

UCH-FC  
Biotecnología  
G 643  
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE PREGRADO



**“Los factores de transcripción NTL9 y NAC017 participan del tráfico endocítico y de la inducción de raíces laterales mediada por Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*.”**

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

**Claudia Natalia González Ramírez**

Director del Seminario de Título: Doctora Lorena Norambuena Morales

Enero de 2015. Santiago, Chile.



## INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias que el Seminario de Título presentado por la candidata **Claudia Natalia González Ramírez**

**“Los factores de transcripción NTL9 y NAC017 participan del tráfico endocítico y de la inducción de raíces laterales mediada por Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*”**

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

Doctora Lorena Norambuena Morales  
**Director Seminario de Título**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

### Comisión Revisora y Evaluadora

Doctor Álvaro Glavic Maurer  
**Presidente Comisión**



Doctor Michael Handford  
**Evaluador**

Una firma manuscrita en tinta azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, enero de 2015.

## DEDICATORIA

Después del laaaaaaargo camino que ha significado el terminar esta tesis de pregrado, me parece imperativamente necesario hacer un reconocimiento a todas las personas que han estado conmigo en algún momento de esta tarea. Desde el Lucrecio (mi perro, pero que es casi una persona, como todos los perros simpáticos) hasta mis padres y mi abuelita, forman una lista que es bastante larga y que me hace sentir barsa (si se puede usar palabras de este estilo en la tesis) cada vez que se me ocurre bajonarme por algo. Con muchos he llorado, reído, carreteado, gritado, corrido, vitrineado hasta querer matarme, etcétera. Algunos siguen en mi camino, otros no. Otros aparecen de vez en cuando confirmando que están vivos. Otros colapsan de trabajo y hay que ir a rescatarlos. Algunos están a muchos kilómetros, pero se les tiene presentes. Entre estos personajes están la Pandilla (Gunther, Carolilla, Sami, Ay, Andrea; la Nata), la Lía, el Bello, la pequeña niña que llora, Las Rosadas (Nía, Mili, la Yu, la Givi), el Rosado, pequeña LoreP, Claudín, mami Analía, Carlitos, el Pato, Roses, Ricardito, la Ceci, la Vicky y la Gabi, la Berni, Yoshi, Uri, mis amigas de la vida (Nicole, Raquel, Nati), la profe, la Coty (mi primita linda, que se paseó caleta conmigo y con mi tesis #ahnoquebrutal), el Cristian (mi primo fotógrafo que pasó el dato pa imprimir), el Ale (mención especial por su aporte en debate filosófico e inspiración)... A todos ellos y a quien pudiera estar dejando en el tintero... Mil gracias. No sería quien soy sin haberme topado con todos ustedes en mi camino.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro de Biología Molecular Vegetal de la Facultad de Ciencias, donde se llevó a cabo este Seminario de Título. A Lorena Pizarro Arcos y Patricio Pérez Henríquez, de cuya labor experimental deriva el planteamiento de este trabajo. A mi tutor, la Doctora Lorena Norambuena, y a los miembros de su equipo los cuales han aportado con su guía, discusión y colaboración durante la ejecución y escritura de este Seminario de Título.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
Resumen .....	1
Introducción .....	5
Materiales y Métodos .....	24
Resultados	
Objetivo 1: Obtención de líneas mutantes que puedan presentar una alteración de la función de los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017 de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	35
Objetivo 2: Estudio del tráfico endocítico en mutantes de <i>Arabidopsis thaliana</i> que presentan una alteración de la función de los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017 .....	64
Objetivo 3: Estudio del rol de los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017 en la inducción de raíces laterales por Sortin2 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	73
Discusión y proyecciones .....	87
Conclusiones .....	104
Bibliografía .....	106

## ÍNDICE DE TABLAS O CUADROS

	Página
Tabla 1. FTs NAC regulan preferencialmente genes del SE con respecto a otros genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	13
Tabla 2. <i>NTL9</i> y <i>NAC017</i> se encuentran conectados a genes del SE importantes en el tráfico intracelular en <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	15
Tabla 3. Los FTs de la familia NAC <i>NTL9</i> y <i>NAC017</i> poseen un grado en la " <i>Red de Coexpresión del Tráfico</i> " similar al de FTs que participan de la regulación del SE . . . . .	17
Tabla 4. Lista de partidores . . . . .	33
Tabla 5. Resumen de las mutantes SALK que fueron escogidas para el estudio de los FTs <i>NTL9</i> y <i>NAC017</i> en este trabajo . . . . .	42
Tabla 6. Resumen de las líneas mutantes genotipificadas para la identificación de mutantes homocigotas de los factores de transcripción <i>NTL9</i> y <i>NAC017</i> . . . . .	49
Tabla 7. Genotipificación de las líneas silvestres utilizadas como control durante este seminario de título . . . . .	50
Tabla 8. Resumen de los tamaños experimentales de los fragmentos de los alelos mutantes amplificados en mutantes insercionales de los factores de transcripción <i>NTL9</i> y <i>NAC017</i> . . . . .	54
Tabla 9. Tamaños esperados de los productos de la digestión de los fragmentos amplificados desde los alelos mutantes y silvestres de <i>NTL9</i> y <i>NAC017</i> . . . . .	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Rutas de tráfico en la célula vegetal . . . . .	6
Figura 2. Los FTs de la familia NAC NTL9 y NAC017 se encuentran entre los factores de mayor grado en la "Red de Coexpresión del Tráfico" . . . . .	18
Figura 3. Características de las mutantes insercionales SALK . . . . .	36
Figura 4. Esquema de los genes AT1G34190 y AT4G35580 de <i>Arabidopsis thaliana</i> y la ubicación de las inserciones de T-DNA en los genes de interés en las mutantes estudiadas en este trabajo . . . . .	40
Figura 5. Resultado esperado de la genotipificación de plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> que permite la identificación de mutantes SALK homocigotas . . . . .	47
Figura 6. Genotipificación de líneas homocigotas de mutantes de los factores de transcripción NTL9 y NAC017 . . . . .	53
Figura 7. Verificación del patrón de digestión de los fragmentos amplificados desde los alelos silvestre y mutante de <i>NTL9</i> y <i>NAC017</i> . . . . .	59
Figura 8. Expresión relativa de <i>AtNAC017</i> en las mutantes <i>nac017-3</i> y <i>nac017-4</i> . . . . .	63
Figura 9. Zonas de crecimiento y tipos celulares presentes en la punta de la raíz de <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	66
Figura 10. El tráfico endocítico está alterado en mutantes del FT <i>NTL9</i> . . . . .	68
Figura 11. El tiempo de llegada del trazador FM4-64 al tonoplasto se encuentra enlentecido en mutantes del FT <i>NTL9</i> . . . . .	69
Figura 12. El tráfico endocítico hacia la vacuola se encuentra alterado en mutantes del FT <i>NAC017</i> . . . . .	70
Figura 13. Desarrollo de una raíz lateral en <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	75
Figura 14. La mutante <i>ntl9-1</i> presenta una menor sensibilidad al aumento de la densidad de raíces laterales inducido por el compuesto Sortin2 . . . . .	77
Figura 15. La inducción de primordios de raíz lateral y de raíces laterales emergidas por Sortin2 se encuentra alterada en mutantes del FT <i>NTL9</i> . . . . .	80

Figura 16. El factor de transcripción NTL9 es requerido en la emergencia de raíces laterales en <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	82
Figura 17. La inducción de raíces laterales en respuesta a Sortin2 se encuentra alterada en mutantes de <i>NAC017</i> . . . . .	84
Figura 18. El desarrollo de raíces laterales inducido por Sortin2 se encuentra alterado en mutantes de <i>NAC017</i> . . . . .	86



## LISTA DE ABREVIATURAS

AG	:	Aparato de Golgi
DNA	:	Ácido Desoxiribonucleico
EE	:	Endosoma temprano
FM4-64	:	(N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide)
FT	:	Factor de Transcripción
LB	:	Borde izquierdo del inserto de T-DNA
MP	:	Membrana Plasmática
NOS	:	Nopalina sintasa
PCR	:	Reacción en cadena de la polimerasa
PVC	:	Compartimento Pre-vacuolar
qPCR	:	PCR cuantitativo o en tiempo real
RB	:	Borde derecho del inserto de T-DNA
RE	:	Retículo Endoplasmático
RNA	:	Ácido Ribonucleico
RT	:	Transcripción Reversa
SE	:	Sistema de endomembranas
TGN	:	Red Trans Golgi
V	:	Vacuola

## RESUMEN

El tráfico, entendido como el transporte a través de los distintos organelos que componen el sistema de endomembranas (endosomas, vacuola, retículo, etcétera), es fundamental para la célula vegetal durante su desarrollo y en procesos como la organogénesis, polaridad celular, respuesta a patógenos, estrés salino, entre otros. De ahí que el tráfico sea un proceso altamente regulado a nivel post-traducciona. Adicionalmente, mecanismos de regulación transcripcional han sido estudiados despertando el interés en el rol de factores de transcripción sobre componentes del sistema de endomembranas vegetal. Para estudiar la regulación transcripcional del sistema de endomembranas, en nuestro laboratorio se han utilizado principalmente herramientas bioinformáticas que permitieron la construcción de la Red Transcripcional del Tráfico y la Red de Coexpresión del Tráfico. La primera es una red transcripcional que conecta factores de transcripción del genoma de *Arabidopsis thaliana* con genes del sistema de endomembranas que poseen cajas de unión para dichos factores de transcripción. La segunda es una red de coexpresión que conecta cada factor de transcripción con un gen del sistema de endomembranas cuando ambos coexpresan. El análisis de ambas redes permitió seleccionar los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017 como posibles reguladores del sistema de endomembranas y del tráfico. A partir de los antecedentes, en el presente trabajo se planteó como hipótesis que AtNTL9 y AtNAC017 participan en la regulación del tráfico. Para comprobar dicha hipótesis, se analizó la internalización de una sonda fluorescente que da cuenta del tráfico endocítico en mutantes de *NTL9* y *NAC017*. Esta actividad reveló múltiples

fenotipos vinculados a alteraciones del tráfico en todas las líneas analizadas. Los resultados más relevantes indicados por estas observaciones son que NTL9 es requerido en el tráfico hacia la vacuola y que NAC017 podría estar regulando una vía de tráfico hacia la vacuola que involucra el compartimento pre-vacuolar (PVC). Con el fin de corroborar estas alteraciones del tráfico, se utilizó el compuesto Sortin2, el cual acelera el tráfico endocítico e induce la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* de manera dependiente del tráfico desde PVC. El análisis de la formación de raíces laterales en la condición control y de la inducción de raíces laterales en respuesta a Sortin2 en las líneas mutantes y la línea silvestre, permitió corroborar que NAC017 y NTL9 participan del tráfico endocítico hacia la vacuola y que NTL9 posee un rol en la emergencia de raíces laterales. Para un mejor entendimiento de la regulación que estos factores de transcripción están ejerciendo sobre el tráfico será necesario encontrar sus blancos transcriptionales. Finalmente, estos resultados en conjunto permiten corroborar que ambos factores de transcripción participan del tráfico endocítico y que esto tiene un impacto en procesos importantes en la fisiología de la planta *Arabidopsis thaliana*, como es el desarrollo de raíces laterales, y, en consecuencia, comprender el tráfico endocítico es importante para el mejoramiento de especies vegetales.

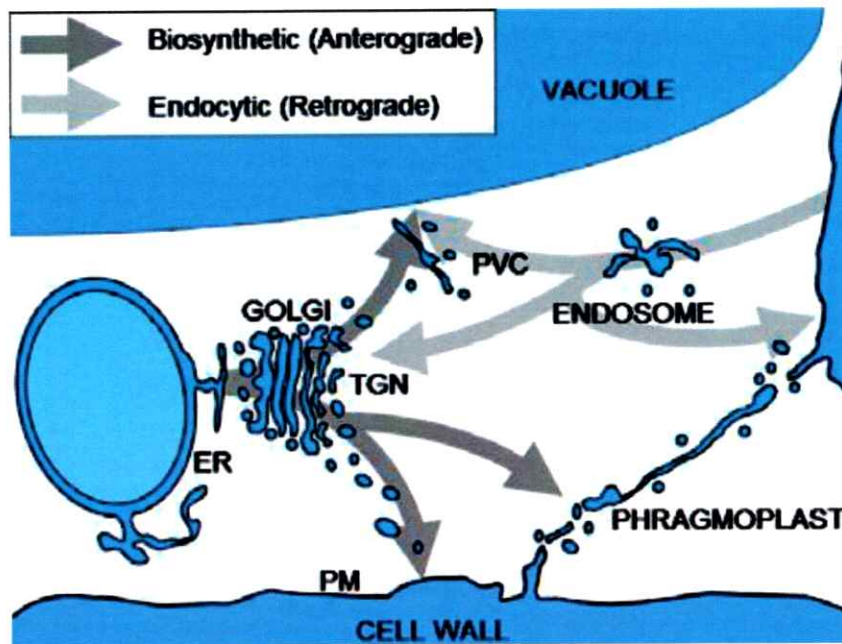
## Abstract

Cellular transport, understood as vesicle trafficking throughout the different cellular compartments that are part of the endomembrane system (endosomes, vacuole, endoplasmic reticulum, etc.), is essential for plant cells during plant development and during processes such as organogenesis, cell polarity, pathogen response, salt stress, among other processes. Because of this, cellular transport is highly regulated at the post-translational level. In addition, transcriptional regulation mechanisms have been studied awakening our interest in the study of transcription factors that could be regulating different components in the plant endomembrane system. To address this subject, our laboratory has used mainly bioinformatic resources to build the Trafficking Transcriptional Network and the Trafficking Coexpression Network. The first one is a transcriptional network that connects transcription factors from the genome of *Arabidopsis thaliana* with endomembrane system genes that contain binding sites for the former transcription factors. The second resource is a coexpression network which connects each transcription factor with an endomembrane system gene when they both are coexpressed. Both networks were analyzed enabling the selection of the transcription factors AtNTL9 and AtNAC017 as possible endomembrane system and endocytic trafficking regulators. Considering this background, in this work it was proposed that AtNTL9 and AtNAC017 have a role in trafficking regulation. To test this hypothesis, we analyzed endocytic trafficking of a fluorescent probe in mutants for the transcription factors *NTL9* y *NAC017*. This revealed several phenotypes related to altered trafficking in all mutant lines analyzed. The most relevant conclusions indicated

by this experiments are that NTL9 is required in endocytic trafficking towards the vacuole while NAC017 could be regulating a trafficking pathway towards the vacuole involving the pre-vacuolar compartment. In order to corroborate this trafficking alterations, the chemical compound Sortin2 was used. This compound accelerates endocytic trafficking towards the vacuole and induces lateral root formation in a way that is dependant on the trafficking from the PVC towards the vacuole. Lateral root initiation analysis of NTL9 and NAC017 mutants, both in control conditions and upon Sortin2 treatment, allowed us to corroborate that NAC017 and NTL9 are involved in endocytic trafficking towards the vacuole and that NTL9 has a role in the emergence of lateral roots. To a better understanding of how these transcription factors are acting as trafficking regulators, it will be necessary to find their primary transcriptional targets. Finally, our results indicate that both transcription factors, NTL9 and NAC017, are involved in endocytic trafficking, affecting several processes which are important in plant physiology, such as lateral root development, and accordingly, understanding endocytic trafficking is also very important for agriculture improvement.

## INTRODUCCION

El sistema de endomembranas (SE) en una célula vegetal está formado por un conjunto de distintos organelos membranosos entre los que se encuentran el Retículo Endoplasmático (RE), el Aparato de Golgi (AG), los endosomas tempranos que incluyen la Red Trans Golgi (TGN) y otros compartimentos endosomales (EEs), la Membrana Plasmática (MP), el endosoma tardío o Compartimento Pre-Vacuolar (PVC) y la Vacuola (V). A través de estos compartimentos tiene lugar el transporte de membranas, proteínas y otras moléculas, ya sea a través de vesículas o de transportadores. El tráfico, entendido como el transporte de vesículas con su correspondiente cargo desde un compartimento de origen hacia un compartimento blanco, ocurre principalmente a través de dos rutas: La Ruta Secretoria y la Ruta Endocítica (Figura 1). En la Ruta Secretoria, las proteínas sintetizadas en el RE son destinadas hacia el resto de los compartimentos celulares o bien son secretadas hacia el apoplasto (Sanderfoot and Raikhel). La Ruta Endocítica, por el contrario, engloba los pasos en el tráfico que conducen a las vesículas en la dirección opuesta (Samaj et al., 2005; Sanderfoot and Raikhel). De esta manera, el tráfico de una proteína sintetizada *de novo* que se inicia en el RE es entendido como parte de la Ruta Secretoria, en tanto que, por ejemplo, un tráfico que se inicia en la MP es entendido como tráfico endocítico (Bolte et al., 2004; Sanderfoot and Raikhel). No obstante, varios pasos del tráfico entre organelos son compartidos entre ambas rutas, dado que en ambas rutas las vesículas se dirigen hacia la vacuola, la membrana plasmática y TGN (Richter et al., 2009; Samaj et al., 2005; Sanderfoot and Raikhel; Viotti et al., 2010).



**Figura 1. Rutas de tráfico en la célula vegetal.** Las flechas indican esquemáticamente las dos grandes rutas de tráfico a través del SE y la dirección en que ocurre el tráfico a través de ellas. En gris oscuro se indica la Ruta Secretoria, definida como flujo anterógrado a través del SE. En gris claro se señala el flujo retrógrado, es decir, la Ruta Endocítica. Imagen tomada de *"El libro de Arabidopsis"* (Sanderfoot and Raikhel).

Diversos procesos fisiológicos son influenciados por el tráfico a través del SE, como son la mantención del transporte polar de auxina (Dhonukshe et al., 2008; Marhavý et al., 2011; Robert et al., 2010; Wang et al., 2013), la polaridad celular (Dhonukshe et al., 2008; Yoo et al., 2012), la organogénesis post-embrionaria (Hashiguchi et al., 2010; Pérez-Henríquez et al., 2012), la respuesta a estrés abiótico (Bar et al., 2013; Ebine et al., 2011; Verslues et al., 2006) y la respuesta de estrés de retículo (Liu et al., 2007a). Debido a su importancia, el estudio de la regulación del SE y el tráfico ha sido de gran interés en la literatura. Se ha visto que esta regulación ocurre principalmente de manera post-traducciona a nivel de la formación y especificidad del

reconocimiento y captación de las vesículas transportadas. Durante la formación, es necesario que en la membrana del organelo de origen de la vesícula ocurra el reclutamiento de una GTPasa que permitirá el ensamblaje de las proteínas de cubierta que darán inicio a la formación de la vesícula. La GTPasa solo puede ser reclutada a la membrana en su forma activa, es decir, unida a GTP, la cual es generada por el respectivo factor intercambiador de nucleótido de la GTPasa (GEF, "*GDP exchanging factor*") (Pfeffer, 2013). Por otro lado, existen proteínas que se localizan de manera específica en los distintos compartimentos del SE y que permiten el reconocimiento del organelo de procedencia de la vesícula y la interacción específica de esta última con el compartimento blanco (Uemura et al., 2004). Estas proteínas son las SNARES, cuya presencia es requerida en la vesícula (*v-SNARE*, "*vesicle-SNARE*"), propia del compartimento de origen y que se encuentra en la vesícula, así como en la membrana receptora (*t-SNARE*, "*target-SNARE*"), propia del compartimento blanco. La asociación entre *v-SNAREs* y *t-SNAREs* permite la interacción entre la vesícula y el compartimento blanco, así como el acercamiento y fusión de las membranas. Diversos autores han revisado y detallado los mecanismos mencionados, así como la gran variedad de moléculas que intervienen en el tráfico en el SE (Pfeffer, 2013; Pizarro and Norambuena, 2014; Richter et al., 2009; Sanderfoot and Raikhel) sugiriendo que la regulación de las rutas de tráfico es altamente compleja.

Una forma de explorar la regulación del SE es el uso de compuestos químicos que alteran las rutas de tráfico. El inhibidor Brefeldina-A (BFA), cuyo blanco son las proteínas intercambiadoras de GTP de la familia de GTPasas monoméricas ARF-GEF, inhibe la secreción de proteínas causando la agregación de compartimentos endosomales tempranos, incluyendo TGN, con el Aparato de Golgi y alterando la



localización de algunas enzimas residentes del retículo endoplasmático (Kahn, 2004). Inhibidores de la enzima fosfoinositol-3-quinasa (PI3K), tales como Wortmanina (Wm) y LY294002, interrumpen el tráfico entre el PVC y la vacuola (Takáč et al., 2012; Wang et al., 2009), causando la agregación de PVCs en un PVC alterado con forma de anillo (Takáč et al., 2012, 2013; Wang et al., 2009). Tanto BFA como Wm inducen cambios en los niveles de proteínas del SE (Takáč et al., 2012; Takác et al., 2011), quedando abierta la posibilidad de que el SE esté sujeto a otros tipos de regulación además de la regulación post-traduccional.

El rol de la regulación a nivel transcripcional sobre el tráfico en el SE se ha observado en diversos procesos, lo que ha llevado a proponer que podrían existir reguladores transcripcionales de rutas de tráfico del SE. Por ejemplo, la proteína de la ruta secretoria SNAP33, que funciona como una t-SNARE en la exocitosis en esta ruta, es inducida en respuesta a patógenos y frente a estrés mecánico (Wick et al., 2003). También, durante la maduración de frutos, ocurren cambios en la expresión de genes de distintas GTPasas involucradas en el tráfico (Falchi et al., 2010). Durante la división celular, la syntaxina KNOLLE/SYP111, que es una t-SNARE que se localiza en el fragmoplasto, es regulada positivamente a nivel transcripcional por los factores MYB3R1/4 (Haga et al., 2007). Por otro lado, el caso más emblemático de regulación transcripcional en el SE es lo que se conoce como Respuesta a Proteínas Desplegadas ("*Unfolded protein response*", UPR) que se activa ante la acumulación de proteínas en estados conformacionales aberrantes durante altas temperaturas, condiciones de alta salinidad y exposición a agentes reductores como el DTT (Deng et al., 2011; Lu and Christopher, 2008; Wang et al., 2011; Williams et al., 2010). Durante el estrés de RE, la proteína IRE1 produce el empalme alternativo del transcrito de

*BZIP60*, permitiendo la traducción de una proteína que carece del dominio de transmembrana que retiene a *BZIP60* en el retículo endoplasmático (Deng et al., 2011). La ausencia del dominio de transmembrana permite la acción de *BZIP60* en el núcleo como regulador transcripcional durante UPR (Deng et al., 2011; Nagashima et al., 2011). Por otro lado, los factores de transcripción (FTs) *BZIP28* y *BZIP17*, ambos proteínas de transmembrana, son proteolizadas durante UPR, de modo que sus porciones citoplasmáticas del extremo amino terminal son escindidas y se relocalizan en el núcleo, activando a nivel transcripcional la respuesta de estrés de RE (Liu and Howell, 2010; Liu et al., 2007a, 2007b; Tajima et al., 2008). En conjunto, la acción de FTs durante UPR conduce a la represión de niveles de proteínas de la ruta secretoria con la retención en el RE de las proteínas no maduras, el aumento de la expresión de proteínas de control de calidad y la activación del mecanismo de degradación vinculado al RE (Iwata and Koizumi, 2012; Urade, 2009).

