIAA28::GUS sometidas a tratamientos durante 24 horas en condiciones control y Sortin2 25 µg/mL.

F. Densidad de las raíces laterales emergidas en plántulas silvestre (izquierda) y mutantes pérdida de función *arf7arf19* tratadas por 5 días en condiciones control, Sortin2 25 µg/mL y NAA 1µM. n = 11-12 plántulas por condición.

G. Plántulas de la mutante pérdida de función *arf7arf19* tratadas como en F.

Además, se ha descrito que para el correcto funcionamiento del complejo receptor SCF^{TIR1/AFBs}, se requiere la función molecular de la proteína AXR1 (Del Pozo et al., 2002). La mutante pérdida de función *axr1-12* presenta un fuerte fenotipo en desarrollo (Del Pozo et al., 2002). Sin embargo, *axr1-12* presentó una sensibilidad a Sortin2, similar a la planta silvestre, en la inducción de raíces laterales (Figura 6 A). Por lo tanto, estos resultados sugirieron un mecanismo de acción de Sortin2 sin requerir la actividad del complejo receptor SCF^{TIR1/AFBs} (Pérez-Henríquez et al., 2012).

A nivel de represor transcripcional Aux/IAA, se analizaron las mutantes ganancia de función *slr-1* e *iaa28-1* (Rogg et al., 2001; Fukaki and Tasaka, 2002). Se

ha descrito ampliamente que IAA14/SLR e IAA28 son proteínas que deben ser degradadas para completar exitosamente la formación de las raíces laterales (Rogg et al., 2001; Fukaki and Tasaka, 2002). Consistentemente, las mutante ganancia de función *slr-1* e *iaa28-1* carecen de raíces laterales. Al analizar la densidad de las raíces laterales, como se observó en el experimento de la Figura 6 B, se observó que las plantas *slr-1* fueron totalmente insensibles a tratamientos con Sortin2 y, como se ha reportado previamente, altamente insensibles a tratamientos con auxina exógena (Rogg et al., 2001; Vanneste et al., 2005a; De Rybel et al., 2010). Esto sugirió que la degradación de esta proteína es necesaria para observar el aumento del número de las raíces laterales en respuesta a Sortin2.

Se ha reportado que proteínas AUX/IAA como IAA14/SLR, IAA3/SHY2, IAA19/MSG2 e IAA28, inhiben la función de los factores de transcripción ARF7 y ARF19 (Uehara et al., 2008). Interesantemente, a evaluar la actividad del reportero transcripcional pIAA28::GUS en tratamientos con Sortin2, se observó un aumento de la actividad del promotor IAA28 en la zona de la punta de la raíz, mientras que en la zona de diferenciación, el marcador permaneció inalterado en tratamientos con Sortin2 (Figura 6 E). Si la mayor actividad de pIAA28 se traduce en aumentados niveles de proteína, indicaría que en tratamientos con Sortin2 habría una mayor represión de los factores ARF7 y ARF19, ya que son inhibidos por IAA28.

Por lo expuesto previamente, a nivel de los factores de transcripción ARF, se analizó la pérdida de función de ARF7 y ARF19. La doble mutante pérdida de función *arf7arf19* carece completamente de raíces laterales en condiciones normales de crecimiento (Okushima et al., 2007). Como se observó en el experimento de la Figura 6 G, las plantas *arf7arf19* tratadas en condiciones experimentales control mostraron absoluta carencia de raíces laterales. Además, se observó que la mutante *arf7arf19* es



un 50% menos sensible a la aplicación de NAA exógena que una planta silvestre. Sin embargo, en tratamientos con Sortin2, *arf7arf19* mostró una sensibilidad equivalente al observado en una planta silvestre. La sensibilidad a Sortin2 de *arf7arf19* sugirió que no se requiere la regulación transcripcional ejercida por ARF7 y ARF19 en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2.

3.2 Objetivo 2. Identificación de el (los) grupo(s) de genes que son regulados en tratamientos con Sortin2 mediante análisis de expresión génica global.

Sólo algunas células, a lo largo de la raíz principal, expresan, y de una manera asincrónica, el perfil molecular que llevará a esas células a la formación de una raíz lateral. En esta tesis, se usó una estrategia experimental que permite que todas las células de la raíz principal ingresen de manera sincronizada al proceso de formación de las raíces laterales. Con esta estrategia, conocida como sistema de inducción de raíces laterales (Himanen et al., 2002; Himanen et al., 2004), se realizó un perfil transcriptómico global comparativo en respuesta a Sortin2 y a la hormona auxina NAA.

En esta sección de la tesis procedimos inicialmente a validar el sistema de inducción de raíces laterales (LRIS) para su uso en el estudio del efecto de Sortin2. Luego de esto, se evaluó la respuesta transcripcional a Sortin2 y NAA, mediante RNA-seq. En base a estos resultados se realizó un análisis funcional de los genes expresados diferencialmente en Sortin2 y/o Auxina.

3.2.1 Sistema de inducción de raíces laterales (LRIS); sincronización de la actividad mitótica de las células del periciclo mediante NPA.

El sistema LRIS permite la sincronización de la formación de las raíces laterales mediante la germinación de las semillas y el crecimiento de las plántulas en presencia del inhibidor del transporte de auxina ácido naftilftalámico (NPA) y el posterior tratamiento con auxina suministrando exógenamente a la planta concentraciones 10 veces superior a las fisiológicas (Himanen et al., 2004; Vanneste et al., 2005a).

En la Figura 7 A, se observa la morfología macroscópica que se obtuvo con plántulas de la línea marcadora pDR5::GUS que son crecidas en condiciones control y aquellas que son crecidas en presencia de NPA. La germinación y crecimiento con NPA causa pérdida de gravitropismo y un detrimento en la tasa de crecimiento de las plántulas. Sin embargo, la morfología de la punta de la raíz de las plántulas germinadas y crecidas en NPA es muy similar a las plántulas crecidas en condiciones control (Figura 7 A). En la Figura 7 B se hace énfasis en la zona de diferenciación de la raíz principal donde se puede identificar, por actividad de la línea reportera pDR5::GUS, los eventos de iniciación de raíz lateral. Se evaluó comparativamente la respuesta de plántulas crecidas en ausencia y en presencia de NPA, cuando son sometidas a un posterior tratamiento con auxina exógena.

Según lo mostrado en la Figura 7 B se observó que el tratamiento NPA inhibe la iniciación de las raíces laterales que se representa por la ausencia de actividad del promotor DR5. Las plántulas crecidas en NPA, que son carentes de raíces laterales, pueden ser inducidas para formar nuevas raíces laterales mediante estimulación exógena con la auxina sintética ácido naftalenacético (NAA).

En la Figura 7 B, se observó la inducción de expresión del marcador pDR5::GUS, denotando que nuevas raíces laterales se están formando en tratamientos con NAA luego de 6 horas. Esta inducción de pDR5 forma un continuo a lo largo de la raíz principal. La inducción pDR5 apareció a las 6 horas después de estar completamente ausente en tiempos más tempranos. Así que, coherentemente con lo descrito en la literatura (Himanen et al., 2004), la inducción de nuevas raíces laterales se produce de manera sincronizada a lo largo de la raíz principal en LRIS.

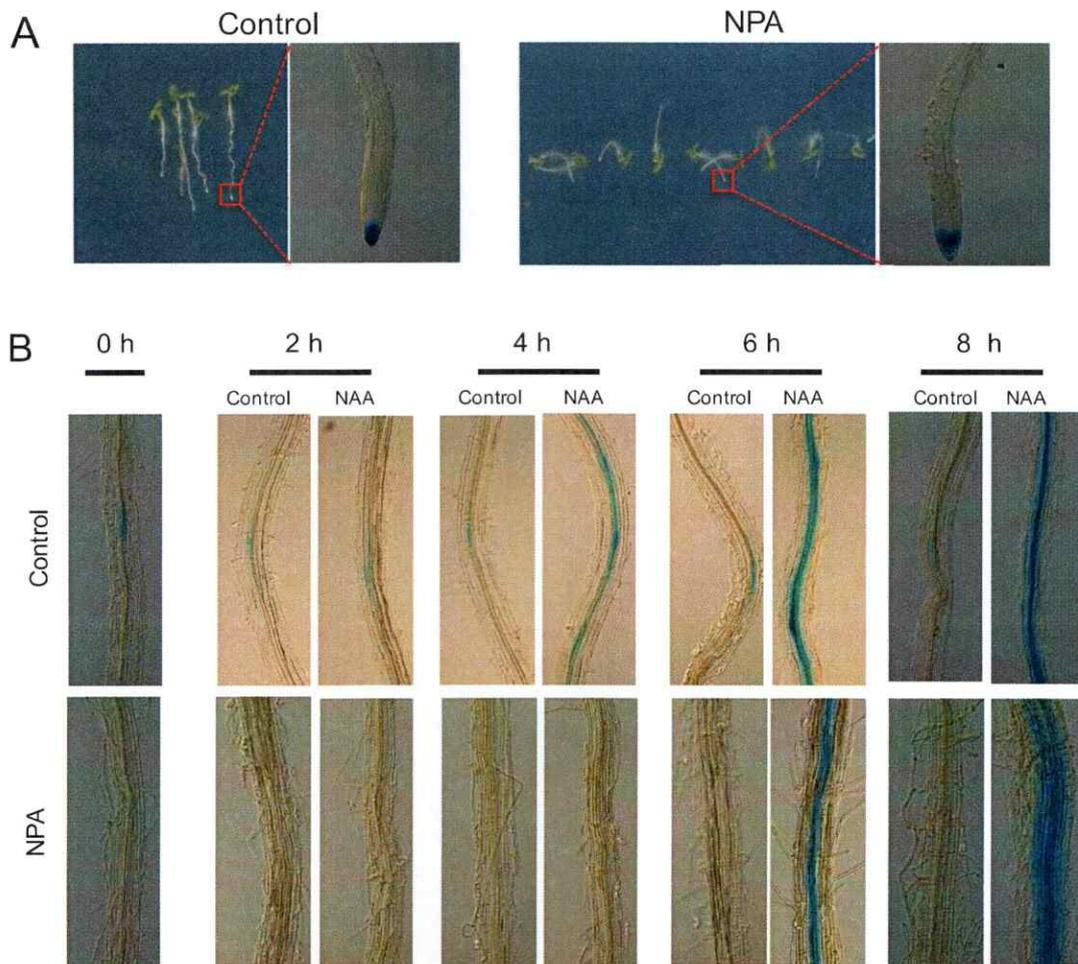


Figura 7. Sincronización del inicio de la formación de las raíces laterales en el sistema LRIS.

A. Plántulas pDR5::GUS crecidas durante 72 horas desde la germinación, en ausencia (control) o en presencia del inhibidor de transporte de auxina NPA 10 μ M. Plantas crecidas en NPA muestran pérdida de gravitropismo, pero la mantienen la misma morfología de la raíz principal.

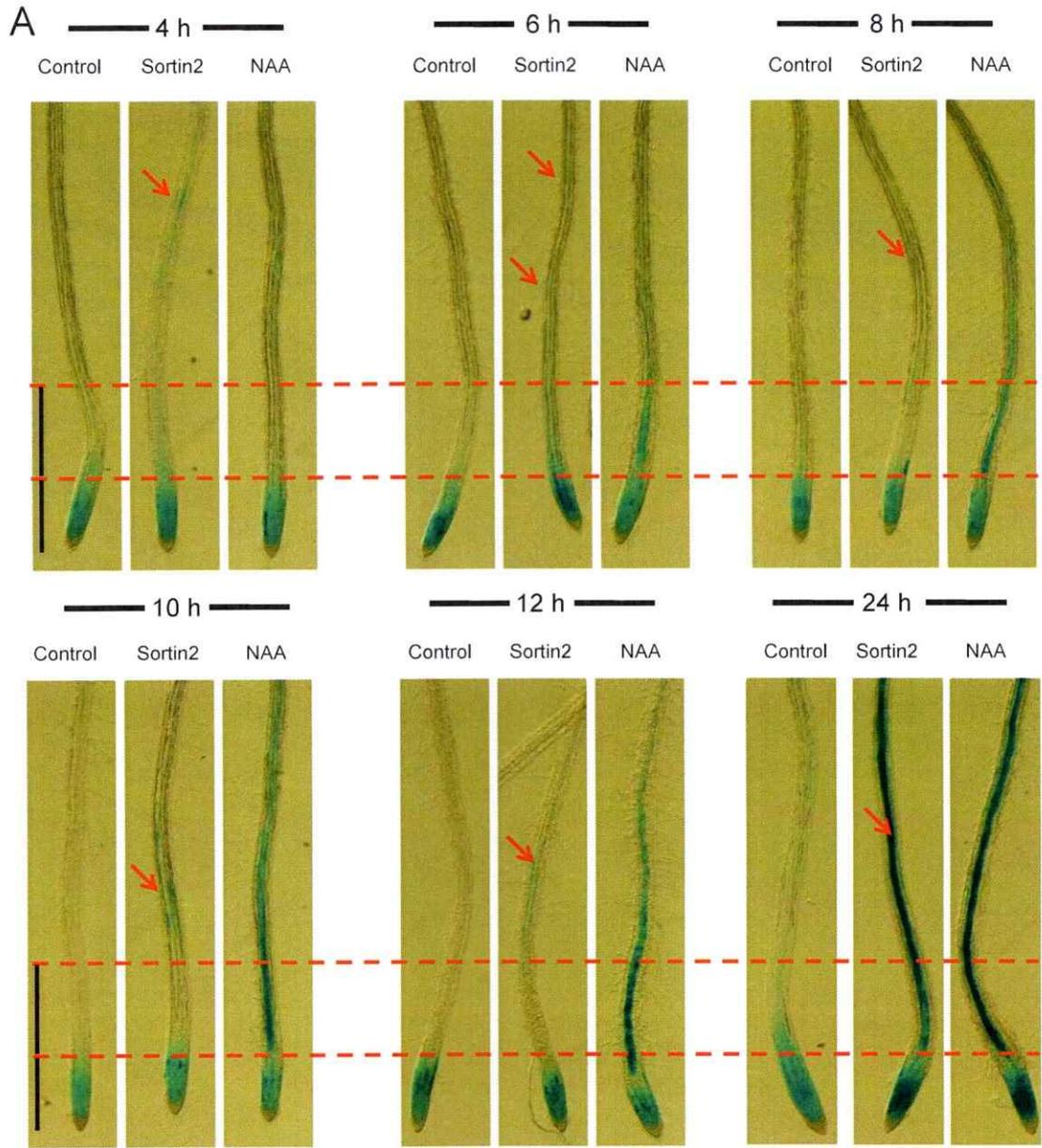
B. Plántulas pDR5::GUS en tratamiento control o tratamiento con NPA por 72h, se traspasan a medio conteniendo NAA 10 μ M durante el tiempo indicado. La aplicación de NAA exógenamente genera en las plántulas crecidas en NPA, una activación del marcador pDR5::GUS, denotando una inducción sincronizada de las células del periciclo a las 6h. En plántulas crecidas en presencia de NPA es posible sincronizar la expresión de pDR5. En plántulas crecidas en condiciones control, la activación de pDR5 es paulatina, primero en un grupo de células y posteriormente se forma un continuo a lo largo de la raíz principal.

3.2.2 Curso temporal de inducción de actividad mitótica temprana por Sortin2.

Para poder establecer la temporalidad de la inducción de la formación de las raíces laterales en respuesta a NAA exógeno, se ha establecido previamente el uso del marcador pCYCB1;1::GUS en combinación con el sistema de inducción de raíces laterales LRIS (Himanen et al., 2004; Vanneste et al., 2005b; De Smet et al., 2007; De Rybel et al., 2010). La señal generada por la actividad de GUS reporta la actividad del promotor del gen del ciclo celular CYCB1 (activación de pCYCB1). Se decidió usar LRIS y la línea reportera pCYCB1;1::GUS para describir el marco temporal de la inducción de la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2. Considerando que Sortin2 aumenta la densidad de primordios después de las 24 horas (ver Figura 2 A-C), se escogió analizar un marco temporal amplio, abarcando desde 4 horas hasta 24 horas de tratamiento. Como control positivo de la activación de pCYCB1, se usó tratamientos aplicando auxina NAA 10 μ M. Se analizaron las plántulas de la línea pCYCB1;1::GUS en grupos de 15-25 plántulas por condición en 3 experimentos independientes. En la Figura 8 A, se mostraron imágenes representativas

aproximadamente el 60% más distal de la raíz principal (más cercana a la punta) de plántulas tratadas en cada condición y en cada tiempo. Tanto en tratamientos con Sortin2 como con NAA, a partir de las 4 horas de tratamiento es posible observar zonas de activación de pCYCB1 reportando la inducción de la actividad mitótica. En tratamientos con NAA, a diferencia de Sortin2, se activa rápida y fuertemente la zona de la raíz principal denotada entre las líneas semi-punteadas de la Figura 8 A. A las 24 horas de tratamiento, Sortin2 también activó mitóticamente esa zona, sugiriendo que existe una diferencia temporal más que espacial entre Sortin2 y NAA, en relación al curso temporal de la activación de pCYCB1.

Para determinar la temporalidad en la que se desarrollan los eventos más tempranos de la formación de las raíces laterales, se realizó un análisis exhaustivo de la activación de pCYCB1. Mediante microscopía, fue posible detectar incluso los eventos de activación de pCYCB1 que posean baja señal del reportero GUS (Figura 8 B) Con este análisis, se obtuvo el porcentaje de plántulas pCYCB1;1::GUS que presentaron activación de pCYCB1, dentro de la población analizada, para cada tratamiento y para cada punto temporal (Figura 8 C). Los tratamientos con NAA mostraron que, a partir de las 6 horas de tratamiento se detectó, en el 100% de las plántulas analizadas, una aumentada expresión del marcador pCYCB1;1::GUS, respecto al tratamiento control, lo que es consistente con lo publicado en la literatura (Vanneste et al., 2005a) (Figura 8 C). En cambio, se observó que a las 6h horas de tratamiento con Sortin2, aproximadamente un 50% de la población presentó una activación de pCYCB1. Después de 24 horas, el 100% de la población de plántulas pCYCB1;1::GUS presentó activación de pCYCB1 en ambas condiciones de tratamiento, NAA y Sortin2.



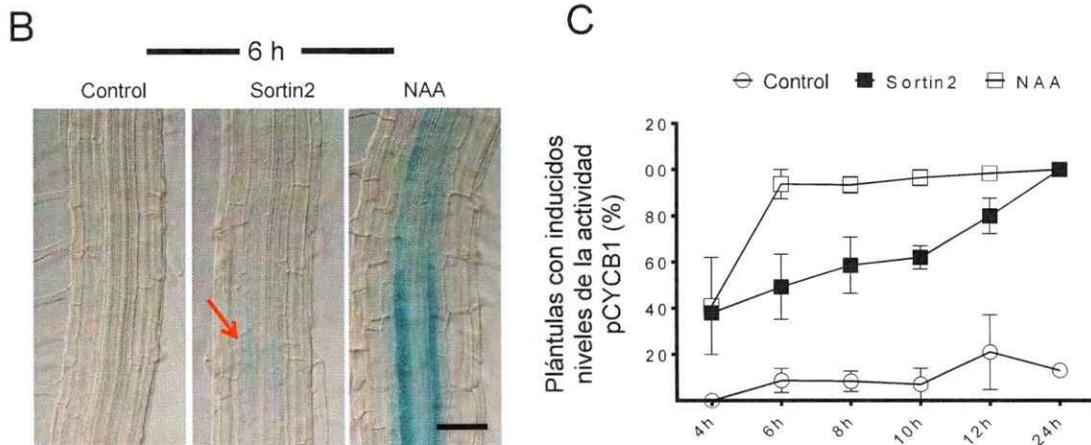


Figura 8. Curso temporal de la activación de pCYCB1 en raíces de plántulas pCYCB1;1::GUS tratadas con Sortin2 y NAA, usando el sistema LRIS.

Plántulas de la línea pCYCB1;1::GUS fueron germinadas y crecidas en NPA 10 μ M por 72 h y luego transferidas a tratamiento Control, Sortin2 25 μ g/mL y NAA 10 μ M por el tiempo indicado.

A. Imágenes representativas del 60% más distal (más cercano a la punta) de una raíz principal de plántulas de la línea pCYCB1;1::GUS que fueron tratadas en condiciones Control, Sortin2 y NAA, durante el tiempo indicado, usando el sistema LRIS. Las flechas en rojo destaca la activación de pCYCB1 que genera el tratamiento Sortin2. Aumento 4X. Barra = 1mm.

B. Imágenes representativas de la señal capturada por la actividad del reportero GUS, dando cuenta de la activación de pCYCB1 que se observa tempranamente a las 6h de los tratamiento indicados, en plántulas pCYCB1;1::GUS. Aumento 20X. Barra = 10 μ M.

C. Cuantificación del porcentaje de plántulas que muestran activación de pCYCB1 en respuesta a tratamientos control, Sortin2 y NAA de entre 4 y 24h de duración. n=45-60 plántulas.

Con este análisis de LRIS en respuesta al inductor Sortin2, se pudo concluir que: 1) inducir raíces laterales en plantas que carecían completamente de primordios ó de raíces laterales; 2) conocer la progresión temporal del aumento de actividad mitótica (activación de pCYCB1) en plántulas tratadas con Sortin2; y finalmente; 3) identificar

que la activación mitótica en un 100% de las plántulas tratadas ocurre más lentamente en tratamientos con Sortin2 que con la auxina NAA 10 μ M.

3.2.3 Sortin2 induce actividad mitótica de células del periciclo y activa marcadores de la iniciación de las raíces laterales.

Las etapas tempranas de formación de raíz lateral involucran la progresión a mitosis de las células del periciclo (Himanen et al., 2002). Células en las capas celulares contiguas, como endodermis o corteza, no sufren el mismo cambio de estadio del ciclo celular. Por lo tanto, la inducción de la formación las raíces laterales sería un fenómeno que requeriría una activación mitótica de manera específica.

Para indagar acerca de la especificidad de la activación mitótica en respuesta a Sortin2, se evaluó la activación de pCYCB1 en plántulas pCYCB1;1::GUS tanto en la punta de la raíz principal (zona meristemática y de elongación) como en la zona más vieja de la raíz principal (zona de diferenciación).

En la Figura 9 A, se reportó la activación del promotor pCYCB1, en la punta de raíces de plántulas pCYCB1;1::GUS sometidas a tratamientos Control y Sortin2 durante 2, 4, 6 y 8 horas. En tratamiento con Sortin2, la intensidad de la activación de pCYCB1 alcanza niveles similares a la condición control (Figura 9 A). Se observan algunos puntos de acumulación intensa de la señal azul generada por la actividad de GUS (flechas negras y rojas en la Figura 9 A), que se visualizan tanto en tratamiento Sortin2 como en tratamiento Control. Por lo tanto, esto sugirió que Sortin2 no es un activador del ciclo celular de manera desregulada. Sortin2 involucraría una activación mitótica específicamente sobre aquella conducente a la formación de las raíces laterales y no sería simplemente un activador desregulado de la proliferación celular.

Consistentemente con lo anterior, la activación de pCYCB1 por Sortin2, en una zona alejada a la punta de la raíz principal (Figura 9 B), es específica y localizada en ciertas capas celulares de la raíz. Coherentemente con el efecto inductor de las raíces laterales que posee Sortin2, la activación de pCYCB1, se centra en la porción interna de la raíz principal, donde se encuentran las células del periciclo que comienzan a dividirse para dar origen a un nuevo órgano (Figura 9 B).

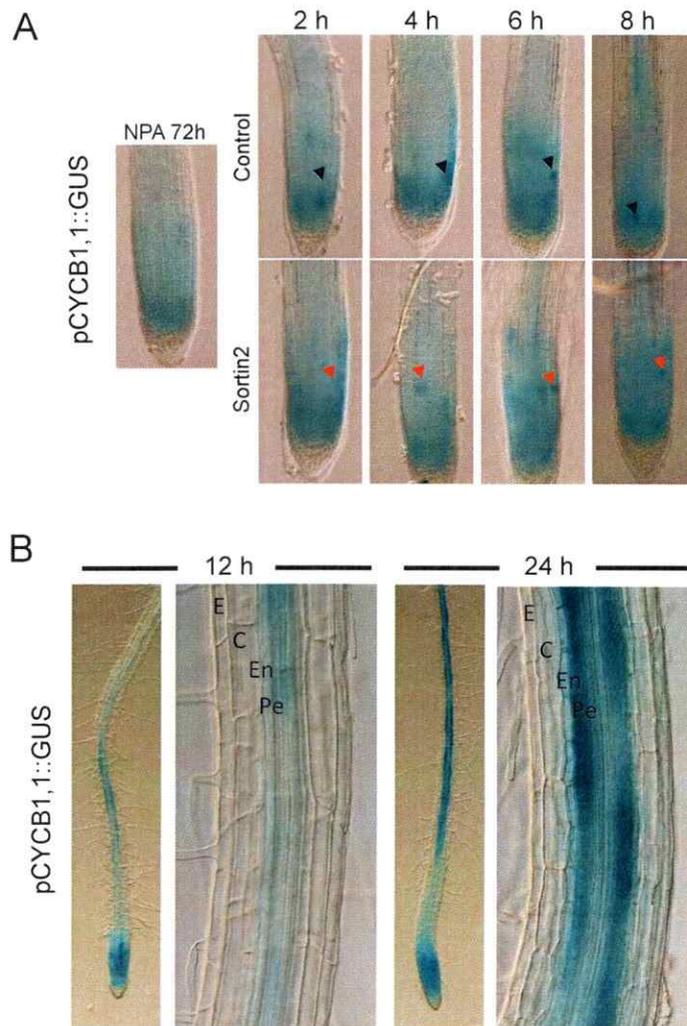


Figura 9. Sortin2 induce la actividad mitótica específicamente en las células del periciclo.