En general se desconoce cómo es regulado a nivel transcripcional el SE y el tráfico de proteínas. Ante la pregunta de qué FTs podrían ser relevantes en la regulación del SE y el tráfico de proteínas, surge la gran problemática metodológica de qué factor o factores de transcripción comenzar a estudiar. El Dr. Alexander Vargas y la candidata a Doctor en Ciencias Lorena Pizarro del programa de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, en colaboración con el Dr. Rodrigo Gutiérrez de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica de Chile, generaron 2 herramientas bioinformáticas que en nuestro laboratorio se han considerado de gran utilidad para responder a este problema: una red transcripcional y una red de coexpresión, en adelante la "*Red Transcripcional del Tráfico*" y la "*Red de Coexpresión del Tráfico*". Ambas redes tienen como input dos grupos de genes: un

conjunto de FTs y los genes del SE involucrados en transporte de proteínas. Las dos redes asignan conexiones entre FTs y genes del SE de acuerdo a distintos criterios. En la "*Red Transcripcional del Tráfico*", la conexión existe cuando en el promotor del gen del SE hay un enriquecimiento de sitios de unión a DNA del FT. En la "*Red de Coexpresión del Tráfico*", por otro lado, la relación es efectiva cuando el FT y el gen del SE coexpresan de manera positiva con una correlación de Spearman mayor a 0,5 de acuerdo a datos de microarreglos. La información que está disponible de estas dos redes en el Laboratorio de Biología Vegetal Molecular para el grupo de estudio del SE ha sido utilizada previamente en la identificación del FT BZIP25 como un represor del tráfico endocítico en la tesis doctoral de Lorena Pizarro, realizada en nuestro grupo de trabajo. En dicha tesis doctoral también se muestra que la utilización de estas herramientas bioinformáticas permiten predecir que BZIP28 es un regulador del SE. Este antecedente, en conjunto con los análisis sobre la mutante de *BZIP25*, la cual posee una dramática aceleración de la endocitosis de la MP y del tráfico hacia la vacuola (Lorena Pizarro, datos no publicados), han contribuido a fortalecer estas dos redes como herramientas interesantes para nuestro grupo de trabajo en la exploración de la regulación transcripcional del SE.

Quizás uno de los aspectos más importantes de la utilización de redes bioinformáticas basadas en interacciones de regulación o de coexpresión es la asignación de nuevas funciones moleculares en un determinado proteoma, en este caso el de *Arabidopsis thaliana*, cuyo genoma se encuentra completamente secuenciado, evidenciando la existencia de una gran cantidad de locus de función aún indeterminada experimentalmente. Esto sigue siendo así incluso a pesar de la utilización de otro tipo de herramientas bioinformáticas (por ejemplo, basadas en

homología estructural) y el amplísimo espectro de datos experimentales reportados en el modelo de estudio *Arabidopsis thaliana*. La red desarrollada por Heyndrickx y Vandepoele (Heyndrickx and Vandepoele, 2012), tal como en el caso de la "*Red Transcripcional del Tráfico*" y la "*Red de Coexpresión del Tráfico*", utiliza también la estrategia de combinar redes de coexpresión y redes transcripcionales para la predicción funcional de genes de rol desconocido en un análisis completo del genoma de *Arabidopsis*. Este estudio es responsable de una cantidad apreciable de las etiquetas de Gene Ontology (GO) asignadas a los locus de este genoma y valida la relación entre la coexpresión de distintos genes y su vínculo funcional, sugiriendo fuertemente que los módulos funcionales en este tipo de redes incluso se conservan entre especies (Heyndrickx and Vandepoele, 2012). Además, en consistencia con el supuesto de que los genes que coexpresan también son corregulados, una red de coexpresión permite depurar e incluso definir redes de regulación transcripcional directa (Heyndrickx and Vandepoele, 2012). En la "*Red Transcripcional del Tráfico*" y la "*Red de Coexpresión del Tráfico*", se pueden utilizar estos principios para identificar los FTs que son capaces de conectar los módulos funcionales en el conjunto de genes alojados en la etiqueta de GO referida a transporte de proteínas (*protein transport*, GO:0015031), de modo de predecir cuales de ellos podrían ser importantes en la regulación de los genes que conectan. Cuando analizamos estas dos redes, salta a la vista que dos FTs de transcripción en particular aparecen, de acuerdo a distintos parámetros, entre los FTs más interesantes a ser estudiados en tráfico en el SE de *Arabidopsis thaliana*. Nos referimos a los dos FTs de la familia NAC, AtNTL9 y AtNAC017, de los cuales en particular se desconocía completamente su función al momento de la construcción de las redes mencionadas previamente, destacando la

importancia de este tipo de aproximación en la predicción funcional en procesos tan poco caracterizados como es la regulación transcripcional en el SE.

A continuación, detallaremos los parámetros obtenidos por Lorena Pizarro durante la caracterización de la "*Red Transcripcional del tráfico*" y de la "*Red de Coexpresión del tráfico*" que permiten predecir que NTL9 y NAC017 participan en la regulación del tráfico en el SE de *Arabidopsis* y ahondar en el estudio de ambos FTs *in vivo*. En primer lugar, NTL9 y NAC017 regulan preferentemente genes vinculados al transporte de proteínas con respecto a genes de *Arabidopsis thaliana* que no poseen la etiqueta de *transporte de proteínas* de GO. En la "*Red Transcripcional del Tráfico*", NTL9 y NAC017 poseen un alto Índice de Enriquecimiento (Tabla 1), parámetro que indica cuán preferentemente los genes del SE son regulados por el FT con respecto a otros genes de *Arabidopsis*. El Índice de Enriquecimiento se expresa como una razón entre genes del SE regulados por el FT y genes del resto del genoma de *Arabidopsis* que presentan en su promotor cajas de unión para el FT. Como se observa en la tabla 1, este índice es incluso más alto para NTL9 y NAC017 que para FTs incluidos en la red cuyo rol en el SE ya ha sido comprobado, como son BZIP25 y BZIP28 (Tabla 1).

Locus	Factor de transcripción	Índice de enriquecimiento
AT4G35580	NTL9	2,73
AT1G34190	NAC017	2,9
At3G54620	BZIP25	1,6
At3G10800	BZIP28	1,6



**Tabla 1. FTs NAC regulan preferencialmente genes del SE con respecto a otros genes de *Arabidopsis thaliana*.** La tabla muestra el Índice de Enriquecimiento de los FTs de la familia NAC, NTL9 y NAC017, y los FTs de la familia bZIP, BZIP25 y BZIP28, de acuerdo a la "*Red Transcripcional del Tráfico*". El Índice de Enriquecimiento corresponde al cociente entre los genes regulados por el FT que pertenecen al SE y los que están involucrados en otros procesos. Se muestra que los dos FTs de la familia NAC poseen un Índice de Enriquecimiento incluso mayor que los dos FTs bZIP, cuya función en la regulación del tráfico ya ha sido verificada.

En segundo lugar, la "*Red Transcripcional del Tráfico*" muestra que tanto NTL9 como NAC017 se encuentran conectados a varios genes del SE involucrados en distintos procesos de tráfico intracelular, tanto de la ruta secretoria como del tráfico post-Golgi (Tabla 2). También encontramos en esta lista de genes que *ARM-4* se encuentra conectado a estos FTs, un gen involucrado en el tráfico de proteínas a través del poro nuclear desde el citoplasma, así como *MYA2*, una isoforma de miosina que permite el anclaje de diversos organelos al citoesqueleto de actina y su movilización a través del citoplasma. Es destacable que la "*Red Transcripcional del Tráfico*" conecta los FTs con varias proteínas involucradas en el transporte hacia la vacuola, como son *VPS45*, *ARA6* y *SYP23*. Interesantemente, en la base de datos de

*Arabidopsis* (TAIR, *The Arabidopsis Information Resource*, <https://www.arabidopsis.org>) se observa que se han asignado a *NAC017* las etiquetas de GO de destinamiento hacia la vacuola (*protein targeting to the vacuole* GO:0006623), transporte endosomal (*endosomal transport* GO:0016197), transporte mediado por vesículas (*vesicle-mediated transport* GO:0016192) y fusión de membrana celular (*cellular membrane fusion* GO:0006944). Todas estas etiquetas se encuentran alojadas dentro de la etiqueta de transporte de proteínas y fueron asignadas durante el trabajo del grupo Heyndrickx y Vandepoele (Heyndrickx and Vandepoele, 2012). En general, estos antecedentes nos conducen a sugerir que estos FTs de la familia NAC son reguladores generales del tráfico a través de la regulación directa de genes involucrados en distintas rutas del tráfico de proteínas.

Conectado a	Locus	Proteína	Función	Referencias
<i>NTL9</i> y <i>NAC017</i>	AT1G26690	EMP24-L1/p2459	Transporte desde RE a Golgi	(Brown and Rose, 1992; Montesinos et al., 2013)
<i>NTL9</i> y <i>NAC017</i>	AT1G57620	EMP24-L2/CYB	Transporte desde RE a Golgi	(Jancowski et al., 2014)
<i>NTL9</i> y <i>NAC017</i>	AT1G77140	VPS45	Destinamiento a la vacuola desde TGN	(Bassham and Raikhel, 1998; Zouhar et al., 2009)
<i>NTL9</i> y <i>NAC017</i>	At3G45280	SYP72	SNARE localizada en el RE	(Uemura et al., 2004)
<i>NAC017</i>	At3G54840	ARA6/AtRABF1	Transporte desde endosoma tardío a MP	(Ebine et al., 2011)
<i>NTL9</i> y <i>NAC017</i>	At3G59020	ARM-4	Transportador de proteína, $\beta$ -importina	(Bollman et al., 2003)
<i>NTL9</i> y <i>NAC017</i>	AT4G17730	SYP23	Tráfico y destinamiento vacuolar	(Shirakawa et al., 2010)
<i>NTL9</i> y <i>NAC017</i>	AT4G32640	cpSEC24b	Tráfico vesicular tipo COPII en el cloroplasto	(Andersson and Sandelius, 2004)
<i>NTL9</i> y <i>NAC017</i>	At5G08080	SYP132	t-SNARE/ Fusión de endosomas a MP	(Reichardt et al., 2011)
<i>NAC017</i>	At5G43900	MYA2	Movilidad de mitocondrias, Golgi y peroxisomas/ Miosina	(Avisar et al., 2009; Hashimoto et al., 2008; Holweg and Nick, 2004; Walter and Holweg, 2008)

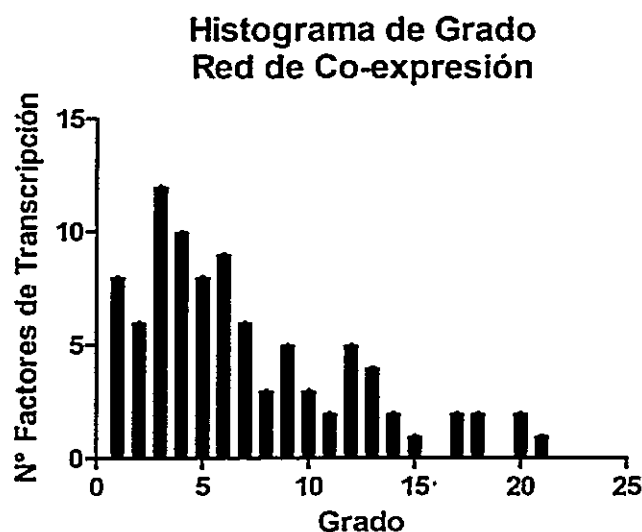
**Tabla 2. *NTL9* y *NAC017* se encuentran conectados a genes del SE importantes en el tráfico intracelular en *Arabidopsis thaliana*.** La Tabla muestra que tanto *NTL9* como *NAC017* se encuentran conectados a genes del SE importantes en el tráfico intracelular en *Arabidopsis thaliana* en la "Red Transcripcional del Tráfico". Se indica el nombre de la proteína, el locus asociado, su función en el SE y las referencias que muestran experimentalmente esta función.



Un tercer parámetro importante es el alto grado (o bien, centralidad de grado) de los nodos en los que se encuentran estos FTs en la "*Red de Coexpresión del Tráfico*". El grado indica el número de conexiones que establece un nodo en una red. El grado es uno de los indicadores de la centralidad de un nodo determinado en una red, propiedad que poseen los nodos que son importantes en el proceso que define las conexiones en una red (Latora and Marchiori, 2007). Algunas extrapolaciones que pueden derivarse de un alto índice de centralidad en una red biológica es que el nodo está definiendo un módulo funcional, en este caso, un módulo que agrupa genes del SE en la "*Red de Coexpresión del Tráfico*". *NTL9* posee un grado de 15 en la "*Red de Coexpresión del Tráfico*", en tanto que *NAC017* posee un grado de 21 (Tabla 3), valor que es incluso más alto que para *BZIP25* o *BZIP60*. Todos estos valores son altos en comparación al grado del resto de los FTs incluidos en la "*Red de Coexpresión del Tráfico*" (Figura 2). Este antecedente nos sugiere que los FTs NAC podrían coordinar la expresión de genes del SE, lo cual se condice con su rol como reguladores transcripcionales del SE. De acuerdo a la "*Red de Coexpresión del Tráfico*", de los genes que son regulados directamente (Tabla 2), *MYA2*, *ARA6* y *EMP24-L1* coexpresan con *NAC017* mientras que *EMP24-L1* coexpresa con *NTL9*. En definitiva, los FT *NTL9* y *NAC017* no sólo regulan preferencialmente procesos asociados al transporte de proteínas en *Arabidopsis*, sino que mantienen conectados los genes del SE a través de relaciones de coexpresión, definiendo módulos funcionales de genes del SE al agrupar tanto los genes que podrían estar regulando indirectamente como aquellos que proponemos que regulan de manera directa a nivel transcripcional.

Locus	Factor de transcripción	Grado
AT4G35580	NTL9	15
AT1G34190	NAC017	21
AT3G54620	BZIP25	20
AT3G10800	BZIP28	18

**Tabla 3. Los FTs de la familia NAC NTL9 y NAC017 se encuentran entre los factores de mayor grado en la "Red de Coexpresión del Tráfico" similar al de FTs que participan de la regulación del SE.** La Tabla muestra el grado de los FTs NTL9 y NAC017 y de dos FTs que participan de la regulación del SE y que también están dentro de la "Red de Coexpresión del Tráfico", mostrando que son similares. Los 4 FTs se encuentran entre los que poseen un mayor grado dentro de esta red (Figura 2). Lo anterior muestra que estos FTs NAC no solamente regulan directamente genes del SE sino que poseen un rol funcional que también es sugerido por sus relaciones de coexpresión con genes del SE.



**Figura 2.** Los FTs de la familia NAC NTL9 y NAC017 poseen un alto grado en la "*Red de Coexpresión del Tráfico*". La figura muestra el histograma de grado de la "Red de Coexpresión del Tráfico", donde la menor parte de los FTs alcanzan un grado mayor a 15, lo cual sí ocurre para NTL9 y NAC017 (Tabla 3). De este modo, NTL9 y NAC017 poseen un alto grado en esta red. El análisis topológico de esta red y el gráfico que se muestra fueron realizados por Lorena Pizarro durante su tesis doctoral.

Dado que todos estos antecedentes sugieren fuertemente que tanto NTL9 como NAC017 poseen un rol en la regulación del tráfico, a primera vista con implicancias en una variedad de rutas de tráfico en el SE, el siguiente paso fue evaluar la función de estos FTs. Esto se decidió en consideración del peso de la evidencia aportada por la "*Red Transcripcional del Tráfico*" y la "*Red de Coexpresión del Tráfico*" y de las herramientas que se poseen en el grupo de estudio del SE en el Centro de Biología Molecular Vegetal. Al respecto, el estudio del tráfico en nuestro grupo está enfocado en aquel que ocurre a través de los compartimentos que clásicamente son considerados como parte del SE, como se señala en la Figura 1. De los genes que

conectan a los FTs NAC, tenemos que *EMP24-L1*, *EMP24-L2* y *SYP72* forman parte de la ruta secretoria en el tráfico de vesículas RE/Golgi; *VPS45*, *ARA6*, *SYP23* y *SYP132* forman parte de la ruta endocítica y *MYA2*, cuyos efectos sobre el tráfico polar de auxina y el transporte conocido como corriente citoplasmática (o bien, "*cytoplasmic streaming*") le otorgan un rol altamente pleiotrópico en el tráfico intracelular (Holweg and Nick, 2004). Como mencionamos anteriormente, nos llamó la atención que tres de los genes de la lista (*VPS45*, *ARA6* y *SYP23*) están involucrados en el tráfico y/o destinamiento hacia la vacuola (Bassham and Raikhel, 1998; Ebine et al., 2011; Reichardt et al., 2011; Zouhar et al., 2009). Por otro lado, está reportado que la regulación del tráfico de salida del retículo endoplasmático puede estar relacionada con el destinamiento hacia la vacuola (Törmäkangas et al., 2001), por lo que el proceso de destinamiento hacia la vacuola podría ser el factor común entre los blancos de NTL9 y NAC017 propuestos desde la "*Red Transcripcional del Tráfico*". De los tres genes incluidos en la Tabla 2 involucrados directamente en el destinamiento hacia la vacuola, dos forman parte de la ruta endocítica. Por lo tanto, tomamos como primera aproximación evaluar la ruta endocítica de mutantes en los FTs ya que el estudio del tráfico endocítico puede realizarse a través de trazadores lipofílicos que nos permitirán realizar un seguimiento de la internalización de la membrana plasmática en vesículas y su llegada hacia el tonoplasto o membrana vacuolar. Además, en el laboratorio contamos con el uso de un compuesto químico que altera el tráfico endocítico hacia la vacuola con la posibilidad de evaluar su efecto a nivel fenotípico, como se detallará a continuación. Es por ello que se resolvió estudiar el rol de los FTs AtNTL9 y AtNAC017 en el tráfico endocítico hacia la vacuola. La hipótesis de trabajo que dirige este estudio es, en consecuencia, que AtNTL9 y AtNAC017 participan de la regulación del tráfico endocítico hacia la vacuola.

### *NTL9 y NAC017 dentro de la familia NAC de FTs*

NTL9 y NAC017 pertenecen a la familia de factores de transcripción de tipo NAC, reportada solamente en plantas, identificada como la familia de factores NAM (No Apical Meristem) ATAF1/2 CUC2 (Souer et al., 1996). Todos los factores de esta familia presentan de 1 a 5 subdominios que en conjunto forman el dominio NAC de unión a DNA, altamente conservado. Muchos poseen además un dominio de regulación transcripcional (TRD) de secuencia variable (Jensen et al., 2010a). NAC017 y NTL9 comparten la estructura típica, con un dominio NAC amino terminal. El dominio de unión a DNA de NTL9 y NAC017 se encuentra codificado en los exones 1 y 2 de NTL9 (Kim et al., 2007a) y los exones 1 y 2 de NAC017 (Ooka et al., 2003), respectivamente. NTL9, además, posee un TRD asociado a distintos tipos de interacción (Kim et al., 2007a; Yoon et al., 2008). A la fecha de inicio de este trabajo, no se había descrito experimentalmente un TRD para NAC017, aunque se predijo que en su extremo carboxilo terminal podría tener una región de interacción con membrana (Kim et al., 2010).

Muchos FTs han sido identificados dentro de la familia NAC en *Arabidopsis thaliana* y han sido asociados a diversos procesos biológicos (Bu et al., 2008; Hao et al., 2011; He et al., 2005; Kim et al., 2007b; Mitsuda et al., 2005; Tran et al., 2007; Xie et al., 2000; Zheng et al., 2009). Sin embargo, hasta hoy se desconoce el rol de la mayor parte de ellos, incluido NAC017. NTL9, por su parte, es un represor transcripcional *in vivo* y su expresión es regulada en *Arabidopsis thaliana* durante estrés osmótico, en respuesta a giberelina exógena e interrupción del transporte polar de auxina (Kim et al., 2007c; Yoon et al., 2008). La sobreexpresión del factor de

transcripción conlleva la inducción temprana de genes relacionados con la senescencia y la regulación negativa de la expresión de la proteína relacionada con la patogénesis (PR1) (Kim et al., 2012; Yoon et al., 2008). Se ha demostrado que NTL9 inhibe la expresión de PR1 mediante interacción directa con su promotor (Kim et al., 2012). SNI1, una proteína que se había reportado anteriormente como un supresor del papel de PR1 en la respuesta sistémica adquirida (Li et al., 1999; Mosher et al., 2006), actúa cooperativamente con NTL9 al interactuar con la porción carboxilo terminal de este último (Kim et al., 2012). Durante una infección, calmodulina competiría con SNI1 por la unión del extremo carboxilo terminal de NTL9 y modificaría la acción del FT NAC sobre la expresión de PR1 (Kim et al., 2007a, 2012; Yoon et al., 2008).

#### *El tráfico endocítico y el desarrollo de raíces laterales*

El SE es fundamental para la planta en el desarrollo de nuevos órganos como son las raíces laterales, cuya formación a partir de la raíz principal es inducida de manera adaptativa, aumentando el dominio de captación de nutrientes desde el suelo. La iniciación y desarrollo de una raíz lateral se encuentra determinada por el tráfico de auxina, donde juega un rol esencial el SE ya que la acción de esta hormona depende de su transporte direccionado a través de sus transportadores de eflujo (Blilou et al., 2005). Estos transportadores se expresan de manera tejida específica y polarizada, permitiendo la salida de auxina en un solo sentido dentro de una célula. Se ha visto que, cuando estos transportadores son sintetizados, son destinados indistintamente a toda la membrana plasmática, pero que cuando son endocitados son movilizados preferencialmente hacia una cara de la célula (Dhonukshe et al., 2008). De este modo, el transporte de auxina es polarizado debido a que el tráfico a través del SE se

encuentra polarizado de manera tejido-específica.

Recientemente, nuestro laboratorio ha descrito que el compuesto Sortin2 acelera el tráfico endocítico hacia la vacuola e induce la formación de raíces laterales (Pérez-Henríquez et al., 2012). En dicho trabajo, se mostró que la formación de raíces laterales inducida por Sortin2 es dependiente del tráfico de proteínas que es sensible a Wortmanina. Interesantemente, la acción de Sortin2 muestra independencia del receptor de auxina SCF<sup>TIR</sup> (Pérez-Henríquez et al., 2012), conocido como la clásica vía de inducción de raíces laterales caracterizada hasta ahora. Dado que el compuesto Sortin2 interfiere con el mecanismo de la planta que controla la frecuencia espacial de los eventos posibles de iniciación de la formación de una raíz lateral, Sortin2 evidencia un mecanismo de regulación en este proceso que depende íntimamente del tráfico endocítico.

#### *Resumen del proyecto y planteamiento de los objetivos general y específico*

En el presente seminario de título se estudiará *in vivo* la función de dos FTs de *Arabidopsis thaliana* que, de acuerdo a información *in silico*, se encuentran involucrados en la regulación transcripcional directa del tráfico endocítico hacia la vacuola y de otros genes del SE. Se estudiará el tráfico de componentes de la membrana plasmática en mutantes de ambos FTs, de NTL9 y de NAC017, colocando un énfasis particular en la llegada de estos componentes a la membrana vacuolar a través de la ruta endocítica. Posteriormente, se utilizará el compuesto químico Sortin2 para comprobar que el tráfico endocítico hacia la vacuola se encuentra alterado. Esto será evaluado como la capacidad del compuesto de inducir la formación de raíces

laterales en las mutantes estudiadas. En conjunto, estos análisis permitirán establecer el rol de los FTs de la familia NAC NTL9 y NAC017 en el tráfico endocítico hacia la vacuola.

**Pregunta a resolver:**

¿Participan los factores de transcripción AtNAC017 y AtNTL9 de la regulación del tráfico endocítico hacia la vacuola en el SE de *Arabidopsis thaliana*?

**Hipótesis:**

Los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017 participan en la regulación del tráfico endocítico hacia la vacuola y de la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.

**Objetivo General:**

Caracterizar el rol de los factores de transcripción NTL9 y NAC017 en el tráfico endocítico y la formación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.

**Objetivos específicos:**

1. Obtener líneas mutantes que puedan presentar una alteración de la función de los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017 de *Arabidopsis thaliana*.
2. Estudiar el tráfico endocítico en mutantes de *Arabidopsis thaliana* de los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017.
3. Estudiar el rol de los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017 en la inducción de raíces laterales por Sortin2 en *Arabidopsis thaliana*.



## MATERIALES Y METODOS

**Esterilización, cultivo de plantas y tratamientos con Sortin2.** Todas las líneas de mutantes de *Arabidopsis thaliana* fueron obtenidas del *ABRC Seed Stock Center* (<http://abrc.osu.edu/>). Las semillas silvestres utilizadas pertenecen al ecotipo Col-0. Asimismo, las líneas utilizadas son mutantes insercionales del ecotipo Col-0. Las semillas fueron esterilizadas con etanol 95% por 5 minutos, seguido de un lavado con etanol 70% y Tritón 0,1% por 15 minutos y 6 lavados con agua estéril. Todos los lavados fueron efectuados en agitación a temperatura ambiente. Las semillas fueron estratificadas por un periodo de 48 horas a 4°C. La siembra se realizó en placas cuadradas (transparentes, 500 cm<sup>2</sup> de superficie, colocadas en posición vertical) con 50 mL de medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) 0,22% p/v, sacarosa 1% p/v, mioinositol 0,01% p/v, ácido 2-(N-morfolino)-etanosulfónico monohidrato 0,05% p/v, ajustado a pH 5,7 antes de la adición de fitoagar 0,7% p/v. Las plantas, tanto cuando fueron cultivadas como cuando fueron tratadas, fueron incubadas a 5000-6000 LUX durante 96 horas con un fotoperíodo de 16 horas luz a 22°C más 8 horas oscuridad a 20°C. Para observar raíces laterales, las plantas fueron traspasadas luego de 7 días post-siembra a placas de 6 pocillos (transparentes, 9,5 cm<sup>2</sup> de área de cultivo), 7 plantas por pocillo, con 3 mL de medio MS líquido 0,5X 1% de agarosa en cada pocillo. Los tratamientos con Sortin2 se realizaron a una concentración de 12,5 µg ó 25 µg/mL de Sortin2. Tanto el tratamiento como el control poseen una concentración final de 1% DMSO. El tratamiento con Sortin2 fue realizado por tres días. Previo al traspaso de las plantas a medios conteniendo Sortin2 o 1% DMSO, las soluciones mencionadas fueron

incubadas en condiciones equivalentes a las condiciones de cultivo de las plantas. Las soluciones de Sortin2 fueron preparadas a partir de una solución de trabajo de 20 mg/mL diluida en DMSO que es mantenida en oscuridad a -20°C.

**Genotipificación de mutantes.** Las secuencias de los loci del genoma de *Arabidopsis thaliana* AT4G35580 y AT1G34190, que codifican los marcos de lectura abierto de los genes *NTL9* y *NAC017*, respectivamente, fueron obtenidos de la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>), así como la ubicación aproximada de los insertos de T-DNA de las mutantes disponibles. Se trabajó en este seminario de título con las siguientes líneas mutantes: *ntl9-1* (SALK\_065041C), *ntl9-2* (SALK\_102041C), *nac017-3* (SALK\_025104C), *nac017-4* (SALK\_026937C). Los partidores, señalados con la nomenclatura "*mutante*(F ó R)" en la Tabla 4, fueron diseñados en base a la secuencia aledaña al inserto y todos poseen una  $T_m$  de 56°C. La región susceptible de ser amplificada por los partidores fue corroborada con la herramienta PRIMER BLAST, disponible en el sitio Pubmed.gov del National Institute of Health (NIH, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Dicho BLAST fue realizado en las bases de datos disponibles de genoma y transcriptoma de *Arabidopsis thaliana* y comprueba que los partidores son específicos para las regiones de interés.

El DNA genómico fue extraído a partir de plántulas de 7 días post siembra con el método de extracción de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) descrito a continuación. Para la obtención del DNA genómico, 10 plantas fueron colocadas en nitrógeno y trituradas. Se agregó 700  $\mu$ L de una solución de CTAB 2% p/v, 0,4%  $\beta$ -mercaptoetanol, NaCl 1,4 M, 100 mM Tris HCl pH 8 y 20 mM EDTA. Posteriormente, la solución fue incubada a 65°C por 45 minutos en agitación a 1.200 RPM. La centrifuga

utilizada es el modelo M-24A Boeco. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 13.000 RPM por 7 minutos y se descartaron los residuos centrifugados al fondo del tubo. El DNA fue purificado desde el sobrenadante mediante una extracción orgánica con una mezcla de 700  $\mu$ L de cloroformo : alcohol isoamílico (24 : 1). La solución fue mezclada por 5 minutos y centrifugada a 8.000 RPM por 5 minutos. Posteriormente, se realizó una segunda extracción con cloroformo : alcohol isoamílico 24 : 1. A la fase acuosa de esta extracción se agregó 650  $\mu$ L de isopropanol, y se incubó por 20 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ , precipitando el DNA genómico. Éste fue centrifugado por 15 minutos a 13.000 RPM y el pelet resultante fue lavado con 100  $\mu$ L de etanol 70%. Finalmente, el pelet fue resuspendido en 50-100  $\mu$ L de agua libre de nucleasas. La integridad del DNA genómico se evaluó en electroforesis en gel de 1,5% de agarosa por 30 minutos a 90 V de 5  $\mu$ L de la solución final de DNA genómico extraído.

A partir de DNA de las mutantes y de las plantas silvestres, se realizaron las genotipificaciones mediante PCR. Las reacciones de PCR fueron realizadas con la polimerasa de DNA Paq5000 de Agilent Technologies de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos amplificados en cada genotipificación con los partidores correspondientes (ver Tabla 4) fueron los fragmentos de los siguientes alelos: *ACTINA1/11* (partidores *ACTINA5'* y *ACTINA3'*), *NPTII* (partidores *NPTII5'* y *NPTII3'*), alelo mutante (con los partidores *mutanteR* y *Lb1.3*) y alelo silvestre (con partidores *mutanteF* y *mutante R*). Luego, se realizó electroforesis de 5  $\mu$ L de cada producto de reacción para el análisis de resultados.

**Electroforesis y visualización de resultados.** La visualización de DNA y RNA, de los productos de PCR, digestión y qPCR y de los estándares de peso molecular de DNA

fue efectuada en el equipo Syngene Darkroom (Model Multigenius, Serial Number SYDR/2082). Esto se realizó con posterioridad a la incubación del gel de agarosa correspondiente en una solución de bromuro de etidio 1 ng/L por 20 minutos en cada caso, con la excepción de la visualización de RNA, que fue preteñido como se señala más adelante. La electroforesis se realizó a 70 V ó 90 V en geles de agarosa 1,5-2% utilizando como solución de corrida el tampón TAE 1X (Tris base 0,484% p/v, ácido acético 0,1142%v/v, EDTA 0,05M), TBE 0,5X (Tris base 0,54% p/v, ácido bórico 0,275% p/v, EDTA 0,05 M) o MOPS 1X (MOPS 3,349% p/v, acetato de sodio 0,328% p/v, EDTA 0,01 M, pH 8), según sea señalado. En cada caso el gel fue preparado diluyendo la agarosa en un tampón idéntico al utilizado como tampón de corrida. Los estándares de peso de DNA utilizados fueron el de 1 kb (Thermo Scientific GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder 250 to 10,000 bp DNA Ladder), el de 100 pb (Thermo Scientific GeneRuler™ 100bp 100 to 1000bp DNA Ladder) y el de 50pb (Thermo Scientific GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use, 50-1000 pb), utilizando 5 µL (250 ng) en cada carga. Se utilizó el programa GeneSnap versión 7.12 para la adquisición de imágenes y su edición.

**Digestión de productos de PCR.** La identidad de los productos de PCR que se logró amplificar fue corroborada mediante digestiones con enzimas de restricción. Las digestiones fueron realizadas al producto de PCR resultante de la reacción con la enzima Paq5000. La reacción de digestión corresponde a una dilución 1:3 de este producto, y fue incubada por 16 horas a 37°C. Las enzimas utilizadas fueron ApaI, KpnI, Bgl II y SpeI (Fermentas) y se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante para digestión de productos de PCR. Se realizó electroforesis en gel de agarosa de los productos de digestión para su posterior evaluación.

**Extracción de RNA.** Se extrajo RNA de un total de 6 plantas de 14 días mediante el kit Invitrap® Spin Plant RNA Mini Kit de Stratec Molecular con la solución DCT ([http://www.invitrek.de/products\\_and\\_service/products/single\\_tube\\_kits/total\\_rna\\_isolation/e2959/index\\_eng.html](http://www.invitrek.de/products_and_service/products/single_tube_kits/total_rna_isolation/e2959/index_eng.html)). Esto se realizó tanto para plantas silvestres como para las líneas mutantes de *NAC017*. La concentración y calidad del RNA fue estimada en nanodrop GE Nanovue™ 28923216, midiendo la absorbancia a 230, 260 y 280 nm. La integridad del RNA fue comprobada en electroforesis denaturante en un gel 1,5% de agarosa, MOPS 1X y 1% formaldehído. Cada muestra fue preparada con 1 µg de RNA en el amortiguador de carga que contiene formamida, azul de bromofenol, xilén cianol, hidróxido de sodio y EDTA (Buffer 3x Winkler Código BM-0310). Las muestras fueron denaturadas por 10 minutos a 70°C e inmediatamente sometidas a electroforesis. La electroforesis fue realizada a 90 V en amortiguador MOPS 1X (diluido en agua tratada con DEPC) por 1 hora. El RNA fue visualizado como se señala en la sección "Electroforesis y visualización de resultados" de "Materiales y Métodos".

**Tratamiento con DNAsa de los RNA extraídos.** Para realizar la síntesis de cDNA a partir de los RNA ya extraídos, éstos fueron tratados, en primer lugar, con DNAsa. La reacción de digestión del DNA fue realizada con 0,13 U de DNAsa I (Código Fermentas #EN0521) por µg de RNA y 0,1 U de Ribolock (Código Fermentas #EO 0381) por µg de RNA a 37°C por 40 minutos. La DNAsa fue inactivada añadiendo EDTA a una concentración final de 2,27mM e incubando por 10 minutos a 65°C.

Para la síntesis de cDNA, se realizó una denaturación y preincubación con Oligo dT (AP) del RNA (Tabla 4) agregando 0,2 ng del partidor (la solución de uso se

prepara a 0,5 µg/mL) por cada µg de RNA tratado con DNAsa. Esta solución fue incubada por 5 minutos a 70°C y luego fue conservada en hielo hasta la síntesis de cDNA.

**Síntesis de cDNA.** Se realizó síntesis de cDNA a partir de RNA de líneas silvestres y líneas mutantes homocigotas de *NAC017* mediante RT-PCR. La reacción de transcripción reversa fue efectuada en un volumen total de 50 µL, a los cuales se agregó 3 µL de transcriptasa reversa ImProm-II (Promega, A3800), 10 µL de amortiguador 5x (ImProm-II™ 5X Reaction Buffer). La reacción contiene, además, dNTPs 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, Ribolock (Fermentas) 0,02 ng/µL y 7,5 µg de RNA incubado con oligo AP. Como control de que el RNA no se encontraba contaminado con DNA, se realizó una reacción de RT-PCR a la cual no se agregó transcriptasa reversa para evaluar en ella la presencia de DNA mediante PCR contra *ACTINA1/11*. La síntesis del cDNA fue realizada incubando la mezcla de reacción en las siguientes 3 etapas: 25°C por 35 minutos, 42°C por 60 minutos y 70°C por 15 minutos. La calidad de los cDNA fue evaluada mediante PCR contra *ACTINA1/11* (Tabla 4) con la polimerasa Paq5000. Los productos fueron visualizados y analizados como se señala en la sección "Electroforesis y visualización de resultados" de "Materiales y Métodos".

**PCR en tiempo real.** Se llevó a cabo la cuantificación de los niveles relativos del transcrito de *NAC017* y de los transcritos provenientes de los genes de referencia *ACTINA2* (*ACT2*, AT3G18780), *UBIQUITINA10* (*UBI10*, AT4G05320) y del gen que codifica para la subunidad A3 de la proteína fosfatasa 2A (*PP2A*, AT1G13320). Esto se realizó mediante PCR cuantitativo (qPCR), utilizando como templado el cDNA de líneas silvestres y líneas mutantes homocigotas de *NAC017*, cuya preparación se describió

anteriormente. Los partidores utilizados fueron qACT10F y qACT10R para ACT2, qUBI10F y qUBI10R para UBI10, qPP2AF y qPP2AR para PP2A y qNAC017F y qNAC017R para NAC017 (ver Tabla 4) y permiten la amplificación de la región del cDNA sintetizada a partir de la región 3' UTR de cada transcrito. Para las reacciones de qPCR se utilizó el kit "Brilliant III SYBR® Master Mix with ROX" de Agilent Technologies. La solución "Master Mix 2X" del kit señalado contiene la enzima polimerasa, dNTPs, cloruro de magnesio, el tampón de reacción y la sonda SYBR-Green, que emite fluorescencia al estar unida a DNA de doble hebra, permitiendo la detección del producto de reacción de qPCR en tiempo real. Cada reacción de qPCR posee un volumen final de 20  $\mu$ L y contiene 10  $\mu$ L de la solución "Master MIX 2X", 0,3  $\mu$ L de una dilución 1 :500 de ROX 1 mM (proveído por el kit Brilliant III), 5  $\mu$ L de una dilución 1 : 625 de una mezcla de los partidores a 250  $\mu$ M y 5  $\mu$ L de una dilución del templado. La concentración apropiada de la dilución de cDNA se determinó realizando una prueba de la reacción de qPCR con los distintos pares de partidores, utilizando como templado diluciones de cDNA silvestre y evaluando la eficiencia de cada reacción y la especificidad de los partidores a cada dilución. La dilución seleccionada fue de 1 : 200. La amplificación se realizó en el equipo Stratagene Mx3000P (Agilent technologies, modelo 401511) con el siguiente protocolo: 10 minutos de denaturación inicial a 95°C y 60 ciclos de amplificación, donde cada ciclo posee una etapa de 10 segundos de denaturación a 95°C seguida de 30 segundos a 60°. En esta última etapa de 30 segundos se fusiona la etapa de alineamiento de los partidores contra su templado y la fase de extensión de la polimerasa, que se realizan a la misma temperatura. Después de cada amplificación, se realizó una curva de renaturación y posterior denaturación con el siguiente protocolo: 1 minuto de denaturación, renaturación del templado hasta los 55°C, 30 segundos a 55°C, denaturación del

templado hasta 95°C y 30 segundos a 95°C. El análisis de esta curva fue utilizado como criterio para evaluar la especificidad de los partidores (la presencia de un único máximo en la curva de disociación), especificidad que también fue confirmada realizando electroforesis en gel de agarosa de los productos de qPCR, como se señala en la sección " Electroforesis y visualización de resultados" de "Materiales y Métodos". La reacción de qPCR fue realizada sobre 3 réplicas biológicas de cDNA con al menos 3 réplicas técnicas cada una. Las curvas de amplificación y disociación fueron obtenidas y analizadas con el programa MXPro-MX3000P (versión 4.1). La eficiencia para cada reacción y para cada par de partidores fue analizada en el programa LinRegPCR (versión 2013.0). El mejor gen de referencia fue seleccionado analizando la variación de la expresión relativa de los 3 genes de referencia en los cDNA evaluados con el macro para Excell NormFinder (NormFinder\_0953) utilizando Microsoft Excell 2007.

**Estudio del tráfico endocítico con FM4-64.** La endocitosis de FM4-64 fue observada en células de la epidermis dentro de la zona meristemática distal y la zona de transición de la punta de la raíz en plántulas de *Arabidopsis thaliana* de 7 días. Las plántulas fueron traspasadas a medio MS 0,5X 1% sacarosa líquido (idéntico al medio MS detallado anteriormente, excepto que sin adición de agarosa) conteniendo FM4-64 5 µM, donde fueron incubadas a la temperatura de 4° C para evitar la internalización del trazador por endocitosis durante la tinción. Las plantas fueron incubadas por 20-30 minutos y luego fueron lavadas a temperatura ambiente en medio líquido MS 0,5X 1% sacarosa para ser sometidas a los tratamientos. Luego, fueron montadas en medio MS líquido. El seguimiento de la internalización del trazador fue realizado siempre en condiciones de oscuridad mediante microscopía confocal en el equipo LSM 510 Carl



Zeiss. La internalización de la sonda fue observada desde el tiempo 5 minutos y cada media hora hasta alcanzar los 120 minutos o bien la visualización de la llegada de la sonda al tonoplasto. El láser utilizado para la excitación del fluoróforo FM4-64 es el de 543 nm utilizando el filtro HFT 488/543. Las imágenes fueron obtenidas con el programa Zeiss LSM 5 y analizadas con el programa ImageJ versión 1.47n. Las imágenes fueron tomadas con una resolución de 1024x1024 píxeles y una profundidad de 8 bits con un acercamiento digital de 2x, utilizando un objetivo 40x de inmersión en aceite. Se realizaron 3 réplicas independientes en cada una de las cuales se observaron al menos 3 plantas de cada línea.

**Cuantificación de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.** Para la cuantificación de de raíces laterales las plantas tratadas con Sortin2 o con DMSO (control) en medio MS líquido fueron traspasadas a etanol 70% durante 1-2 días. Posteriormente, fueron lavadas con medio MS 0,5X 1% sacarosa y se determinó el largo de raíz principal. Las raíces fueron aclaradas y montadas en ácido láctico durante 1 a 3 días previo a la cuantificación de primordios y raíces laterales emergidas.

**Análisis de significancia estadística.** El programa GraphPad Prism versión 5.0 fue utilizado tanto para realizar el análisis estadístico de los experimentos realizados como para la confección de los gráficos que se muestran. Se realizaron los test de Student pareado de dos colas (para la comparación del número de raíces laterales) y de muestra única de dos colas (para la comparación de la expresión relativa). En todos los gráficos la barra de error representa el error estándar.

Nombre	Secuencia del partidor
<i>ntl9-1F</i>	5' CAGATTCAGACCTACCGATG 3'
<i>ntl9-1R</i>	5' AAATATCCCATTGGTGAGAC 3'
<i>ntl9-2F</i>	5' TCATCAGGTGAGTATTTGTTG 3'
<i>ntl9-2R</i>	5' TTTTCTCTGCTTAGACGTTTC 3'
<i>nac017-3F</i>	5' AAACCTCACCCATCTCAG 3'
<i>nac017-3R</i>	5' TTTGCCTCCTTTGAAACAC 3'
<i>nac017-4F</i>	5' GTTCCATGACGTTTCCATG 3'
<i>nac017-4R</i>	5' ACCAGACAGTCTACTTTGTG 3'
Lb1.3	5' ATTTTGCCGATTCGGAAC 3'
qNAC017F	5' CAGTTGAGTCTCAGGTAGAA 3'
qNAC017R	5' GGTCATAATCCCATGAACACT 3'
qUBI10F	5' ACCAGCAGCGTCTCATCTT 3'
qUBI10R	5' GCATAACAGAGACGAGATTTAGAA 3'
qPP2AF	5' GATACTTTGTCGTGTGTTGTCTT 3'
qPP2AR	5' CAAATACGCCAACGAACAA 3'
qACT2F	5' GCTTCTCCATTTGTTTGTTCAT 3'
qACT2R	5' GGAATAAAGAGGCATCAATTCGA 3'
Oligo AP	5' CGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
ACTINAF	5' CACACTTTCTACAATGAGCT 3'
ACTINAR	5' GCAGTGATCTCTTTGCTCAT 3'
NPTIIF	5' CAAGATGGATTGCACGCA 3'
NPTIIR	5' CTATGTCCTGATAGCGGT 3'

**Tabla 4. Lista de partidores.** Secuencias de los partidores utilizados en este trabajo para la amplificación de *ACTINA1/11* y de alelos mutantes y silvestres relativos a los loci AT1G34190 y

AT4G35580 de *Arabidopsis thaliana*, así como los partidores que amplifican el gen NPTII del vector pROK2 y el partidor complementario a la secuencia del borde izquierdo (Lb1.3) del mismo vector. También se muestran los partidores utilizados para la cuantificación de la expresión relativa. Estos partidores son señalados anteponiendo una q y el nombre del gen cuya expresión se analizó. Los partidores utilizados en la genotipificación llevan el nombre de la mutante correspondiente y la letra F (Forward) o R (Reverse). Oligo AP corresponde al partidor utilizado para realizar la transcripción reversa teniendo como templado RNA extraído de las distintas líneas mutantes estudiadas en este trabajo y la línea control.

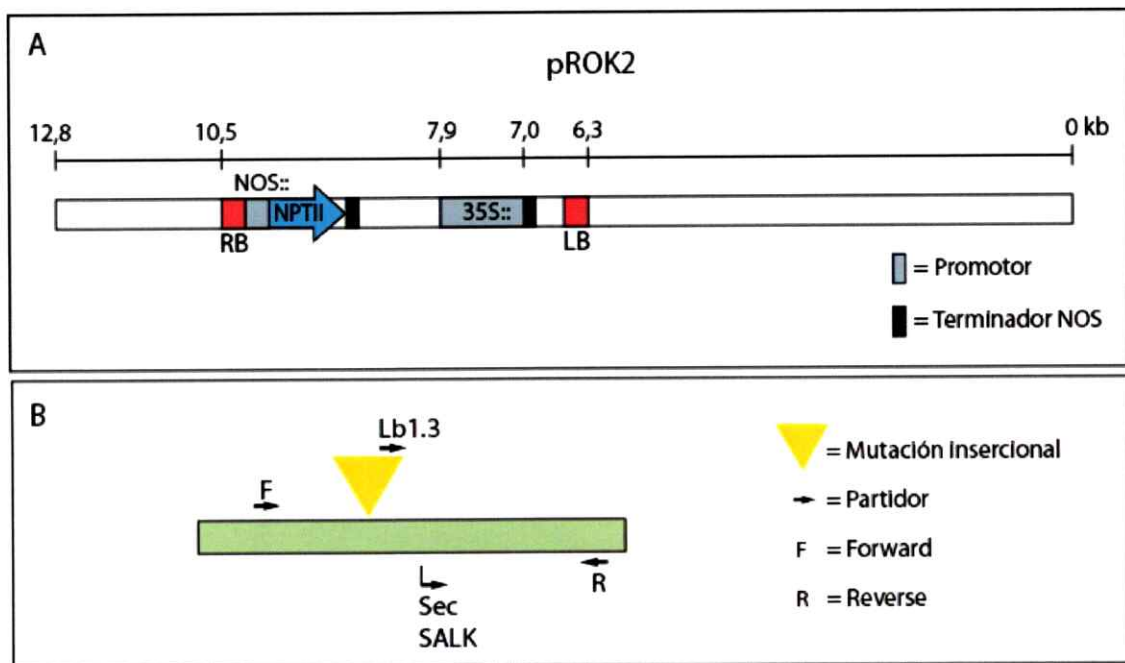
---

Continuación de la leyenda de la Tabla 4.