Plántulas de las líneas marcadoras pCYCB1;1::GUS fueron germinadas y crecidas en NPA

10 μ M durante 72 h después de germinación para posteriormente ser trasladadas a los tratamientos Control, Sortin2 (25 μ g/mL) o NAA 10 μ M.

A. Activación de pCYCB1 en la zona meristemática y parte de la zona de elongación de plántulas pCYCB1;1::GUS tratadas durante 2, 4, 6 y 8 horas en condiciones Control y Sortin2. Flechas negras y rojas indican una intensa señal de la actividad mitótica en condiciones control y Sortin2, respectivamente.

B. Activación de pCYCB1 en la zona de diferenciación de la raíz principal de plántulas pCYCB1;1::GUS tratadas durante 12 y 24h en condiciones con Sortin2. E, epidermis, C, corteza, En, Endodermis y Pe, periciclo.

La especificidad de la actividad inductora de Sortin2, se pudo apreciar también observando en qué células se expresan los reguladores tempranos de la formación de las raíces laterales, como lo es el factor de transcripción GATA23 (De Rybel et al., 2010). Se ha reportado que GATA23 participa en la especificación de aquellas células del periciclo que serán fundadoras de raíz lateral (De Rybel et al., 2010; Van Norman et al., 2013). Plántulas de la línea reportera pGATA23::GUS (De Rybel et al., 2010), que no poseen raíces laterales iniciadas, porque fueron germinadas y crecidas en NPA, mostraron activación del promotor pGATA23, en células del periciclo, después de su transferencia por 6 y/ó 24 horas a tratamiento Control (Figura 10 A y B). En tratamientos con Sortin2 por 6 horas, se observó un incremento en la actividad pGATA23 que es mayor al observado en respuesta al tratamiento Control. Un tratamiento más prolongado de 24h con Sortin2 induce una activación aún más intensa de pGATA23 en respuesta a Sortin2. Consistentemente, los niveles de transcritos de GATA23 detectados en la zona diferenciada de la raíz principal mediante qRT-PCR también aumentaron en respuesta a Sortin2 progresivamente mientras más prolongado es el tratamiento con Sortin2 (Figura 10 C). GATA23 no es el único gen con ese comportamiento, ya que SLR/IAA14 respondió a Sortin2 de manera similar (Figura 10

C).

Tanto en condiciones Control como en Sortin2, la activación de pGATA23 se observó específicamente en la capa celular del periciclo (Figura 10 A y B). Además, como ya ha sido reportado previamente en De Rybel et al, 2010, pGATA23 se activó fuertemente en tratamientos con NAA exógeno, específicamente en las células del periciclo (Figura 10 A y B), lo que es consistente con el papel que GATA23 juega en la inducción de la actividad mitótica en las células fundadoras de raíz lateral (Figura 9).

Los resultados revelaron que tratamientos con Sortin2 inducen un aumento de la actividad mitótica, pero de manera selectiva, afectando exclusivamente a la fila celular del periciclo, lo que es conducente a la formación de las raíces laterales. Además, estos resultados indican que tratamientos con Sortin2 también aumentan, específicamente en células del periciclo, la expresión de un regulador molecular de la diferenciación de las células del periciclo hacia células fundadora de raíz lateral. En conjunto, los datos señalan que en tratamientos con Sortin2, se activan las condiciones moleculares claves y necesarias para la formación de las raíces laterales.

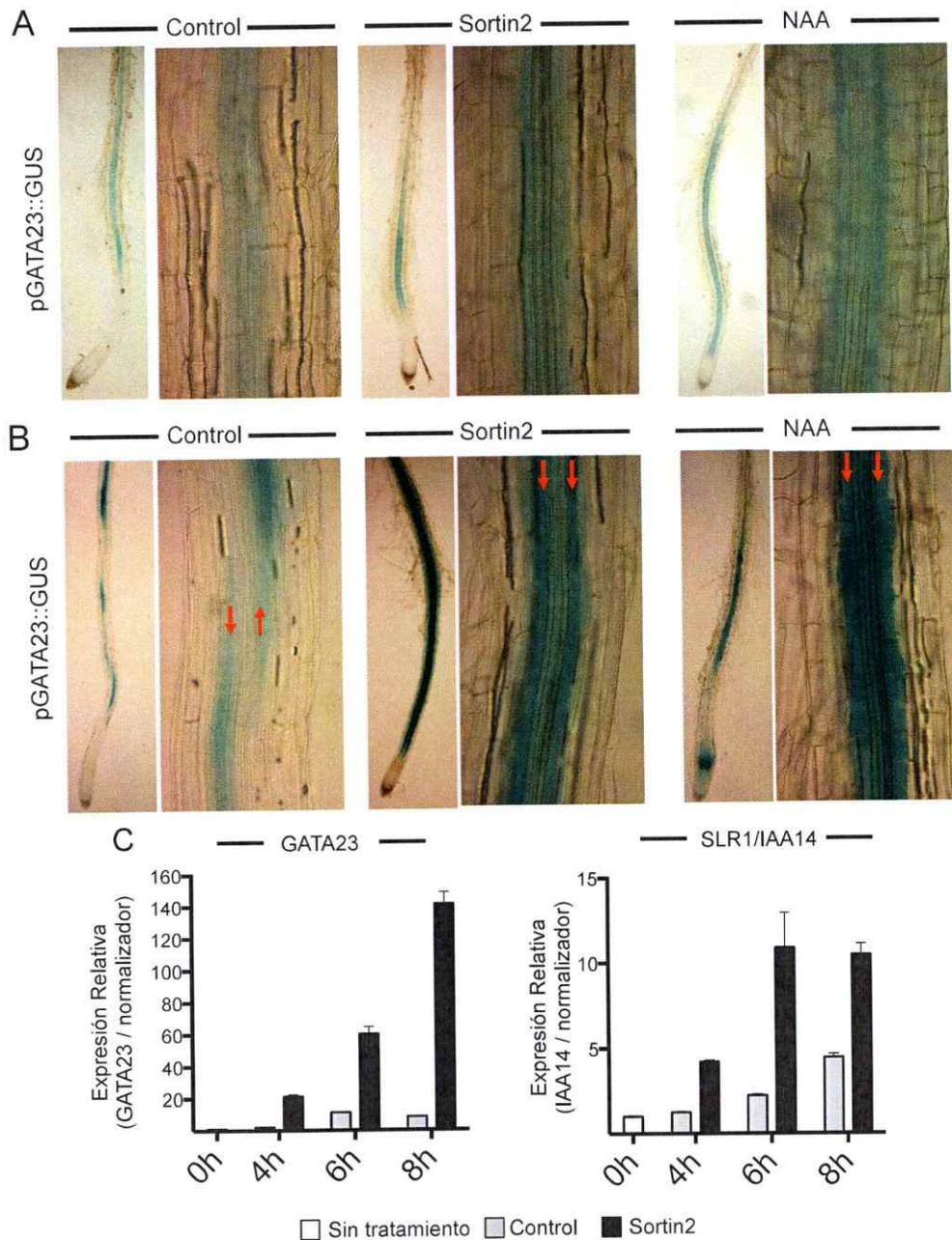


Figura 10. Sortin2 induce la activación del regulador de diferenciación de células del periciclo pGATA23.

Plántulas de las líneas marcadoras pGATA23::GUS fueron germinadas y crecidas durante 72 h después de germinación en NPA 10 μ M para posteriormente ser trasladadas a los tratamientos Control, Sortin2 (25 μ g/mL) o NAA 10 μ M. Se muestra la raíz principal (izquierda) y un aumento en la zona de diferenciación de la raíz principal (derecha) de

plántulas pGATA23::GUS tratadas durante 6 h (A) ó 24h (B) en las condiciones señaladas. Flechas rojas en (B) indican la activación de pGATA23 en las células del periciclo. Notar que en condiciones control la activación de pGATA23 no es continua a lo largo de la fila de células del periciclo, en cambio en Sortin2 y NAA, la activación es continua a lo largo del periciclo. (C) Niveles de transcritos detectados mediante qRT-PCR de los genes GATA23 y SLR/IAA14 en tejido de la raíz principal sin la punta de la raíz principal de plántulas sometidas a los tratamientos control y Sortin2 durante 6 h.

3.2.4 Perfil transcriptómico comparativo mediante RNA-seq de raíces primarias que fueron inducidas para la formación de las raíces laterales con Sortin2 y NAA.

Montar un perfil de expresión génica es un mecanismo frecuentemente utilizado en los sistemas vivos para regular y establecer un determinado proceso biológico. Bajo esa premisa, en tratamientos con Sortin2, se estaría estableciendo un perfil de expresión conducente a la formación de las raíces laterales. Para identificar componentes moleculares que podrían estar mediando la respuesta a Sortin2, se decidió realizar un perfil de expresión génica mediante secuenciación masiva de transcritos (RNAseq). El establecimiento de las condiciones experimentales y el análisis de los datos crudos se realizó en el laboratorio del Dr. Tom Beeckman en el instituto VIB, Gent, Bélgica.

Esta aproximación se diseñó para poder obtener al menos dos tipos de resultados; primero, saber cuáles son los genes cuyos niveles de expresión son modificados en el tratamiento con Sortin2 y segundo, identificar cuáles de estas modificaciones se producen en tratamientos con Sortin2 en comparación con tratamientos con la auxina exógena NAA. Esto último aumentaría la probabilidad de encontrar genes cuyas funciones moleculares den luces de las diferencias que existen entre las respuesta de Sortin2 y de NAA.

Para poder identificar los genes cuyos niveles de transcritos cambian en Sortin2, se comparó el perfil de expresión génica obtenido en tratamientos con Sortin2 frente al perfil obtenido bajo el tratamiento control (Figura 11). Se obtuvieron los genes que cambian exclusivamente en Sortin2, al sustraer aquellos que cambiaron en el tratamiento con 10 μ M de NAA. Mediante esta estrategia se esperaba determinar si es que existe y hasta qué nivel, una respuesta transcripcional específica a Sortin2. Posteriormente, a partir de ese análisis, jerarquizar, seleccionar y caracterizar componentes moleculares que podrían estar mediando la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2.

El resultado que provoca el establecimiento de un perfil de expresión, está determinado por el tiempo y la zona del organismo en dónde ocurre. Por lo tanto, para realizar un estudio transcriptómico es importante definir condiciones experimentales que lo consideren. Nuestro estudio transcriptómico se realizó focalizándose en el tejido radicular, descartando el tejido aéreo. Dentro del tejido radicular se focalizó en particular en la zona de diferenciación de la raíz principal, el tejido dónde ocurre la iniciación de las raíces laterales (Figura 11). En la zona de diferenciación, las células del periciclo y las capas celulares vecinas, tienen la madurez y el estado de diferenciación apropiado para el desarrollo de primordios de las raíces laterales. Las zonas más jóvenes de la raíz principal, zonas de elongación y meristemática, no fueron consideradas en el análisis, ya que concentran células en un estadio de madurez o de diferenciación muy diferente al de aquellas células que da origen a la iniciación de las raíces laterales (Verbelen et al., 2006).

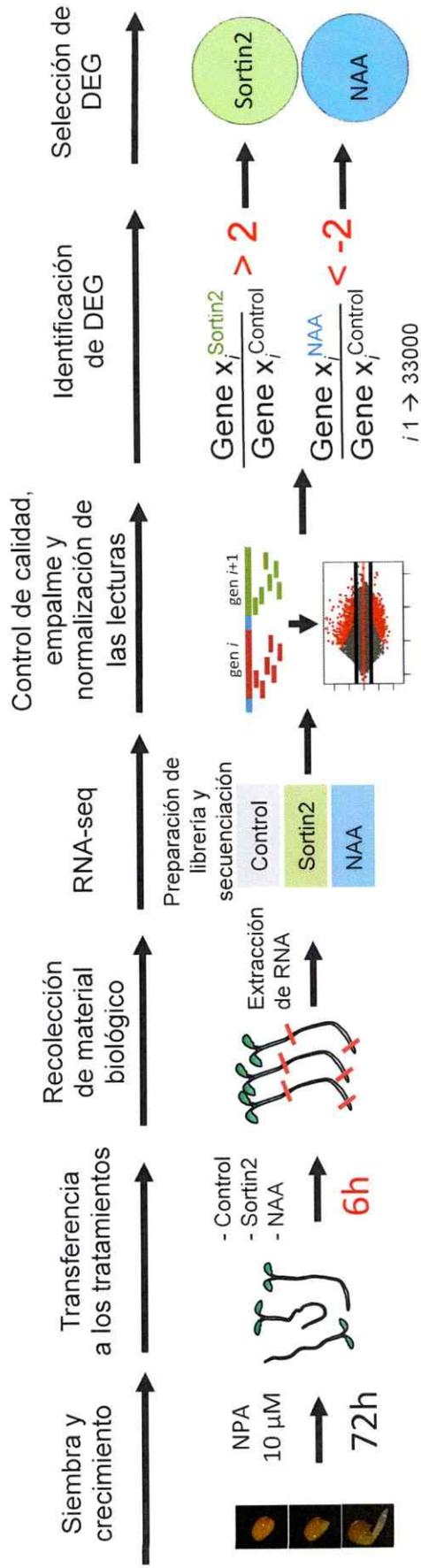


Figura 11. Esquema del diseño experimental del perfil transcriptómico mediante RNA-seq, en respuesta a tratamientos con Sortin2 y NAA.

Plántulas obtenidas mediante germinación y crecimiento durante 72h después la germinación, en NPA 10µM (*Siembra y crecimiento*) fueron transferidas durante 6h a los tratamientos Control, Sortin2 (25µg/mL) ó NAA 10µM (*transferencia a los tratamientos*). El RNA se obtuvo con muestras de raíces a las que se les cortó la punta de la raíz principal *Recolección de material biológico*). Se prepararon las librerías de cDNA para la posterior secuenciación (*RNAseq*). Se analizó la calidad de la secuenciación para cada lectura y se seleccionaron aquella aquellas lecturas que pasaron el control de calidad. Se realizó el alineamiento de las secuencias contra el genoma de Arabidopsis, en base a la versión TAIR10, para obtener el número de secuencias que empalman en cada gen (CPM, cuentas por millón). Se normalizaron los datos de CPM para hacerlos comparables entre los distintas réplicas biológicas y entre los distintos tratamientos (*Control de calidad, empalme y normalización de las secuencias*). Los valores de CPM que representan abundancias normalizadas de transcritos permiten expresar los resultados como veces de cambio en escala lineal (*Identificación de genes diferencialmente expresados, DEG*). Se utilizó un umbral de 2 veces de cambio para identificar grupos de genes cuyos niveles de transcritos cambiaron positiva ó negativamente en Sortin2 ó NAA, en ambos casos, respecto a la condición control (*selección de genes regulados*).

La selección de la duración del tratamiento con Sortin2 y NAA, para realizar el perfil transcriptómico, está supeditado al objetivo de detectar los primeros cambios de expresión génica que conllevan a un aumento de la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2. En la selección de la duración del tratamiento, se consideraron factores que derivan de las evidencias experimentales presentadas anteriormente (sección 3.2.2), así como información que deriva del conocimiento en el área. Primero, se describió que el tiempo más temprano en el que se alcanza una activación de pCYCB1, en el 100% de las plántulas analizadas, es a las 6 horas de tratamiento, y es en respuesta a NAA exógeno. En cambio, en respuesta a Sortin2, el 100% de las plántulas activa pCYCB1 recién después de 24h, un tiempo demasiado prolongado para detectar cambios transcripcionales tempranos. Segundo, se consideró que dado que el aumento de la actividad de pCYCB1 es el primer cambio transcripcional en tratamientos de menos de 6 horas, se podría dejar afuera a genes que recién están empezando a aumentar sus niveles de expresión. Por lo tanto, se escogió realizar el experimento de expresión global usando un tratamiento en condiciones Control, Sortin2 y NAA de 6 horas. Tercero, existen perfiles transcriptómicos en respuesta a NAA a las 6 horas de tratamiento, que pueden servir para validar o expandir conclusiones biológicas.

La recolección del material biológico para el perfil transcriptómico se realizó en 3 experimentos independientes con 2 réplicas biológicas en cada experimento. En cada experimento, se usó el sistema LRIS con plántulas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. En total se obtuvieron 6 réplicas biológicas para cada condición de tratamiento; Control, Sortin2 y NAA. Paralelamente, se realizó un experimento con plántulas pCYCB1:1:GUS, como control positivo de la efectividad de la actividad Sortin2 y NAA que se reportó previamente. Se validó que los tratamientos Sortin2 y

NAA funcionaron de acuerdo a lo que se reporta en la Figura 8 de esta tesis, cuando se observó la inducción de pCYCB1 a las 6 horas.

Se obtuvo muestras de RNA desde 6 réplicas biológicas y se seleccionaron las mejores 3 muestras para la secuenciación masiva. Para seleccionar las muestras que se usarían para el RNA-seq, se usaron los siguientes criterios: Primero, la cantidad total de RNA, considerando aquellas muestras que tuvieron más de 1µg. Segundo, la calidad del RNA, considerando aquellas muestras con índices de absorbancia 260 nm / 280 nm entre 1.8-2.2 y 260 nm / 230 nm entre 1.9-2.1.

3.2.5 Análisis del perfil de expresión en respuesta a NAA y Sortin2; desde la secuenciación masiva hasta la obtención de genes diferencialmente expresados.

El análisis desde las lecturas para cada librería hasta la obtención de las veces de cambio de los transcritos, fue realizado por el Dr. Boris Parizot, con la ayuda del Dr. Qian Chen, miembros del laboratorio del Dr. Tom Beeckman. Los datos obtenidos desde la secuenciación masiva por RNA-seq están constituidos por una colección de ~20 millones de pequeñas secuencias nucleotídicas, lecturas de 50 pares de bases, y por valores respecto a la calidad de secuenciación. La calidad de secuenciación se evalúa por medio de la probabilidad de que cada base de cada una de las lecturas, haya sido correctamente secuenciada. Todos estos datos se ingresaron a la plataforma informática *open source* Galaxy (<http://galaxyproject.org>), que contiene diversos programas informáticos para el análisis de estos valores. Primero, la calidad de la secuenciación se evalúa mediante el programa FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc>), para cada lectura. FastQC seleccionó las lecturas con más de un 75% de bases que un puntaje de calidad de 20,

es decir que tuvieran una probabilidad del 99.9% de ser correctas. Mediante FastQC trimmer, se removieron de las lecturas aquellos nucleótidos secuenciados erróneamente en el extremo 3' de la lectura. Estos errores se aluden a un incorrecto corte de los adaptadores que son usados durante la secuenciación. Posteriormente, mediante el programa GSNAP (Wu and Nacu, 2010), se alineó cada lectura contra la información genómica más actualizada de *Arabidopsis thaliana*, TAIR10. Con los resultados de este alineamiento y mediante el software HTSeq (Anders et al., 2015) se pudo obtener el número de lecturas que empalman en cada gen. Estos fueron posteriormente normalizadas dentro y entre las distintas muestras usando el programa edgeR (Robinson et al., 2010) con el método TMM (del inglés *trimmed mean of M values*) (Robinson and Oshlack, 2010), que fue usado dentro del paquete *open source* Bioconductor (Gentleman et al., 2004). El método TMM considera al menos dos elementos durante el proceso de normalización; (1) el número de lecturas en cada colección y (2) el largo del gen. Con lo anterior, se obtuvieron niveles de transcritos normalizados, en formato del parámetro CPM (*counts per million of reads*). Posteriormente, los valores de CPM fueron nuevamente analizados con edgeR para obtener los valores de expresión diferencial, que se entregan en escala logarítmica y acompañados de un test estadístico *t-test*, que permite evaluar las variaciones entre las replicas biológicas. Además, debido a que el grupo de datos se somete a múltiples comparaciones estadísticas *t-test*, se calcula la probabilidad de que el resultado del *t-test* sea un falso positivo, obteniendo la tasa de descubrimiento de falsos positivos FDR, *False Discovery Rate* (Benjamini and Hochberg, 1995). FDR es un método estadístico que permite evaluar la cantidad de falsos positivos cuando, como ocurre en los perfiles transcriptómicos, existe una múltiple iteración del *t-test* y por lo tanto aumenta considerablemente la probabilidad de error de ese test (Storey and Tibshirani,

2003; Colquhoun, 2014). Finalmente, los valores de expresión diferencial fueron transformados desde escala logarítmica a escala lineal expresando las veces de cambio (VC) de los niveles de transcritos en los tratamientos de Sortin2 y NAA, respecto a la condición control (Figura 11), tanto en valores negativos como en valores positivos. Cuando los niveles de transcritos en un tratamiento son mayores que en la condición control, el valor VC es positivo. En el caso contrario, es decir, cuando los niveles de transcrito en un tratamiento son menores que en la condición control, el valor VC es negativo.

Para minimizar la frecuencia de falsos positivos entre los valores VC, se seleccionaron aquellos genes cuyo nivel de variación entre las réplicas biológicas arrojara un valor FDR ≤ 0.05 . Por otro lado, se descartaron aquellos genes que tienen menos de 5 lecturas empalmadas en un modelo génico, en cualquiera de las tres condiciones de tratamiento experimental. En respuesta a estos criterios se seleccionó 10.899 genes en el tratamiento con auxina y 4018 en el tratamiento con Sortin2.

Estos 10.899 y 4018 genes que fueron seleccionados bajo los criterios de expresión y confiabilidad del FDR, muestran distintas veces de cambio en sus niveles de expresión respecto al control. Algunos genes tienen un valor muy cercano a 1, es decir no cambian o cambian poco, mientras que otros genes tienen cambios sustanciales de varios cientos de veces (Figura 12 A). Cuando se filtró y cuantificó la cantidad de genes que supera un determinado valor absoluto de veces de cambio ($|VC|$), es decir sin considerar si es negativo o positivo, se pudo notar que a medida que aumenta el valor $|VC|$ que se usa como corte inferior del filtro, disminuye el número de genes que cumple con el requisito (Figura 12 A). En todos los cortes, de acuerdo al $|VC|$, el número de genes de respuesta a NAA es siempre superior al número de genes de respuesta a Sortin2 que supera el $|VC|$.

Los genes que cambian sus niveles de transcritos, respecto al control, en al menos 2 veces ($|VC| \geq 2$), fueron considerados genes diferencialmente expresados (DEG). Cada uno de los genes diferencialmente expresados (DEG) forman parte de uno de los siguientes dos grupos: (1) genes diferencialmente expresados de forma positiva (DEG+); definidos como aquellos que aumentaron sus niveles de transcrito, respecto al control, en al menos 2 veces, es decir, que mostraran un $VC \geq 2$ ó (2) genes diferencialmente expresados de forma negativa (DEG-); definidos como aquellos cuyos niveles de transcritos disminuyeron respecto al control, es decir, que mostraran un $VC \leq -2$. La tabla en la Figura 12 B, muestra que 1361 y 6408 son genes DEG, en respuesta a Sortin2 y NAA, respectivamente.

Auxina regula diversos procesos biológicos y se espera que respondan genes de diversas funciones que den cuenta del pleiotropismo de auxina. Algunos de esos genes no serían parte del perfil transcriptómico montado por Sortin2, generando una lista de genes específicos de NAA. Por otro lado, otros genes serían diferencialmente expresados solo en respuesta a Sortin2 y no en NAA. Esos genes podrían estar involucrados en la actividad inductora de las raíces laterales que Sortin2 posee, en especial si se considera que Sortin2 no es capaz de gatillar la señalización intracelular de auxina. Por último, otros genes, responderían tanto a Sortin2 como a NAA, y podrían ser aquellos que se requieren regular en mutantes insensibles a Sortin2 y NAA, en términos de las raíces laterales (ver sección 3.1.5.). Para obtener cuáles y cuántos son los genes cuyos niveles de transcrito son modificados (1) solamente por Sortin2 (2) solamente por NAA y (3) por ambos tratamientos, se realizó un análisis de sustracción diferencial, intersectando las listas de genes diferencialmente expresados en cada tratamiento. Entre los DEG+ ($VC \geq 2$) se encontraron 171 genes inducidos solamente por Sortin2, mientras que 3248 genes fueron inducidos solamente por NAA.