## RESULTADOS

**Objetivo 1: Obtención de líneas mutantes que pueda presentar una alteración de la función de los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017 de *Arabidopsis thaliana*.**

Con el fin de estudiar la función de los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017 en el tráfico endocítico y procesos relacionados, se propuso como modelo de estudio la utilización de mutantes de *Arabidopsis thaliana* para estos factores de transcripción, las cuales pudieran presentar una alteración de la función de éstos. Se consideró deseable que las mutantes presentaran una pérdida de función y que ésta pudiera verse reflejada en una disminución en los niveles de transcrito, ya que, por un lado, no se dispone de anticuerpos que permitan la detección de NTL9 o de NAC017 y, por otro lado, es el tipo de alteración que dará mejor cuenta de la función del factor de transcripción. Las mutantes disponibles para *NTL9* y *NAC017* al momento de iniciar este trabajo correspondían principalmente a mutantes SALK, las cuales son mutantes insercionales generadas por el SALK Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGNAL, <http://signal.salk.edu/>; Alonso, 2003) y que poseen interrumpido su genoma con un fragmento de T-DNA. Dicho fragmento proviene del plásmido pROK2 (Figura 3A) y corresponde a la región que se encuentra entre los bordes derecho e izquierdo (Right Border ó RB y Left Border ó LB), incluyendo ambos bordes. Como se observa en la Figura 3A, la región mencionada contiene el gen de resistencia a kanamicina, *NPTII*, bajo el promotor de nopalina sintasa (*NOS*) y el promotor del virus del mosaico de la



**Figura 3. Características de las mutantes insercionales SALK.** Las mutantes SALK son mutantes insercionales que tienen interrumpido su genoma con un fragmento del vector pROK2. **A) Elementos del vector pROK2**, el cual es utilizado para la generación de las mutantes SALK. Los elementos del T-DNA que se encuentran en el genoma de las mutantes SALK son aquellos comprendidos entre el RB y el LB (Bordes derecho e izquierdo, respectivamente) y constituyen un inserto de 4,2 kb que incluye las secuencias de ambos bordes, el gen NPTII bajo el promotor de nopalina sintasa (NOS), un promotor 35S seguido de un terminador NOS, otro terminador NOS al final del gen NPTII y las secuencias de los bordes LB y RB. **B) Esquema de una región del genoma de *Arabidopsis thaliana* en la que se ha insertado el fragmento del vector pROK2.** Utilizando como información la secuencia próxima al borde izquierdo del fragmento, es posible estimar la ubicación de la porción del T-DNA en el genoma y con ello generar partidores que permitan corroborar la identidad de mutantes SALK. Se requieren dos partidores que flanquean la inserción y un partidor que hibride específicamente en el fragmento de T-DNA, en este caso, el partidor Lb1.3, que hibrida en el borde izquierdo del T-DNA.



coliflor (35S) seguido de un terminador nopalina sintasa (NOS), en tanto que un segundo terminador NOS se encuentra al final del gen NPTII. Es importante tomar en cuenta que la expresión del transgén NPTII en *Arabidopsis thaliana* no conduce a alteraciones pleiotrópicas en su transcriptoma (Ouakfaoui and Miki, 2005), de modo que los efectos observados en este tipo de mutantes dependen del lugar y orientación del inserto (Eike, 2004; Wang, 2008). Se ha visto que la inserción de T-DNA conduce con mayor probabilidad a una disminución en los niveles de transcrito de genes mutados cuando el inserto se encuentra en un exón o río arriba del inicio de la transcripción (Wang, 2008). Tomando en cuenta este criterio como punto de partida, las mutantes insercionales a ser estudiadas fueron escogidas como se describe a continuación.

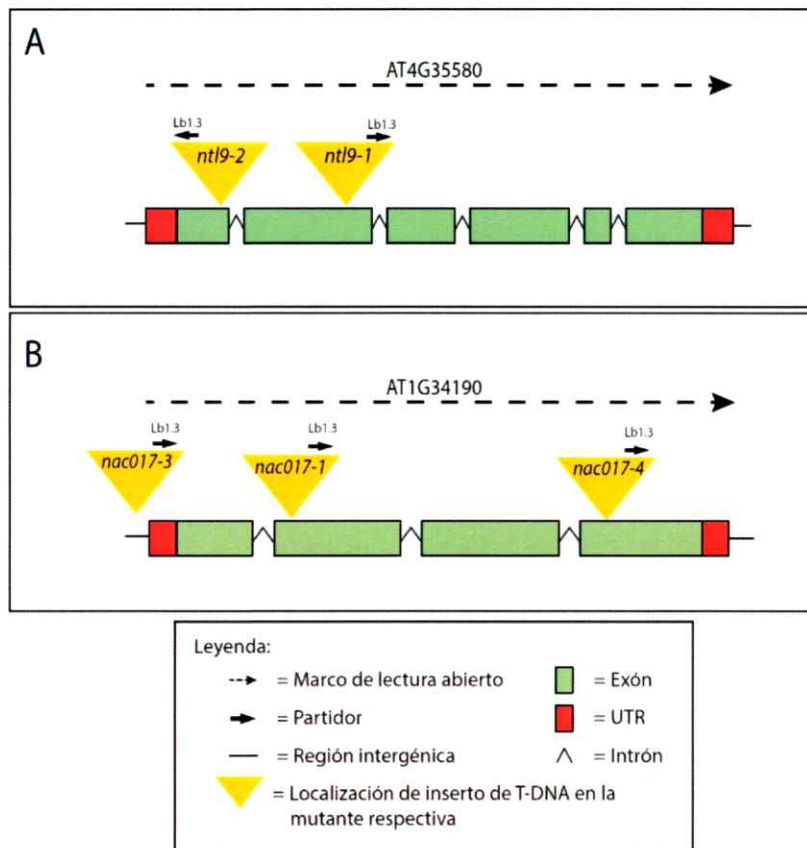
Se buscó en la base de datos TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) cuáles eran las mutantes SALK disponibles con interrupción del locus AT4G35580, que codifica para el factor de transcripción AtNTL9, o del locus AT1G34190, que codifica para el factor de transcripción AtNAC017. En la base de datos, además, se señala parte de la secuencia de un fragmento amplificado a partir del DNA genómico de cada mutante utilizando un partidador que hibrida específicamente en el LB del inserto. Esta secuencia coincide con la secuencia silvestre de la región del genoma de *Arabidopsis thaliana* adyacente a la mutación insercional y se indica en la base de datos a qué lado de esta secuencia se encuentra el inserto y, por ende, la orientación de este inserto. Debido a la incerteza en la lectura de la secuenciación del inicio del fragmento amplificado, sabemos que entre la secuencia publicada y el inserto hay alrededor de 300 pb cuya secuencia no puede ser determinada. De este modo, se infiere que el LB del inserto de T-DNA se encuentra a alrededor de 300 pb de la secuencia señalada en

la base de datos (Figura 3B). A esta posición, 300 pb río arriba de la secuencia señalada en la base de datos y su región adyacente, en la que también puede hallarse la inserción de T-DNA, nos referiremos de ahora en adelante como el sitio posible de la inserción. Este sitio fue identificado en las mutantes de la base de datos y se descartaron aquellas en las que el inserto pudiera encontrarse en un intrón de los genes de interés. Se dio preferencia a las mutantes en que el evento insercional estuviera en los exones. En este caso, se interrumpen los exones que codifican para el dominio NAC de unión a DNA de NTL9 o de NAC017, lo que en ambos casos corresponde a los exones 1 y 2 (Figura 4). El dominio NAC de NTL9 fue identificado en el trabajo de Kim y colaboradores (Kim et al., 2007a) y corresponde a la región amino terminal (Figura 4A). La extensión del dominio NAC de NAC017 fue buscada en este trabajo mediante la herramienta ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) utilizando como input la secuencia aminoacídica de NAC017 (NCBI Reference Sequence: NP\_564440.1, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_564440.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_564440.1)) e incluye desde el aminoácido 16 al 166 del factor de transcripción. Además, se aplicó una última consideración metodológica a la elección de las mutantes, que fue la disponibilidad de germoplasma de mutantes confirmadas como portadoras del inserto en homocigosis de acuerdo a la base de datos. Este hecho, aunque debía ser confirmado, sugería que las mutantes homocigotas eran viables para su estudio. Se quiso líneas mutantes homocigotas para este proyecto ya que las plantas heterocigotas podrían no presentar un fenotipo tan claro como las plantas homocigotas. Por otro lado, se espera que las mutantes sean viables ya que, debido a la gran importancia que tiene el tráfico en muchos procesos biológicos, como se ha descrito anteriormente en la Sección "Introducción", la redundancia funcional haya sido favorecida evolutivamente para genes del sistema de endomembranas. En consecuencia, las

mutantes escogidas fueron: *ntl9-1* (SALK\_065051) y *ntl9-2* (SALK\_102041C) para el locus AT4G35580; y las mutantes *nac017-3* (SALK\_025104C), *nac017-4* (SALK\_026937) y la mutante *nac017-1* (SALK\_022174C) para el locus AT1G34190. Aquellas líneas cuyo código SALK termina en una letra C son aquellas que estaban indexadas como homocigotas en la base de datos TAIR.

Se estimó que el inserto se ubica aproximadamente en el primer exón de *NTL9* en el alelo mutante *ntl9-2* y en el exón 2 de *NTL9* en el alelo mutante *ntl9-1*, de tal modo que en ambas mutantes el inserto interrumpiría la región que codifica para el dominio NAC de *NTL9*. Nótese que el LB se orienta hacia el 5' UTR en *ntl9-2* y hacia el 3' UTR en *ntl9-1* (Figura 4A). Cabe señalar que la mutante *ntl9-1* ya había sido caracterizada como una mutante de pérdida de función de *NTL9* con respecto a su rol en el estrés osmótico y senescencia (Yoon et al., 2008) y, posteriormente, se observó lo mismo con respecto al rol de *NTL9* en la represión de la proteína relacionada con la patogénesis, PR1 (Kim et al., 2012). Con respecto a las mutantes del loci AT1G34190, en las 3 mutantes escogidas el LB se orienta hacia el extremo 3' del gen, estimándose que la interrupción insercional se encuentra al inicio del exón 2 en la mutante *nac017-1* (probablemente interrumpiendo la región que codifica para el dominio NAC de *NAC017*) y al inicio del exón 4 en la mutante *nac017-4*. En la mutante *nac017-3* la ubicación aproximada del inserto es previa al inicio de la transcripción de *NAC017*, probablemente interrumpiendo la región 3'UTR del locus AT1G34180 (*NAC016*). Se ha reportado que la interrupción del 3'UTR con un fragmento de T-DNA puede incrementar los niveles de transcrito del gen afectado, probablemente debido al enhancer que se encuentra en el promotor 35S (Wang, 2008). Dado que este enhancer se encuentra cerca del LB, es decir a más de 4 kb del 3'UTR *NAC016* en la mutante *nac017-3*,





**Figura 4. Esquema de los genes AT1G34190 y AT4G35580 de *Arabidopsis thaliana* y la ubicación de las inserciones de T-DNA en los genes de interés en las mutantes estudiadas en este trabajo. A) Esquema del locus AT4G35580 que codifica para el factor de transcripción NTL9. NTL9 posee un dominio NAC de unión a DNA codificado en sus dos primeros exones, región que se encuentra interrumpida tanto en la mutante *ntl9-1* como en la mutante *ntl9-2*. B) Esquema del locus AT1G34190 que codifica para el factor de transcripción NAC017. El dominio de unión a DNA de NAC017 se encuentra codificado en los primeros 2 exones de su marco de lectura abierto, región que está interrumpida en la mutante *nac017-1*. NAC017, además, posee un dominio regulatorio que en la mutante *nac017-4* no podría transcribirse. En la mutante *nac017-3* el fragmento insercional interrumpe la región previa al inicio de la transcripción del gen *NAC017*.**

es poco probable un efecto en la expresión de *NAC016* debido a la mutación y, en la ausencia de mejores líneas candidatas confirmadas como homocigotas, se solicitó la mutante *nac017-3*. Además, cabe tomar en cuenta que, a diferencia de lo que ocurre con las mutantes *ntl9-1/2* y *nac017-1*, las cuales presentan interrumpida la región que codifica el dominio de unión a DNA, siendo posible afirmar una pérdida de función sin evaluar los niveles de expresión de *NTL9* o de *NAC017*, esto era menos claro en la mutante *nac017-4*, haciendo aconsejable agregar al menos una mutante alélica al estudio a realizar. Al respecto, aunque se había predicho la existencia de una región de transmembrana codificada de manera posterior a la interrupción insercional presente en la mutante *nac017-4* (Kim et al., 2010), esto no se confirmó ni estuvo reportado un rol para esta región en la función de *NAC017* hasta mucho después de la obtención de las líneas mutantes en este seminario de título (Ng et al., 2013). Por el trabajo de Ng y colaboradores, ahora sabemos que la región descrita permite la localización de *NAC017* en la membrana del retículo endoplasmático, donde la acción de una proteasa romboide permite la traslocación del factor de transcripción al núcleo, de modo que la mutante SALK *nac017-2*, que produce una proteína carente de esta región de asociación a membrana, constituye una mutante de ganancia de función de *NAC017* (Ng et al., 2013). Debido a que la localización de la interrupción insercional en la mutante *nac017-2* es similar a la encontrada en *nac017-4* (Ng et al., 2013) y que una localización similar del inserto SALK no necesariamente conduce al mismo tipo de alteración de la expresión relativa del gen interrumpido (Wang, 2008), se tuvo en cuenta que sería necesaria la evaluación de la expresión de *NAC017* para saber si la mutante *nac017-4* correspondería a una pérdida de función (disminución de la expresión relativa de *NAC017*) o una ganancia de función (mantención o aumento de la expresión relativa de *NAC017*). De tal manera que, en consideración a la información

disponible en ese momento, semillas de los 5 germoplasmas escogidos fueron solicitadas al banco de semillas de *Arabidopsis thaliana* ABRC (*Arabidopsis* Biological Resource Center, <http://abrc.osu.edu/>). La localización del inserto en cada una de estas mutantes se resume en la Tabla 5.

Nombre de la mutante insercional	Código de la mutante	Locus interrumpido	Lugar posible de la inserción de T-DNA
<i>ntl9-1, cbnac</i>	SALK_102104C	AT4G35580	Exón 2 de NTL9
<i>ntl9-2</i>	SALK_065051	AT4G35580	Exón 1 de NTL9
<i>nac017-3</i>	SALK_025104C	AT1G34190	Precede al inicio de la transcripción de NAC017
<i>nac017-1</i>	SALK_022174	AT1G34190	Exón 2 de NAC017
<i>nac017-4</i>	SALK_026937	AT1G34190	Exón 4 de NAC017

**Tabla 5. Resumen de las mutantes SALK que fueron escogidas para el estudio de los FTs NTL9 y NAC017 en este trabajo.** Se escogieron 5 mutantes SALK en las que el elemento insercional se encuentra en algún exón o previo al inicio de la transcripción, ya que en estas ubicaciones el inserto de T-DNA puede conducir a la disminución de los niveles de transcrito del locus interrumpido. En la tabla, se resume la información de la localización del inserto en cada mutante y su código SALK. El lugar posible del sitio de la inserción es 300 pb río arriba de la secuencia aledaña al inserto publicada en la base de datos TAIR y posteriormente se requirió confirmar si el inserto se encontraba en este lugar o más lejos de la secuencia de la base de datos.

Una vez obtenidas las semillas de las 5 mutantes insercionales para los factores de transcripción NTL9 o NAC017, éstas fueron propagadas generando una

línea independiente por cada semilla de *Arabidopsis thaliana*. Debido a problemas en el cultivo y propagación, solamente se obtuvieron líneas con parental de los stock de ABRC de las mutantes *ntl9-1*, *ntl9-2*, *nac017-3* y *nac017-4*. Para no llevar a conclusiones erróneas con respecto a este punto, adelantamos que en un trabajo publicado a un año del inicio de este seminario de título se mostró que la mutante *nac017-1* es viable y es una mutante de pérdida de función del factor de transcripción NAC017 (Ng et al., 2013), de modo que el hecho de no haber obtenido esta línea se debe exclusivamente a imprevistos experimentales y no a un problema de viabilidad.

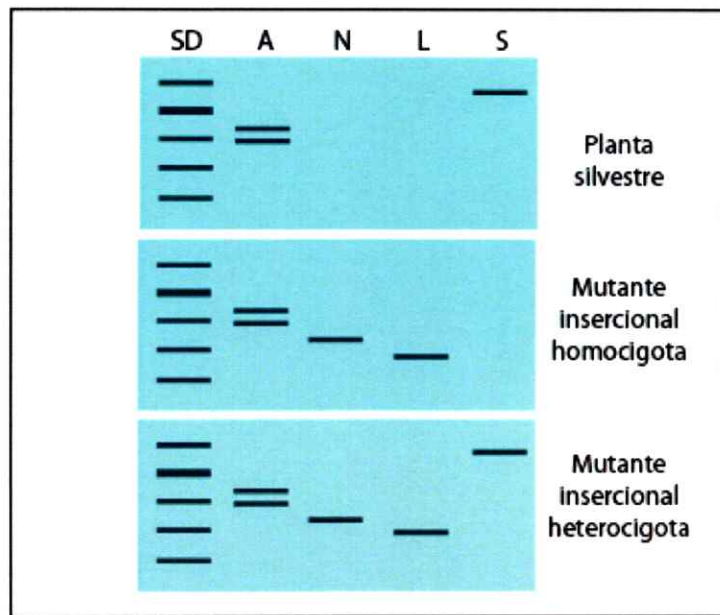
Con el fin de verificar la identidad del parental de las líneas obtenidas de la propagación del germoplasma mutante y corroborar el sitio de la mutación insercional, se realizó una genotipificación utilizando como templado DNA genómico de un conjunto de plantas de cada una de las líneas obtenidas. Esta genotipificación consiste en la detección mediante PCR tanto del inserto de T-DNA en la región esperada del DNA genómico extraído (en la mutante) como del alelo silvestre (en mutantes heterocigotas y plantas silvestres), de modo que, al identificar los alelos presentes en cada conjunto de plantas, se obtendrá el genotipo del parental, el cual comparten todas las plantas de cada conjunto y corresponde a una única planta propagada por autocruce. En primer lugar, se verificó la calidad del DNA genómico extraído corroborando la amplificación del gen de actina con partidores que amplifican simultáneamente dos fragmentos, los que provienen de los loci codificantes para las isoformas *ACTINA1* y *ACTINA11* de *Arabidopsis thaliana* (Tabla 4). Obtenida la amplificación de *ACTINA1/11*, es decir, solamente en muestras de calidad comprobada del DNA genómico, se verificó la presencia del gen NPTII, que se encuentra en el fragmento de T-DNA insertado en el genoma de las mutantes (Figura 3A) y que está ausente del genoma de plantas

silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Una vez confirmado que las plantas mutantes poseen el gen NPTII y, en conclusión, un fragmento de T-DNA insertado en su genoma, se debió confirmar que dicha inserción se encuentra en la región prevista en cada mutante. Para ello, se realizó un PCR utilizando dos partidores: uno que hibrida de manera específica en la región LB del T-DNA (Lb1.3, Tabla 4) y uno que hibrida de manera específica en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Este último partidor, en adelante "Reverse" (R, Figura 3B), fue diseñado para hibridar cerca del sitio putativo de la inserción tanto en la mutante como en la planta silvestre, de manera que en la mutante hibrida en sentido opuesto que el partidor Lb1.3 y el PCR efectuado con ambos partidores en presencia del alelo mutante amplifica un fragmento, cuyo tamaño será determinado mediante electroforesis de DNA en gel de agarosa. La presencia del amplificado permitirá inferir que en la progenie analizada está presente el alelo mutante y que, en consecuencia, el parental posee al menos un alelo mutante. El partidor Lb1.3 es incapaz de hibridar en el genoma de plantas silvestres del ecotipo Col-0 (utilizadas como control ya que las mutantes SALK corresponden a mutantes del ecotipo Col-0), por lo tanto, el mismo PCR efectuado sobre DNA genómico silvestre no generará ningún producto amplificando con este partidor. Tampoco se generará ningún producto mediante el mismo PCR sobre DNA de plantas mutantes que posean una mutación insercional en otra región del genoma, ya que el partidor genómico es específico para la región del gen de interés de *Arabidopsis thaliana*. Esto es importante de notar ya que, si bien la mayor parte de las mutantes SALK poseen solamente una mutación insercional, también podría ocurrir que exista una segunda inserción en su genoma. En este caso, la segregación de la segunda inserción podría llegar a encontrarse con un resultado que prueba, simultáneamente, la presencia del gen NPTII y la ausencia de interrupción insercional en la región del genoma evaluada de manera específica.

Adicionalmente, la determinación del tamaño del producto permitirá confirmar con mayor precisión el lugar de la mutación insercional. Es decir, el tercer PCR (utilizando los partidores LB1.3/R), efectuado sobre DNA de las líneas mutantes, responde 3 preguntas: ¿es el parental de esta línea portador del alelo mutante?, ¿se encuentra la mutación insercional en la región de interés? y ¿en qué lugar del genoma de las mutantes, alrededor del sitio putativo, se encuentra efectivamente el fragmento de T-DNA?; y, eventualmente, podría responder la cuarta pregunta que es ¿existe una segunda mutación insercional en estas líneas?, si es que se encontrara una línea portadora de la segunda mutación insercional y no de la mutación insercional de interés. El mismo PCR que es realizado sobre DNA de plantas silvestres, con resultado de ausencia de producto, por su parte, confirma la especificidad del PCR en la detección del alelo mutante. Finalmente, mencionábamos el requerimiento de estudiar plantas homocigotas. Para ello se realiza un cuarto PCR con el partidor R y un segundo partidor que hibrida también de manera específica en el genoma silvestre, el partidor Forward o F. El partidor F hibrida en el sentido contrario que el partidor R y ambos hibridan tanto en el genoma de plantas mutantes como en el de plantas silvestres ya que la secuencia en la que hibridan flanquea el inserto (Figura 3B). Debido a la procesividad de la enzima polimerasa utilizada y el tiempo de extensión utilizado durante la reacción de PCR, el PCR realizado con los partidores F y R solo genera un producto utilizando como templado DNA genómico silvestre. En tanto, en estas condiciones la enzima es incapaz de amplificar el alelo mutante, donde el tamaño del producto, debido a la presencia del inserto, es mayor al que puede ser amplificado por la polimerasa. Debido a que basta una planta con un alelo silvestre en la progenie analizada para que se obtenga el producto de este PCR, la ausencia de producto en la reacción con los partidores F y R que utiliza como templado DNA genómico mutante

implica que ninguna de las plantas analizadas contiene el alelo silvestre y, en conclusión, que el parental corresponde a una mutante homocigota. En la tabla 4 se indican los partidores F y R diseñados para cada mutante insercional. Una representación del resultado hipotético de la genotipificación de una planta o progenie de parental silvestre, otra de parental mutante heterocigoto y otra de parental homocigoto, puede ser encontrada en la Figura 5. En la Figura 5, en la planta o progenie silvestre se amplifica el gen de actina y el alelo silvestre pero no el alelo mutante ni tampoco NPTII, en la planta o progenie de parental mutante heterocigoto se amplifica actina, NPTII, el alelo mutante y además el silvestre y, por último, en una planta o progenie de parental mutante homocigoto se amplifica actina, NPTII y el alelo mutante pero no el silvestre. Los partidores fueron diseñados para obtener fragmentos de distinto tamaño en los diferentes PCR que detectan el alelo mutante (alrededor de 500 pb) en comparación con el PCR que detecta el alelo silvestre (alrededor de 1 kb). El diseño de partidores se realizó de esta manera para facilitar la identificación de los productos de PCR en electroforesis en gel de agarosa.