Así mismo, se encontraron 444 genes inducidos en ambos tratamientos (Figura 12 C). Entre los genes DEG- ($VC \leq -2$), se encontraron 182 genes reprimidos exclusivamente por Sortin2, 2152 genes reprimidos exclusivamente por NAA y 564 genes reprimidos por ambos estímulos (Figura 12 C).

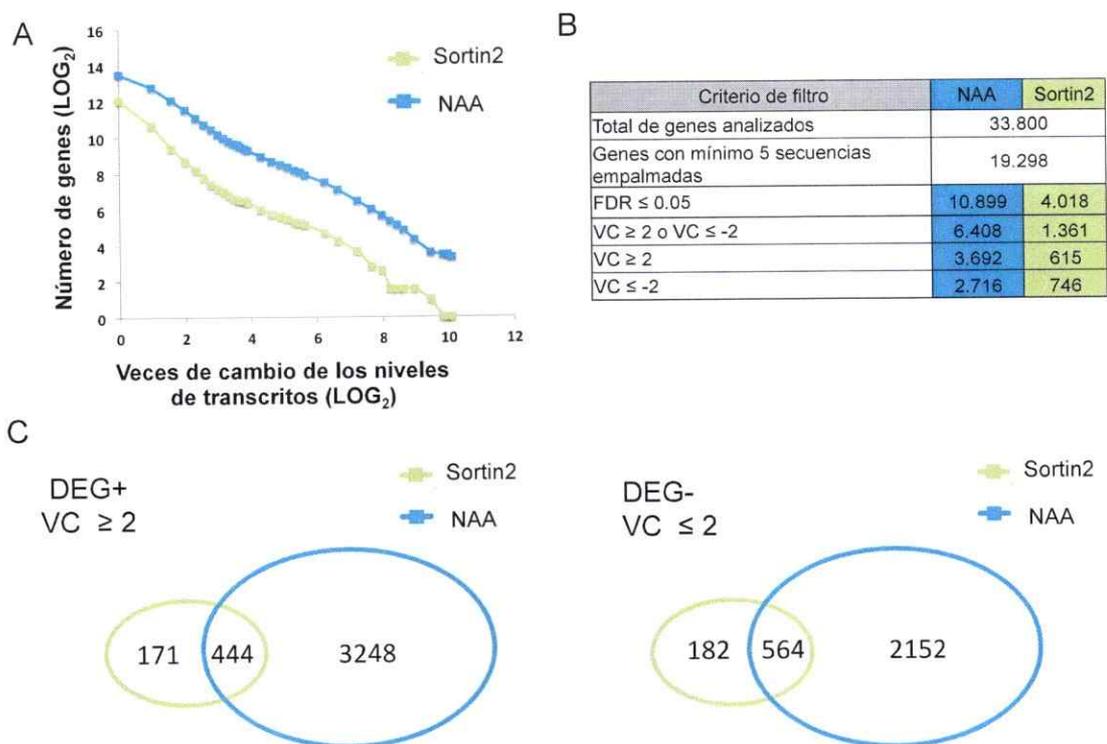


Figura 12. Análisis del perfil de expresión transcriptómico realizado mediante RNA-seq sobre raíces tratadas con Sortin2 ó NAA.

A. Gráfica de correlación entre el número de genes que supera un determinado valor veces de cambio de los niveles de transcritos [VC], para los genes de respuesta a los estímulos Sortin2 (verde) y NAA (azul).

B. Tabla resumen con los diferentes criterios de filtro durante el proceso de selección de genes diferencialmente expresados en respuesta a los tratamiento Sortin2 (verde) y NAA (azul), junto al número de genes obtenidos en cada etapa.

C. Diagramas de Venn representando la intersección entre los genes diferencialmente expresados positivamente (DEG+) y negativamente (DEG-) en respuesta a Sortin2 y a NAA.

3.2.6 Caracterización del perfil transcriptómico inducido por Sortin2 mediante cuantificación del enriquecimiento de procesos biológicos entre los genes diferencialmente expresados.

El análisis de caracterización de un perfil transcriptómico busca entender los procesos biológicos que subyacen al cambio transcripcional que induce un estímulo. Una estrategia para indagar sobre los procesos biológicos involucrados, es a través del análisis de la función biológica asociada a los genes que fueron modificados transcripcionalmente. La clasificación de ontología génica (GO, de *Gene Ontology* en inglés) es una forma de indexar sistemáticamente información acerca de los genes en relación a tres aspectos de su producto génico; (1) su función molecular, (2) su localización celular y (3) el proceso biológico en cuál participan (Boyle et al., 2004). La indexación se basa en el conocimiento adquirido por la comunidad científica usando evidencias que van desde la inferencia bibliográfica hasta la evidencia experimental (Werner, 2008). Es importante considerar que estos análisis tienen la restricción de analizar sólo los genes del genoma de *Arabidopsis* que están asociados a un término GO y que la asociación se basa en el conocimiento actual que la comunidad científica tiene para cada gen de esta especie.

Para obtener una vista amplia de cómo se representan los procesos biológicos entre los genes de respuesta a Sortin2 y NAA, decidimos categorizar los genes en función de sus términos GO (aspecto proceso biológico). Para esto, se usó la lista de términos GO Slim que corresponde a una lista de términos GO, seleccionada por miembros del consorcio GO, que incluye los procesos más importantes para poder obtener un panorama amplio de los cambios biológicos que subyacen a un determinado perfil transcriptómico (<http://geneontology.org/page/go-slim-and-subset>

guide).

Para evaluar la tasa de enriquecimiento de los procesos biológicos, se agruparon los genes a analizar de dos maneras distintas (Figura 13 A) En el primer análisis se analizaron dos grupos de genes, los DEG de respuesta a Sortin2 y los DEG de respuesta a NAA (Figura 13 A y Figura 14). En el segundo tipo de análisis, se utilizaron tres grupos de genes, que resultaron de la intersección de las listas de DEG en respuesta a Sortin2 y NAA (Figura 13 A y Figura 15). En ambos casos los genes DEG fueron analizados también, separando los genes DEG+ de los DEG-. La importancia del segundo tipo de análisis es que permite caracterizar funcionalmente a los DEG cuyos niveles de expresión varían en respuesta a ambos estímulos (Sortin2 y NAA), así como también a aquellos genes que responden exclusivamente frente a los estímulos Sortin2 ó NAA.

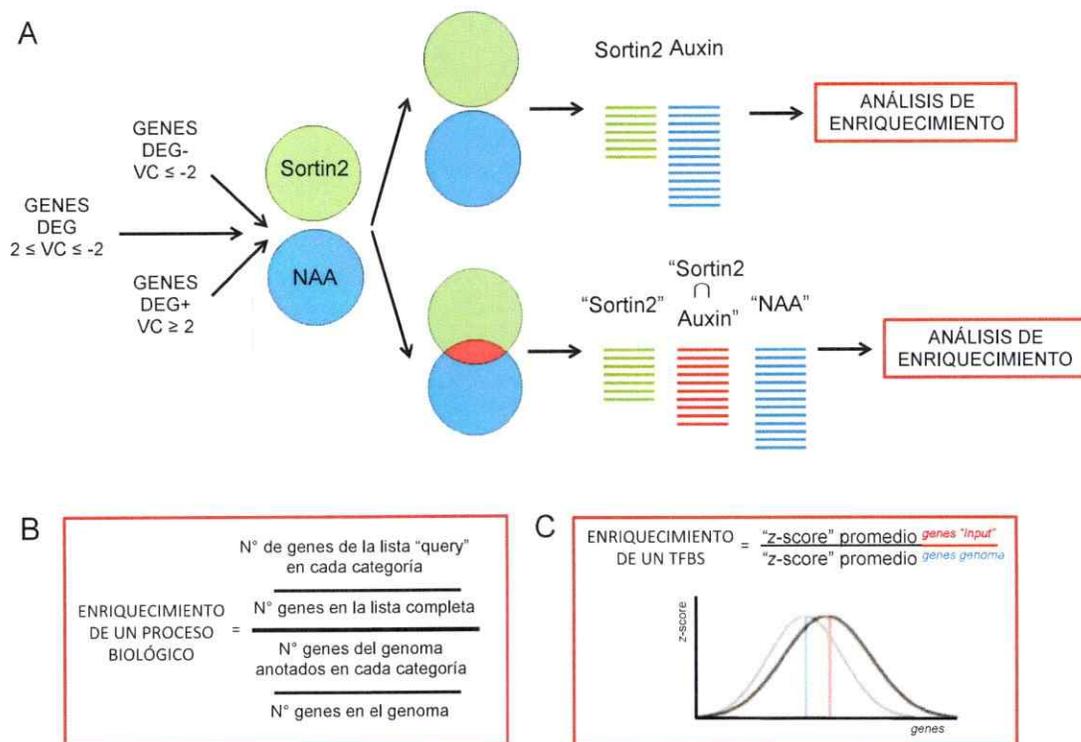


Figura 13. Diagrama de trabajo para el análisis de enriquecimiento de procesos biológicos y de sitios de unión de factores de transcripción (TFBS).

A. Genes diferencialmente expresados positiva y negativa, DEG+ y DEG-, respectivamente, fueron enlistados y sometidas a un análisis de enriquecimiento de procesos biológicos y de sitios de unión de factores de transcripción (*arriba*). Alternativamente, las listas de genes fueron intersectadas generando un tercer grupo de genes a partir de la intersección, y posteriormente fueron sometidas a análisis de enriquecimiento de procesos biológicos y de sitios de unión de factores de transcripción (*abajo*). Cada uno de los miembros dentro de estos tres grupos de genes; Sortin2, Auxina y Sortin2 \cap Auxina. La tasa de enriquecimiento para los procesos biológicos analizados, en cada uno de los grupos de genes analizados, se calculó con la fórmula en A.

B. Formula para calcular la tasa de enriquecimiento de cada uno de los términos GO - procesos biológicos que fueron analizados.

C. Formula para calcular la tasa de enriquecimiento de los sitios de unión de factores de transcripción que fueron analizados.

La categorización de los genes en base a sus términos GO permitió el cálculo de un parámetro de enriquecimiento para cada proceso biológico, dentro del grupo de genes se quiere analizar. El enriquecimiento se obtuvo mediante la comparación de la frecuencia de aparición de un determinado GO en los genes a analizar en relación a la frecuencia encontrada en todo el genoma (Figura 13 B). Una tasa de enriquecimiento mayor a 1, indica que un proceso biológicos está sobre-representado entre los genes analizados. Contrariamente, enriquecimiento menor a 1 muestra una sub-representación del proceso biológico entre los genes analizados.

En la Figura 14, se muestran los resultados del primer análisis; la tasa de enriquecimiento de los procesos biológicos entre los genes DEG, DEG- y DEG+ en respuesta a Sortin2 y a NAA. Se observaron diferentes comportamientos entre los procesos. Algunos procesos biológicos fueron sobre o sub-representados exclusivamente entre los genes de respuesta a Sortin2 y no entre los genes de respuesta a NAA, otros procesos biológicos mostraron un resultado inverso. Otros procesos biológicos fueron sobre o sub-representados en el mismo sentido tanto entre los genes de respuesta a Sortin2 como entre los genes de respuesta a NAA. El orden en la gráfica de los diferentes procesos biológicos en la Figura 14, fue establecido de acuerdo al valor de la tasa de enriquecimiento que alcanzaron entre los DEG+ en respuesta a Sortin2

Los procesos biológicos más enriquecidos, entre los DEG+ en respuesta a Sortin2, son los procesos "transporte" y "respuesta a estímulos bióticos". Interesantemente, este enriquecimiento es exclusivo para los genes de respuesta a Sortin2, ya que esos dos procesos no están enriquecidos entre los genes de respuesta a NAA (Figura 14 A). Por otro lado, los procesos biológicos más enriquecidos, entre los genes DEG+ de respuesta a NAA, son "procesos metabólicos de DNA", "ciclo celular" y

"traducción". Mientras el primer proceso mantiene una tasa de enriquecimiento igual a 1 entre los genes de respuesta a Sortin2, los otros dos procesos son sub-representados entre los genes de respuesta a Sortin2. Estos datos en conjunto sugieren que los genes de respuesta a Sortin2 y a NAA del tipo DEG+, están conformados por genes que se asocian a procesos biológicos muy diferentes mostrando una completa segregación entre sí.

Otros procesos biológicos entre los DEG+ alcanzan niveles muy similares de enriquecimiento, ya sea para los genes en respuesta a Sortin2 como en respuesta a NAA. Este es el caso para los procesos biológicos "procesos catabólicos" y "respuesta a estímulos abióticos", los que presentaron valores de enriquecimiento cercanos a 1, sugiriendo que los genes participantes en estos procesos biológicos no son parte sobre o sub-representada de la respuesta biológica, en nuestras condiciones experimentales, ni de Sortin2 ni de NAA.

En el análisis con los genes diferencialmente expresados negativamente, DEG-, se puede observar que las tasas de enriquecimiento son menores, para algunos procesos biológicos, comparado con lo obtenido entre los DEG+. Algunos de estos procesos biológicos son "procesos metabólicos de DNA", "ciclo celular" y "traducción", que se encuentran altamente sub-representados entre los genes DEG- de respuesta a NAA, contrariamente a lo observado entre los genes DEG+ donde están altamente sobre-representado (comparar Figura 14 A y Figura 14 B). En otros procesos ocurre el caso contrario donde el enriquecimiento es mucho mayor entre los genes DEG- que entre los DEG+, como ocurre con los procesos "diferenciación celular", "procesos metabólicos secundarios", "crecimiento" y "crecimiento celular" tanto para los genes de respuesta a Sortin2 como de respuesta a NAA.

Algunos procesos biológicos destacables son aquellos que están más sobre-

representados en DEG+ en Sortin2 que en auxina, como “diferenciación celular”, “crecimiento celular” y “morfogénesis de la estructura anatómica”, y que tienen directa relación con aquellos procesos biológicos necesarios para la formación de una raíz lateral y sugiriendo que son parte del mecanismo transcriptómico que efecto de Sortin2 en la formación de las raíces laterales

La exclusividad con la que se ven representados ciertos procesos biológicos dependiendo de qué genes se analizan; genes de respuesta a Sortin2 o genes de respuesta a NAA, refuerzan la idea de que los perfiles transcriptómicos que monta la planta en respuesta a estos estímulos, es diferente. Además, daría cuenta de las diferencias con en el cuál actuarían estos dos estímulos exógenos, Sortin2 y NAA, en términos de la actividad transcripcional de pDR5 (Figura 4). Por esto, es importante un análisis de intersección entre los genes de respuesta, donde existe un grupo importante de genes que responden exclusivamente a Sortin2 ó a NAA.

En la Figura 15, se muestra la tasa de enriquecimiento de los procesos biológicos entre los genes DEG, DEG- y DEG+, que pertenecen a los tres grupos de genes que resultan de la intersección entre los genes de respuesta a Sortin2 y a NAA. Los tres grupos génicos son denominados (2) “Sortin2”, para aquellos que modifican sus niveles de transcritos en tratamientos con Sortin2 y no con NAA (3) “NAA”, para aquellos que modifican sus niveles de transcritos en tratamientos con NAA y no con Sortin2 y (4) “Sortin2 \cap NAA”, para aquellos que modifican sus niveles de transcritos en tratamientos con NAA y con Sortin2. Los datos fueron ordenados en función del enriquecimiento que se obtuvo con el grupo de genes “Sortin2” (Barras verdes en Figura 15).

En la Figura 15 A, en los genes diferencialmente expresados de forma positiva DEG+, , se puede apreciar que los procesos biológicos “respuesta a estímulos



bióticos", "respuesta a estímulos externos", "transducción de señal", "comunicación celular", "procesos metabólicos secundarios" y "respuesta a estrés", se sobre-representan en el grupo de genes "Sortin2" (barras verdes en Figura 15 A), pero tienen tasas de enriquecimiento cercanas a 1 entre los genes "NAA" y "Sortin2 \cap NAA" (barras azul y rojas en la Figura 15 A, respectivamente). Por otro lado, entre los genes DEG+, se sobre-representan, entre el grupo de genes "NAA", procesos biológicos como "ciclo celular", "traducción", "procesos metabólicos de DNA", "procesos metabólicos de proteína" y "procesos de modificación de proteínas celulares". En resumen, los genes DEG+ que pertenecen al grupo "Sortin2" sobre-representan ciertos procesos biológicos que son completamente diferentes a los sobre-representados entre los genes DEG+ del grupo "NAA".

En general, para la mayoría de los procesos biológicos, se ve una disminución en las tasas de enriquecimiento encontradas entre los genes DEG- respecto a los descrito entre los genes DEG+, tanto para los genes "NAA", "Sortin2" como "Sortin2 \cap NAA" . Sin embargo, en algunos procesos biológicos ocurre algo diferente. En particular, es notorio lo que ocurre con los procesos biológicos "diferenciación celular", "crecimiento", "crecimiento celular" y "morfogénesis de la estructura anatómica". Todos estos procesos tuvieron tasas de enriquecimiento muy cercanas a 1 entre los genes DEG+ de las tres listas, pero alcanzan tasas de enriquecimiento de 2-3, entre los genes DEG- en la lista "Sortin2 \cap NA". Es muy notorio que las tasas más altas de enriquecimiento en estos procesos biológicos se alcanzan entre los genes "Sortin2 \cap NAA", es decir aquellos genes que modifican sus niveles de transcritos frente a los dos estímulos Sortin2 y NAA.

En resumen, el análisis del perfil transcriptómico en respuesta a Sortin2 y NAA, permitió recabar importante información acerca del efecto de Sortin2 en la planta. Entre esta información se destaca que: (1) los cambios en los niveles de transcritos generadas por los estímulos Sortin2 y NAA no solo son diferentes en el número de genes que modifica (como se revisó en la sección 3.2.5), sino que además, también son diferente en términos de los procesos biológicos en los que participan estos genes. (2) el cambio transcripcional común entre Sortin2 y NAA se relaciona con procesos que pueden estar altamente ligados a la formación de las raíces laterales como la "diferenciación celular" y la "morfogénesis de la estructura anatómica"

3.2.7 Caracterización del perfil transcriptómico inducido por Sortin2 mediante el enriquecimiento de sitios de unión de factores de transcripción en la región reguladora de los genes diferencialmente expresados.

El primer paso para establecer una determinada expresión génica es mediada por los factores de transcripción (FT). Los FT se unen a secuencias definidas de 6-14 nucleótidos en la región reguladora de sus genes blancos definiendo un TFBS (del inglés, *transcription factor binding site*). Los TFBS pueden presentar cierta variabilidad soportando mutaciones en el DNA sin alterar la especificidad FT-gen blanco. La variabilidad en la secuencia de los TFBS se expresa mediante matrices de probabilidad de ocurrencia de las diferentes secuencias TFBS que han sido experimentalmente identificados y enlistados en bases de datos (Wasserman and Sandelin, 2004). Así, es posible calcular *in silico* la probabilidad de la presencia de un determinado TFBS en la región reguladora de un gen (Stormo, 2000).

Para indagar acerca de la red de regulación transcripcional que se establece en respuesta a Sortin2, se realizó un ensayo de enriquecimiento de TFBS y se mantuvo la perspectiva comparativa respecto a NAA. Se analizaron los grupos de genes que resultan de la intersección de los genes de respuesta a Sortin2 y NAA, es decir los grupos de genes denominados "Sortin2", "NAA", y "Sortin2 \cap NAA" (Figura 13 A). El análisis se realizó tanto para los genes DEG- como DEG+. Para este propósito se utilizó la herramienta PSCAN que reconoce como *input* a un set de genes que comparten una característica funcional, regulación o expresión común (Zambelli et al., 2009).

PSCAN calcula un puntaje que describe la probabilidad de obtener un TFBS en la región promotora definida como los 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (TSS) para cada set de genes que está bajo análisis. Un análisis de la

distancia a la que se encuentran los TFBS respecto de los TSS para cada gen podría ser muy informativo, ya que existe una mayor tendencia a encontrar más elementos de regulación funcionalmente más importantes en zonas más cercanas al TSS que en zonas más alejadas (Shen and Ho, 1995; Wasserman and Sandelin, 2004). En base a esta información se puede generar un buen filtro que permita priorizar un posterior estudio *in vivo* de la funcionalidad de estos TFBS. Sin embargo, también es importante considerar que es probable que exista mayor evidencia de elementos funcionales de *cis*-regulación en las proximidades del TSS simplemente porque se busca con más frecuencia en esa zona. (Wasserman and Sandelin, 2004; Mathelier et al., 2015a).

El puntaje obtenido en PSCAN se comparó con lo que se obtuvo usando los promotores de todos los genes del genoma, entregando un valor de sobre o sub-representación para el grupo de genes que fue co-regulado. El análisis fue realizado para todos los TFBS de *Arabidopsis thaliana* que se encuentran en la base de datos de TFBS de JASPAR (Mathelier et al., 2014).

En la Figura 16 se observan los valores z-score que representan la probabilidad de encontrar un determinado TFBS en la región promotora de cada uno de los tres grupos de genes que están siendo analizados. Un z-score positivo significa una sobre-representación de aquél TFBS entre la región promotora de los genes *input*. Un z-score negativo significa una sub-representación de aquél TFBS entre la región promotora de los genes *input*.

Interesantemente, entre los genes DEG+ (Figura 16 A), se puede observar una importante segregación de aquellos TFBS que estarían sobre-representados entre los genes "Sortin2", respecto a aquellos TFBS que estarían enriquecidos entre los genes "NAA". Así, los TFBS de los factores de transcripción TGA1, ZAP1, HAT5 y SEP4 están sobre-representados entre los promotores de los genes "Sortin2", pero están

sub-representados entre los promotores de los genes "NAA" (Figura 16 A). Contrariamente, los TFBS de los factores de transcripción ERF1, FHY3 y TCP16 y CDC5, están sobre-representados entre los promotores de los genes "NAA", pero están sub-representados entre los promotores de los genes "Sortin2" (Figura 16 A).

Los enriquecimientos de los TFBS en la región promotora de los genes DEG- presentó un comportamiento diferente al observado entre los genes DEG+ (comparar Figura 16 A y B). En el análisis de la región promotora de los genes DEG-, se observó que la mayoría de los TFBS están sobre representados entre los genes "Sortin2" y también entre los genes "NAA" y "Sortin2 \cap NAA". Se observan notables excepciones a ese comportamiento con los TFBS AtMYB15 y ATMYB84, los cuáles se observan sobre-representados entre los genes "NAA", pero se encuentran sub-representados entre los otros dos grupos de genes (Figura 16 B).

La probabilidad que la sobre-representación de cada TFBS sea un falso positivo se evalúa mediante un test estadístico, entregando un *p-value*, que calcula la probabilidad de obtener el mismo resultado en base a un set de genes que se escoge aleatoriamente (Zambelli et al., 2009). Se seleccionaron aquellos TFBS con un *p-value* < 0.01, lo que implicaría que 1 de cada 100 TFBS analizados puede ser un falso positivo. Este filtro entregó una lista de TFBS con una alta probabilidad de encontrarse enriquecidos entre los promotores de los genes de los grupos génicos analizados sin que el resultado sea un falso positivo. Por lo tanto, entrega fuerte evidencia bioinformática para establecer hipótesis biológica acerca de cuáles podrían ser los reguladores transcripcionales de estos genes.

La lista de TFBS seleccionados para cada uno de los distintos grupos génicos fueron intersectadas entre sí, revelando que existen 16 TFBS, entre los genes DEG-, mientras que no existen TFBS, entre los genes DEG+, que se encuentran enriquecidos

en la región promotora de los tres grupos génicos analizados anteriormente (Tabla V - I). En la Tabla V - II y III se muestran los valores de *z-score* y de *p-value* para los TFBS que resultan del análisis de intersección.

En análisis de enriquecimiento de TFBS sugiere que existen factores comunes en la regulación que se establece para disminuir los niveles de transcritos en respuesta a Sortin2 y a NAA. Mientras que las herramientas moleculares usadas para establecer un aumento de los niveles de transcritos difiere notablemente entre Sortin2 y NAA.

La identificación de TFBS permite plantear válidas hipótesis biológicas que pueden ser experimentalmente probadas con posterioridad (Wasserman and Sandelin, 2004). Sin embargo, es importante considerar que la presencia de un TFBS en una región reguladora es una probabilidad y no una certeza, de encontrar un elemento funcional de cis-regulación. Está bien identificado que se deben conjugar otros fenómenos para controlar la expresión génica como la concertación de varios elementos de trans-regulación, la conformación de la cromatina, las modificaciones post-traduccionales de histonas, etc (Mathelier et al., 2015b). Todos estos elementos promueven la utilización de estrategias experimentales *in vivo* o *in vitro* en etapas posteriores a esta identificación *in silico*.

Es importante mencionar que la búsqueda *in silico* de TFBS realizada en esta tesis puede ser complementada con la identificación de pares o grupos de TFBS en la región promotora de un determinado gen. Esto es importante porque la expresión de ciertos genes es comandada por co-ocurrencia de TFs, es decir cuando dos o más factores de transcripción actúan de manera concertada en la región reguladora de un gen (Wasserman and Sandelin, 2004). Mediante análisis de co-ocurrencia de TFBS se podrían obtener qué pares o grupos de factores de transcripción serían necesarios para determinar la regulación transcripcional de determinados genes de interés. La

herramienta PlantPAN permitiría evaluar la co-ocurrencia de dos o más factores de transcripción en una misma región reguladora (Chang et al., 2008).

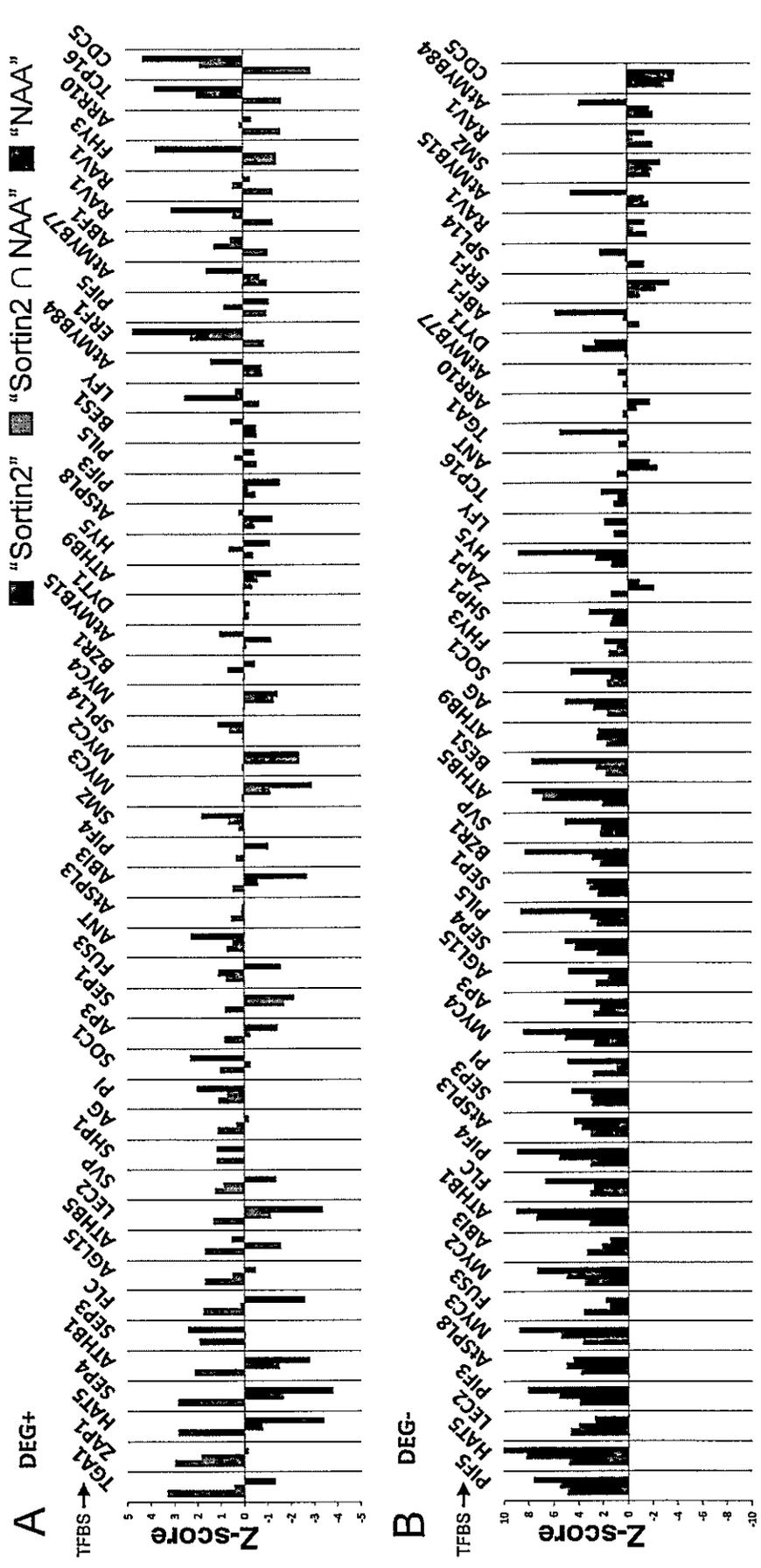


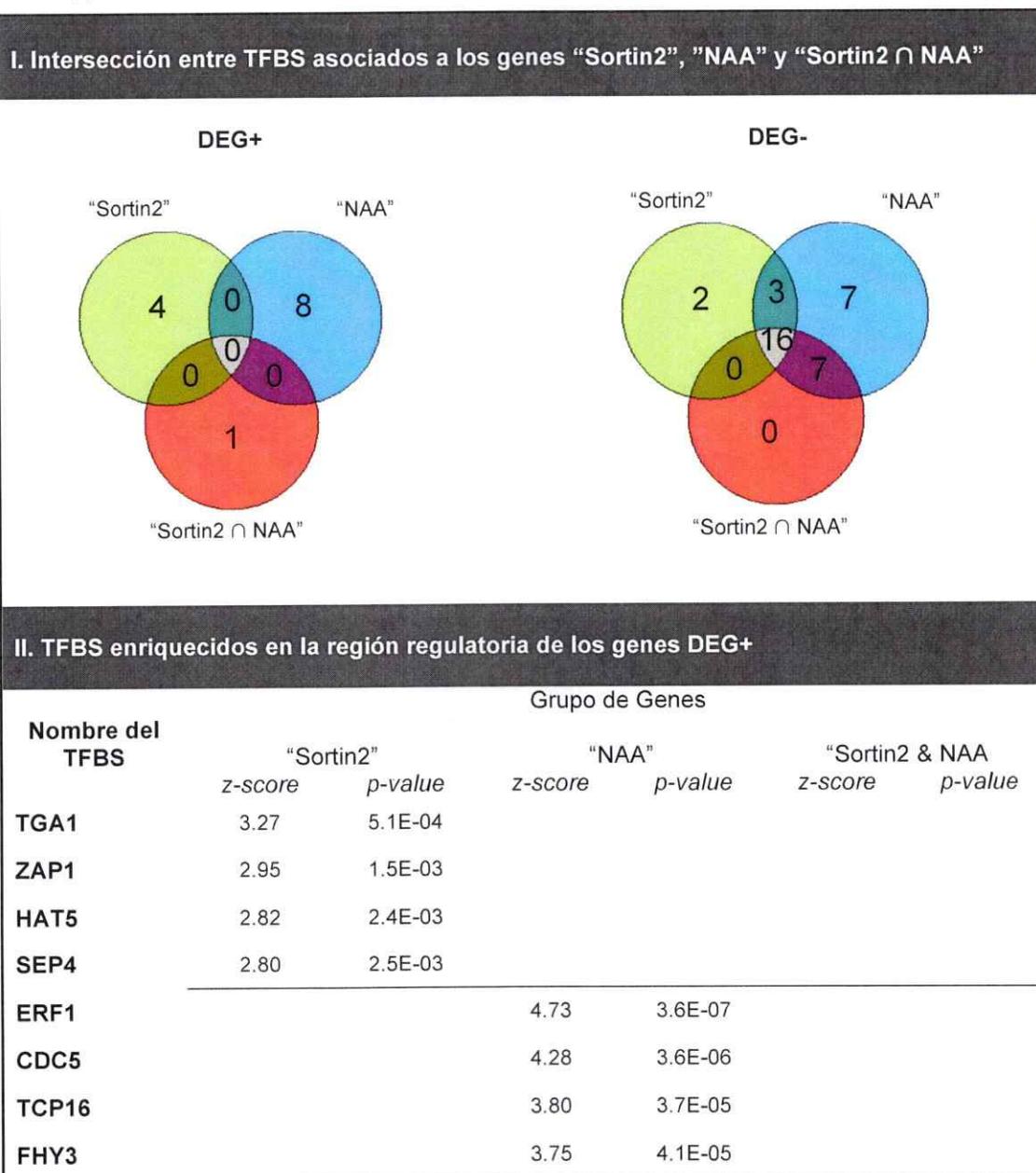
Figura 16. Enriquecimiento de sitios de unión de factores de transcripción (TFBS) en la región regulatoria de genes diferencialmente expresados en respuesta a Sortin2, en respuesta a NAA y en respuesta tanto a Sortin2 como a NAA

Los grupos de genes que resultan de la intersección entre los genes de respuesta a Sortin2 y a NAA, es decir, "Sortin2" (verde) y "NAA" (azul) y "Sortin2 ∩ NAA" fueron sometidos a análisis de enriquecimiento de los sitios de unión de factores de transcripción en su región promotora (1000 pb) mediante la herramienta informática PSCAN (Zambelli et al., 2009). El enriquecimiento es calculado en referencia a la frecuencia de ocurrencia de un determinado sitio de unión de factores de transcripción (TFBS) en los promotores de todos los genes del genoma (Figura 13 C). El análisis es realizado sobre (A) los genes diferencialmente expresados de forma positiva, DEG+ y (B) los genes diferencialmente expresados de forma negativa, DEG-.

Tabla V. Lista de los TFBS que son identificados en la región reguladora de los genes "Sortin2", "NAA" y "Sortin2 \cap NAA" con un *p-value* < 0.01.

Sección I, presenta un diagrama de Venn que intersecta los TFBS que resultaron del análisis de cada una de las tres listas de genes, tanto para los genes DEG- como los DEG+.

Sección II y III, presenta la lista con el nombre y su valor de enriquecimiento asociado (*z-score*) para cada uno de los TFBS que es utilizado en el diagrama de Venn de la sección I.



RAV1 (var.2)	3.08	6.1E-04		
SEP3	2.40	5.9E-03		
SOC1	2.31	7.8E-03		
ANT	2.28	8.4E-03		
LFY			2.53	5.5E-03

III. TFBS enriquecidos en la región regulatoria de los genes DEG-

Nombre del TFBS	Grupo de Genes					
	"Sortin2"		"NAA"		"Sortin2 & NAA"	
	<i>z-score</i>	<i>p-value</i>	<i>z-score</i>	<i>p-value</i>	<i>z-score</i>	<i>p-value</i>
FUS3	3.52	2.1E-04				
ABI3	3.29	4.8E-04				
ABF1			5.79	9.3E-10		
TGA1			5.38	1.3E-08		
SVP			5.09	7.5E-08		
AtMYB15			4.55	1.3E-06		
SOC1			4.55	1.3E-06		
AtMYB84			3.91	2.5E-05		
SHP1			3.08	7.3E-04		
PI	2.82	2.4E-03			4.87	2.5E-07
AP3	2.72	3.2E-03			5.08	8.2E-08
AGL15	2.57	4.9E-03			4.83	3.2E-07
ATHB5			6.89	1.9E-12	7.70	8.7E-16
DYT1			3.54	1.8E-04	2.63	3.3E-03
BZR1			2.92	1.6E-03	8.32	3.5E-18
AG			2.76	2.7E-03	4.99	1.3E-07
HY5			2.55	5.0E-03	8.78	4.2E-20
BES1			2.55	5.0E-03	7.74	6.6E-16
ATHB9			2.49	6.1E-03	2.36	7.4E-03
PIF5	4.82	6.6E-07	5.47	1.7E-08	7.58	2.4E-15
HAT5	4.75	1.0E-06	8.15	1.3E-16	10.56	1.1E-27
LEC2	4.57	2.2E-06	3.93	3.6E-05	2.73	2.4E-03
PIF3	3.91	4.4E-05	5.56	1.0E-08	8.03	5.2E-17
AtSPL8	3.81	6.6E-05	4.97	2.8E-07	4.40	2.8E-06
MYC3	3.57	1.7E-04	5.39	2.8E-08	8.78	6.0E-20
SEP4	2.46	6.7E-03	4.27	8.5E-06	5.06	9.5E-08
PIL5	2.45	7.0E-03	3.01	1.2E-03	8.62	2.3E-19
SEP1	2.43	7.5E-03	3.10	8.8E-04	3.31	3.2E-04
MYC2	3.45	2.7E-04	4.97	2.7E-07	7.30	2.5E-14

ATHB1	3.09	9.8E-04	7.38	5.1E-14	8.94	1.3E-20
FLC	3.04	1.2E-03	2.75	2.8E-03	6.67	3.0E-12
PIF4	3.02	1.2E-03	5.54	1.1E-08	8.89	2.0E-20
AtSPL3	2.97	1.4E-03	3.77	7.4E-05	4.36	3.6E-06
SEP3	2.88	1.9E-03	3.05	1.1E-03	4.56	1.4E-06
MYC4	2.77	2.7E-03	5.07	1.6E-07	8.44	1.6E-18

3.2.8 Identificación de componentes moleculares que participarían en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2 mediante jerarquización piramidal.

Para poder seleccionar componentes moleculares que puedan ser propuestos como participantes en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2, se procedió a realizar una jerarquización piramidal en base a diferentes consideraciones sustentadas en los resultados de esta tesis.

La estrategia de jerarquización piramidal, se realizó en varios pasos consecutivos (Figura 17 A). En el paso (1) se descartaron los genes que tuvieran menos de 5 lecturas identificadas en el análisis de RNA-seq. En el paso (2), se seleccionaron aquellos genes cuya expresión diferencial obtenida tuviera una baja probabilidad de ser falsos positivos ($FDR \leq 0.05$). En el paso (3) se seleccionaron los genes cuyos niveles de transcritos se indujeron al menos dos veces en respuesta a Sortin2, es decir los genes DEG+ en respuesta a Sortin2. Con esto se obtuvo alrededor de 615 genes. Se focalizó todo el interés en los genes (DEG+) por dos razones. Primero, los procesos biológicos asociados a los genes DEG+, en respuesta a Sortin2 y a NAA, segregan más fuerte y notoriamente, que los procesos biológicos asociados a los DEG- (Figura 14 y Figura 15). Segundo, los resultados con los TFBS entre los DEG+ sugieren vías de regulación transcripcional segregadas para montar las.

respuestas transcripcionales frente a Sortin2 a NAA, lo que no sucede entre los genes DEG- (Figura 16 y Tabla V - I). En el paso (4) se focalizó el interés en los genes cuyos niveles de transcritos cambiaron exclusivamente en respuesta a Sortin2 y no en respuesta a NAA. Por lo tanto, manteniendo la atención en la respuesta transcripcional a Sortin2, se sustrajeron aquellos genes que además de ser diferencialmente expresados en Sortin2, también fueron diferencialmente expresados en respuesta a NAA con un $VC \geq 2$. Se obtuvieron 171 genes como resultado, los cuales son genes cuyos niveles de transcritos aumentan en respuesta a Sortin2 y no en respuesta a NAA. En el paso (5), se decidió focalizar nuestra atención en el potencial regulatorio que habría dentro de los 171 genes regulados específicamente por Sortin2. Se consideró para focalizarse en la función biológica "regulación transcripcional" la evidencia recabada dentro de los 40 primeros genes diferencialmente expresados, ya que un 12.5% eran reguladores de la transcripción. De esta manera se seleccionaron los 15 genes, dentro de la lista, que poseían alguna función regulatoria de la transcripción de acuerdo a las anotaciones de función biológica de la base de datos de TAIR.

Cuando se analizaron los niveles de expresión para estos 15 genes, que se capturaron mediante RNA-seq, se observó que 8 reguladores transcripcionales tienen un nivel de expresión que supera el umbral inferior 20 CPM (Figura 17 B). En el paso (6) se filtró de acuerdo a este valor umbral de 20 CPM como un nivel mínimo de expresión que es considerado en la comunidad informática como adecuado para poder obtener un impacto biológico morfológicamente detectable, mediante ensayos genéticos con mutantes pérdida de función. Por último, con la perspectiva de analizar mediante herramientas genéticas la relevancia de estos genes en la formación de las

raíces laterales en respuesta a Sortin2, se obtuvo un total 7 genes cuyas mutantes insercionales están disponibles en el banco de semillas ABRC, al momento del análisis en Noviembre del 2014.

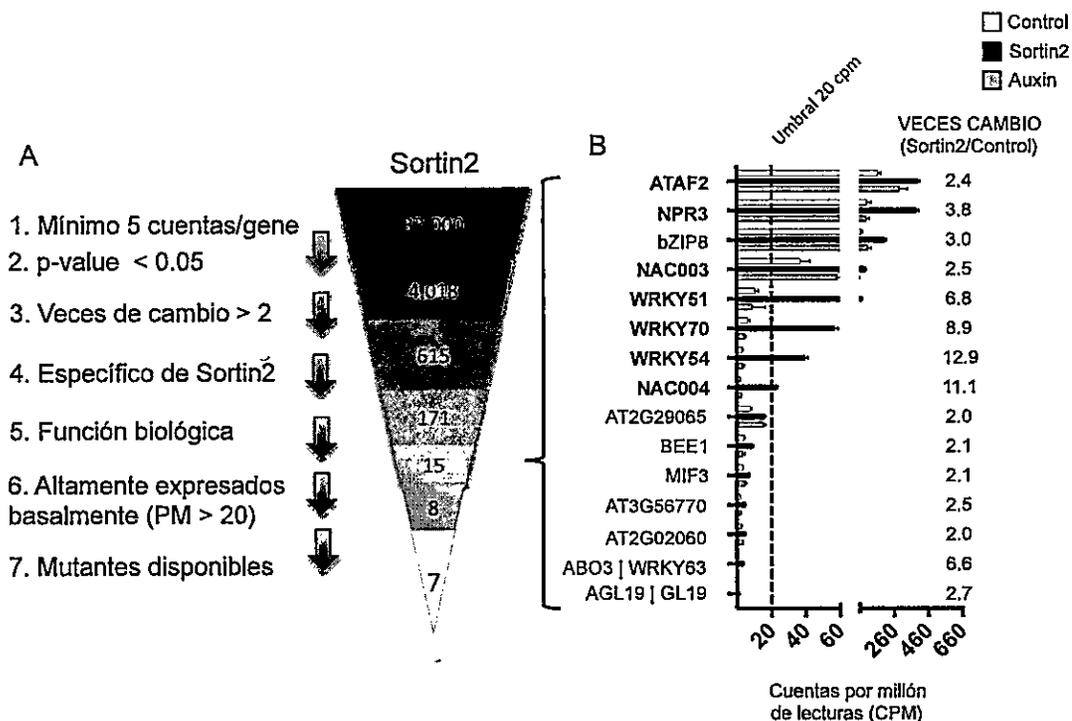


Figura 17. Identificación de componentes moleculares que participarían en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2.

A. Etapas del filtrado de genes que permita identificar mediadores moleculares de la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2.

B. Niveles de expresión obtenidas por RNA-seq de los 15 genes reguladores transcripcionales que fueron seleccionados mediante los filtros descritos en A. La barra segmentada permite distinguir los genes que alcanzan niveles superiores a los 20 CPM. Destacado en negro se presentan a los genes que tienen mutantes insercionales disponibles en ABRC

3.2.9 Validación mediante qRT-PCR de los resultados del perfil transcriptómico global por RNA-seq.

Los resultados del RNA-seq podría identificar genes que participarían en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2 y por lo tanto, servirán de apoyo para futuros estudios de caracterización funcional. Entonces, es altamente necesario validar que la información que deriva de los resultados del RNAseq es fidedigna y reproducible. La validación de la fidelidad los resultados obtenidos por RNA-seq, se realizó utilizando qRT-PCR, para comprobar las veces de cambio de los niveles de transcritos para una población de genes de interés. Se implementó en nuestro laboratorio una repetición al experimento realizado para el RNA-seq. Se comprobó, la fidelidad y la reproducibilidad de los resultados. Para ello, se realizó en ensayo de qRT-PCR en nuestro laboratorio, utilizando muestras obtenidas en las mismas condiciones experimentales utilizadas en el laboratorio del Dr. Beeckman, donde se prepararon las muestras para el experimento RNA-seq. Además, se comprobó la reproducibilidad de los fenotipos obtenidos en nuestro laboratorio en esta réplica experimental, con respecto a los obtenidos en el laboratorio del Dr. Beeckman.

La validación de los datos de RNA-seq mediante qRT-PCR, se realizó sobre 15 genes en total. Se escogieron 7 que cambian sus niveles de transcrito con $VC \geq 2$, en respuesta a Sortin2 y que fueron identificados como genes interesantes a partir del análisis expuesto en la Figura 17. También se incluyeron 4 genes que no cambian sus niveles de transcrito, es decir que poseen un $VC \leq 2$, pero que están funcionalme relacionados con los genes que cambian: TGA1, TGA4, NPR1, NPR4. Finalmente, se incluyeron también 4 genes de referencia para el proceso de normalización de los

datos obtenidos mediante el ensayo qRT-PCR.

Para evitar subestimaciones de los niveles de transcritos mediante qRT-PCR, la literatura recomienda comprobar la linealidad que debe existir entre la cantidad de templado y los valores del ciclo en donde se supera la fluorescencia de fondo en la curva de amplificación (valores de Ct), obtenidos en cada reacción (Nolan et al., 2006; Udvardi et al., 2008). Este se conoce como comprobación de la linealidad del rango dinámico del ensayo de qRT-PCR (Nolan et al., 2006). Para realizar esto, primero se determinó qué genes debían ser amplificados para comprobar esta linealidad. Se buscó dentro de los 11 genes a validar, aquél con los niveles de transcritos más bajos dentro del grupo (WRKY63), aquél gen con los nivel más altos de transcritos (TGA1) y dos genes adicionales sintermedios (WRKY54 y WRKY70), como se puede observar en la Figura 18 A.

Los resultados de los ensayos de qRT-PCR amplificando los genes WRKY63, TGA1, WRKY54 y WRKY70 con cantidades de templados que variaron desde 0,05 hasta 5 ng de cDNA, se muestran resumidos en la tabla de la Figura 18 B. Los datos son analizados mediante gráficos de dispersión entre los valores de Ct y la cantidad de templado (\log_2 (cDNA)) utilizada en cada reacción (Figura 18 C). La regresión lineal que se realiza con estos datos muestran valores para el coeficiente de correlación R^2 superior a 0.98 para los cuatro genes analizados. Estos resultados demuestran que existe linealidad entre la cantidad de cDNA, para el rango entre 0.05 y 5 ng, y el valor de Ct obtenido mediante qRT-PCR. A partir de esto se decidió realizar los experimentos con 2,5 ng de cDNA como cantidad de templado a utilizar en cada reacción de qRT-PCR.

Las veces de cambio de los niveles de transcrito en respuesta a Sortin2 y a NAA, muestran la misma tendencia de cambio cuando son analizados por qRT-PCR

respecto a lo obtenido mediante RNA-seq, para los 15 genes analizados (Figura 19). Los 7 genes en la Figura 19 A fueron seleccionados porque cambiaron sus niveles de transcritos en respuesta a Sortin2 y no en NAA, según los datos de RNA-seq (Figura 17). Esta premisa de cambiar sus niveles de transcritos frente a Sortin2 y no a NAA, se mantiene cuando los niveles de transcritos se evalúan mediante qRT-PCR (Figura 19 A).

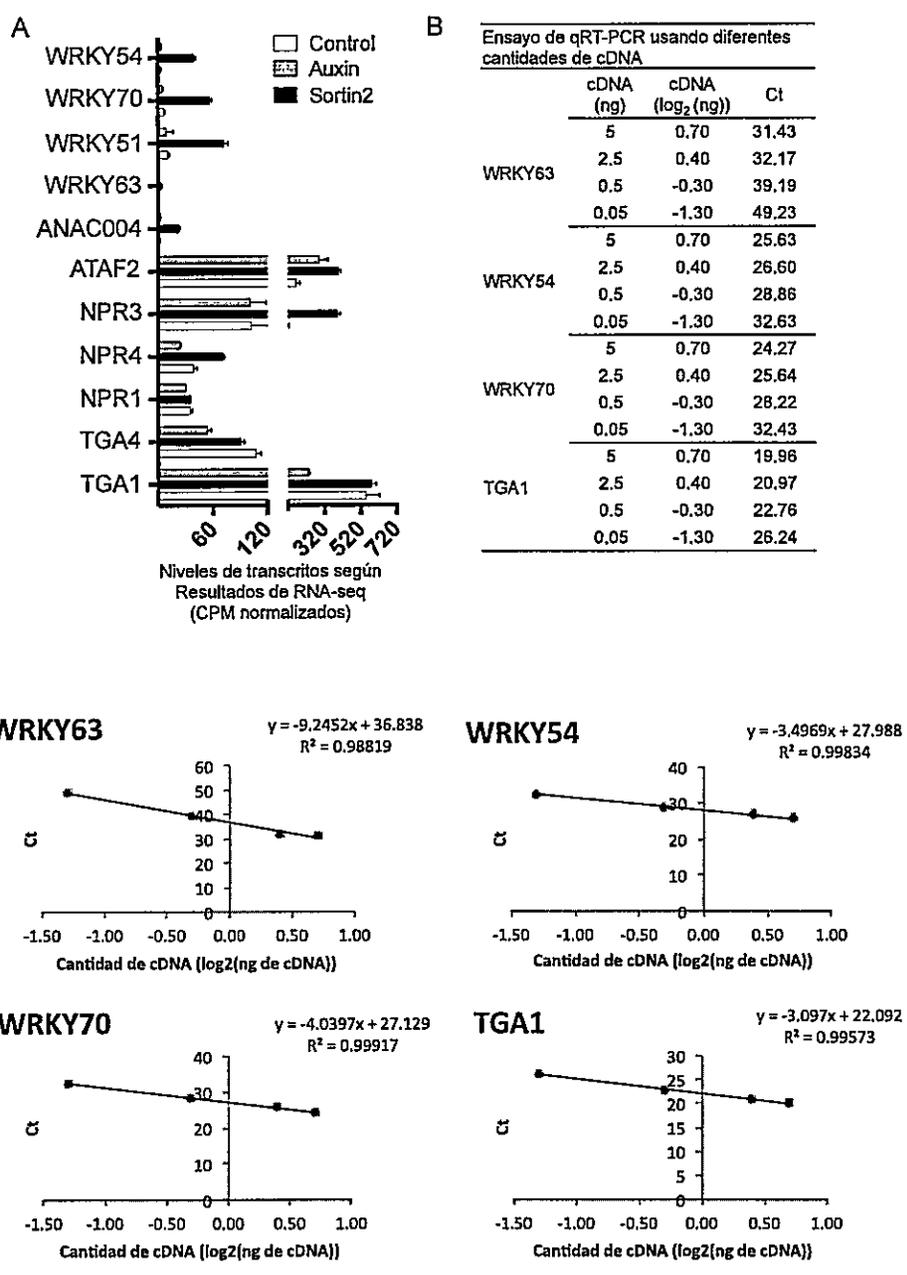


Figura 18. Comprobación de la linealidad del rango dinámico de la reacción de qRT-PCR.