De acuerdo al diseño experimental que hemos descrito, se realizó la genotipificación de las líneas mutantes de los genes *NTL9* y *NAC017*. Para ello, se diseñaron los partidores F y R de acuerdo a la estrategia mencionada anteriormente (Figura 3B), teniéndose un par de partidores distintos para la genotipificación de cada mutante (Tabla 4). Así se identificó el genotipo del parental de cada una de las líneas mutantes con los partidores correspondientes, resultado que se detalla en la Tabla 6 y que fue validado mediante la comparación contra el genotipo de las líneas silvestre del ecotipo Col-0, utilizadas como control en cada genotipificación. En primer lugar, entonces, se corroboró que las plantas silvestres utilizadas presentan el alelo silvestre



**Figura 5. Resultado esperado de la genotipificación de plantas de *Arabidopsis thaliana* que permite la identificación de mutantes SALK homocigotas.** Se muestra el resultado de la genotipificación de una planta silvestre (panel superior), una planta heterocigota para la mutación insercional (panel central) y una planta que presenta la mutación insercional en sus dos alelos (panel inferior). Mediante PCR, se detectan 4 elementos genómicos: *ACTINA* (A), *NPTII* (N), el alelo mutante (L) y el alelo silvestre (S). Para estudiar las mutantes homocigotas, se seleccionan aquellas plantas que presentan el alelo mutante y carecen del alelo silvestre para un determinado gen de interés.



en homocigosis. Como se indica en la Tabla 7, el DNA genómico de la línea Col-0 utilizada permite amplificar los fragmentos provenientes de *ACTINA1/11* y de los alelos silvestres de los genes *NTL9* y *NAC017*, y carece del fragmento que proviene del gen foráneo NPTII y del alelo mutante. Con este resultado, se confirma que la línea silvestre utilizada presenta el alelo silvestre en homocigosis y que no presenta la mutación insercional de T-DNA en su genoma. De los germoplasmas mutantes evaluados, para 2 de ellos se confirmaba en la base de datos que su genoma presentaba el alelo mutante en homocigosis. Este hecho solamente se confirmó para las líneas del germoplasma *ntl9-2*, en las que a partir de DNA de todas ellas se amplificó mediante PCR únicamente el fragmento del alelo mutante y nunca el fragmento del alelo silvestre. En las líneas analizadas de los otros 3 germoplasmas, *ntl9-1*, *nac017-3* y *nac017-4*, se identificaron líneas en que el parental es mutante en heterocigosis (se amplificó el fragmento del alelo mutante y además el fragmento del alelo silvestre) e incluso una línea sin inserto (no se amplificó el fragmento del gen NPTII ni del alelo mutante, pero sí el fragmento del alelo silvestre), segregante del germoplasma *nac017-1*. Por otro lado, se obtuvieron líneas homocigotas para todas las mutaciones insercionales de interés. Estas líneas mutantes homocigotas son las que se continuaron utilizando durante este seminario de título. En la tabla 6 se indican todas las líneas analizadas y el resultado obtenido, el cual se ha descrito en este párrafo.

Germoplasma del que proviene el parental	Línea	Presencia (+) o ausencia (-) de producto de PCR				Genotipo del parental para el alelo respectivo
		A	N	L	S	
<i>ntl9-1</i>	3	+	+	+	-	Mutante homocigota
	4	+	+	+	-	Mutante homocigota
	5	+	+	+	+	Mutante heterocigota
	6	+	+	+	-	Mutante homocigota
<i>ntl9-2</i>	8	+	+	+	-	Mutante homocigota
	9	+	+	+	-	Mutante homocigota
	10	+	+	+	-	Mutante homocigota
	11	+	+	+	-	Mutante homocigota
<i>nac017-3</i>	31	+	+	+	-	Mutante homocigota
	39	+	-	-	+	Sin inserto
	40	+	+	+	-	Mutante homocigota
	41	+	+	+	-	Mutante homocigota
	N15	+	-	+	+	Mutante heterocigota
	N16	+	+	+	-	Mutante homocigota
	N17	+	+	+	+	Mutante heterocigota
	N18	+	+	+	+	Mutante heterocigota
<i>nac017-4</i>	34	+	+	+	-	Mutante homocigota
	36	+	+	+	+	Mutante heterocigota
	37	+	+	+	-	Mutante homocigota

**Tabla 6. Resumen de las líneas mutantes genotificadas para la identificación de mutantes homocigotas de los factores de transcripción NTL9 y NAC017.** Las mutantes *ntl9-1*, *ntl9-2*, *nac017-3* y *nac017-4* fueron obtenidas desde el banco de germoplasma y propagadas para la obtención de material de trabajo. La identidad de las líneas obtenidas fue verificada mediante la estrategia de genotificación descrita en el texto previo a esta tabla. A = *ACTINA*, N = *NPTII*, L = alelo mutante, S = alelo silvestre. El signo (+) indica que se obtuvo la amplificación del fragmento de la región genómica señalada en la columna y el signo (-) indica la ausencia del fragmento indicado. Para las líneas heterocigotas, n=1. Para las líneas homocigotas, n=3.

Germoplasma	Mutación insercional cuya ausencia se comprobó	Presencia (+) o ausencia (-) de producto de PCR			
		A	N	L	S
Col-0	<i>ntl9-1</i>	+	-	-	+
	<i>ntl9-2</i>	+	-	-	+
	<i>nac017-3</i>	+	-	-	+
	<i>nac017-4</i>	+	-	-	+

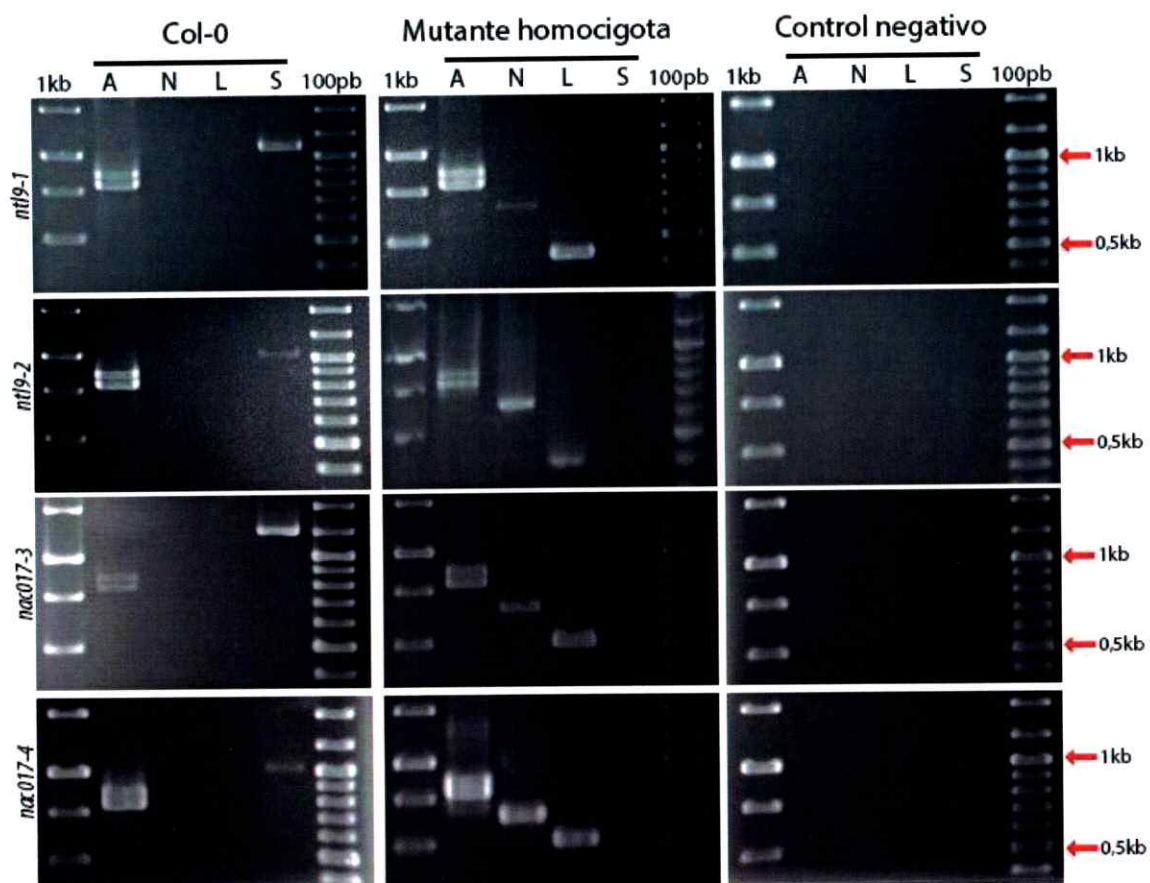
**Tabla 7. Genotipificación de las líneas silvestres utilizadas como control durante este seminario de título.** El genotipo de las plantas Col-0 utilizadas durante los distintos experimentos de este trabajo fue corroborado mediante la estrategia descrita anteriormente. A = *ACTINA*, N = NPTII, L = alelo mutante, S = alelo silvestre. El signo (+) indica que se obtuvo la amplificación del fragmento de la región genómica señalada en la columna y el signo (-) indica la ausencia de amplificación del fragmento indicado. Como se indica, se comprobó que la planta silvestre Col-0 (control) no posee el gen NPTII de *Agrobacterium tumefaciens* que se encuentra en el fragmento de T-DNA en el genoma de las mutantes insercionales SALK y que todos los fragmentos de los alelos silvestres de *NTL9* y *NAC017* son amplificados. Los fragmentos de los alelos mutantes estudiados, *ntl9-1*, *ntl9-2*, *nac017-3* y *nac017-4*, en cambio, están ausentes del genoma de la planta silvestre. n=6.

El resultado de la genotipificación de las líneas homocigotas obtenidas (Tabla 6) puede observarse en la Figura 6, donde se muestra la genotipificación de una línea mutante homocigota para cada factor de transcripción, *NTL9* o *NAC017*, mediante los 4 PCR que se realizan sobre 3 muestras: DNA mutante, DNA silvestre y un control negativo que corresponde a la reacción de PCR sin templado. Como decíamos, en la planta silvestre se obtuvo solamente la amplificación de los fragmentos de *ACTINA* y del alelo silvestre. En cada mutante, por otro lado, se obtuvo la amplificación del fragmento de *ACTINA*, del fragmento de NPTII, indicando la presencia del inserto de T-



DNA; y del fragmento de su respectivo alelo mutante, indicando que el inserto de T-DNA se encuentra en el lugar de interés. Lo anterior, en conjunto con la ausencia del alelo silvestre, indica que el parental de las líneas evaluadas presenta la mutación en ambos alelos. En la Figura 6 vemos, además, los tamaños de los productos de PCR de cada fragmento amplificado. El producto del PCR de actina se visualiza como una doble banda, de manera consistente con los tamaños esperados de 795 pb y 850 pb de los fragmentos provenientes de *ACTINA1* y *ACTINA11*, respectivamente. El fragmento que amplifican los partidores de NPTII utilizados posee un tamaño consistente con el esperado, esto es, de 655 pb de acuerdo a la secuencia de NPTII en el plásmido pROK2 (<http://signal.salk.edu/pBIN-pROK2.txt-new>). Los fragmentos de los alelos silvestres también poseen tamaños esperados, los que corresponden a 1080 pb para el fragmento que está interrumpido en *ntl9-1*, 1017 pb para el fragmento que está interrumpido en *ntl9-2*, 1214 pb para el fragmento que está interrumpido en *nac017-3* y 1029 pb para el fragmento que está interrumpido en *nac017-4*. Para los alelos mutantes, se había estimado cuál sería el tamaño del fragmento amplificado si la interrupción insercional se encontrara exactamente a 300 pb de la secuencia obtenida a partir de DNA genómico mutante y que está indicada en la base de datos. Los tamaños estimado/real corresponden a 411/425 para el fragmento de *ntl9-1*, 479/400 para el fragmento de *ntl9-2*, 569/500 para el fragmento de *nac017-3* y 452/500 para el fragmento de *nac017-4*. Estos tamaños, que se resumen en la Tabla 8, confirman la posición de las interrupciones del exón 2 de AT4G35580 en la mutante *ntl9-1*, del exón 1 de AT4G35580 en la mutante *ntl9-2*, de la región río arriba del inicio de la transcripción de AT1G34190 en la mutante *nac017-3* y del exón 4 de AT1G34190 en la mutante *nac017-4*. A estas observaciones cabe añadir que el tamaño calculado del fragmento del alelo mutante de *nac017-3* ubica la mutación insercional a 17 pb del

término de la transcripción de *NAC016*, distancia que no supera la resolución con que podemos definir mediante electroforesis el tamaño de los fragmentos amplificados, por lo que se requiere otro tipo de experimentos para determinar si la inserción se encuentra efectivamente dentro del 3'UTR de *NAC016*. En conclusión, se obtuvieron mutantes homocigotas provenientes de 4 de los 5 germoplasmas que se planificó estudiar y se confirmó la localización de la interrupción del genoma de estas 4 mutantes con respecto a los loci que codifican para *NTL9* y *NAC017*. Esto último permitió proseguir con los estudios sobre estos 4 germoplasmas, ya que comprueba que las mutantes son buenas candidatas a presentar una alteración de la función del factor de transcripción *NTL9* o de *NAC017*, según sea el caso. Debido a que, como se dijo anteriormente, cuando la interrupción insercional se encuentra en un exón o río arriba del inicio de la transcripción es más probable que conduzca a una disminución de los niveles de transcrito (Wang, 2008), dicha alteración podría corresponder a una pérdida de función de *NTL9* o de *NAC017* en las mutantes obtenidas.



**Figura 6. Genotipificación de líneas homocigotas de mutantes de los factores de transcripción NTL9 y NAC017.** En cada fila se muestra el resultado de genotipificación representativo de líneas homocigotas para las mutaciones insercionales *ntl9-1*, *ntl9-2*, *nac017-3* y *nac017-4*. Para cada genotipificación se señala el resultado para la mutante homocigota (al centro), para la línea silvestre control (a la izquierda) y el control negativo (a la derecha) de cada una de las 4 reacciones de PCR que permiten amplificar los fragmentos de las regiones genómicas de *ACTINA* (A), de *NPTII* (N), del alelo mutante respectivo (L) y del alelo silvestre (S). n=3. A la izquierda se indica qué mutación insercional se buscaba en homocigosis en cada genotipificación en cada una de las líneas mutantes analizadas en la columna central. En cada imagen se encuentran el estándar de peso de DNA de 1 kb (a la izquierda) y de 100 pb (a la derecha). Las flechas indican la posición de las bandas de 1 kb y la de 0,5 kb, homologables a

todas las fotos de la figura. Los tamaños de los fragmentos amplificados se señalan en la Tabla 8.

Continuación de la leyenda de la Figura 6.

Locus	Alelo del que proviene el fragmento amplificado	Tamaño esperado	Tamaño experimental
AT4G35580	<i>ntl9-1</i>	411	425
	<i>ntl9-2</i>	479	400
AT1G34190	<i>nac017-3</i>	569	500
	<i>nac017-4</i>	452	500

**Tabla 8. Resumen de los tamaños experimentales de los fragmentos de los alelos mutantes amplificados en mutantes insercionales de los factores de transcripción NTL9 y NAC017.** El tamaño esperado del producto de PCR obtenido al amplificar el fragmento del alelo mutante con los partidores Lb1.3 y R fue calculado y comparado con el tamaño experimental determinado durante la genotipificación para cada una de las mutantes de *NTL9* o de *NAC017*. Aunque existe una variación entre el valor experimental y el valor esperado calculado previamente, los tamaños experimentales de los fragmentos de los alelos mutantes son consistentes con la localización de las mutaciones insercionales descrita en la Tabla 5.

Para corroborar que los fragmentos de los alelos mutante y silvestre que fueron amplificados anteriormente provienen efectivamente de las regiones genómicas de interés, se realizó una digestión con enzimas de restricción de cada uno de los fragmentos amplificados, el fragmento del alelo silvestre y el fragmento del alelo mutante, obtenido en la genotipificación de cada una de las 4 mutantes. Para cada par

de fragmentos, es decir, el fragmento del alelo mutante, obtenido de la línea mutante homocigota, y el fragmento del alelo silvestre, obtenido de la línea silvestre, se utilizó la misma enzima de restricción. Esto último conduce a que uno de los fragmentos generados en la digestión tenga el mismo tamaño y secuencia tanto en la digestión del alelo mutante como en la digestión del alelo silvestre, ya que corresponde al extremo de los fragmentos que se encuentra del lado de la secuencia en que hibrida el partidor R. Además, se escogieron enzimas para las que los fragmentos de los alelos mutantes presentaran un único sitio de corte, lo que también resultó en un único sitio de corte para los fragmentos de los alelos silvestres amplificados en la genotipificación de *ntl9-1*, *ntl9-2* y *nac017-4*. El fragmento del alelo silvestre amplificado en la genotipificación de *nac017-3*, por su parte, posee dos sitios de corte para la enzima escogida, por lo que su digestión completa genera tres productos de digestión. Las enzimas escogidas fueron KpnI para la digestión del fragmento del alelo mutante de *ntl9-1* y su contraparte silvestre, ApaI para el fragmento del alelo mutante de *ntl9-2* y su contraparte silvestre, BglII para el fragmento del alelo mutante de *nac017-3* y su contraparte silvestre y, por último, SpeI para el fragmento del alelo mutante de *nac017-4* y su contraparte silvestre. Se determinó cuáles eran los tamaños de los productos de la digestión de los fragmentos amplificados en la genotipificación de las 4 líneas mutantes, tamaños que se detallan en la Tabla 9. Al realizar la digestión, vemos que se confirmó el número y tamaño de los fragmentos generados, tal como se detalla en la Tabla 9. El resultado de esta digestión se describe a continuación y se puede observar en la Figura 7. Para la digestión de cada uno de los fragmentos del alelo mutante se obtuvieron dos bandas que, de acuerdo a sus tamaños, corresponden a los productos de la digestión del fragmento. En los 4 casos, existe una tercera banda (apenas detectable para el caso de *nac017-4*) cuyo tamaño es consistente con el tamaño del fragmento íntegro del

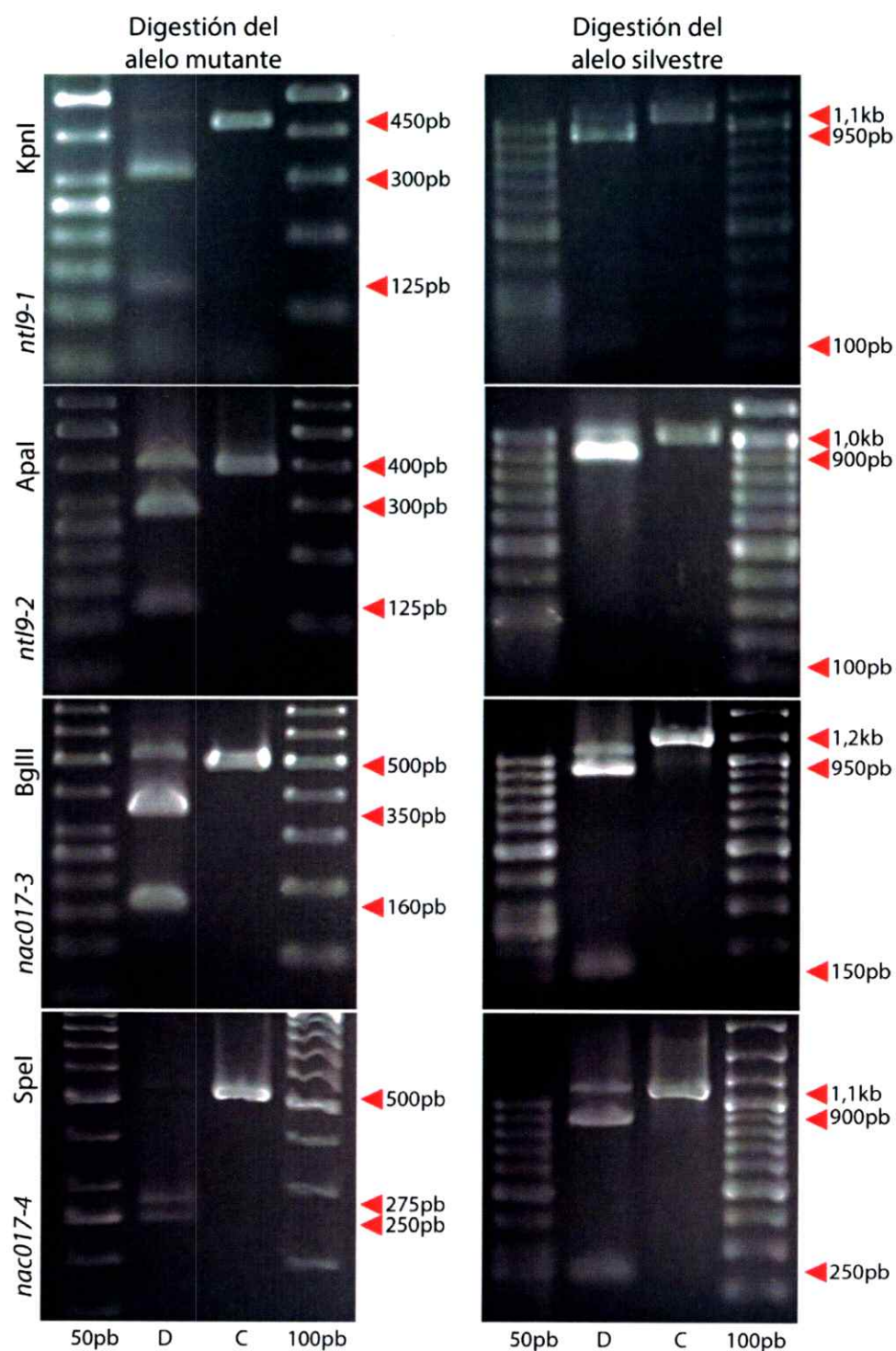


alelo mutante y su presencia se debe a que el rendimiento de la reacción de digestión no permitió la digestión de todo el templado agregado a la reacción de digestión. Si comparamos el tamaño del templado sin digerir en la reacción de digestión con el tamaño del fragmento sin digerir, de acuerdo a lo que se observa en la misma figura, vemos que existen pequeñas diferencias atribuibles al estado del DNA en la misma reacción de digestión, ya que existe una tendencia a una movilidad electroforética ligeramente menor a la esperada para todas las bandas, que se hace notoria para las bandas de tamaños pequeños. No obstante, se confirma que los fragmentos amplificados desde los alelos mutantes *ntl9-1*, *ntl9-2*, *nac017-3* y *nac017-4*, presentan un único sitio de corte para las enzimas de restricción utilizadas, permitiendo sostener que proceden de la región genómica del DNA mutante que se encuentra interrumpida por la inserción del fragmento del T-DNA. Además, los tamaños de los productos de digestión siguen siendo consistentes con los tamaños esperados. Un resultado similar se obtuvo con la digestión de los fragmentos del alelo silvestre que proceden de las regiones que en las mutantes se encuentran interrumpidas por el fragmento de T-DNA, como se observa en la misma figura (Figura 7). La digestión de los fragmentos de los alelos silvestres que se encuentran interrumpidos en las mutantes *ntl9-1*, *ntl9-2* y *nac017-4*, resulta en una banda que corresponde a parte del templado que no ha sido digerido y, adicionalmente, dos bandas de los tamaños esperados que corresponden a los productos de la digestión con la enzima de corte único para esos fragmentos. En la digestión del fragmento del alelo silvestre que se encuentra interrumpido en la mutante *nac017-3* se observan 3 bandas. Dos de ellas corresponden a los tamaños esperados de la digestión completa del fragmento: una banda de mayor tamaño que corresponde al producto de la digestión cuyo tamaño es de 916 pb y una banda de menor tamaño en que se encontrarían los otros dos productos de la digestión, de tamaños 155 pb y

143 pb. Los dos productos de menor tamaño provienen de los extremos del fragmento del alelo silvestre y la digestión incompleta del mismo explica la tercera banda visualizada, que corresponde al fragmento del alelo silvestre que ha sido cortado por la enzima BglII solamente en uno de los dos sitios de corte presentes en el templado. Consistentemente, el tamaño de esta banda se acerca a los 1100 pb. Si comparamos el tamaño de la banda más pequeña obtenida de la digestión de cada fragmento del alelo mutante y del alelo silvestre correspondiente, vemos que su tamaño es idéntico. Esto es consistente con la observación que se realizó en un principio de que el extremo del fragmento que está del lado de la secuencia en que hibrida el partidor R es idéntica tanto en el alelo silvestre como en el alelo mutante. En conjunto, estos resultados permiten afirmar que los fragmentos amplificados, tanto desde DNA genómico silvestre como mutante, proceden de las regiones de interés.