A. Niveles de expresión en unidades de cuentas por millón normalizadas obtenidas mediante RNA-seq, de los 11 genes utilizados para la validación mediante qRT-PCR de los resultados obtenidos por RNA-seq

B. Tabla resumen de los resultados de los ensayos de qRT-PCR amplificando los genes

WRKY63, TGA1, WRKY54 y WRKY70 con cantidades de templados que variaron desde 0,05 hasta 5 ng de cDNA.

C. Gráficos de dispersión mostrando los valores de Ct y de cantidad de cDNA de acuerdo a los datos de la tabla en (B). El coeficiente de correlación (R^2) y la ecuación de la regresión lineal se muestra en cada gráfico. $R^2 \geq 0.98$ para los cuatro genes analizados.

Por otro lado, se demostró la correlación que existe entre los resultados obtenidos mediante RNAseq y qRT-PCR, incluso en los genes que no superan el criterio $VC \geq 2$, pero que son genes que están funcionalmente relacionados a aquellos que mostraron una expresión diferencial con $VC > 2$ (Figura 17 B). Por último, los genes de referencia, mantuvieron valores de veces de cambio de sus niveles de transcritos cercanos a 1, tanto en respuesta a los tratamientos con Sortin2 como NAA, corroborando el que fueran acertadamente escogidos como genes de referencia (Figura 17 C).

Utilizando los datos obtenidos se realizó un análisis de correlación entre los resultados obtenido por RNA-seq y por qRT-PCR. Los valores de veces de cambio de los niveles de transcritos en respuesta a Sortin2 obtenidos por estas dos técnicas, forman una línea de tendencia sobre la cual se deposita el 83% de los datos. Es decir poseen un coeficiente de correlación $R^2 = 0,83$.

Estos resultados indican que el experimento realizado en raíces tratadas con Sortin2 y NAA, permite detectar cambios transcripcionales de una manera reproducible. Además, los cambios transcriptómicos obtenidos mediante RNA-seq, , pueden ser reproducidos por qRT-PCR, en al menos 15 genes analizados, sugiriendo y sustentando la validez de los cambios transcripcionales detectados mediante RNA-seq.

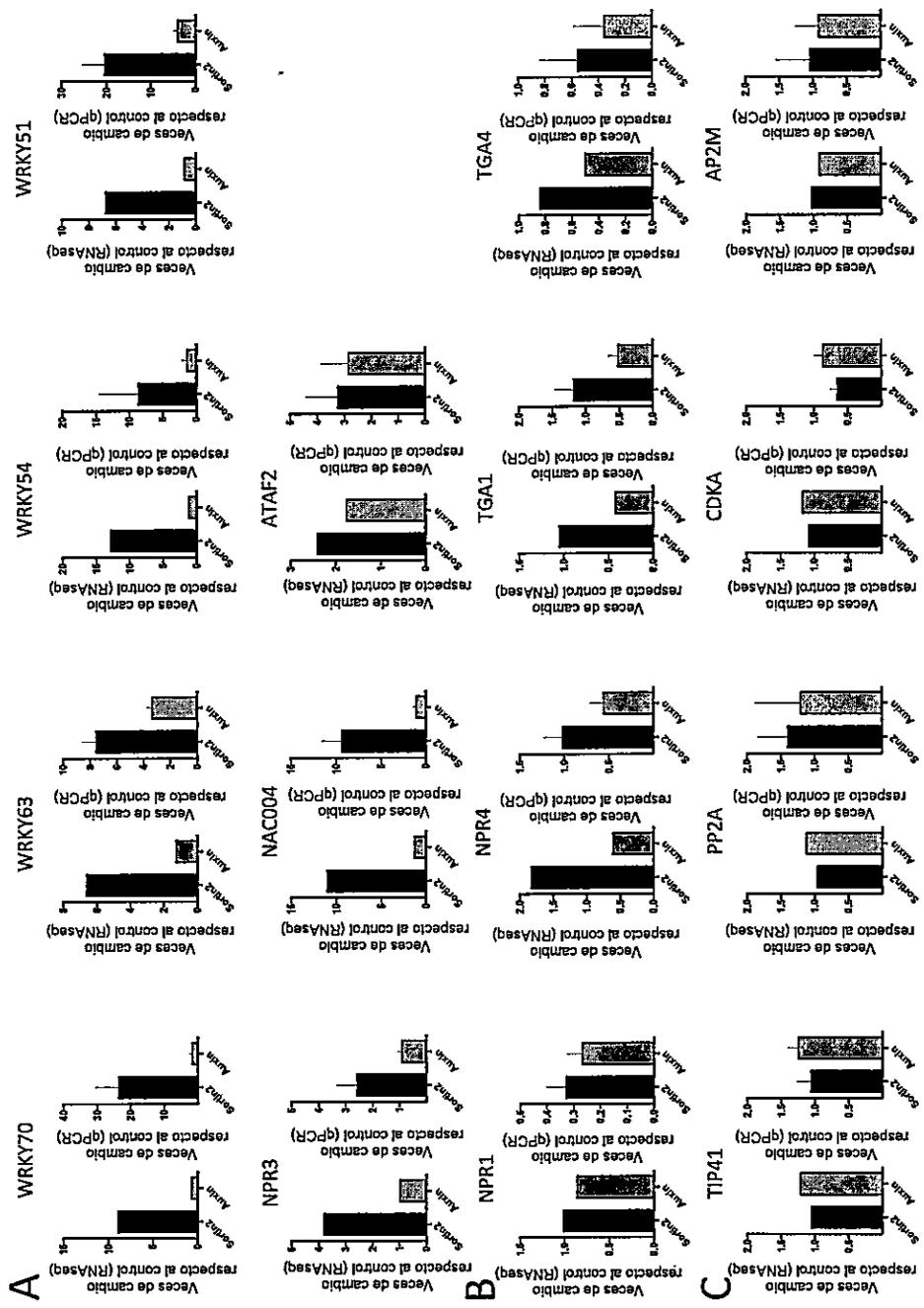


Figura 19. Validación de los cambios transcripcionales detectados por RNA-seq mediante ensayos de qRT-PCR

Los valores de veces de cambio de los niveles de transcritos obtenidos mediante RNA-seq y qRT-PCR son comparados para (A) 7 genes DEG+, es decir cuyos niveles de transcritos cambiaron según el experimento de RNA-seq con un $VC \geq 2$, (B) 4 genes que no cambiaron sus niveles de transcritos, es decir $-2 \leq VC \leq 2$ y (C) 4 genes que no cambiaron en los tratamientos, es decir con valores de $VC \sim 1$ y que fueron usados para referencia los valores resultados obtenidos en el ensayo de qRT-PCR.

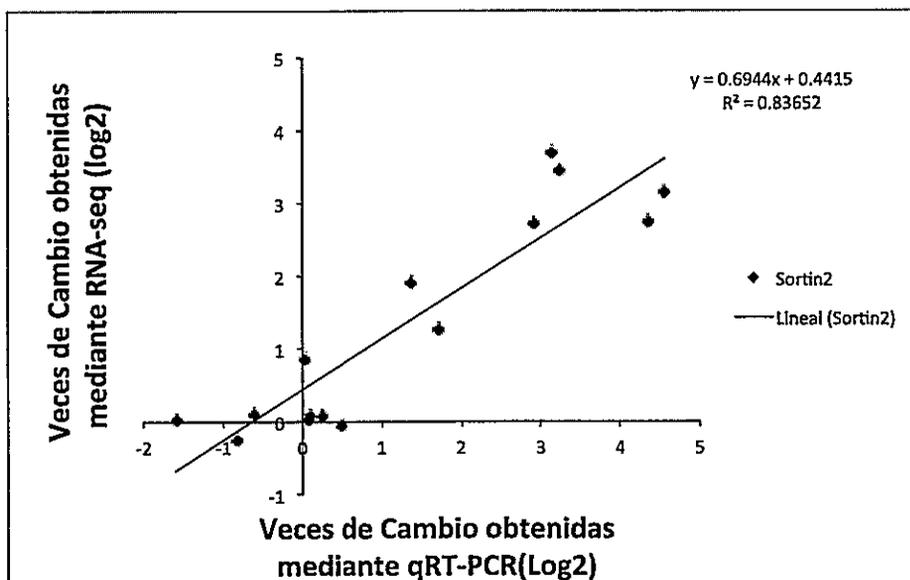


Figura 20. Análisis de correlación de los cambios en los niveles de transcritos en respuesta a Sortin2, obtenidos mediante qRT-PCR y RNA-seq.

Grafico de dispersión que muestra los valores de veces de cambio de los niveles de transcritos en respuesta a Sortin2, obtenidos mediante RNA-seq y qRT-PCR. Se grafican los resultados obtenidos para 7 genes que cambian sus niveles de transcritos en respuesta a Sortin2 ($VC \geq 2$), 4 genes que no cambian sus niveles de transcritos en respuesta a Sortin2 ($VC \leq 2$) y 4 genes de referencia. La correlación es analizada mediante regresión lineal obtenido un coeficiente de correlación con un $R^2 = 0,83$.

3.3 Objetivo 3. Integración de la información acerca de los componentes moleculares que podrían ser importantes para la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2.

Se ha logrado identificar genes que podrían participar en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2. En este parte de la tesis se integraron los resultados obtenidos en esta tesis con información recopilada de la literatura, poniendo a prueba nuestras conclusiones mediante análisis bioinformáticos y experimentales.

Se recopiló información biológica de los 7 genes identificados en la Figura 17

como Genes con una Putativa Participación En La Formación de Raíces Laterales en respuesta a Sortin2, los que serán llamados genes GEPPERALS.

Los términos GO - procesos biológicos que son comunes para al menos un par de los genes GEPPERALS revelan una importante preponderancia de procesos como respuesta de defensa, desarrollo de organismo multicelular y señalización hormonal de ácido jasmónico y de ácido salicílico. Estos procesos se encuentran ennegrecidos en la Tabla VI, entre la lista de procesos biológicos asociados a cada uno de los genes GEPPERALS. La lista de procesos biológicos es particularmente larga en los genes NPR3, WRKY54 y WRKY70, pudiendo indicar que sus funciones moleculares se han estudiado más en detalle o que participan en un proceso celular nodular que impacta a muchos otros procesos biológicos.

Es sencillo identificar en la literatura que se ha demostrado robustamente que NPR3 posee una función como receptor nuclear de la hormona ácido salicílico (SA) junto con su parólogo NPR4 (Fu et al., 2013), regulando la expresión de una serie de genes río abajo. Aún más, los niveles de transcrito de NPR3 aumentan en respuesta a infecciones con *Pseudomonas syringae*. Además, la vía de transducción de la señalización de la hormona SA involucra la participación de factores de transcripción de la familia WRKY, en particular representantes como los factores WRKY70 y WRKY54 (Besseau et al., 2012), los que participan activándose a si mismos o a otros miembros de la familia génica WRKY (Eulgem et al., 2000).

La función biológica asociada a NPR3 y los factores WRKYs es bastante coherente con la respuesta transcripcional que se observa en respuesta a Sortin2. Esto porque, los genes que han sido identificados como genes que se inducen por SA, son modificados transcripcionalmente de manera positiva, en respuesta a Sortin2 (Figura 21 A). También es interesante notar que NAA, al contrario de Sortin2, reprime a algunos genes de respuesta a SA (Figura 21 A). Por otro lado, los genes de respuesta ó de

síntesis de ácido jasmónico, otra hormona que regula procesos similares a SA, cambian poco sus niveles de transcritos en respuesta a Sortin2 (Figura 21 B). Interesante observación, considerando que algunos de los genes GEPPERALS han sido asociados, en la base de datos de TAIR, con el proceso biológico señalización de ácido jasmónico (JA) como se observa en la Tabla VI.

Tabla VI. Procesos Biológicos de los Genes con una Putativa Participación En La Formación De Raíces Laterales En Respuesta a Sortin2, GEPPERALS.

Gen ID	Nombre	Procesos Biológicos (términos GO)
AT5G45110	NPR3	defense response by callose deposition, defense response to bacterium, incompatible interaction, defense response to fungus, defense response to fungus, incompatible interaction, effector dependent induction by symbiont of host immune response, innate immune response, jasmonic acid mediated signaling pathway, negative regulation of defense response, negative regulation of programmed cell death, protein targeting to membrane, protein ubiquitination, regulation of plant-type hypersensitive response, response to bacterium, response to chitin, response to xenobiotic stimulus, salicylic acid biosynthetic process, salicylic acid mediated signaling pathway, systemic acquired resistance, systemic acquired resistance, salicylic acid mediated signaling pathway
AT2G40750	WRKY54	MAPK cascade, defense response to bacterium, defense response to fungus, detection of biotic stimulus, jasmonic acid mediated signaling pathway, negative regulation of defense response, negative regulation of leaf senescence, protein targeting to membrane, regulation of defense response, regulation of hydrogen peroxide metabolic process, regulation of innate immune response, regulation of multi-organism process, regulation of plant-type hypersensitive response, regulation of transcription, DNA-templated, response to chitin, response to salicylic acid, salicylic acid biosynthetic process, systemic acquired resistance, systemic acquired resistance, salicylic acid mediated signaling pathway, transcription, DNA-templated
AT3G56400	WRKY70	MAPK cascade, defense response to bacterium, defense response to fungus, defense response, incompatible interaction, detection of biotic stimulus, induced systemic resistance, jasmonic acid mediated signaling pathway, jasmonic acid mediated signaling pathway, negative regulation of defense response, negative regulation of leaf senescence, negative regulation of programmed cell death, negative regulation of transcription, DNA-templated, photosynthesis, light reaction, protein targeting to membrane, regulation of defense response, regulation of hydrogen peroxide metabolic process, regulation of innate immune response, regulation of multi-organism process, regulation of plant-type hypersensitive response, regulation of protein dephosphorylation, regulation of transcription, DNA-templated, respiratory burst involved in defense response, response to bacterium, response to chitin, response to cold, response to hypoxia, response to insect, response to jasmonic acid, response to other organism, response to salicylic acid, salicylic acid biosynthetic process, salicylic acid mediated signaling pathway, systemic acquired resistance, systemic acquired resistance, salicylic acid mediated signaling pathway, transcription, DNA-templated
AT5G64810	WRKY51	defense response to bacterium, defense response to fungus, jasmonic acid mediated signaling pathway, regulation of transcription, DNA-templated, transcription, DNA-templated
AT1G02230	NAC004	multicellular organismal development, regulation of transcription, DNA-templated, transcription, DNA-templated
AT1G02220	NAC003	hydrogen peroxide biosynthetic process, multicellular organismal development, protein desumoylation, regulation of transcription, DNA-templated, transcription, DNA-templated, vegetative to reproductive phase transition of meristem
AT5G08790	NAC081 ATAF2	multicellular organismal development, regulation of cell size, regulation of transcription, DNA-templated, response to fungus, response to jasmonic acid, response to light stimulus, response to salicylic acid, response to sucrose, response to wounding, transcription, DNA-templated
AT1G66600	ABO3 WRKY63	abscisic acid-activated signaling pathway, regulation of transcription, DNA-templated, transcription, DNA-templated

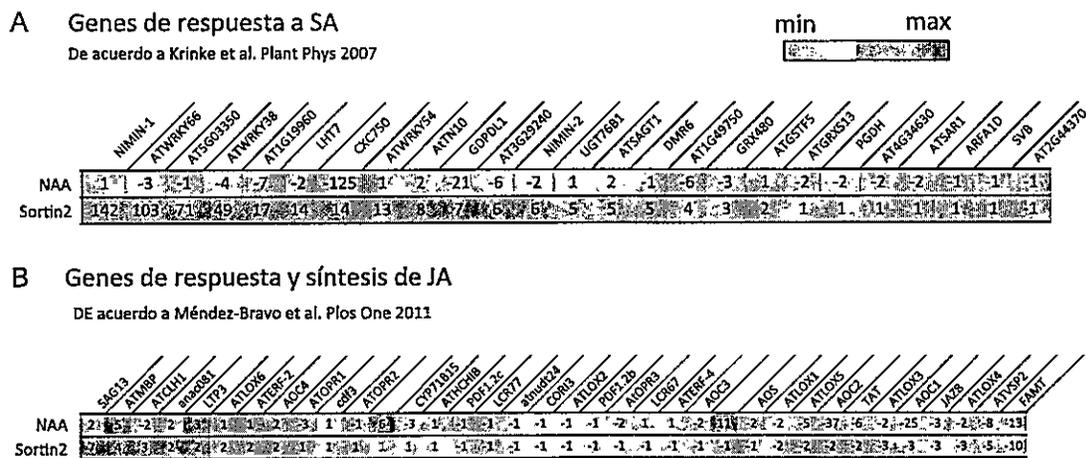


Figura 21. Cambios transcripcionales en respuesta a Sortin2 y a NAA de los genes de respuesta a SA y de los genes de respuesta y síntesis de JA.

Se recopilaron los genes de respuesta a ácido salicílico, SA (Krinke et al., 2007) y genes de respuesta a ácido jasmónico, JA, junto con genes participantes en la síntesis de JA (Méndez-Bravo et al., 2011). Para estos genes, se recolectaron las veces de cambio en los niveles transcripcionales en respuesta a Sortin2 y a NAA, desde nuestro experimento de RNA-seq. Los resultados se muestran en valores de veces de cambio que son enlistados y coloreadas según la siguiente escala de colores Azul: $VC \geq 2$, Amarillo: $VC \leq -2$ y Gris: $-2 \leq VC \leq 2$.

Para seguir indagando en los genes GEPPERALS se realizó un análisis de co-expresión. Es definido en la literatura bioinformática como co-expresión de dos o más genes, al aumento o disminución de los niveles de transcritos, en respuesta a un determinado estímulo. Los análisis de co-expresión sondean si es que existe co-expresión en una amplia variedad de experimentos, permitiendo sumar evidencia para aseverar que los genes co-expresados participarían en una función biológica común (Obayashi et al., 2009). Por otro lado, los análisis de co-expresión se pueden realizar sobre un subconjunto de datos transcriptómicos disponibles generando un subconjunto de datos de expresión que están obtenidos bajo condiciones biológicamente ligadas (Obayashi et al., 2011).

Se realizaron análisis de co-expresión para indagar en la posible participación en un proceso biológico común dentro de los genes GEPPERALS seleccionados en la Figura 17. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla VII, donde se muestran los valores de co-expresión en unidades MR (*Mutual Ranking*). Un menor valor de MR implica una mayor correlación de expresión entre los dos genes. En la se Tabla VI destacan los genes WRKY54, WRKY70 y NPR3 co-expresándose fuertemente cuando se utilizan todos los datos transcriptómicos disponibles en la base de datos ATTED-II. Entre los tres genes destaca el par WRKY54-WRKY70 que además tienen un nivel de co-expresión muy alto para los 5 subconjuntos de datos transcriptómicos que se encuentran disponibles en la base de datos ATTED-II y que se utilizan en el análisis (Tejido, Abiótico, Biótico, Hormona, Luz). Se destacan también los genes WRKY54, WRKY70 y NPR3 co-expresándose fuertemente entre los sub-set de datos Abióticos y Luz, principalmente.

Tabla VII. Análisis de co-expresión para pares de genes entre los genes GEPPERALS.

Gen1	Gen2	Co-expresión (MR)					
		Todo	Tejido	Abiótico	Biótico	Hormona	Luz
WRKY54	WRKY70	1.7	4.2	41	2.5	4.2	43.5
WRKY70	NPR3	115.2	2465.3	17.9	3556.6	318.6	5.3
WRKY54	NPR3	896.7	3697	1118	5394.4	286.3	55.9
NPR3	NAC003	2934.5	4366	4981.1	3883.3	4045.7	9914.8
WRKY70	NAC003	6617.4	14533.2	2025	4905.9	18064.1	10701.4
WRKY54	NAC003	10554.7	11825.4	11222.5	10709.5	17515.8	12767

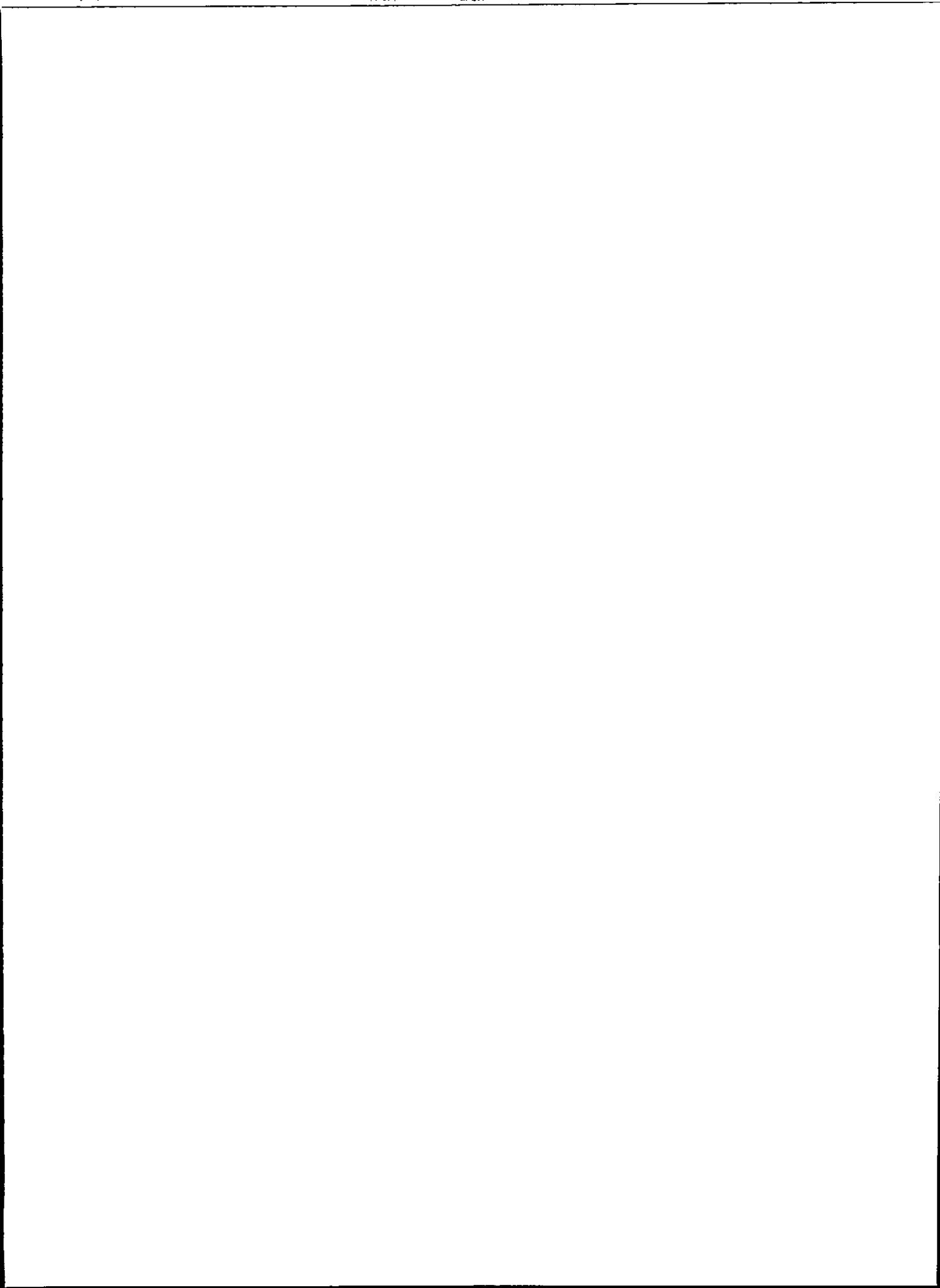
En conjunto, la función biológica de los gene GEPPERALS, la alta co-expresión de algunos de sus miembros en los subconjuntos Hormonal y Abiótico, junto con la respuesta transcripcional de los genes de respuesta a ácido salicílico, sugirieron indagar el rol de la hormona ácido salicílico en la formación de las raíces laterales.