Enzima	Tamaños esperados de la digestión del fragmento digerido (pb)		
	Alelo mutante	Alelo silvestre	
KpnI	<i>ntl9-1</i>	123* y 280	123* y 957
Apal	<i>ntl9-2</i>	111* y 300	111* y 906
BglII	<i>nac017-3</i>	155* y 360	155*, 916** y 143
SpeI	<i>nac017-4</i>	240* y 260	240* y 889

**Tabla 9. Tamaños esperados de los productos de la digestión de los fragmentos amplificados desde los alelos mutantes y silvestres de *NTL9* y *NAC017*.** Se muestran los tamaños esperados de los productos de la digestión de los fragmentos amplificados desde los alelos mutantes de las mutantes insercionales estudiadas y de los fragmentos del alelo silvestre correspondiente. El producto de la digestión que proviene del extremo del fragmento del alelo en que se encuentra la secuencia complementaria al partidor R se indica con un asterisco. Con dos asteriscos se señala el producto de la digestión que proviene de la región central del fragmento amplificado desde el alelo silvestre en la genotipificación de *nac017-3* luego de la digestión con BglII.



**Figura 7. Verificación del patrón de digestión de los fragmentos amplificados desde los alelos silvestre y mutante de *NTL9* y *NAC017*. Se muestra la digestión (D)**

de los productos de PCR definidos como los alelos mutante y silvestre en relación a la región de T-DNA de cada mutante junto a su control sin digerir (C). En cada foto se encuentran los estándares de peso de DNA de 50 pb (a la izquierda) y de 100 pb (a la derecha). Con las flechas rojas se indican los tamaños de los productos de la digestión y el templado sin digerir. Las variaciones de tamaño con respecto a las descritas en la tabla 9 no son significativas, de acuerdo a la resolución de los geles, confirmando que los productos de PCR provienen de las regiones génicas de interés.

---

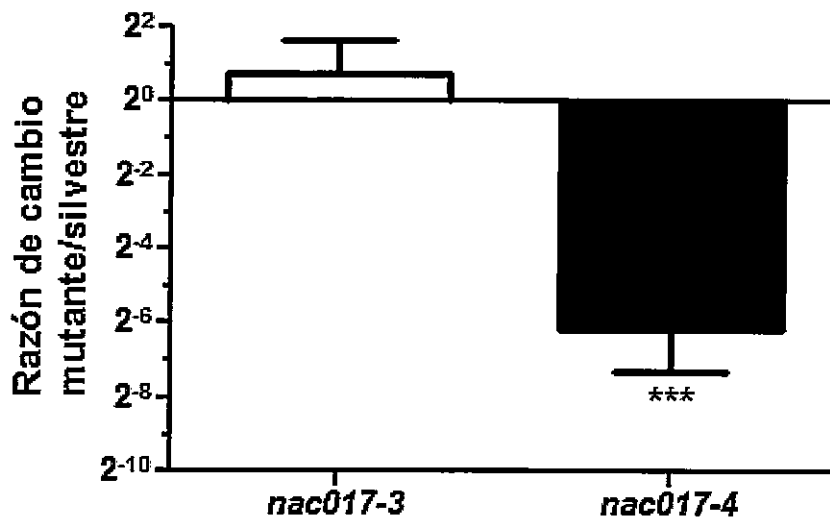
Continuación de la leyenda de la Figura 7.

Finalmente, para dar por cumplido el primer objetivo de este trabajo es necesario analizar si las mutantes obtenidas serán útiles para poder evidenciar el rol funcional de *NTL9* y de *NAC017*, es decir, si pueden presentar una alteración de la función suficiente para presentar un fenotipo observable. De acuerdo a los análisis previos que muestran que la localización del inserto es en el primer exón de *NTL9* en la mutante *ntl9-2* y en el segundo exón de *NTL9* en la mutante *ntl9-1*, ambas mutantes de *NTL9* presentan una pérdida de la función del factor de transcripción *NTL9*. En el caso de la mutante *ntl9-2*, se espera que esta pérdida de función sea total debido a la imposibilidad de generar una proteína con su correspondiente dominio de unión a DNA. En el caso de la mutante *ntl9-1*, si bien la mutante podría generar una proteína con gran parte de este dominio, la mutante ya ha sido reportada como una mutante de pérdida de función en que la proteína relacionada con la patogénesis (PR1), blanco transcripcional del represor *NTL9*, se encuentra inducida basalmente, lo cual confiere a la mutante resistencia a patógenos. Debido a lo anterior, sabemos que la pérdida de función en esta mutante, aunque tal pérdida pudiera ser parcial, es suficiente para alterar la fisiología de la planta.

En el caso de las mutantes de *NAC017*, la comprobación de la alteración de la función del factor de transcripción requirió de más antecedentes. Para resolver este problema, se cuantificó la expresión relativa de *NAC017* en las mutantes *nac017-3* y *nac017-4*. Para comenzar, se buscó en la base de datos EFP Browser en qué tejidos de *Arabidopsis thaliana* se expresa *NAC017*. Se encontró que el factor de transcripción se expresa en todos los tejidos de *Arabidopsis thaliana* excepto en las silicuas y que los mayores niveles de expresión reportados se obtienen en polen maduro y hojas senescentes, aunque ya hay expresión del FT en las primeras hojas de la roseta de *Arabidopsis*. Se resolvió extraer RNA de plantas de 14 días, tiempo que se estimó más que suficiente para obtener la cantidad de tejido necesaria para los análisis posteriores. Se extrajo RNA a partir de plantas Col-0 y mutantes *nac017-3* y *nac017-4*. Se realizó una transcripción reversa, obteniéndose el cDNA que se utilizó como templado para cuantificar la expresión relativa de *NAC017* mediante qPCR. La calidad, tanto del RNA como del cDNA, fue corroborada mediante electroforesis y PCR convencional, como se detalla en la Sección "Materiales y Métodos". Como genes de referencia del qPCR, fueron amplificados *ACTINA*, *UBIQUITINA* y *PP2A*, de los cuales se determinó mediante la herramienta NormFinder que *UBIQUITINA* correspondía al gen de expresión más estable, por lo que fue utilizado como normalizador. La expresión relativa de *NAC017* fue calculada mediante el método de Pfaffl, habiendo determinado la eficiencia de cada par de partidores con el programa LinkRegPCR. De este modo, la expresión relativa de *NAC017* fue determinada como:

$$\text{Expresión relativa de } NAC017 = \frac{[\text{Eficiencia}^{(Ct \text{ mutante} - Ct \text{ Col-0})}]_{NAC017}}{[\text{Eficiencia}^{(Ct \text{ mutante} - Ct \text{ Col-0})}]_{UBI10}}$$

, donde el Ct es la cantidad de ciclos en que comienza la amplificación. Durante el transcurso de este trabajo se realizaron 3 réplicas biológicas de la cuantificación de la expresión relativa de *NAC017*. La expresión relativa de *NAC017* en cada mutante fue comparada con la expresión relativa de *NAC017* en la planta silvestre que, por definición, es igual a 1. Se encontró que *nac017-3* presenta una expresión relativa promedio de *NAC017* de 1,7 veces la expresión relativa en la planta silvestre, en tanto que *nac017-4* tiene una expresión relativa promedio de *NAC017* de sólo 0,014 veces los niveles de transcrito en la planta silvestre. A continuación, se realizó una prueba estadística con el test de t de Student de dos colas para una muestra única con el objetivo de determinar si la expresión relativa promedio en cada mutante es significativamente distinta de una expresión relativa igual a 1, es decir, de la expresión relativa de *NAC017* en el ecotipo silvestre. Con esta prueba estadística se obtuvieron un valor de  $p=0,666$  para el análisis sobre la mutante *nac017-3* y un valor de  $p$  menor a 0,0001 para el análisis sobre la mutante *nac017-4*. Esto nos indica que los niveles de transcrito de *NAC017* en la mutante *nac017-4* son significativamente menores que los encontrados en la planta silvestre y que la mutante es "knock-down" para este factor de transcripción. Por otro lado, se requieren más réplicas biológicas para establecer si la mutante *nac017-3* presenta una alteración de función de *NAC017* a nivel de transcrito. Estos resultados se muestran en la Figura 8.



**Figura 8.** Expresión relativa de *AtNAC017* en las mutantes *nac017-3* y *nac017-4*. En el gráfico se muestra en escala logarítmica, expresada como potencia de 2, la expresión relativa de *AtNAC017* en mutantes insercionales del factor de transcripción *nac017-3* y *nac017-4*. La expresión relativa es obtenida como la razón de cambio entre niveles de transcrito de *NAC017* en cada línea mutante con respecto a la expresión en Col-0. Se utilizó como normalizador la expresión del gen de referencia *UBIQUITINA10*. n = 3 \*\*\* = p << 0,001 Prueba estadística utilizada: t de Student.

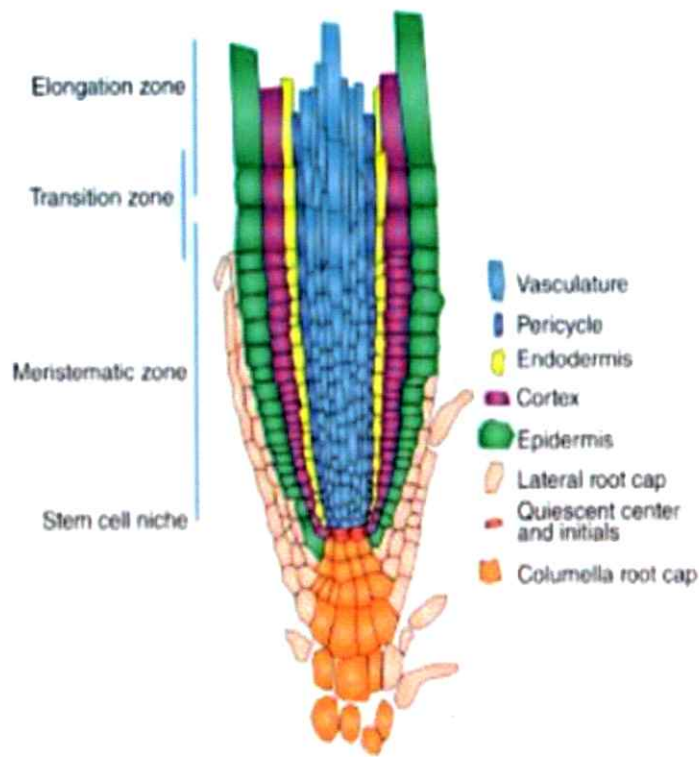


**Objetivo 2: Estudiar el tráfico endocítico en mutantes de *Arabidopsis thaliana* que presentan una alteración de la función de los factores de transcripción AtNTL9 y AtNAC017.**

Para responder a la pregunta de si acaso los FTs NTL9 y NAC017 participan de la regulación del tráfico endocítico en *Arabidopsis thaliana*, se estudió el tráfico de un trazador de membrana en las mutantes homocigotas de los FT NTL9 y NAC017. El trazador utilizado, FM4-64, permite marcar la membrana plasmática y luego seguir la movilización de la sonda hacia el interior de estas células. Dado que la molécula FM4-64 solamente emite fluorescencia tras ser excitada si es que se encuentra asociada a una membrana y ya que el FM4-64 no puede atravesar la membrana por difusión (Bolte et al., 2004), la internalización de la sonda es observada principalmente a medida que ocurre la endocitosis de componentes de la membrana plasmática. Estos componentes son llevados hacia la vacuola, lo cual ocurre a través de la ruta endocítica. A través de la observación en el tiempo de la internalización de FM4-64 es posible distinguir la tasa de endocitosis de componentes de la membrana plasmática y la velocidad con que estos componentes llegan al tonoplasto. De este modo, el trazador de membrana FM4-64 es una herramienta muy potente para detectar anomalías esperables como resultado de la alteración del tráfico endocítico, lo cual permite responder al objetivo general del presente trabajo, que consiste en estudiar el tráfico endocítico hacia la vacuola.

En primer lugar, plantas Col-0 y mutantes (de las líneas homocigotas *nac017-3*, *nac017-4*, *ntl9-1* y *ntl9-2*) fueron teñidas con la sonda FM4-64. La tinción se realizó a 4°C, condición en que la endocitosis es inhibida, lo cual permite limitar la

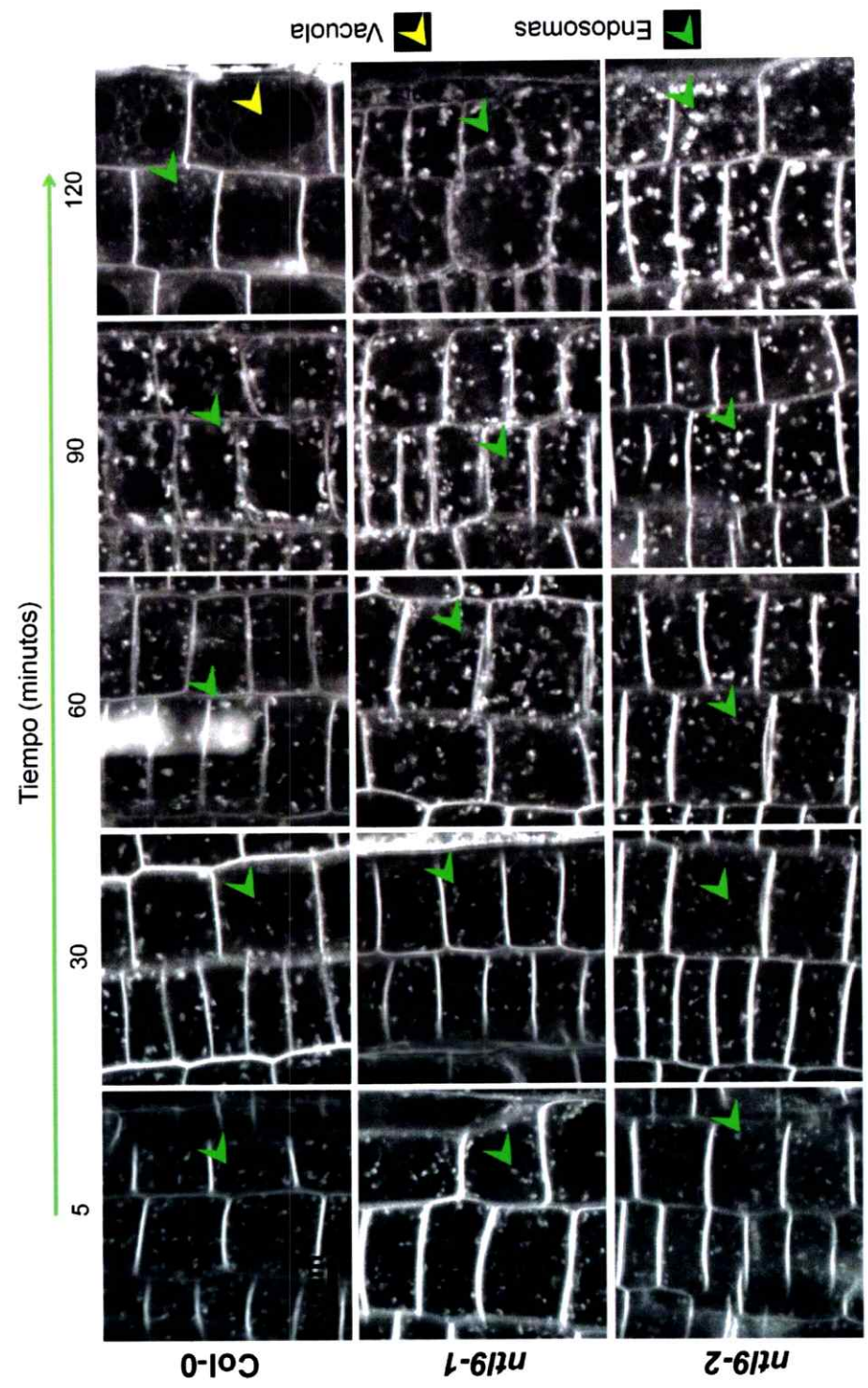
internalización de la sonda y distinguir los primeros endosomas en que será movilizada la molécula de FM4-64. Luego, se realizó la reactivación de la endocitosis al llevar las plantas a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó el seguimiento de la internalización de la sonda, la cual fue registrada al tiempo inicial (5 minutos) y a los 30, 60, 90 y 120 minutos o hasta la visualización del tonoplasto. La observación se realizó en un corte óptico paralelo al eje de la raíz principal sobre las células de la epidermis dentro de la zona de transición de la punta de la raíz (Figura 9, tomado de Jaillais and Chory, 2010), células que en este plano tienen una morfología característica semejante a un cuadrado, por lo que su identificación es sencilla. Además, en estas células se observan claramente los compartimentos del SE marcados por el trazador debido a que se encuentran en la superficie de la raíz, región en la que puede penetrar el láser del microscopio confocal y, por tanto, es posible excitar la molécula de FM4-64 y registrar su fluorescencia. Durante la endocitosis del trazador en plantas silvestres, a tiempo inicial el marcador se encuentra únicamente en la membrana plasmática y en endosomas tempranos, los cuales se observan como estructuras punteadas (Figura 10). Posteriormente, el marcador sigue acumulándose en los endosomas, de modo que a los 60 minutos se observan endosomas de mayor tamaño que a 5 o que a 30 minutos, alcanzando su tamaño máximo a los 90 minutos (Figura 10). Adicionalmente, cuando han transcurrido 120 minutos de internalización del trazador, observamos que éste ya marca el tonoplasto, el cual es visualizado rodeando completamente la vacuola. La vacuola es una estructura de gran tamaño que puede ocupar un porcentaje muy alto del volumen celular. El número de vacuolas por célula y su forma es variable, pudiendo ser perfectamente redondas o bien alargadas o achatadas en alguno de sus bordes (Figura 10, Col-0 120 minutos).



**Figura 9. Zonas de crecimiento y tipos celulares presentes en la punta de la raíz de *Arabidopsis thaliana*.** La zona de transición ("*Transition Zone*") está comprendida por las células que han dejado de proliferar activamente, como sí lo hacen las células meristemáticas, y que aún no han comenzado a elongar. Por tanto, la zona de transición se encuentra entre la zona meristemática ("*Meristematic zone*") y la zona de elongación ("*Elongation zone*"). En esta zona, la capa celular señalada como epidermis (en verde), corresponde a las células en las que se observó la internalización del trazador FM4-64. Otro aspecto a notar en esta imagen es la capa de células del periciclo ("*Pericycle*", en azul) que rodea el haz vascular. En esta capa se encuentran las células que son capaces de generar una raíz lateral, como se señalará durante el desarrollo del objetivo 3. Imagen tomada de Jaillais and Chory, 2010.

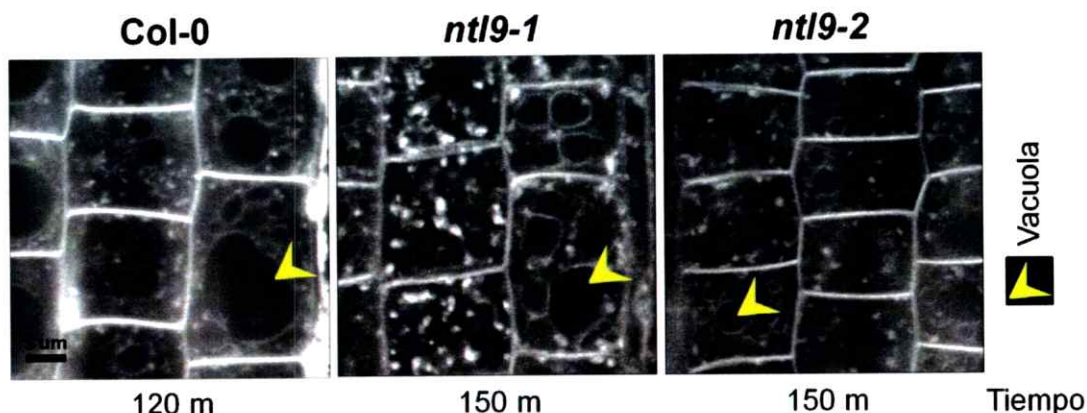
Cuando observamos el curso de la endocitosis del trazador FM4-64 en mutantes de *NTL9*, vemos que las mutantes presentan diferencias en el número y en el tamaño de los endosomas en comparación con la línea silvestre (Figura 10) y en el tiempo de llegada del trazador a la membrana vacuolar (Figura 10 y Figura 11). La mutante *ntl9-2* presenta mayor cantidad de endosomas que la línea silvestre a los 30 minutos y la acumulación del trazador en los endosomas sigue aumentando más allá de los 90 minutos, tiempo en que se alcanza el máximo tamaño de los endosomas en la línea silvestre. Esta acumulación del trazador en los endosomas prosigue aún hasta los 120 minutos sin haber alcanzado aún la membrana vacuolar, generando endosomas de gran tamaño (Figura 10). En la mutante *ntl9-1* se alcanzan endosomas de tamaño similar al máximo observado en la línea silvestre pero más rápidamente, teniendo lugar a los 60 minutos en lugar de a los 90 minutos (Figura 10). También a los 90 minutos se observa un gran número de endosomas en la mutante *ntl9-1*, mayor que el que se llega a observar en la línea silvestre a los 90 minutos (Figura 10). Para el caso de ambas mutantes de *NTL9*, a los 120 minutos el trazador aún no ha alcanzado el tonoplasto (Figura 10). Si continuamos monitoreando la internalización del trazador (Figura 11) vemos que a los 150 minutos el trazador ha alcanzado el tonoplasto en ambas líneas mutantes. Esto nos indica que el tráfico hacia la vacuola se encuentra enlentecido en las mutantes de *NTL9*. Por otro lado, las alteraciones observadas en endosomas pueden deberse a que la endocitosis de la membrana plasmática se encuentra acelerada o bien a que el tráfico hacia la vacuola se encuentra afectado en un paso de la ruta endocítica posterior a la llegada del trazador a los endosomas. Dado que los endosomas, en cuanto a su número y tamaño, se observan de manera similar en las mutantes y en la línea silvestre en el tiempo inicial (5 minutos), esto sugiere que el rol de *NTL9* sería importante en el tráfico desde endosomas hacia la vacuola más

**Figura 10. El tráfico endocítico está alterado en mutantes del FT *NTL9*. Se muestra el curso temporal de la endocitosis del trazador FM4-64 en las líneas mutantes homocigotas del FT *NTL9*, *ntl9-1* y *ntl9-2*, y en la**



planta silvestre en células de la epidermis de la zona de transición de la punta de la raíz. Las mutantes presentan endosomas más grandes o en mayor número a 60 minutos. Por otro lado, el tráfico desde endosomas hacia la vacuola se encuentra enlentecido ya que, dentro de los primeros 120 minutos de seguimiento, el trazador sólo ha alcanzado la vacuola en el ecotipo silvestre. La barra de tamaño representa 10  $\mu\text{m}$  siendo la misma para todas las imágenes. Imágenes de microscopía confocal. Tres réplicas independientes con 3 plantas cada una.