3.3.1 Efecto de la aplicación exógena de ácido salicílico en la formación de las raíces laterales.

Para investigar el efecto de ácido salicílico (SA) sobre la formación de las raíces laterales se diseñaron dos esquemas experimentales. En ambos se usaron plántulas crecidas en condiciones normales de crecimiento durante 7 días y se evaluó el efecto del tratamiento con SA después de otros 7 días de crecimiento. Sin embargo, los diseños experimentales difieren en que en el primer esquema se consideró un tratamiento continuo con SA durante 7 días en medio sólido (Figura 22 A-D). Mientras que en el segundo esquema experimental consideró un pulso de 2 días con SA y una posterior recuperación durante 5 días (Figura 22 E-H).

En tratamientos continuos con SA se observó una considerable disminución del largo de la raíz principal a medida que aumenta la concentración de SA en el tratamiento. El efecto es muy notorio en concentraciones sobre los 50 μM de SA. Así mismo, tratamientos con SA exógeno por sobre 50 μM reduce el número de las raíces laterales emergidas en las plántulas tratadas, alcanzando una reducción de casi el 100% en concentraciones sobre los 300 μM . Interesantemente, la aplicación de SA por sobre los 100 μM genera una reducción de más de 10 veces del número de las raíces laterales, mientras que el largo de la raíz principal se reduce en 1.5 veces, respecto al control en ambos casos. Esto indica un desacople del efecto de SA como inhibidor del largo de la raíz principal y de la formación de raíces lateral, mostrando una especificidad mucho más alta sobre el efecto en las raíces laterales.

La exposición a concentraciones entre los 200 hasta los 500 μM generó una inhibición casi completa del crecimiento de la raíz principal. Para evitar posibles efectos nocivos por la exposición prolongada a SA, pero manteniendo los mismos rangos de concentración de aplicación de la hormona, se decidió realizar un experimento de pulso



transferidas a tratamientos en medio sólido de las siguiente maneras: (A) tratamiento continuo con diferentes concentraciones con ácido salicílico (SA) durante 7 días ó (B) tratamiento con diferentes concentraciones de SA durante 2 días y un posterior crecimiento en condiciones controles por 5 días.

- A. Esquema experimental para el tratamiento continuo con SA durante 7 días.
- B. Imágenes representativas de las plántulas bajo tratamiento como se muestra en A.
- C. Número de las raíces laterales de plántulas bajo tratamiento como se muestra en A.
- D. Largo de la raíz principal de plántulas bajo tratamiento como se muestra en A.
- E. Esquema experimental para el tratamiento con un pulso de SA durante 2 días.
- F. Imágenes representativas de las plántulas bajo tratamiento como se muestra en A.
- G. Número de las raíces laterales de plántulas bajo tratamiento como se muestra en A..
- H. Largo de la raíz principal de plántulas tratadas como se muestra en E.

En tratamientos con SA por 2 días se observó una reducción del número de las raíces laterales y del largo de las raíces laterales en tratamientos con concentraciones superiores a los 200 μM . El pulso de SA a concentraciones de 500 μM , provocó una irreversible inhibición del crecimiento de la raíz principal, presumiblemente por muerte del meristema apical. Sin embargo las raíces laterales muestran una leve reducción de 25% respecto al control. Esto difiere de lo observado en tratamientos continuos con SA, donde la reducción en el número de las raíces laterales fue de 1000%. Los tratamientos con un pulso de SA, sugieren que el efecto inhibitorio de las raíces laterales es independiente del efecto inhibitorio del crecimiento de la raíz principal.

4 DISCUSION

4.1 Sortin2 induce la formación *de novo* de las raíces laterales (RL).

La formación de las raíces laterales comprende los eventos que conducen a la producción de una raíz lateral activa (Van Norman et al., 2013). Diversas evidencias obtenidas en esta tesis, sugieren que Sortin2 tiene la capacidad de estimular la formación de las raíces laterales induciendo la fase de iniciación del desarrollo de primordios. Lo anterior se sustenta fundamentalmente en la estimulación con Sortin2, de la expresión de marcadores de diferenciación celular acompañada de una actividad mitótica específica en la capa celular del periciclo donde se inician las raíces laterales. A continuación se destacan las implicancias de este tipo de evidencias en el contexto de la inducción de la iniciación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2.

4.1.1 Sortin2 estimula la expresión de marcadores de diferenciación celular.

El evento de iniciación de las raíces laterales ocurre en la zona de diferenciación de la raíz principal, donde sólo algunas células dentro de la fila celular del periciclo se diferencian hacia célula fundadora de raíz lateral (Vermeer and Geldner, 2015). El primer componente molecular que fue identificado en la especificación de célula fundadora de raíz lateral es GATA23 (Yadav et al., 2010). Este

factor de transcripción se expresa en las células del periciclo y regula positivamente la diferenciación de éstas hacia células fundadoras de raíz lateral (De Rybel et al., 2010). Los datos presentados en esta tesis permiten concluir que Sortin2 induce la expresión de GATA23 en células de periciclo. Además, los niveles de transcrito de GATA23 aumentan progresivamente entre las 4 y 8 horas de tratamiento con Sortin2 (Figura 10 C). Consistentemente, mediante secuenciación masiva también se observaron aumentados niveles de GATA23 en respuesta a Sortin2. Además, una fuerte sobre-representación del proceso biológico "diferenciación celular" entre los genes "Sortin2 \cap NAA", sugieren que Sortin2 promueve la diferenciación de las células del periciclo mediante la activación de la expresión de GATA23, cuya función molecular es la especificación de células fundadoras de raíz lateral.

4.1.2 Sortin2 induce iniciación de las raíces laterales.

La activación de células especificadas como células fundadora conduce a las divisiones celulares asimétricas que constituyen la iniciación del desarrollo de un primordio de una raíz lateral (Van Norman et al., 2013). En respuesta a tratamientos de 24 horas con Sortin2 se detecta un aumento en la densidad de primordios (Figura 2), sugiriendo que Sortin2 estimula la iniciación del desarrollo de primordios.

Interesantemente, el efecto de Sortin2 sobre la densidad de primordios se observa a lo largo de toda la raíz principal, tanto en la zona de formación como en la zona de ramificación (Figura 2 E y F). El efecto de Sortin2 es esperable en un tejido donde se define la formación de las raíces laterales como lo es la zona de formación. Sin embargo, es sorprendente que Sortin2 aumente también la densidad de primordios en la zona de ramificación, ya que es una zona altamente diferenciada de la raíz principal. En efecto, se ha podido observar que una plántula creciendo en condiciones

normales, es decir sin estímulos experimentales, define un número finito de primordios en la zona de ramificación, sin registrarse eventos de formación *de novo* de las raíces laterales, al analizar la misma plántula días posteriores (Dubrovsky et al., 2006). Sin embargo, nuestros datos, en contraste con lo expuesto en la literatura, revelan un aumento de la densidad de primordios en la zona de ramificación, alcanzando 2 veces la densidad de la condición control, Esto sugiere que Sortin2 induce la formación *de novo* de las raíces laterales, en la zona de ramificación de la raíz principal. La formación *de novo* de las raíces laterales, es consistente con el aumento de la expresión de GATA23 en el periciclo, en respuesta a Sortin2, ya que se requiere la expresión de GATA23 para especificar una célula fundadora y estimular la iniciación.

En contraste al efecto que se observa en respuesta a tratamientos de Sortin2 por 24 horas, la densidad de primordios en la zona de ramificación de plántulas tratadas con Sortin2 por 48 y 72 horas, presenta la misma densidad de primordios que el observado en tratamiento control (Figura 2). Se puede argumentar que podría existir una capacidad limitada de generar raíces laterales, dentro de esta zona de la raíz principal, que alcanzó su máximo, después de responder al tratamiento con Sortin2. Alternativamente, la molécula de Sortin2 podría ser degradada o desactivada biológicamente en el medio de cultivo luego de varios días. Sin embargo, podría ser descartable esta última alternativa, ya que en la zona más joven de la raíz principal, la zona de formación, Sortin2 induce un aumento de 5 veces respecto de la condición control de la densidad de primordios a las 48 y 72 horas de tratamiento con Sortin2 (Figura 2 F)

Basados en que la densidad de primordios en la raíz principal disminuye cuando se aumenta el tiempo de duración del tratamiento (Figura 2 C). Además, considerando que la densidad de las raíces laterales emergidas aumenta con el tiempo de duración del tratamiento (Figura 2 B). Entonces, aunque no se tiene evidencia

directa, nuestros datos sugieren que los primordios que son inducidos por tratamientos con Sortin2 logran progresar hasta la emergencia de la raíz lateral. Alternativamente, estos datos también podrían sugerir que Sortin2 promueve tempranamente la formación de primordios y luego promueve la emergencia de estos órganos y también de aquellos que estaban preestablecidos en las plántulas al momento de recibir el tratamiento con Sortin2. La evaluación de un efecto de Sortin2 sobre la velocidad del desarrollo de un primordio hasta su emergencia, podría ser evaluado en futuras investigaciones mediante un seguimiento continuo en el tiempo del desarrollo de un primordio o mediante un perfil de los estadios de desarrollo de los primordios, en respuesta a tratamientos con Sortin2, durante distintos tiempos.

Los tratamientos localizados con Sortin2, mediante placas SAP, son capaces de inducir un aumento en la densidad de RL (Figura 3 A y B), lo que está en el mismo sentido de inducir raíces laterales *de novo*, post-estimulación de la zona diferenciada de la raíz primaria, la zona de ramificación. Sin embargo, también se reconoce que las placas SAP presentan limitaciones técnicas donde se abrió la oportunidad para realizar mejoras al diseño experimental utilizado en esta tesis. La primera limitación técnica es que los tratamientos con placas SAP, se desarrollan en posición horizontal. La horizontalidad evita que los medios de diferente composición se deslicen por gravedad y tomen contacto físico entre sí. Sin embargo, y a pesar de que los resultados se comparan con un tratamiento control, se agregan efectos de gravi-estimulación en el análisis mediante el procedimiento que se siguió en esta tesis. La segunda limitación técnica es la dificultad de marcar la zona de la raíz principal que toma contacto con el tratamiento con Sortin2. Esto impide retirar las plántulas del tratamiento y realizar análisis bajo microscopio, de primordios o de marcadores tempranos de la formación de las raíces laterales, sobre la zona sometido a tratamiento con Sortin2. Por ello se evalúan los efectos de Sortin2 a partir de los 3 días de tratamiento, cuando se



cuantifican las raíces laterales emergidas. En el seminario de título de Stefania Morales realizado en el laboratorio de la Dra. Norambuena, se intentó resolver este tipo de limitaciones técnicas. En su seminario de título se cuantificó la densidad de las raíces laterales específicamente en la zona que tomó contacto con Sortin2 detectando que Sortin2 aumenta la densidad de RL en la zona de la raíz principal sometida a tratamiento localizado (Morales, 2015). Además, se desarrolló una estrategia para realizar evaluar la actividad de líneas reporteras GUS *in situ* y así poder utilizar marcadores de la formación temprana de las raíces laterales como pCYCB1;1::GUS o pGATA23::GUS. Esto permitió observar un aumento de la formación de las raíces laterales en tratamientos localizados con Sortin2 (Morales, 2015).

Existe un evidente mayor número de primordios en estadio I y II, sugiriendo que Sortin2 induce la formación de las raíces laterales desde la iniciación. Se logra detectar un mayor número de primordios en estadios de desarrollo tempranos (estadio del I al IV), en tratamientos durante 24 horas con Sortin2, respecto a un tratamiento control (Figura 3 E). Consistentemente, un primordio se desarrolla, desde el estadio I hasta el IV, en aproximadamente 24 horas (Péret et al., 2012; Voß et al., 2015), sugiriendo que los primordios en estadio IV en las plántulas que recibieron tratamiento con Sortin2, se iniciaron en las primeras horas de tratamiento. Es importante hacer notar la amplia desviación de los datos obtenidos en este experimento, probablemente como resultado de un número bajo de planta analizadas (Figura 3 E). Es necesario repetir el experimento aumentando el número de plántulas analizadas y agregando en el análisis una caracterización de localización de los primordios a lo largo de la raíz principal.

Por último, se observó la iniciación *de novo* de las raíces laterales al aplicar Sortin2 sobre plántulas completamente carentes de órganos laterales (Figura 8). Esta evidencia despeja cualquier duda que pueda generarse al realizar experimentos como los anteriormente mencionados, con plántulas que tienen un desarrollo de *pre-*

patterning normal. Ya que, en estas plantas carentes de raíces, los tratamientos por 24 horas con Sortin2, inducen una muy evidente aparición de abundantes primordios, tanto en la zona meristemática, ubicada entre las líneas semi-punteadas rojas, como en la zona de diferenciación, ubicada más proximal de las líneas semi-punteadas rojas (Figura 8).

4.2 Rol de la señalización canónica de auxina en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2.

4.2.1 Localización de la acumulación de auxina; homeostasis y transporte de auxina.

La localización de la acumulación de auxina es el resultado de la homeostasis de la hormona auxina y de su transporte a través del tejido radicular. Por lo tanto es muy interesante el hecho de que la localización de la acumulación de auxina detectada mediante la respuesta transcripcional de los reporteros de auxina, se mostró sin variaciones mayores respecto a la condición control, tanto en la zona de diferenciación como en la zona meristemática de la raíz principal. El resultado es coherente con lo que se ha mostrado anteriormente, en plántulas completas mediante ensayos fluorométricos, donde se observó que la actividad pDR5, es similar a un tratamiento control, en plántulas tratadas por 24 horas con Sortin2 (Pérez-Henríquez, 2010; Pérez-Henríquez et al., 2012)

Sortin2 modificó levemente la localización de la acumulación de auxina, en raíces de plántulas pIAA2::GUS. La actividad de pIAA2 en plántulas sometidas a tratamientos con Sortin2 incluyó más capas celulares que la vasculatura que se

observa en condiciones controles. Esta localización de la acumulación de auxina puede ser consecuencia de un efecto de deslocalización de los transportadores de auxina en esas capas celulares, interrumpiendo el correcto flujo y distribución normal de esta hormona. Alternativamente, Sortin2 podría estar gatillando directamente la actividad transcripcional de pIAA2 sin que esté asociado a una modificación de los niveles de auxina en esas células. Sin embargo, en esta tesis se comprobó que Sortin2 no gatilla la señalización de auxina, ya que no estimula la degradación de DII- VENUS y por lo tanto se sugiere que el aumento de respuesta de pIAA2 no resultaría de un aumento directo de la actividad transcripcional de pIAA2.

Aún más, es evidente morfológicamente que el efecto de Sortin2, detectable por el marcador de respuesta transcripcional a auxina pIAA2, se observa solamente en la zona meristemática y que no se observa en la zona de diferenciación de la raíz principal (comparar Figura 4 D y E). Recientemente se reveló un importante papel para la señalización de auxina en la endodermis como una señal que fomenta la iniciación de las raíces laterales (Kumpf et al., 2013; Vermeer et al., 2014). Así, la localización de la acumulación de auxina en capas celulares como la endodermis o corteza, en respuesta a Sortin2, puede ser un mediador del efecto de este compuesto como un inductor de la formación de las raíces laterales. Sin embargo, la inducción por Sortin2, de la formación de raíces laterales *de novo*, en la zona de diferenciación de la raíz principal, se desarrolla en un contexto en donde Sortin2 no genera un cambio en la localización de la acumulación de auxina reportada tanto por pDR5 como por pIAA2.

4.2.2 Señalización intracelular de auxina.

Es crucial para la transducción de la señal de auxina, la degradación de proteínas codificadas por genes Aux/IAA. Las mutante *iaa28-1*, y también *slr-1*,

incapaces de degradar a las proteínas Aux/IAA IAA28 y IAA14, son insensibles a Sortin2 en la inducción de la formación de las raíces laterales (Figura 6). Esto implicaría que la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2 requiere la degradación de las proteínas Aux/IAA, pero es una molécula incapaz de inducir la degradación de éstas, a diferencia de la auxina NAA. Ya que, como se observa en la Figura 5, la aplicación de 1 μ M de auxina exógena NAA es suficiente para degradar un 90% de la proteína DII-VENUS presente en la punta de una raíz principal lo que no se produce en tratamientos Sortin2 (Figura 5). Interesantemente, tratamientos más extensos con Sortin2, tampoco induce la degradación de DII-VENUS (datos no mostrados) descartando que se requiera de mayor tiempo para que Sortin2 tenga ese efecto. Por otro lado, resultados equivalentes cuando se evalúa la acumulación de DII-VENUS en un plano focal donde se observan todas las capas celulares de la raíz principal (datos no mostrados), sugirieron que no solo la epidermis, sino también en todas las capas celulares más internas, DII-VENUS mantiene su nivel de acumulación en presencia de Sortin2.

El reportero DII-VENUS es el reportero más sensible de la señalización intracelular de auxina conocido hasta la fecha (Wells et al., 2013). Su alta sensibilidad involucra que se alcance la degradación de la proteína, en respuesta a cantidades fisiológicas de auxina. Medir la acumulación nuclear de DII-VENUS en células fundadoras es un tarea compleja, ya que la acumulación de auxina que se produce en esas células, impide su acumulación. Una proyección para los resultados mostrados en esta tesis, sería desarrollar una estrategia que permita medir la señalización intracelular de auxina, mediante DII-VENUS, en células fundadoras de raíz lateral. Para este propósito, se podría aplicar temporalmente un inhibidor como MG132, del mecanismo de degradación proteica por proteosoma, que media la degradación de DII-VENUS. Aunque no existe evidencia que MG132 sea funcional en células fundadoras,

se ha reportado que es eficiente en impedir la degradación de DII-VENUS en células meristemáticas en la punta de una raíz principal (Brunoud et al., 2012).

4.2.3 Requerimientos moleculares de la señalización canónica de auxina en la formación de las raíces laterales inducidas por Sortin2.

Los resultados sugieren que la actividad del complejo SCF^{TIR1-AFB1-3} no se requiere para observar el efecto de Sortin2 como un inductor de la formación de las raíces laterales (Pérez-Henríquez et al., 2012). Este resultado, es consistente con que, frente a Sortin2, pDR5 y pIAA2 no se activen en la zona de diferenciación y también con los inalterados niveles de DII-VENUS, en la punta de la raíz principal. Sin embargo, en la familia de receptores TIR/AFBs existen al menos 6 miembros (Calderon-Villalobos et al., 2010; Calderón Villalobos et al., 2012). Los receptores AFB4 y AFB5, que se encontraría funcionales en la mutante *tir1afb1,2,3*, han sido estudiados recientemente. AFB4 se reconoce como un mediador negativo de la señalización de auxina (Greenham et al., 2011). Mientras que, para AFB5 sólo se ha descrito que une derivados de auxina, pero sin una caracterización funcional asociada (Calderón Villalobos et al., 2012). Por otro lado, reafirmando la herramienta genética *tir1afb1,2,3*, se ha reconocido recientemente que el componente AFB3 sería el implicado más directamente en la formación de las raíces laterales (Vidal et al., 2010; Si-Ammour et al., 2011; Calderón Villalobos et al., 2012). Por lo tanto, a pesar de que sería importante estudiar la relación de AFB4 y AFB5 en la actividad de Sortin2, la mutante *tir1afb1,2,3* es una buena herramienta para evaluar el rol a nivel del receptor de la vía de señalización canónica de auxina en respuesta a Sortin2.

La proteína SLR/IAA14, mantiene reprimida la activación génica que producen los factores ARF7 y ARF19. Esta función represora de SLR/IAA14 implicaría que

Sortin2 requeriría de la función molecular de los factores ARF7 y ARF19. Sin embargo, la doble mutante pérdida de función *arf7arf19* presenta los mismos niveles de inducción de las raíces laterales que una planta silvestre (Figura 6 F y G). Estos antecedentes en conjunto sugieren que en el mecanismo de inducción de las raíces laterales en respuesta a Sortin2, se establece una vía de señalización distinta a la señalización canónica de auxina, que contempla una degradación de SLR/IAA14 independiente de SCF-^{TIR1/AFB1-3} y que además involucraría la función molecular de componentes o factores de transcripción, distintos a ARF7 y a ARF19.

4.3 Cambios transcripcionales en respuesta a Sortin2.

Plántulas sometidas a tratamientos con Sortin2 responden modificando los niveles de transcritos claves para la formación de las raíces laterales. Genes cruciales para la formación de las raíces laterales como GATA23 e IAA28 presentan cambios en sus niveles de expresión Figura 6. Estos cambios transcripcionales sustentan la idea de generar un perfil transcriptómico para identificar masivamente aquellos genes cuyos niveles de transcritos se modifican en respuesta a Sortin2.

4.3.1 Perfil de expresión mediante secuenciación masiva de RNA (RNA-seq).

La secuenciación masiva de RNA (RNA-seq), es una técnica que presente importantes ventajas sobre el microarreglo, permitiendo identificar cambios de niveles de transcritos de genes para los cuales no hay sondas disponibles en los microarreglos. En efecto, 83 de los 1361 y 1049 de los 6408 genes diferencialmente expresados en respuesta a Sortin2 y NAA, respectivamente, no tienen una sonda disponible en el microarreglo Arabidopsis 3 de Agilent®, confirmando la pertinente selección de la

técnica del RNA-seq sobre microarreglo.

El análisis de los datos obtenidos mediante RNA-seq constituyen un paso crucial para poder asegurar la veracidad de los mismos. Para el análisis se seleccionaron sólo con las lecturas que superan un 99.9% de probabilidad de haber sido correctamente secuenciadas. También, para asegurar un conteo de las lecturas que refleje fidedignamente la cantidad de transcritos presentes en cada condición, se utilizó método en modo "intersección estricta", lo que permite descartar empalmes con regiones intrónicas y extragénicas. Una porción de un 0.05% de los datos obtenidos por RNA-seq fueron validados mediante qRT-PCR y se obtuvo una alta correlación entre los valores de veces de cambio obtenidos mediante RNA-seq con los obtenidos mediante qRT-PCR, alcanzando un coeficiente de correlación $R^2 = 0,89$ (Figura 19 y Figura 20). Esto apoya que los datos del RNA-seq son confiables para obtener conclusiones biológicas a partir de ellos, ya que los datos obtenidos pueden ser validables por técnicas análogas.

4.3.2 El número de genes de la respuesta transcripcional de Sortin2 es menor que la de NAA.

La respuesta transcripcional que induce Sortin2 en el tiempo analizado de 6 horas es más acotada que la inducida por NAA. El número de genes diferencialmente expresados, tanto positivamente como negativamente, en respuesta a Sortin2 es ~5 veces menor que en respuesta a NAA (Figura 12). Este resultado se puede aludir como una consecuencia del tiempo escogido en que un 50% de las plántulas tratadas con Sortin2, están activadas mitóticamente, mientras que en NAA es un 100%. Sin embargo, esto no explicaría que fuese 5 veces más pequeño en cuanto al número de genes. Este resultado es coherente si se considera la actividad pleiotrópica de NAA,

como una molécula con actividad auxina cuya función reguladorio es amplia. Aunque por su puesto, no se puede descartar que se pudieran obtener resultados diferentes con un mayor tiempo de tratamiento con Sortin2 ó seleccionando poblaciones de plántulas igualmente activadas mitóticamente en ambos tratamientos.

Alternativamente, un mayor tamaño de la respuesta transcripcional se podría plantear la hipótesis de que NAA posee una mayor facilidad de ingresar al tejido radicular que Sortin2. Sin embargo, tratamientos con 6 horas de Sortin2 induce un aumento de la actividad de pGATA23 específicamente las células del periciclo. Aún más, experimentos con qRT-PCR muestran que cambios en los niveles de transcrito de GATA23 se observan aún más tempranamente. Estos resultados en conjunto sugieren que Sortin2 induce una respuesta transcripcional, en un tiempo aún menor que el utilizado para el perfil de expresión por RNA-seq.

Finalmente, sin duda que el tamaño de la respuesta transcripcional es sólo un referente del número de genes diferencialmente expresados, pudiendo tener pocas implicancias respecto a los procesos biológicos que estos genes están representando. Es en este contexto donde la información de las evaluaciones de enriquecimiento funcional fueron determinantes para obtener conclusiones biológicas del perfil transcriptómico de Sortin2 y NAA.

4.3.3 Aproximaciones bioinformáticas para extraer información biológica del perfil transcriptómico comparativo entre Sortin2 y NAA.

En un perfil transcriptómico en respuesta a un estímulo químico, cambian los niveles de transcrito de cientos o miles de genes (De Rybel et al., 2009; Hicks and Raikhel, 2012; Xuan et al., 2013). Esto también ocurre para el estímulo químico con Sortin2 (Figura 12). Estudios transcriptómico masivos revelan que solo una porción de

los genes diferencialmente expresados, en raíces, en respuesta a NAA, participarían en la formación de las raíces laterales (Himanen et al., 2004; Vanneste et al., 2005a; De Smet et al., 2008; De Rybel et al., 2012). Es más, usando el inductor específico para la formación de las raíces laterales, NAXILLIN, se modifican diferencialmente los niveles de transcrito de ~550 genes, mientras que sólo ~270 de ellos se alude a que podrían participar en la formación de las raíces laterales (De Rybel et al., 2012).

En base a lo expuesto en el párrafo anterior, es lógico pensar que no todos los genes diferencialmente expresados en respuesta a Sortin2 serán aquellos que se modificaron para dar curso a la formación de las raíces laterales en respuesta a este compuesto. Aún menos lógico sería pensar que todos los genes, con un rol en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2, tienen una relación gen-función biológica definida y anotada en bases de datos. Para obtener información biológica desde el perfil transcriptómico realizado en esta tesis, se estudiaron los cambios transcripcionales detectados desde una perspectiva integral. Se estudiaron los procesos biológicos que subyacen a esos cambios transcripcionales y posibles reguladores moleculares de estos cambios transcripcionales de la respuesta.

4.3.4 Los procesos biológicos enriquecidos entre los genes DEG de respuesta a Sortin2 difieren de los asociados a los DEG de respuesta a NAA.

La herramienta *GoTermMapper* de Princeton University (Boyle et al., 2004) resultó mejor evaluada que las herramientas alternativas para los estudios de enriquecimiento de procesos biológicos como Gorilla (Eden et al., 2009), VirtualPlant (Katari et al., 2010), PlantGSEA (Yi et al., 2013) y Amigo (www.geneontology.org), en términos del tiempo de respuesta de los resultados, la estabilidad de la plataforma, el tiempo que el servidor guarda los resultados para visitas posteriores y la posibilidad de

usar un archivo de asociación personalizado.

Una visión amplia y comparativa, así como la separación entre genes DEG- y DEG+ fue clave para facilitar la comprensión de los resultados. Al separar los genes en DEG+ y DEG-, se puede detectar el tipo de modificación transcripcional predominante en la sobrerrepresentación o sub-representación de un determinado proceso y biológico. Por ejemplo, los procesos biológicos: "transporte y "respuesta estímulos bióticos" están sobre-representados, entre los genes de respuesta a Sortin2, al analizar entre todos los genes diferencialmente expresados, (DEG- + DEG+). Sin embargo, la fuente de esa sobre-representación es principalmente de los genes DEG+, ya que la sobre-representación es muy pequeña o inexistente entre los genes DEG-

La visión comparativa también sustentó la focalización en los genes DEG+ que se establece en la jerarquización piramidal que permitió la identificación de los genes GEPERALS. Esto porque, el 75 % de los procesos biológicos (6/8), que están sobre-representados entre los genes de respuesta a Sortin2, son más fuertemente determinados por lo observado entre los genes que DEG+ que DEG-.

Una mirada comparativa entre Sortin2 y NAA, se pueden visualizar aquellos procesos biológicos que se enriquecen exclusivamente entre los genes de respuesta a un estímulo y no al otro.

Otros procesos biológicos están sub-representados entre los genes de respuesta a Sortin2, como "modificación de proteínas celulares", "procesos metabólicos del DNA", "ciclo celular" y "traducción", Interesantemente, todos estos procesos están opuestamente sobre-representados entre los genes de respuesta a auxina, marcando diferencias entre los cambios biológicos que experimenta la planta en respuesta a Sortin2 versus NAA

.Algunos de estos resultados son fáciles de ligar con nuestros resultados experimentales. Por ejemplo, la modificación de la proteínas celular DII-VENUS cuyos

niveles en la punta de la raíz son disminuidos exclusivamente en respuesta a NAA podría estar con la sobre-representación del proceso "modificación de proteínas celulares" sólo entre los genes de respuesta a NAA.

El proceso biológico "ciclo celular", entre los genes de respuesta a NAA, está más fuertemente influenciado por los aumentos que por la disminución de los niveles de transcritos. Esto es consistente con la evidencia experimental que reporta que en respuesta a un activador del ciclo celular como NAA, se observa un aumento de los niveles de transcrito de varios reguladores positivos del ciclo celular como por ejemplo CYCB1 (Gutierrez; 2009). Sin embargo, el mismo proceso biológico, "ciclo celular", entre los genes de respuesta a Sortin2, muestra una importante sub-representación respecto al genoma. A la vez, Sortin2 induce la activación de la división celular y también la activación de pCYCB1, conducente a la formación de las raíces laterales (Figura 3 y Figura 9). Entonces ¿por qué no está sobre-representado este proceso entre los genes de respuesta a Sortin2?. Para responder esa pregunta se pueden tener varias consideraciones. Primero, el proceso biológico ciclo celular involucra más etapas que solo la división celular, por lo tanto para saber cómo se comporta el proceso biológico "división celular" habría que determinar enriquecimiento en procesos biológicos más específicos, es decir con un menor nivel de abstracción. Segundo, se debe tomar en cuenta que para obtener el desencadenamiento de la división celular se requiere un reducido repertorio génico se da demostrado que la manipulación de solamente 1 regulador clave, es suficiente para regular un proceso de división celular (Himanen et al., 2002), similar a lo que podría estar sucediendo tras la estimulación con Sortin2 .

4.3.5 Perfil transcriptómico común entre Sortin2 y NAA.

Sortin2 requiere la degradación de la proteína SLR/IAA14, ya que no es capaz de inducir la formación de las raíces laterales de la mutante con ganancia de función *slr-1*. Por lo tanto, existe una probabilidad de que aquellos genes diferencialmente expresados en ambos tratamientos sean parte de un programa genético común necesario para la formación de las raíces laterales.

La aplicación de Sortin2, al igual de NAA, requiere la degradación de proteínas Aux/IAA, para la inducción de la formación de las raíces laterales (Figura 6 B-D). La literatura ha reportado ampliamente la existencia de cambios transcripcionales que son desencadenados por la degradación de estas proteínas. Acorde con lo anterior, se obtuvieron perfiles transcriptómicos para Sortin2 y NAA, con una sobreposición de 1008 genes entre genes DEG+ y DEG-. Para el caso de los 444 genes DEG+ que son comunes entre Sortin2 y NAA, se puede destacar que corresponde a un número 5.4 veces mayor que el número de genes comunes esperado por azar, de acuerdo a una distribución hipergeométrica (Fury et al., 2006) que es usado en el algoritmo asociado a la plataforma web http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html. Para el caso de los 564 genes comunes DEG-, este número es 7.4 veces mayor que el número de genes comunes esperado por azar. Para ambos análisis, se consideraron 27,416 genes codificantes como el universo de genes. El hecho de que el solapamiento de genes encontrado entre ambos estímulos no es resultado del azar, podría estar indicando que el perfil transcriptómico común entre Sortin2 y NAA corresponde a herramientas genético-moleculares compartidas entre Sortin2 y NAA para desarrollar raíces laterales.

Las funciones biológicas en las que participaría este grupo de genes comunes entre Sortin2 y NAA se desprende del análisis de enriquecimiento funcional en la

Figura 15 C. Procesos como "diferenciación celular" y "crecimiento celular" son los únicos dos procesos biológicos enriquecidos entre los 1008 genes de este grupo. Ambos procesos son necesarios y característicos en general de cualquier proceso organogénico y en particular, en este caso, de la formación de las raíces laterales. El enriquecimiento de estos procesos biológicos sería consistente con la hipótesis que este grupo de genes compartidos en los perfiles de Sortin2 y NAA son parte de un programa genético establecido para la formación de las raíces laterales.

4.3.6 Características de los genes de expresión diferencial exclusivamente en respuesta a Sortin2 .

Sortin2 no activa a los reporteros transcripcionales pDR5 y pIAA2 como lo hace NAA exógeno (Figura 4). Tampoco degrada al reportero de señalización DII-VENUS como lo hace NAA exógeno (Figura 5). Por lo tanto la diferencia transcripcional entre Sortin2 y NAA debiera tener un significado biológico. Este significado se reafirma cuando se analizaron los genes cuyos niveles de transcritos se modificaron en Sortin2, pero no en NAA, es decir los genes "Sortin2". En particular porque estos genes enriquecen procesos biológicos diferentes a los enriquecidos en los genes "NAA".

Procesos enriquecidos entre los genes "Sortin2" y no enriquecidos entre los genes "NAA" sugieren que se utilizan diferentes mecanismos para inducir la formación de las raíces laterales. En efecto, procesos como "respuesta a estímulos bióticos" pueden estar indicando un mecanismo biológico a través del cual se produce la inducción de las raíces laterales en respuesta a Sortin2. Esto sustentado en el hecho de que se encuentra bien descrito en la literatura que el contacto del sistema radicular con ciertos microorganismos beneficiosos - un ejemplo de un estímulo biótico-, son inductores de un cambio de la arquitectura radicular, a través de la estimulación de la

ramificación (Gutiérrez-Luna et al., 2010). Procesos biológicos enriquecidos entre los genes "Sortin2" como "respuesta a estrés", podría simplemente estar representando una respuesta generalizada a la aplicación exógena de un químico sintético como Sortin2. Sin embargo, en respuesta a NAA, también una molécula sintética, no se enriquece los mismos procesos biológicos como respuesta a "estímulos bióticos" ó "respuesta a estrés", sugiriendo que los procesos biológicos que subyacen a la respuesta transcripcional de Sortin2, son mecanismos por el cuál se modula la formación de las raíces laterales en respuesta a este compuesto.

En efecto, Xie *et al*, postula que es posible que las plantas usen mecanismos para dirigir respuestas de crecimiento a través de la respuesta transcripcional a un cierto tipo de estrés (Xie et al., 2014). Esta es una concepción que deriva de la participación de REVOLUTA, un determinante del *patterning* temprano de la hoja, que actúa como un sensor de estrés oxidativo dirigiendo la expresión de WRKY53, para dar forma a la hoja en etapas tardías de su desarrollo (Xie et al., 2014). REVOLUTA y WRKY53 tienen un patrón de expresión complementario, por lo que se sugiere que podrían dar forma al sistema radicular también (Xie et al., 2014). Es más, señales de estrés oxidativo pueden incluso controlar los niveles de transcritos de reguladores moleculares de la diferenciación celular, que son regulados transcripcionalmente por auxina. Plántulas con estrés oxidativo en el cloroplasto por sobreexpresión de la enzima glicolato oxidasa, aumenta en ~10 veces los niveles de transcritos del factor de transcripción GATA23, el primer especificador descrito para las células fundadoras de las raíces laterales (Balazadeh et al., 2012).

En el marco del proyecto de tesis doctoral de Carlos Rubilar en el laboratorio de la Dra. Norambuena, se logró visualizar un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en respuesta a tratamientos de menos de 1 hora con Sortin2. Utilizando el inhibidor de ROS, difenileno iodonium (DPI), fue posible inhibir la formación de las

raíces laterales en respuesta a Sortin2. Tratamientos con DPI también produjo una inhibición de la respuesta a NAA exógeno en términos de la formación de las raíces laterales. Esto sugiere que tanto Sortin2 como NAA es mediado en su señalización por señales dependientes de ROS. Esta conclusión se sustenta en el recientemente revelado rol de la señalización ROS en la formación de las raíces laterales (Manzano et al., 2014).

Otros procesos enriquecidos en los genes "Sortin2" como "comunicación celular", podrían estar representando el establecimiento de la comunicación que se ha propuesto que debe existir entre las células del protoxilema y las células de periciclo, al momento de la definición de células fundadoras de raíz lateral, en el meristema basal de la raíz principal (De Smet et al., 2007; Yue and Beeckman, 2014). Así mismo, pueden formar parte de la comunicación entre la endodermis y el periciclo al momento de la iniciación de una raíz lateral, que se sabe que existe, pero cuyos participantes moleculares no son conocidos (Kumpf et al., 2013; Yue and Beeckman, 2014).

El proceso de "comunicación celular" enriquecido entre los genes "Sortin2", también puede estar representando un papel fundamental en las señales que entrega la capa más externa de la raíz LRC (Lateral Root Cap). Las células de LRC movilizan un precursor de auxina que tiene influencia en la definición hacia célula fundadora que se establece en las células del periciclo, en la porción más interna la raíz principal. La respuesta a Sortin2 podrían estar induciendo la señal de comunicación que se ha aludido que existe entre estas capas celulares (De Rybel et al., 2012; Kumpf and Nowack, 2015; Xuan et al., 2015).

4.4 Sortin2 afecta una vía de señalización parcialmente diferente de la señalización canónica de auxina.

Tratamientos con Sortin2 inducen la formación *de novo* de raíces laterales. Para observar el efecto inductor de la formación de las raíces laterales, no se requiere la actividad del receptor de auxina *tir1afb1,2,3* (Figura 5 y Pérez-Henríquez *et al*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que la mutante *tir1a/afb1,2,3* no responde a la aplicación de auxina exógena, en términos de la formación de las raíces laterales (Dharmasiri *et al.*, 2005b). Esto genera un elemento de separación entre las vías de Sortin2 y Auxina (Figura 23 - (1)).

Otros estímulos exógenos, también inducen la formación de las raíces laterales de manera independiente al receptor de auxina TIR1, al igual que Sortin2. Un ejemplo de esto es la inducción mecánica de la formación de las raíces laterales (Richter *et al.*, 2009). Aunque se conoce poco de la vía de transducción de la señal que utilizan los estímulos mecánicos, está bien descrito que requiere de la señalización por Ca^{+2} . Consistentemente con lo anterior, los inhibidores del flujo de Ca^{+2} como $LaCl_3$, impiden la estimulación mecánica de las raíces laterales (Richter *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos en el marco del proyecto de tesis doctoral de Carlos Rubilar muestran que la inhibición de la respuesta a Ca^{+2} y de ROS, inhiben la formación de las raíces laterales estimuladas por Sortin2. Interesantemente, la inhibición de la respuesta a Ca^{+2} , no inhiben la formación de las raíces laterales estimuladas por NAA exógena (Rubilar, 2013). Por lo tanto, los mecanismos de transducir la señal de inducción de la formación las raíces laterales por aplicación exógena de Sortin2 y NAA, son separables en este punto (Figura 23 - (2)).

Otra importante diferencia de Sortin2 frente a la señalización por auxina se

revela dado que Sortin2 requiere la degradación de proteínas Aux/IAA, pero no gatilla su degradación (Figura 5 y Figura 23 - (3)). Es coherente entonces que como resultado de mecanismos de transducción de la señal diferentes existan respuesta transcripcionales asociadas a procesos biológicos diferentes (Figura 15 y Figura 23 - (4)).

Así mismo, los elementos de regulación transcripcional que utilizan Sortin2 y NAA para montar sus respectivas respuestas transcripcionales, son diferentes (Figura 16 y Tabla V). El sitio de unión para el factor de transcripción TGA1 es el más enriquecido entre los promotores de los genes de respuesta a Sortin2. El regulador transcripcional TGA1 interactúa con proteínas como NPR3 para lograr la inducción de factores del tipo WRKY, como parte de la transducción de la señal de la hormona ácido salicílico (Gruner et al., 2013; Shi et al., 2013). Tanto NPR3 como factores WRKY son parte de los genes identificados en esta tesis con putativa participación en la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2, GEPPERALS (Figura 17 y Tabla VI). El factor TGA1 fue descrito recientemente como un regulador de la iniciación de las raíces laterales en respuesta a nitrato (Alvarez et al., 2014). Es plausible esperar que otros interactores moleculares de TGA1 como los son algunos miembros de los genes GEPPERALS (NPR3 y WRKY 51/54/70), tengan una participación la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2 (Figura 23 - (5)). Es participación se puede producir ya sea directamente en la iniciación o en la emergencia de las raíces laterales o sobre la señalización dependiente de la degradación de las proteínas Aux/IAA (Figura 23 (6-7)). También se podría producir a través de genes para la inducción de las raíces laterales que responden a Sortin2 ((Figura 23 (8?)), los cuáles podrían estar interactuando o no con los genes de inducción de las raíces laterales en respuesta a auxina ((Figura 23 (9-10?)).

Resultados preliminares realizados durante esta tesis indican que mutantes

insercionales, no genotipificadas, en los genes WRKY51 y WRKY70, poseen un menor número de raíces laterales que una planta silvestre, aún cuando poseen un tamaño de raíz principal mayor, lo que indicaría una participación de estos genes en la formación de las raíces laterales. Así mismo, estas mutantes pérdida de función presentan una menor densidad de las raíces laterales en respuesta a Sortin2 respecto a una planta silvestre. Interesantemente, un alelo de mutante insercional de WRKY51 en la región promotora de este presenta un aumento en la intensidad de respuesta frente a Sortin2. Estos resultados deberán ser corroborados en mutantes genotipificadas para establecer más claramente su participación en la inducción de las raíces laterales en respuesta a Sortin2. En todos los escenarios, la participación de estos factores de transcripción en la formación de las raíces laterales estaría desligado de su comportamiento como genes de respuesta a salicilato, ya que la aplicación exógena de esta hormona inhibe, en vez de promueve, la formación de las raíces laterales (Figura 22).

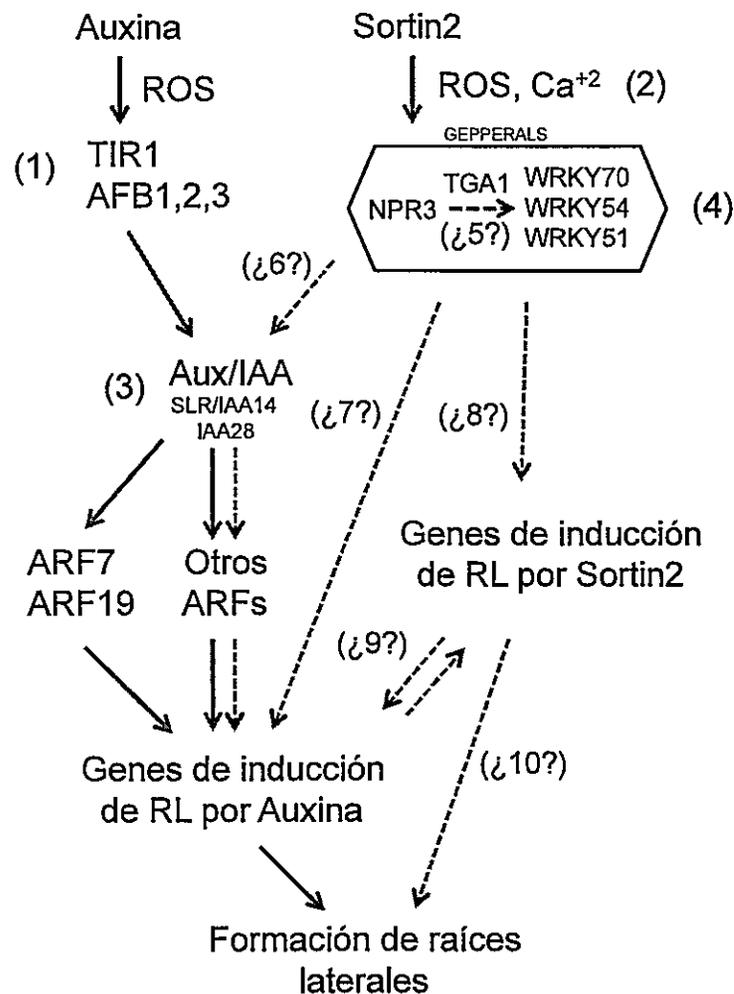


Figura 23. Modelo de interacción de la vía utilizada para responder a Sortin2 con la vía de señalización canónica de auxina conducente a la formación de las raíces laterales (RL).

La vía utilizada para formar raíces laterales en respuesta a Sortin2 (flechas verdes) difiere de la señalización canónica de auxina (flechas azules) en al menos 4 puntos. (1) La vía utilizada para responder a Sortin2 es independiente del receptor SCF^{TIR/AFB1,2,3}, mientras que la auxina depende de esa función molecular. (2) La vía utilizada para responder a Sortin2, pero no la señalización canónica de auxina, es inhibible por inhibidores de calcio (Rubilar, 2013). El efecto sobre la formación de raíces laterales tanto de Sortin2 como de auxina son inhibibles por inhibidores de la formación de ROS (Rubilar, 2013). (3) La vía de respuesta a Sortin2 requiere pero no induce la degradación de proteínas, mientras que la auxina induce y requiere la degradación de estas proteínas. (4) La vía de respuesta a Sortin2 induce cambios transcripcionales, diferentes a los modificados en auxina, en Genes con una

Putativa Participación En la formación de RAíces Laterales en respuesta a Sortin2, GEPPERALS. (¿5?) Los genes GEPPERALS NPR3, WRKY51, WRKY54, WRKY70 podrían estar formando una vía de regulación de expresión génica que incluiría a TGA1. Esto está basado en que los genes "Sortin2" tienen enriquecido en su región reguladora a los TFBS para el factor de transcripción TGA1. (¿6?) Los genes GEPPERALS podrían controlar la expresión de "genes de inducción de RL por auxina" actuando río arriba de la degradación de proteínas Aux/IAA. Esto está basado en que la degradación de proteínas Aux/IAA es requerida para la formación de las raíces laterales en respuesta a Sortin2. (¿7?) Alternativamente, los genes GEPPERALS podrían controlar la expresión de "genes de inducción de RL por auxina" actuando río abajo de la degradación de proteínas Aux/IAA. Esto está basado en que Sortin2 no induce la degradación de proteínas Aux/IAA. (¿8?) Por último, los genes GEPPERALS podrían conducir la expresión de "genes de inducción de RL por Sortin2" actuando de manera paralela a las proteínas Aux/IAA. Esto también está basado en que Sortin2 no induce la degradación de proteínas Aux/IAA. (¿9?) Los "genes de inducción de RL por Sortin2" podrían estar río arriba o río abajo de los "genes de inducción de RL por auxina". (¿10?) Los "genes de inducción de RL por Sortin2" podrían participar en la formación de las raíces laterales sin ser mediado por los "genes de inducción de RL por auxina".

5 CONCLUSIONES

1. Sortin2 induce la etapa de la iniciación de las raíces laterales, lo que correlaciona con la inducción de marcadores de actividad mitótica y de definición de célula fundadora de raíz lateral en la capa celular del periciclo, donde se inician las raíces laterales.

2. La formación de las raíces laterales estimulada por Sortin2 requiere de componentes moleculares parcialmente diferentes de la señalización canónica de auxina. Sortin2 estimula la formación de las raíces laterales en ausencia del receptor de auxina SCF^{TIR1/AFB1,2,3} y de los factores de transcripción ARF7 y ARF19 que regulan la formación de las raíces laterales como parte de la señalización canónica de auxina.

3. Los genes diferencialmente expresados que se identifican en raíces sometidas a tratamientos con Sortin2 y a la auxina NAA, se sobrelapan parcialmente, permitiendo identificar grupos de genes que solo responden a uno de los dos estímulos, los denominados "Sortin2" y "NAA", y un grupo de genes que responden a ambos estímulos, denominado "Sortin2 \cap NAA".

4. La modificación de los niveles de transcrito de los genes "Sortin2 \cap NAA" sería relevante para la formación de las raíces laterales tanto en respuesta a Sortin2 como en respuesta a NAA. La identificación de este grupo de genes es consistente con que ambos estímulos requieren la degradación de proteínas Aux/IAA para estimular la formación de las raíces laterales.

5. Los genes del grupo "Sortin2" están enriquecidos en procesos biológicos diferentes a los asociados a los genes del grupo "NAA". Así mismo, los elementos de cis-regulación enriquecidos entre estos dos grupos también son diferentes.

6. Los genes del grupo "Sortin2" están enriquecidos en los procesos biológicos "respuesta a estímulos bióticos", "transducción de señal" y "comunicación celular". A partir de estos genes se logró identificar a Genes con una Putativamente Participación En la formación de RAíces Laterales en Respuesta a Sortin2, GEPPERALS.

7. La evaluación de la posible participación en la formación de las raíces laterales de los genes NPR3, WRKY51, WRKY54 y WRKY70, miembros los genes GEPPERALS, se posiciona como una promisorio actividad a realizar en futuras investigaciones.

8. Sortin2 genera respuestas moleculares parcialmente diferentes a los que genera la auxina NAA, en cuanto al montaje del perfil transcriptómico y en cuanto a los requerimientos de componentes moleculares necesarios para estimular la formación de las raíces laterales, indicando que Sortin2 estimula la formación de las raíces laterales mediante una ruta alternativa a la señalización canónica de auxina.