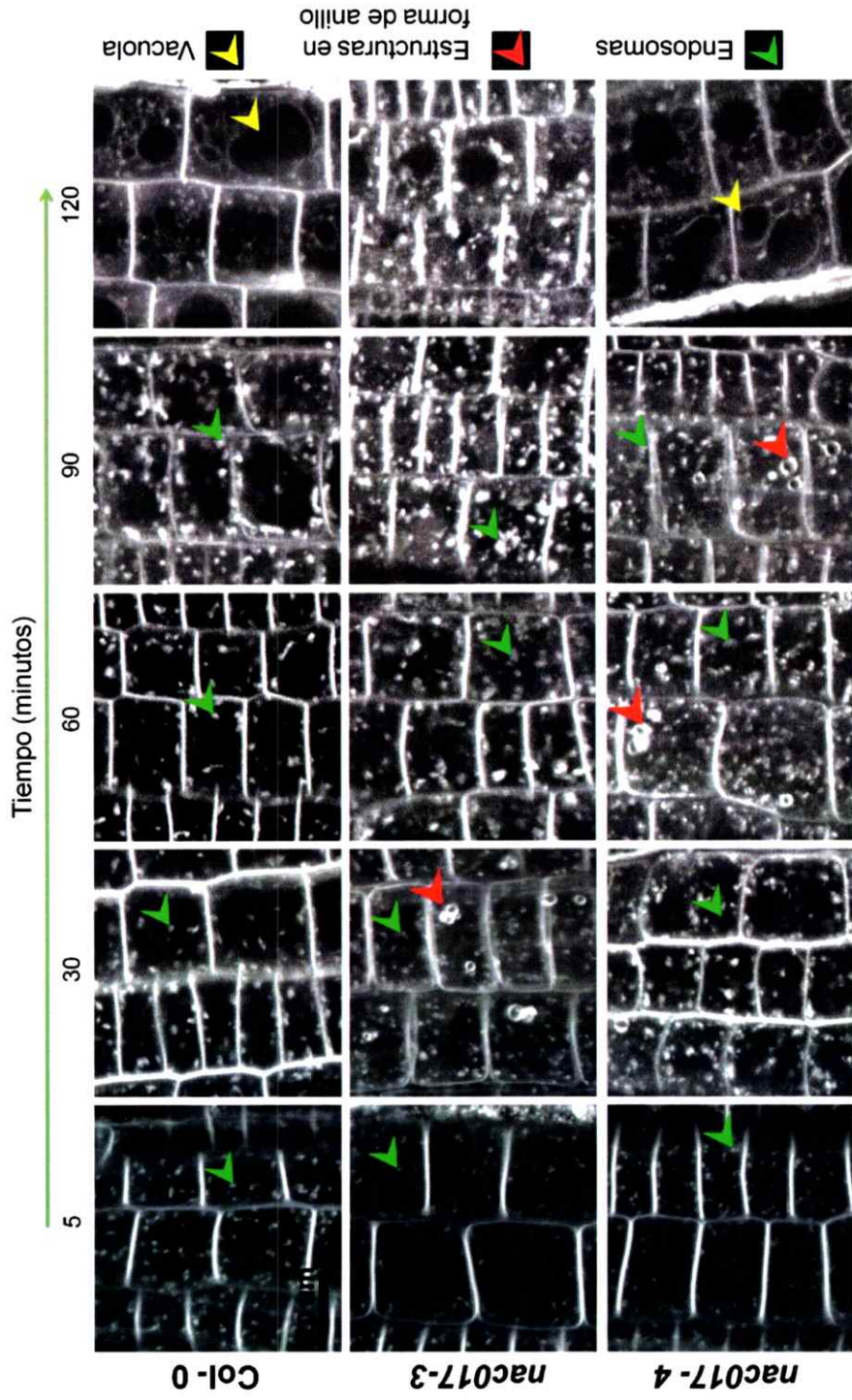
que en la endocitosis de la membrana plasmática. Sin embargo, otros experimentos son requeridos para confirmar cuál es específicamente el rol de este FT en el tráfico endocítico.



**Figura 11. El tiempo de llegada del trazador FM4-64 al tonoplasto se encuentra enlentecido en mutantes del FT *NTL9*.** La internalización del trazador FM4-64 al tonoplasto es visualizada a los 120 minutos en la línea silvestre y a los 150 minutos en las líneas mutantes del FT *NTL9* (*ntl9-1* y *ntl9-2*). Flechas amarillas: Vacuolas. La barra de tamaño es de 5 μm para todas las imágenes.

El análisis de la internalización del trazador de membrana FM4-64 también mostró resultados interesantes para el caso de las mutantes del FT *NAC017*. La mutante *nac017-3* presenta disminuida la endocitosis de la membrana plasmática, como puede apreciarse por la menor marca del trazador en los endosomas que se observa al tiempo inicial (5 minutos) en comparación con la línea silvestre en la Figura 12. A los 60 minutos, se observan endosomas de mayor tamaño y en mayor densidad que en la planta silvestre y, además, el tráfico hacia la vacuola se encuentra enlentecido (Figura 12). Por otro lado, a distintos tiempos de la internalización de FM4-

**Figura 12. El tráfico endocítico hacia la vacuola se encuentra alterado en mutantes del FT *NAC017*. Se muestra el curso temporal de la endocitosis del trazador FM4-64 en las líneas mutantes homocigotas.**



gotas del FT *NAC017* (*nac017-3* y *nac017-4*) y en la planta silvestre en células de la epidermis de la zona de transición de la punta de la raíz. La mutante *nac017-3* presenta disminución de la endocitosis y del tráfico hacia la vacuola y posee cuerpos anulares que podrían corresponder a PVCs de morfología alterada. Estos cuerpos también se encuentran en la mutante *nac017-4*, sugiriendo que el tráfico endocítico a través de PVC se encuentra alterado en mutantes de *NAC017*. La barra de tamaño representa 10  $\mu\text{m}$  y es la misma para todas las imágenes de la figura. Imágenes de microscopía confocal. Tres réplicas independientes con 3 plantas cada una.

64, en esta mutante se identificaron unos cuerpos con forma de anillo, los cuales son similares a los descritos en la literatura que se vinculan a la fusión homotípica de PVCs (Gu and Innes, 2012; Saito et al., 2002; Takáč et al., 2012). Este antecedente sugiere que un paso de la ruta endocítica que involucra el PVC se encuentra alterado en la mutante. Lo anterior podría estar ocurriendo en ambas mutantes de *NAC017*, ya que en la mutante *nac017-4* también se observan cuerpos con la morfología descrita, siendo posible que correspondan al mismo compartimento (Figura 12). La acumulación de endosomas en la mutante *nac017-4* se hace evidente más tempranamente incluso que para la mutante alélica *nac017-3*, observándose ya a 30 minutos un número de endosomas mayor que en la planta silvestre a 30 minutos. La endocitosis de la membrana plasmática en la mutante *nac017-4* es muy similar a la de la planta silvestre a los 5 minutos (Figura 12). La llegada del trazador FM4-64 a la vacuola se observa a los 120 minutos, de manera similar a lo que ocurre en la planta silvestre (Figura 12). Estos resultados indican que la mutante *nac017-3* posee una alteración de la función de *NAC017* ya que la línea mutante posee un fenotipo significativo. Según sugieren los resultados, el proceso alterado en esta mutante es el tráfico endocítico que involucra el PVC. Consistentemente, los cuerpos alterados observados son similares a los que se encuentran en la mutante alélica *nac017-4*. Además, el FT también estaría involucrado en la endocitosis de la membrana plasmática, ya que este proceso se encuentra enlentecido en la mutante *nac017-3* (Figura 12), sugiriendo que el FT podría estar activando un represor de este proceso.

En definitiva, ambos FT, *NTL9* y *NAC017*, se encuentran involucrados en el funcionamiento del tráfico hacia la vacuola. El FT *NTL9* participa del tráfico hacia la vacuola, en tanto que *NAC017* participa de la endocitosis de la membrana plasmática,



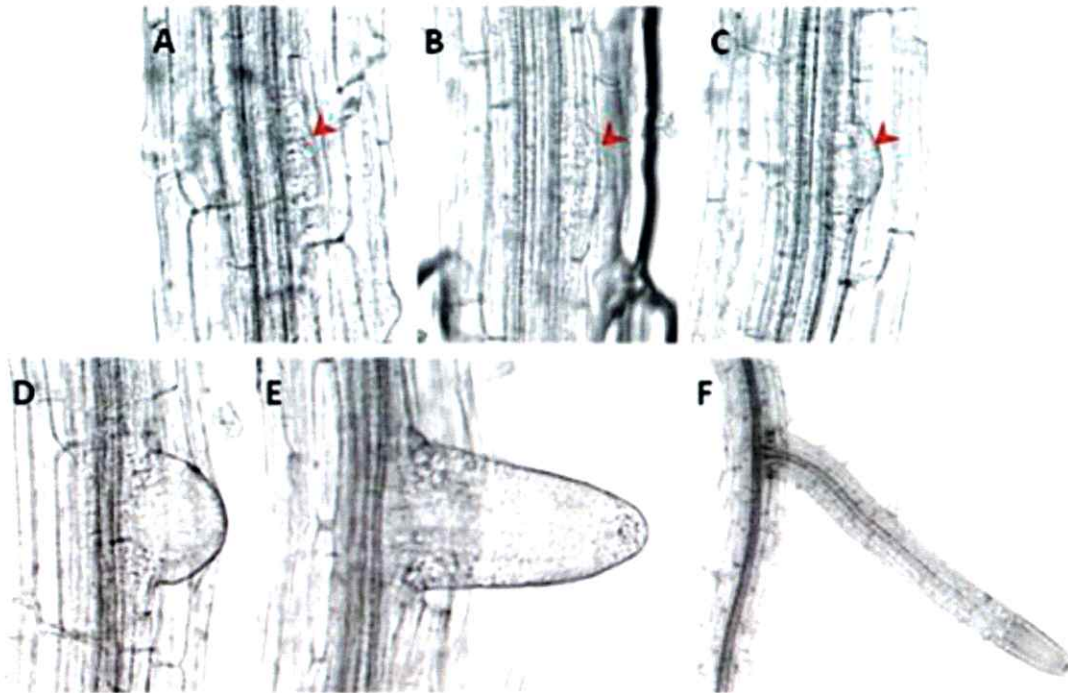
el tráfico hacia la vacuola y, posiblemente, del tráfico a través del PVC. Para el caso de ambos FTs, las mutantes analizadas muestran fenotipos que sugieren una interrupción del tráfico hacia la vacuola, evidenciando un rol para estas proteínas en la regulación del tráfico neto hacia la vacuola y, por ende, del balance entre los flujos de vesículas entre compartimentos del SE.

### **Objetivo 3: Estudiar el rol de los factores de transcripción AtNLT9 y AtNAC017 en la inducción de raíces laterales por Sortin2 en *Arabidopsis thaliana***

Dado que tanto las mutantes de *NLT9* como las mutantes de *NAC017* presentaron anomalías en el tráfico hacia la vacuola del trazador de membrana FM4-64, se prosiguió con el estudio del rol de ambos FT en el desarrollo de raíces laterales. Como se describió previamente, el compuesto Sortin2 induce la formación de raíces laterales al acelerar el tráfico endocítico hacia la vacuola (Pérez-Henríquez et al., 2012). Esta acción de Sortin2 sobre el desarrollo de *Arabidopsis* depende, en particular, del tráfico desde el PVC hacia la vacuola que es sensible al compuesto Wortmanina. La acción de Sortin2 es reversible y dosis dependiente, de modo que el mayor efecto inductor del compuesto se obtiene a una concentración de 25 µg/mL y a mayores concentraciones el efecto inductor es menor (Pérez-Henríquez et al., 2012). Además, el compuesto Sortin2 ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la raíz principal que es también dosis dependiente (Pérez-Henríquez et al., 2012). Para estudiar el efecto del compuesto Sortin2, plantas mutantes y silvestres fueron tratadas con el compuesto a la concentración de mayor efecto inductor en el ecotipo silvestre (25 µg/mL) y a una concentración de 12,5 µg/mL, que es considerada una dosis baja. Se registró el largo de raíz principal y se cuantificaron los eventos de formación de una raíz lateral a lo largo de la raíz principal en cada planta. Con estos dos datos se calculó el Índice de Raíces Laterales (IRL), que corresponde al número de raíces laterales relativo al largo de la raíz principal. El compuesto Sortin2 provoca un aumento de este índice, es decir, un aumento de la densidad de raíces laterales en la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Además, se estudió el efecto del compuesto en el desarrollo de raíces laterales en las mutantes, identificando el estado de desarrollo de estos

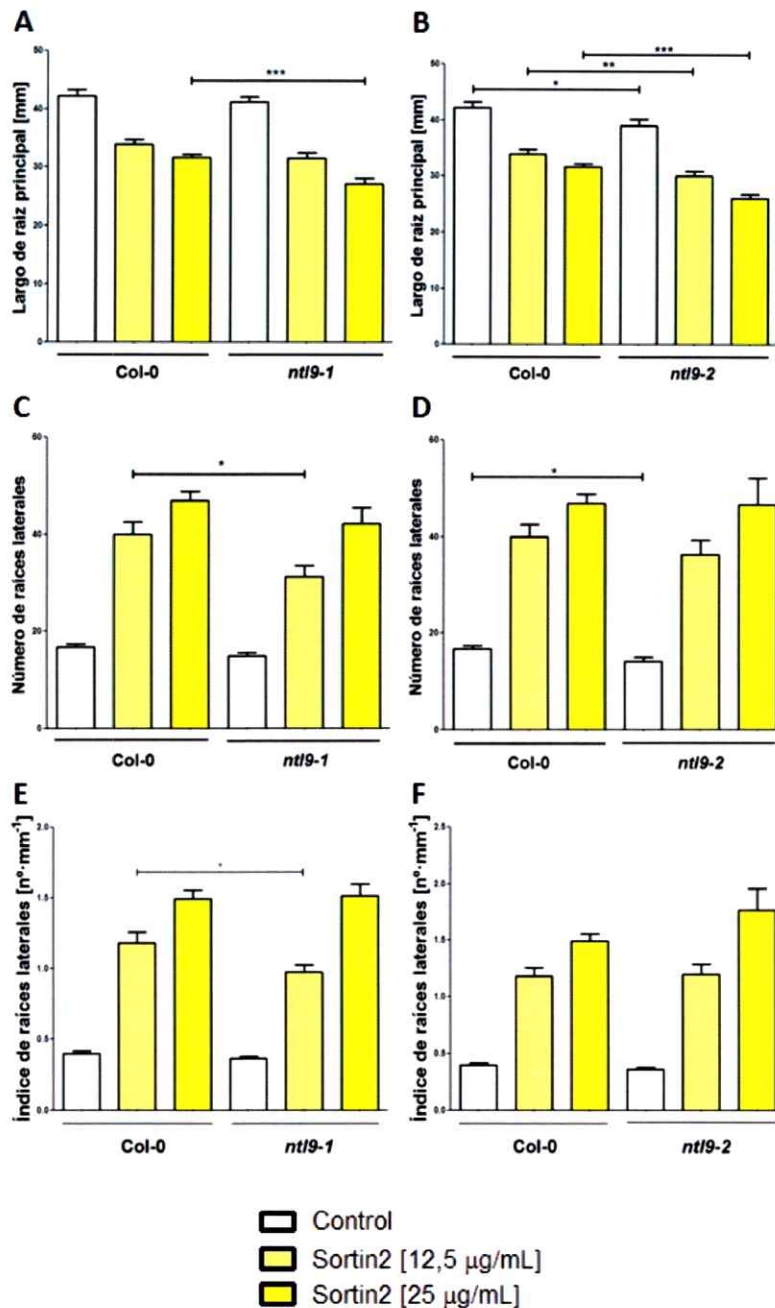
órganos. El desarrollo de una raíz lateral se divide principalmente en dos etapas: aquella que corresponde a un desarrollo temprano (estadio no emergido o primordio) y aquella que corresponde a un desarrollo más avanzado o tardío (raíz lateral emergida) del desarrollo de una raíz lateral. Una raíz lateral se origina en la capa celular del periciclo, la cual rodea el haz vascular (Figura 9). Las células del periciclo, que tienen la identidad de células fundadoras, pueden dar inicio a una serie de divisiones celulares, primero en sentido anticlinal y luego en sentido periclinal, dando lugar a una estructura en forma de domo que crece hasta emerger de la capa celular más externa de la raíz principal (Péret et al., 2009). A partir de este momento, la estructura pasa de ser considerada un primordio de raíz lateral a ser considerada una raíz lateral emergida (Casimiro et al., 2001; Péret et al., 2009), como puede observarse en la Figura 13 (Berkowitz et al., 2008). Distinguir entre primordios y raíces laterales emergidas nos ayudará a caracterizar el rol en el desarrollo de raíces laterales de las alteraciones del tráfico endocítico observadas en las mutantes, ya que el compuesto Sortin2 tiene un rol en la iniciación de raíces laterales y en su emergencia, así como también en la reactivación de primordios cuyo desarrollo se encuentra arrestado en estadios tempranos (Datos no publicados del laboratorio).

Cuando analizamos el largo de raíz en mutantes de *NTL9*, observamos que la mutante *ntl9-1* posee un largo de raíz similar al de la planta silvestre en la condición control y a una baja concentración de Sortin2, pero que a una mayor concentración del compuesto sufre una mayor inhibición del crecimiento de la raíz principal que la planta silvestre (Figura 14 A). Cuando analizamos el número de raíces laterales totales en esta mutante vemos que en la condición control este número es similar al de la planta silvestre, pero que el número de raíces laterales inducidas por Sortin2 a la



**Figura 13. Desarrollo de una raíz lateral en *Arabidopsis thaliana*.** La raíz lateral es un órgano postembrionario que se genera en la capa celular del periciclo. Por medio de divisiones celulares consecutivas se forma una estructura con forma de domo (flechas rojas, A, B y C). Mientras el domo se forma, la raíz lateral es denominada "primordio". Cuando la punta alcanza la capa celular más externa de la raíz principal, el primordio pasa a ser una "raíz lateral emergida" (D). Esta estructura sigue elongando (E y F) y se desarrolla de manera similar a la raíz principal. Es más, a partir de células del periciclo de las raíces laterales pueden formarse otras raíces laterales llamadas raíces terciarias, las que recapitulan el desarrollo de la raíz lateral. Modificado de Berkowitz et al., 2008.

concentración baja del compuesto es menor que en la planta silvestre. De este modo, la mutante posee una menor sensibilidad al compuesto (Figura 14 C). Al obtener el IRL, vemos también que en el tratamiento con una baja concentración del compuesto hay una menor inducción del IRL en la mutante *ntl9-1* que en la línea silvestre (Figura 14 E). Esto confirma que la mutante *ntl9-1* posee una reducción de la sensibilidad a Sortin2, ya que la diferencia observada se traduce en un menor aumento de la densidad de raíces laterales en la mutante con respecto a la línea silvestre Col-0. No obstante, tanto el número de raíces laterales como el IRL es similar para la línea silvestre y mutante *ntl9-1* a una concentración de Sortin2 mayor. Por otro lado, la mutante *ntl9-2* posee un menor largo de raíz tanto en la condición control como en ambos tratamientos con Sortin2 (Figura 14 B). Al analizar el número de raíces laterales, vemos que la mutante de por sí tiene un menor número de raíces laterales, pero que ambos tratamientos con Sortin2 aumentan las raíces laterales totales a los niveles alcanzados en la planta silvestre (Figura 14 D). Esto sugiere que la mutante *ntl9-2* posee una sensibilidad al aumento de la densidad de raíces laterales inducido por Sortin2 similar a la de la planta silvestre, lo cual se confirma al ver que el IRL es similar al de la planta silvestre en las 3 condiciones evaluadas (Figura 14 F). Estos resultados sugieren que existe una relación entre la alteración de la función del FT NTL9 en el tráfico endocítico y el crecimiento de la raíz principal de *Arabidopsis thaliana*. Dado que la inducción de raíces laterales en respuesta a Sortin2 es distinta en ambas mutantes alélicas, los resultados también llevan a considerar que los efectos observados en respuesta a Sortin2 podrían deberse a otro tipo de alteración distinta de la pérdida de función del FT. Esto será revisado



**Figura 14.** La mutante *nt19-1* presenta una menor sensibilidad al aumento de la densidad de raíces laterales inducido por el compuesto Sortin2. Se muestra el largo de raíz (A y B) el número de raíces laterales totales (C y D) y el Índice de raíces laterales (E y F) para las mutantes del FT NTL9 *nt19-1* (gráficos de la izquierda) y *nt19-2* (gráficos de la derecha). Ambas mutantes alélicas presentan una mayor inhibición que la

planta control en el crecimiento de la raíz principal. La mutante alélica *ntl9-1* es resistente al aumento del número de raíces laterales y al aumento de la densidad de raíces laterales en la raíz principal inducidos por Sortin2. La mutante *ntl9-2* posee un menor número de raíces laterales en la condición control, pero en tratamientos con Sortin2 alcanza un número de raíces laterales similar a la planta silvestre. La densidad de raíces laterales de la mutante *ntl9-2* es similar al de la planta silvestre, tanto en la condición control como en tratamientos con Sortin2. Se utilizó prueba de t de Student de dos colas. \* =  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ . Efecto de cada tratamiento con Sortin2 con respecto a su control en DMSO es estadísticamente significativo pero los asteriscos han sido omitidos de los gráficos.

---

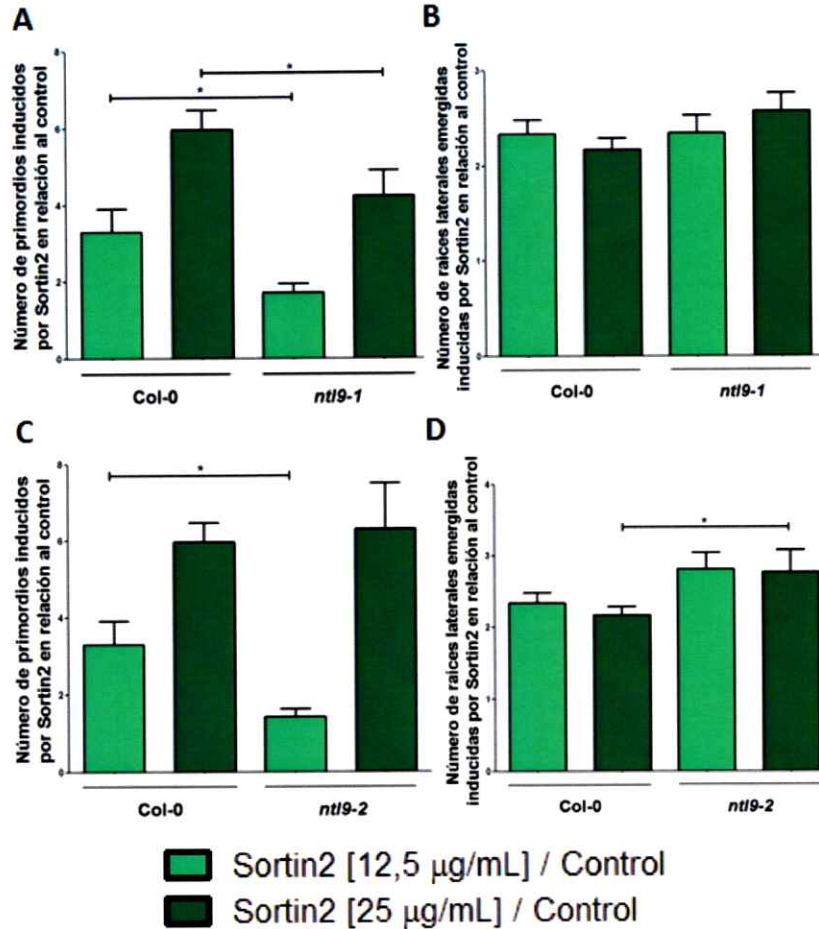
Continuación de la leyenda de la Figura 14.

durante la discusión de este trabajo.