6 REFERENCIAS

- Alvarez JM, Riveras E, Vidal EA, Gras DE, Contreras-López O, Tamayo KP, Aceituno F, Gómez I, Ruffel S, Lejay L, et al (2014)** Systems approach identifies TGA1 and TGA4 transcription factors as important regulatory components of the nitrate response of *Arabidopsis thaliana* roots. *Plant J* **80**: 1–13
- Anders S, Pyl PT, Huber W (2015)** HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**: 166–169
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004)** Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**: 5245–5250
- Atkinson JA, Rasmussen A, Traini R, Voß U, Sturrock C, Mooney SJ, Wells DM, Bennett MJ (2014)** Branching out in roots: uncovering form, function, and regulation. *166*: 538–550
- Audenaert D, De Rybel B, Nguyen L, Beeckman T (2013)** Small-molecule screens to study lateral root development. *Methods Mol Biol* **959**: 189–195
- Balazadeh S, Jaspert N, Arif M, Mueller-Roeber B, Maurino VG (2012)** Expression of ROS-responsive genes and transcription factors after metabolic formation of H₂O₂ in chloroplasts. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2012.00234
- Band LR, Wells DM, Larrieu A, Sun J, Middleton AM, French AP, Brunoud G, Sato EM, Wilson MH, Péret B, et al (2012)** Root gravitropism is regulated by a transient lateral auxin gradient controlled by a tipping-point mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 4668–4673
- Beeckman T, Engler G (1994)** An Easy Technique for the Clearing of Histochemically Stained Plant Tissue. *Plant Molecular Biology Reporter* **12**: 37–42
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995)** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*. doi: 10.2307/2346101
- Benková E, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Dubrovsky JG (2009)** A morphogenetic trigger: is there an emerging concept in plant developmental biology? *Trends Plant Sci* **14**: 189–193
- Besseau S, Li J, Palva ET (2012)** WRKY54 and WRKY70 co-operate as negative regulators of leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **63**: 2667–2679
- Bhalerao RP, Bennett MJ (2003)** The case for morphogens in plants. *Nat Cell Biol* **5**: 939–943
- Boyle EI, Weng S, Gollub J, Jin H, Botstein D, Cherry JM, Sherlock G (2004)** GO::TermFinder—open source software for accessing Gene Ontology information

and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics* **20**: 3710–3715

Brunoud G, Wells DM, Oliva M, Larrieu A, Mirabet V, Burrow AH, Beeckman T, Kepinski S, Traas J, Bennett MJ, et al (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* **482**: 103–106

Calderon-Villalobos LI, Tan X, Zheng N, Estelle M (2010) Auxin perception—structural insights. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:

Calderón Villalobos LIA, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard LB, Tan X, Parry G, Mao H, et al (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nat Chem Biol* **8**: 477–485

Casero PJ, Casimiro I, Lloret PG (1995) Lateral root initiation by asymmetrical transverse divisions of pericycle cells in four plant species: *Raphanus sativus*, *Helianthus annuus*, *Zea mays*, and *Daucus carota*. *Protoplasma* **188**: 49–58

Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beeckman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inze D, Sandberg G, Casero PJ, et al (2001) Auxin transport promotes *Arabidopsis* lateral root initiation. *Plant Cell* **13**: 843–852

Chandler JW (2011) Founder cell specification. *Trends Plant Sci* **16**: 607–613

Chang W-C, Lee T-Y, Huang H-D, Huang H-Y, Pan R-L (2008) PlantPAN: Plant promoter analysis navigator, for identifying combinatorial cis-regulatory elements with distance constraint in plant gene groups. *BMC Genomics* **9**: 561–561

Chapman EJ, Estelle M (2009) Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. *Annu Rev Genet* **43**: 265–285

Coates JC, Laplaze L, Haseloff J (2006) Armadillo-related proteins promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 1621–1626

Colquhoun D (2014) An investigation of the false discovery rate and the misinterpretation of p-values. *R Soc Open Sci* **1**: 140216

De Rybel B, Audenaert D, Beeckman T, Kepinski S (2009) The past, present, and future of chemical biology in auxin research. *ACS Chem Biol* **4**: 987–998

De Rybel B, Audenaert D, Xuan W, Overvoorde P, Strader LC, Kepinski S, Hoye R, Brisbois R, Parizot B, Vanneste S (2012) A role for the root cap in root branching revealed by the non-auxin probe naxillin. *Nat Chem Biol*

De Rybel B, Vassileva V, Parizot B, Demeulenaere M, Grunewald W, Audenaert D, Van Campenhout J, Overvoorde P, Jansen L, Vanneste S, et al (2010) A Novel Aux/IAA28 Signaling Cascade Activates GATA23-Dependent Specification of Lateral Root Founder Cell Identity. *Current Biology* **20**: 1697–1706

De Smet I, Tetsumura T, De Rybel B, Frey NFD, Laplaze L, Casimiro I, Swarup R,

- Naudts M, Vanneste S, Audenaert D, et al (2007)** Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development* **134**: 681–690
- De Smet I, Vassileva V, De Rybel B, Levesque MP, Grunewald W, Van Damme D, Van Noorden G, Naudts M, Van Isterdael G, De Clercq R, et al (2008)** Receptor-like kinase ACR4 restricts formative cell divisions in the *Arabidopsis* root. *Science* **322**: 594–597
- De Smet I, White PJ, Bengough AG, Dupuy L, Parizot B, Casimiro I, Heidstra R, Laskowski M, Lepetit M, Hochholdinger F, et al (2012)** Analyzing lateral root development: how to move forward. *THE PLANT CELL ONLINE* **24**: 15–20
- Del Pozo JC, Dharmasiri S, Hellmann H, Walker L, Gray WM, Estelle M (2002)** AXR1-ECR1-dependent conjugation of RUB1 to the *Arabidopsis* Cullin AtCUL1 is required for auxin response. *Plant Cell* **14**: 421–433
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005a)** The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nat Cell Biol* **435**: 441–445
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M (2005b)** Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev Cell* **9**: 109–119
- DiDonato RJ, Arbuckle E, Buker S, Sheets J, Tobar J, Totong R, Grisafi P, Fink GR, Celenza JL (2004)** *Arabidopsis* ALF4 encodes a nuclear-localized protein required for lateral root formation. *Plant J* **37**: 340–353
- Ditengou FA, Teale WD, Kochersperger P, Flittner KA, Kneuper I, van der Graaff E, Nziengui H, Pinosa F, Li X, Nitschke R, et al (2008)** Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 18818–18823
- Dubrovsky JG, Doerner PW, Colón-Carmona A, Rost TL (2000)** Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in *Arabidopsis*. **124**: 1648–1657
- Dubrovsky JG, Forde BG (2012)** Quantitative analysis of lateral root development: pitfalls and how to avoid them. *Plant Cell* **24**: 4–14
- Dubrovsky JG, Gambetta GA, Hernández-Barrera A, Shishkova S, González I (2006)** Lateral root initiation in *Arabidopsis*: developmental window, spatial patterning, density and predictability. *Ann Bot* **97**: 903–915
- Dubrovsky JG, Sauer M, Napsucialy-Mendivil S, Ivanchenko MG, Friml J, Shishkova S, Celenza J, Benková E (2008)** Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 8790–8794
- Dubrovsky JG, Soukup A, Napsucialy-Mendivil S, Jeknic Z, Ivanchenko MG (2009)** The lateral root initiation index: an integrative measure of primordium formation. *Ann Bot* **103**: 807–817

- Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z (2009)** GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* **10**: 48
- Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE (2000)** The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci* **5**: 199–206
- Ferreira PC, Hemerly AS, Engler JD, van Montagu M, Engler G, Inzé D (1994)** Developmental expression of the arabidopsis cyclin gene *cyc1At*. *Plant Cell* **6**: 1763–1774
- Fu ZQ, Yan S, Saleh A, Wang W, Ruble J, Oka N, Mohan R, Spoel SH, Tada Y, Zheng N, et al (2013)** NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**: 228–232
- Fukaki H, Tasaka M (2002)** Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the SOLITARY-ROOT/IAA14 gene of Arabidopsis. *Plant J* **29**: 153–168
- Fury W, Batliwalla F, Gregersen PK, Li W (2006)** Overlapping probabilities of top ranking gene lists, hypergeometric distribution, and stringency of gene selection criterion. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* **1**: 5531–5534
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, et al (2004)** Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* **5**: R80
- Giehl RFH, Lima JE, Wirén von N (2012)** Localized iron supply triggers lateral root elongation in Arabidopsis by altering the AUX1-mediated auxin distribution. *THE PLANT CELL ONLINE* **24**: 33–49
- Gray WM, Kepinski S, Rouse D, Leyser O, Estelle M (2001)** Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**: 271–276
- Greenham K, Santner A, Castillejo C, Mooney S, Sairanen I, Ljung K, Estelle M (2011)** The AFB4 auxin receptor is a negative regulator of auxin signaling in seedlings. *Curr Biol* **21**: 520–525
- Gruner K, Griebel T, Návarová H, Attaran E, Zeier J (2013)** Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2013.00252
- Grunewald W, Friml J (2010)** The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J* **29**: 2700–2714
- Gutierrez (2009)** The Arabidopsis Cell Division Cycle. *arab book* 1–20
- Gutiérrez-Luna FM, López-Bucio J, Altamirano-Hernández J, Valencia-Cantero E, Cruz HR, Macías-Rodríguez L (2010)** Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in Arabidopsis thaliana through volatile organic compound emission. *Symbiosis* **51**: 75–83
- Haswell ES, Peyronnet R, Barbier-Brygoo H, Meyerowitz EM, Frachisse J-M (2008)**

Two MscS homologs provide mechanosensitive channel activities in the Arabidopsis root. *Curr Biol* **18**: 730–734

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**: R19

Hicks GR, Raikhel NV (2012) Small Molecules Present Large Opportunities in Plant Biology. Annual review of plant biology **63**: 261–282

Himanen K, Vanneste S, Inzé D, Beeckman T (2002) Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell* **14**: 2339–2351

Himanen K, Vuylsteke M, Vanneste S, Vercruyssen S, Boucheron E, Alard P, Chriqui D, Van Montagu M, Inzé D, Beeckman T (2004) Transcript profiling of early lateral root initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 5146–5151

Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**: 3901–3907

Kachroo A, Robin GP (2013) Systemic signaling during plant defense. *Curr Opin Plant Biol* **16**: 527–533

Katari MS, Nowicki SD, Aceituno FF, Nero D, Kelfer J, Thompson LP, Cabello JM, Davidson RS, Goldberg AP, Shasha DE, et al (2010) VirtualPlant: a software platform to support systems biology research. **152**: 500–515

Kepinski S, Leyser O (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 446–451

Kleine-Vehn J, Leitner J, Zwiewka M, Abas L, Luschnig C, Friml J (2008) Differential degradation of PIN2 auxin efflux carrier by retromer-dependent vacuolar targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 17812–17817

Koornneef M, Meinke D (2010) The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J* **61**: 909–921

Krämer U (2015) Planting molecular functions in an ecological context with Arabidopsis thaliana. *Elife*. doi: 10.7554/eLife.06100.001

Krinke O, Ruelland E, Valentová O, Vergnolle C, Renou J-P, Taconnat L, Flemr M, Burketová L, Zachowski A (2007) Phosphatidylinositol 4-kinase activation is an early response to salicylic acid in Arabidopsis suspension cells. **144**: 1347–1359

Ku HH (1966) Notes on the use of propagation of error formulas. *Journal of Research of the National Bureau of Standards, Section C: Engineering and Instrumentation* **70C**: 263

Kumpf RP, Nowack MK (2015) The root cap: a short story of life and death. *J Exp Bot* **1–13**

- Kumpf RP, Shi C-L, Larrieu A, Stø IM, Butenko MA, Péret B, Riiser ES, Bennett MJ, Aalen RB (2013)** Floral organ abscission peptide IDA and its HAE/HSL2 receptors control cell separation during lateral root emergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 5235–5240
- Laskowski M, Grieneisen VA, Hofhuis H, Hove CAT, Hogeweg P, Marée AFM, Scheres B (2008)** Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biol* **6**: e307
- Lavenus J, Goh T, Roberts I, Guyomarc'h S, Lucas M, De Smet I, Fukaki H, Beeckman T, Bennett M, Laplaze L (2013)** Lateral root development in *Arabidopsis*: fifty shades of auxin. *Trends Plant Sci* **18**: 450–458
- Leonelli S (2007)** *Arabidopsis*, the botanical *Drosophila*: from mouse cress to model organism. *Endeavour* **31**: 34–38
- Li F-Q, Mofunanya A, Harris K, Takemaru K-I (2008)** Chibby cooperates with 14-3-3 to regulate β -catenin subcellular distribution and signaling activity. *J Cell Biol* **181**: 1141–1154
- Lincoln C, Britton JH, Estelle M (1990)** Growth and development of the *axr1* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2**: 1071–1080
- Malamy JE (2005)** Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ* **28**: 67–77
- Malamy JE, Benfey PN (1997)** Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**: 33–44
- Manzano C, Pallero-Baena M, Casimiro I, De Rybel B, Orman-Ligeza B, Van Isterdael G, Beeckman T, Draye X, Casero P, del Pozo JC (2014)** The Emerging Role of Reactive Oxygen Species Signaling during Lateral Root Development. **165**: 1105–1119
- Marchant A, Bhalerao R, Casimiro I, Eklöf J, Casero PJ, 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
- Mathelier A, Shi W, Wasserman WW (2015a)** Identification of altered cis-regulatory elements in human disease. *Trends Genet* **31**: 67–76
- Mathelier A, Shi W, Wasserman WW (2015b)** Identification of altered cis-regulatory elements in human disease. *Trends Genet* **31**: 67–76
- Mathelier A, Zhao X, Zhang AW, Parcy F, Worsley-Hunt R, Arenillas DJ, Buchman S, Chen C-Y, Chou A, Ionescu H, et al (2014)** JASPAR 2014: an extensively expanded and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* **42**: D142–7
- Mestdagh P, Van Vlierberghe P, De Weer A, Muth D, Westermann F, Speleman F,**

- Vandesompele J** (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* **10**: R64
- Méndez-Bravo A, Calderón-Vázquez C, Ibarra-Laclette E, Raya-González J, Ramírez-Chávez E, Molina-Torres J, Guevara-García AA, López-Bucio J, Herrera-Estrella L** (2011) Alkamides activate jasmonic acid biosynthesis and signaling pathways and confer resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **6**: e27251
- Mockaitis K, Estelle M** (2008) Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **24**: 55–80
- Monshausen GB, Gilroy S** (2009) Feeling green: mechanosensing in plants. *Trends Cell Biol* **19**: 228–235
- Morales S** (2015) Estudio del mecanismo inductor de Sortin2 en la organogénesis de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Tutor: Dra. Lorena Norambuena.
- Moreno-Risueno MA, Benfey PN** (2011) Time-based patterning in development: The role of oscillating gene expression. *Transcription* **2**: 124–129
- Moreno-Risueno MA, Busch W, Benfey PN** (2010a) Omics meet networks - using systems approaches to infer regulatory networks in plants. *Curr Opin Plant Biol* **13**: 126–131
- Moreno-Risueno MA, Van Norman JM, Moreno A, Zhang J, Ahnert SE, Benfey PN** (2010b) Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science* **329**: 1306–1311
- Murphy JE, Padilla BE, Hasdemir B, Cottrell GS, Bunnett NW** (2009) Endosomes: A legitimate platform for the signaling train. *PNAS* **106**: 17615–17622
- Nibau C, Gibbs DJ, Bunting KA, Moody LA, Smiles EJ, Tubby JA, Bradshaw SJ, Coates JC** (2011) ARABIDILLO proteins have a novel and conserved domain structure important for the regulation of their stability. *Plant Mol Biol* **75**: 77–92
- Nolan T, Hands RE, Bustin SA** (2006) Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* **1**: 1559–1582
- Obayashi T, Hayashi S, Saeki M, Ohta H, Kinoshita K** (2009) ATTED-II provides coexpressed gene networks for *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **37**: D987–91
- Obayashi T, Nishida K, Kasahara K, Kinoshita K** (2011) ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants. *Plant Cell Physiol* **52**: 213–219
- 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

- Overvoorde P, Fukaki H, Beeckman T (2010)** Auxin control of root development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:
- Parizot B, De Rybel B, Beeckman T (2010)** VisuaLRTC: a new view on lateral root initiation by combining specific transcriptome data sets. *153*: 34–40
- Parizot B, Roberts I, Raes J, Beeckman T, De Smet I (2012)** In silico analyses of pericycle cell populations reinforce their relation with associated vasculature in *Arabidopsis*. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* **367**: 1479–1488
- Péret B, De Rybel B, Casimiro I, Benková E, Swarup R, Laplaze L, Beeckman T, Bennett MJ (2009)** *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci* **14**: 399–408
- Péret B, Li G, Zhao J, Band LR, Voß U, Postaire O, Luu D-T, Da Ines O, Casimiro I, Lucas M, et al (2012)** Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nat Cell Biol* **14**: 991–998
- Pérez-Henríquez P (2009)** Analisis del Efecto de Sortin2 en la Respuesta a Auxinas y en el Sistema de Endomembranas. Tesis para obtener el título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Universidad de Chile. Tutor: Dra. Lorena Norambuena.
- Pérez-Henríquez P (2010)** Caracterización celular y molecular de los efectos de Sortin2 en *A. thaliana*. Tesis para obtener el grado de Magister en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile. Tutor: Dra. Lorena Norambuena, Co-tutor: Dra. Michael Handford
- Pérez-Henríquez P, Raikhel NV, Norambuena L (2012)** Endocytic trafficking towards the vacuole plays a key role in the auxin receptor SCF(TIR)-independent mechanism of lateral root formation in *A. thaliana*. *Mol Plant* **5**: 1195–1209
- Pizarro L (2015)** Identificación y estudio funcional de factores de transcripción que regulan la expresión de genes del sistema de endomembrana en *Arabidopsis thaliana*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile. Tutor: Dra. Lorena Norambuena, Co-tutor: Dra. Victoria Guixé
- Rahman A, Takahashi M, Shibasaki K, Wu S, Inaba T, Tsurumi S, Baskin TI (2010)** Gravitropism of *Arabidopsis thaliana* roots requires the polarization of PIN2 toward the root tip in meristematic cortical cells. *Plant Cell* **22**: 1762–1776
- Raikhel N, Hicks G (2007)** Signaling from plant endosomes: compartments with something to say! *Genes Dev* **21**: 1578–1580
- Richter GL, Monshausen GB, Kroi A, Gilroy S (2009)** Mechanical stimuli modulate lateral root organogenesis. *151*: 1855–1866
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010)** edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140

- Robinson MD, Oshlack A (2010)** A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* **11**: R25
- Rogg LE, Lasswell J, Bartel B (2001)** A Gain-of-Function Mutation in IAA28 Suppresses Lateral Root Development. *THE PLANT CELL ONLINE*
- Roycewicz PS, Malamy JE (2014)** Cell wall properties play an important role in the emergence of lateral root primordia from the parent root. *J Exp Bot* eru056
- Rubilar C (2013)** Caracterización del mecanismo de transducción de señales que participa en la formación de raíces laterales independiente de SCF^{TIR1} inducida por el tráfico endocítico en *Arabidopsis thaliana*.
- . Proyecto de Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad de Chile. Tutor: Dra. Lorena Norambuena.
- Ruijter JM, Ramakers C (2012)** Analysis of real-time quantitative PCR data. 1–12
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJB, Moorman AFM (2009)** Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* **37**: e45–e45
- Ruiz Herrera LF, Shane MW, López-Bucio J (2015)** Nutritional regulation of root development. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **4**: 431–443
- Shen Q, Ho TH (1995)** Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell* **7**: 295–307
- Shi Z, Maximova S, Liu Y, Verica J, Guiltinan MJ (2013)** The salicylic acid receptor NPR3 is a negative regulator of the transcriptional defense response during early flower development in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **6**: 802–816
- Si-Ammour A, Windels D, Arn-Boulidoires E, Kutter C, Ailhas J, Meins F, Vazquez F (2011)** miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the TIR1/AFB2 auxin receptor clade and auxin-related development of *Arabidopsis* leaves. **157**: 683–691
- Storey JD, Tibshirani R (2003)** Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 9440–9445
- Stormo GD (2000)** DNA binding sites: representation and discovery. *Bioinformatics* **16**: 16–23
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M (2001)** Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev* **15**: 2648–2653
- Tan X, Calderón Villalobos LIA, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N (2007)** Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase.

Nature 446: 640–645

- Thornton B, Basu C** (2011) Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem Mol Biol Educ* 39: 145–154
- Torrey JG** (1950) The Induction of Lateral Roots by Indoleacetic Acid and Root Decapitation. *American Journal of Botany* 37: 257–264
- Udvardi MK, Czechowski T, Scheible W-R** (2008) Eleven golden rules of quantitative RT-PCR. *Plant Cell* 20: 1736–1737
- Uehara T, Okushima Y, Mimura T, Tasaka M, Fukaki H** (2008) Domain II Mutations in CRANE/IAA18 Suppress Lateral Root Formation and Affect Shoot Development in *Arabidopsis thaliana*. *THE PLANT CELL ONLINE* 49: 1025–1038
- Ulmasov T, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9: 1963–1971
- Van Norman JM, Xuan W, Beeckman T, Benfey PN** (2013) To branch or not to branch: the role of pre-patterning in lateral root formation. *Development* 140: 4301–4310
- Vanneste S, De Rybel B, Beemster GTS, Ljung K, De Smet I, Van Isterdael G, Naudts M, Iida R, Gruijsem W, Tasaka M, et al** (2005a) Cell cycle progression in the pericycle is not sufficient for SOLITARY ROOT/IAA14-mediated lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 17: 3035–3050
- Vanneste S, Maes L, De Smet I, Himanen K, Naudts M, Inze D, Beeckman T** (2005b) Auxin regulation of cell cycle and its role during lateral root initiation. *Physiologia Plantarum* 123: 139–146
- Verbelen J-P, De Cnodder T, Le J, Vissenberg K, Baluška F** (2006) The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities. *Plant Signaling & Behavior*. doi: 10.4161/psb.1.6.3511
- Vermeer JEM, Geldner N** (2015) Lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*: a force awakens. *F1000Prime Rep* 7: 32
- Vermeer JEM, Wangenheim von D, Barberon M, Lee Y, Stelzer EHK, Maizel A, Geldner N** (2014) A spatial accommodation by neighboring cells is required for organ initiation in *Arabidopsis*. *Science* 343: 178–183
- Vidal EA, Arous V, Lu C, Parry G, Green PJ, Coruzzi GM, Gutiérrez RA** (2010) Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107: 4477–4482
- Vilches-Barro A, Maizel A** (2015) Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 23: 31–38

- Voß U, Wilson MH, Kenobi K, Gould PD, Robertson FC, Peer WA, Lucas M, Swarup K, Casimiro I, Holman TJ, et al (2015)** The circadian clock rephases during lateral root organ initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Comms* **6**: 7641
- Wasserman WW, Sandelin A (2004)** Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nat Rev Genet* **5**: 276–287
- Wells DM, Laplaze L, Bennett MJ, Vernoux T (2013)** Biosensors for phytohormone quantification: challenges, solutions, and opportunities. *Trends Plant Sci* **18**: 244–249
- Werner T (2008)** Bioinformatics applications for pathway analysis of microarray data. *Current Opinion in Biotechnology* **19**: 50–54
- Wu TD, Nacu S (2010)** Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. *Bioinformatics* **26**: 873–881
- Xie Y, Huhn K, Brandt R, Potschin M, Bieker S, Straub D, Doll J, Drechsler T, Zentgraf U, Wenkel S (2014)** REVOLUTA and WRKY53 connect early and late leaf development in *Arabidopsis*. *Development* **141**: 4772–4783
- Xuan W, Audenaert D, Parizot B, Möller BK, Njo MF, De Rybel B, De Rop G, Van Isterdael G, Mähönen AP, Vanneste S, et al (2015)** Root Cap-Derived Auxin Pre-patterns the Longitudinal Axis of the *Arabidopsis* Root. *Curr Biol* **1–9**
- Xuan W, Murphy E, Beeckman T, Audenaert D, De Smet I (2013)** Synthetic molecules: helping to unravel plant signal transduction. *J Chem Biol* **6**: 43–50
- Yadav SR, Bishopp A, Helariutta Y (2010)** Plant development: early events in lateral root initiation. *Curr Biol* **20**: R843–5
- Yi X, Du Z, Su Z (2013)** PlantGSEA: a gene set enrichment analysis toolkit for plant community. *Nucleic Acids Res* **41**: W98–W103
- Yue K, Beeckman T (2014)** Cell-to-cell communication during lateral root development. *Mol Plant* **7**: 758–760
- Zambelli F, Pesole G, Pavesi G (2009)** Pscan: finding over-represented transcription factor binding site motifs in sequences from co-regulated or co-expressed genes. *Nucleic Acids Res* **37**: W247–W252
- Zastrow Von M, Sorkin A (2007)** Signaling on the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 436–445
- Zhang H, Forde BG (2000)** Regulation of *Arabidopsis* root development by nitrate availability. *J Exp Bot* **51**: 51–59