Como se ha visto previamente en el laboratorio, Sortin2 actúa tanto induciendo nuevos eventos de formación de raíces laterales como promoviendo la emergencia de los primordios desde la raíz principal (Pérez-Henríquez, datos no publicados). De modo que, a continuación, analizamos el estadio del desarrollo en que se encontraban las raíces laterales en las mutantes de *NTL9* y la línea silvestre, tanto en la condición control como en ambos tratamientos con Sortin2. Graficamos el aumento de primordios o de raíces laterales emergidas inducido por Sortin2, expresado como una razón de aumento con respecto a la condición control (DMSO). En primer lugar, notamos que, en la línea silvestre, la concentración mayor del compuesto Sortin2, que es la que produce una mayor respuesta en el aumento de la densidad de raíces laterales, induce un aumento de primordios mayor que la concentración baja de Sortin2 (Figuras 15 A y

C). Sin embargo, la razón de aumento de raíces laterales emergidas inducida por Sortin2 es similar a ambas concentraciones del compuesto (Figuras 15 B y D). Esto sugiere que el mayor efecto obtenido en el aumento del Índice de raíces laterales a la concentración más alta (25 µg/mL) se debe principalmente al aumento producido en el número de primordios, es decir, de eventos de formación *de novo* de una raíz lateral. Cuando analizamos las mutantes del FT NTL9, observamos que en la mutante *ntl9-1* se produce un menor aumento del número de primordios en comparación con el control, tanto a una concentración baja como una concentración mayor de Sortin2 (Figura 15 A). En la línea mutante *ntl9-1*, por otro lado, la razón de aumento de raíces laterales emergidas inducida por Sortin2 es similar a la de la planta silvestre. En conclusión, la mutante *ntl9-1* presenta una menor sensibilidad a Sortin2 debido a que el compuesto no logra ejercer un efecto sobre el aumento de primordios de la misma manera que en la línea silvestre. En la mutante *ntl9-2*, a pesar de que la densidad de raíces laterales es similar a la de la planta silvestre, al analizar el efecto de Sortin2 sobre las raíces laterales según su estadio de desarrollo se observan diferencias significativas en comparación al ecotipo silvestre en los distintos tratamientos. A una baja concentración de Sortin2 se observa que, al igual que en la mutante *ntl9-2*, existe un menor incremento de los primordios en relación al control en respuesta al tratamiento (Figura 15 C). No obstante, la mutante presenta un mayor aumento que la planta silvestre en el número de raíces laterales emergidas a la concentración alta de Sortin2 (Figura 15 D). Esto sugiere que la disminución en el número de primordios inducidos por Sortin2 en la mutante *ntl9-2* podría deberse a un aumento de la emergencia de los mismos en lugar de la disminución de la iniciación de eventos de formación de una raíz lateral. En conjunto, los resultados observados en ambas mutantes indican que la alteración del tráfico endocítico debido a la pérdida de la

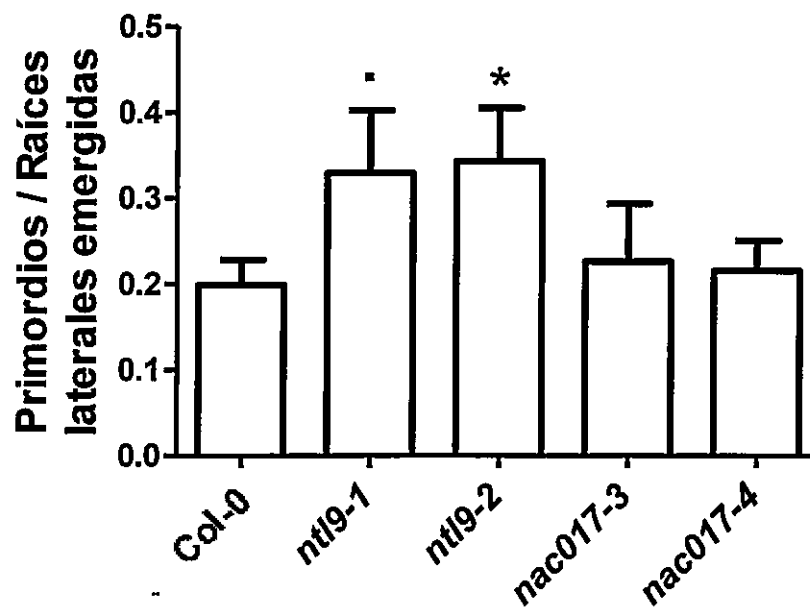




**Figura 15. La inducción de primordios de raíz lateral y de raíces laterales emergidas por Sortin2 se encuentra alterada en mutantes del FT NTL9.** Se grafica la razón de cambio con respecto al tratamiento en DMSO producida por dos concentraciones de Sortin2, 12,5 µg/mL (verde claro) y 25 µg/mL (verde oscuro), en el número de primordios (A y C) o en el número de raíces laterales emergidas (B y D) para las mutantes alélicas del FT NTL9 *ntl9-1* (A y B) y *ntl9-2* (C y D). En ambas mutantes alélicas el aumento en los primordios inducido por Sortin2 es menor con respecto a la línea silvestre. Por otro lado, la mutante *ntl9-2* presenta además un mayor aumento de las raíces laterales emergidas. Se realizó una prueba de t de Student de dos colas. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . En los gráficos A y C existen diferencias significativas entre ambos tratamientos dentro de cada línea (significancia no mostrada en el gráfico).



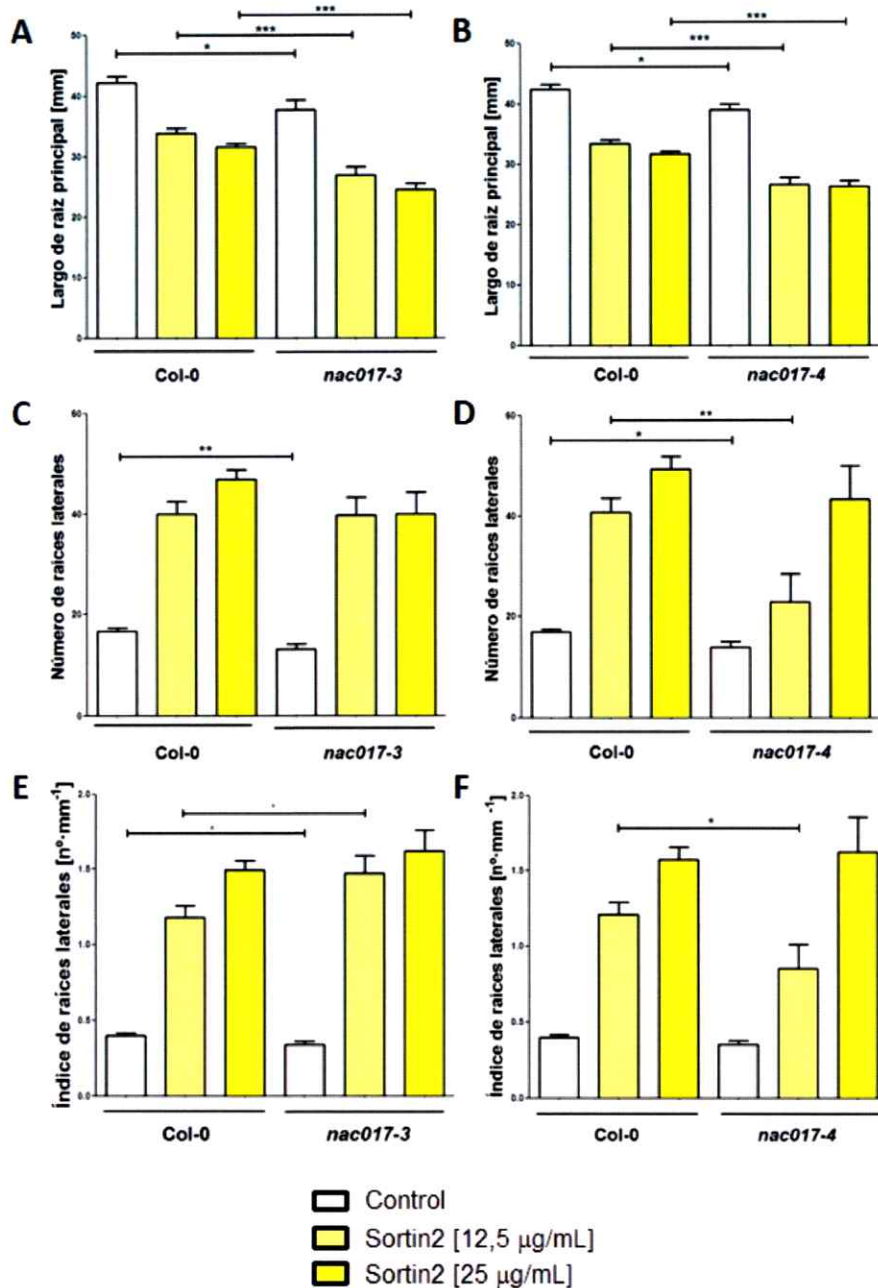
función del FT NTL9 está vinculada a una respuesta diferencial al efecto de Sortin2 sobre la arquitectura radicular con respecto al ecotipo silvestre, siendo mayor el efecto sobre la emergencia en mutantes de pérdida de función del FT. No obstante, para comprender el efecto de Sortin2 sobre la emergencia debemos evaluar la emergencia en la condición control en mutantes de NTL9. Para ello, analizamos el cociente entre el número de primordios y el número de raíces laterales emergidas en la condición control, para la línea silvestre y las líneas mutantes de los FTs NAC. Este cociente dará cuenta en general del estadio en que se encuentran los eventos de raíz lateral en las distintas líneas analizadas y será de menor valor mientras una mayor proporción de estos eventos de raíz lateral correspondan a raíces laterales emergidas. De esta manera, observamos que este cociente es significativamente más alto para la mutante *ntl9-2* en comparación a la línea silvestre y que la línea mutante *ntl9-1* sigue la misma tendencia (Figura 16). Este resultado nos indica que NTL9 es requerido para la emergencia de raíces laterales en *Arabidopsis* dado que su pérdida de función conduce a que una menor proporción de los eventos de raíz lateral hayan alcanzado el estadio correspondiente a una raíz lateral emergida en comparación con la línea silvestre. Interesantemente, al analizar este cociente en las líneas mutantes de NAC017 vemos que es similar en ambas al cociente de la línea silvestre (Figura 16), mostrando que la emergencia no se encuentra alterada significativamente en las dos mutantes de NAC017 a pesar de que, como se verá más adelante, ambas presentan una alteración en el largo de la raíz. Esto también refuerza que el efecto observado es específico para la pérdida de función de NTL9.



**Figura 16.** El factor de transcripción NTL9 es requerido en la emergencia de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Se evaluó el estadio de las raíces laterales en la condición control (1% DMSO). Al graficar el cociente entre el número de primordios y raíces laterales emergidas en las distintas líneas luego del tratamiento control, observamos que las líneas mutantes de *NTL9* presentan una menor emergencia que la línea silvestre. La emergencia en las mutantes de *NAC017* es similar al ecotipo silvestre. Las líneas mutantes de *NTL9* poseen una densidad de raíces laterales similar a la de la planta silvestre. Se indica la significancia de las diferencias con respecto al ecotipo silvestre de acuerdo a prueba de T de Student de dos colas. \* =  $p < 0,05$ ; · =  $p < 0,1$ .

Al evaluar el largo de raíz, vemos que ambas mutantes de *NAC017*, *nac017-3* y *nac017-4*, poseen un menor largo de raíz principal tanto en la condición control como en ambos tratamientos con el compuesto Sortin2 (Figura 17 A y B). También se observa que ambas líneas poseen un menor número de raíces laterales en condiciones de crecimiento control (Figura 17 C y D). En el tratamiento con una baja concentración de Sortin2, sin embargo, sólo *nac017-4* posee una sensibilidad reducida al compuesto al evaluar el número total de raíces laterales (Figura 17 D). Interesantemente, ambas mutantes poseen una tendencia contraria en el tratamiento con una baja dosis de Sortin2 al evaluar la densidad de raíces laterales a lo largo de la raíz principal. Vemos que la mutante *nac017-3* presenta una mayor sensibilidad que el ecotipo silvestre a una baja concentración de Sortin2 en tanto que *nac017-4* mantiene una sensibilidad reducida al compuesto (Figura 17 E y F). La mutante *nac017-3*, además, posee una menor densidad de raíces laterales en la condición control (Figura 17 E).

Cuando evaluamos el efecto de Sortin2 en el aumento de primordios y de raíces laterales emergidas con respecto al control, vemos que las mutantes alélicas de *NAC017*, *nac017-3* y *nac017-4*, mantienen tendencias opuestas entre ellas (Figura 18). Por un lado, una baja dosis de Sortin2 induce en la mutante *nac017-3* un mayor número de primordios y también de emergencias laterales en comparación al efecto producido en la línea silvestre (Figura 18 A y C). En la mutante *nac017-4*, en cambio, Sortin 2 aumenta en menor medida que en las plantas Col-0 las raíces laterales emergidas (Figura 18 D). Dado que la mutante *nac017-4* presenta una pérdida de función a nivel de transcrito y que *nac017-3* muestra una tendencia a una expresión relativa de *NAC017* mayor que la línea silvestre (Figura 8), estos resultados sugieren que la mutante *nac017-3* podría corresponder a una ganancia de la función de



**Figura 17. La inducción de raíces laterales en respuesta a Sortin2 se encuentra alterada en mutantes de *NAC017*.** Se muestra el largo de raíz (A y B), el número de raíces laterales totales (C y D) y el Índice de raíces laterales (E y F) para las mutantes del FT *NAC017* *nac017-3* y *nac017-4*. Ambas mutantes alélicas presentan una mayor inhibición que la planta control en el crecimiento de la raíz principal (A y B). Las mutantes también poseen una raíz principal más corta (A y B) y con un menor número de raíces laterales (C y D). Al evaluar la densidad de raíces laterales, la mutante *nac017-3* es más sensible al compuesto y *nac017-4* es menos sensible (E y F) en relación a la planta silvestre. Se utilizó la prueba de t

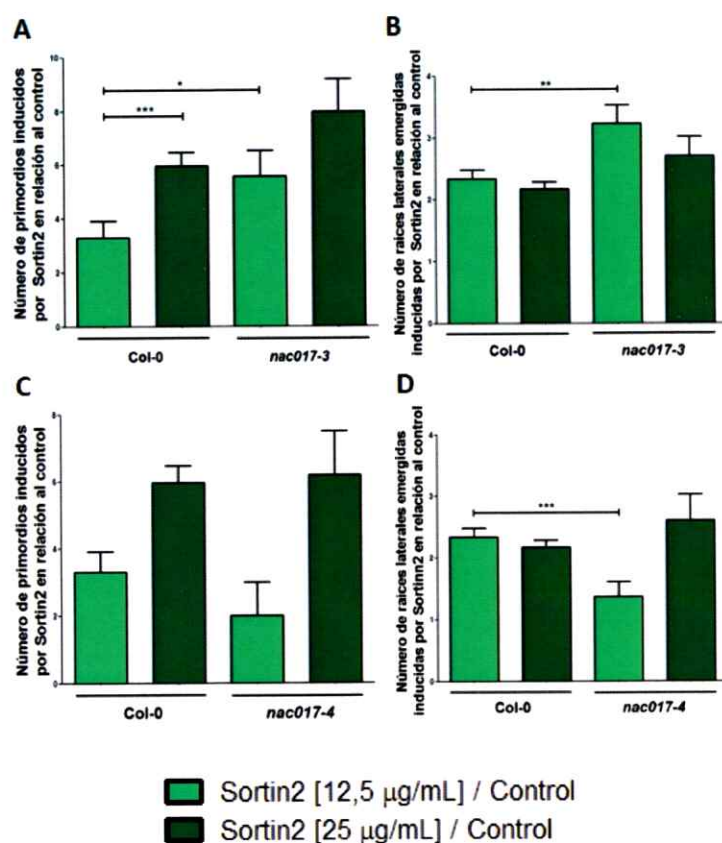
de Student de dos colas. \* =  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\* $p < 0,001$ . El efecto de cada tratamiento con respecto al control es estadísticamente significativo, no obstante, no se muestra en el gráfico.

---

Continuación de la leyenda de la Figura 17.

NAC017. Estos resultados son consistentes con una relación entre la alteración de la función entre el FT NAC017 y el desarrollo de raíces laterales, tanto en condiciones control como en tratamientos en el mecanismo inducido por Sortin2.

Finalmente, vemos que el análisis del desarrollo de raíces laterales en líneas mutantes de los FTs NTL9 y NAC017, tanto en condiciones control como en tratamientos con un compuesto que altera el tráfico endocítico y, como consecuencia, el desarrollo de las raíces laterales, revela importantes diferencias con respecto a la línea silvestre en la arquitectura radicular de las líneas mutantes. Esto confirma que la alteración de la función de ambos FTs, los cuales poseen un rol en el tráfico endocítico hacia la vacuola, tiene un impacto en el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*. Dado que la alteración de la función de ambos FTs resulta en una respuesta diferencial con respecto a la línea silvestre al compuesto Sortin2 que actúa a través de la modulación del tráfico endocítico, estos resultados sugieren que el rol en el tráfico endocítico de ambos FTs es capaz de impactar en el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.



**Figura 18. El desarrollo de raíces laterales inducido por Sortin2 se encuentra alterado en mutantes de *NAC017*.** Se grafica la razón de cambio con respecto al tratamiento en DMSO producida por dos concentraciones de Sortin2, 12,5 µg/mL (verde claro) y 25 µg/mL (verde oscuro), en el número de primordios (A y C) o en el número de raíces laterales emergidas (B y D) para las mutantes alélicas del FT *NAC017* *nac017-3* (A y B) y *nac017-4* (C y D). Mientras la línea *nac017-3* presenta una sensibilidad aumentada con respecto al control Col-0, tanto en el aumento de primordios (A) como en el aumento de raíces laterales emergidas inducido por Sortin2 (C), la línea *nac017-4* presenta una sensibilidad reducida a Sortin2 al evaluar el aumento de raíces laterales emergidas (D). Se realizó una prueba de t de Student de dos colas. \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . En los gráficos A y C existen diferencias significativas entre ambos tratamientos dentro de cada línea (significancia no mostrada en el gráfico).

## DISCUSION Y PROYECCIONES

Para estudiar el rol de los FT NTL9 y NAC017 en el tráfico endocítico, se optó como estrategia por la utilización de mutantes insercionales disponibles en el banco de semillas *ABRC Seed Stock Center*. A pesar de que varias de estas líneas fueron señaladas como ya disponibles como homocigotas para las mutaciones insercionales, la genotipificación de las líneas reveló que algunas de ellas eran portadoras del alelo silvestre. De ahí la importancia de realizar la genotipificación, la cual aseguró la corroboración de la viabilidad de las plantas mutantes homocigotas para ambos FT. En el caso de *NAC017*, se ha confirmado recientemente que otras mutantes de pérdida de función de *NAC017* son viables (Ng et al., 2013) y la mutante de *NTL9*, *ntl9-1*, utilizada en este trabajo, había sido reportada anteriormente como viable (Kim et al., 2012).

El hecho de que varias mutantes alélicas homocigotas para estos FT sean viables lleva a pensar en la importancia biológica que puede tener que NTL9 y NAC017 participen como reguladores del tráfico en general. Los FTs de la familia NAC sólo se encuentran presentes en plantas, por lo que es esperable que sus funciones estén vinculadas a respuestas específicas de este taxón. Por ejemplo, participan de etapas específicas del desarrollo vegetal (Aida et al., 1997; Jensen et al., 2010; Kim et al., 2013; Mitsuda et al., 2005), de la acción de hormonas vegetales (Bu et al., 2008; He et al., 2005; Jensen et al., 2010; Xie et al., 2000) y de la respuesta a estreses en organismos vegetales (Hao et al., 2011; Kim et al., 2012; Seo et al., 2010; Yoon et al., 2008; Zheng et al., 2009). Éste último es el caso de NTL9, involucrado en el estrés



osmótico (Yoon et al., 2008), senescencia (Yoon et al., 2008) y la respuesta a patógenos (Kim et al., 2012). *NAC017*, por su parte, es un regulador positivo directo de la oxidasa alternativa (AOX1) durante la señalización retrógrada mitocondrial (Ng et al., 2013). En este proceso, la actividad de AOX1 es necesaria para redirigir el metabolismo en respuesta a una disminución en la eficiencia de la cadena respiratoria (Garmier et al., 2008). Por otro lado, *NAC017* también regula directamente FTs de la familia NAC de respuesta a citoquininas que regulan negativamente la senescencia (Ng et al., 2013), por lo que *NAC017* también podría estar mediando una respuesta protectora específica de la planta durante el estrés mitocondrial. De este modo, *NTL9* y *NAC017* podrían estar regulando el tráfico en conjunto con otros procesos como parte de una respuesta a estrés específica de plantas. Además, existiría una redundancia funcional dentro de la regulación de las vías de tráfico controladas por estos FTs. Esto se observa, además, en la Red Transcripcional, donde ambos FTs comparten la mayoría de sus blancos transcripcionales (Lorena Pizarro, datos no publicados).

Se ha predicho a través del Índice de Enriquecimiento en la Red Transcripcional del Tráfico que *NTL9* y *NAC017* podrían regular genes de tráfico de manera preponderante con respecto a otros genes de *Arabidopsis*. Sin embargo, cabe analizar hasta qué punto llega el valor predictivo de esta herramienta. Por ejemplo, es necesario considerar que en la construcción de la Red Transcripcional del Tráfico se utilizó una predicción de cuáles eran las cajas de unión para ambos FT de la familia NAC. La información experimental de cuáles eran los sitios de unión de *NTL9* y de *NAC017* fue reportada en 2012 (Kim et al., 2012) y 2013 (Ng et al., 2013), respectivamente, posterior a la construcción de la Red Transcripcional del Tráfico. Cuando realizamos una búsqueda preliminar en el genoma de *Arabidopsis* de una caja

consenso para NTL9, de secuencia 5'AATAATGCTT3', la cual fue construida manualmente en base al trabajo de Kim y colaboradores (Kim et al., 2012), encontramos esta caja en el promotor de *PR1* y de varios genes que codifican para peptidasas que podrían estar involucradas en la respuesta a patógenos. Interesantemente, también encontramos esta caja en el promotor de una RAB GTPasa y de algunos transportadores aniónicos. Sin embargo, no se hallaron cajas en los promotores de los genes identificados por la Red Transcripcional del Tráfico como blancos directos de NTL9 ni una preponderancia en particular de la presencia de genes de tráfico. Por otro lado, en el trabajo de Ng y colaboradores (Ng et al., 2013) se muestra que 28% de los genes cuya expresión se encuentra alterada en la mutante que expresa una forma del FT NAC017 constitutivamente activa, pertenecen a respuesta a estrés biótico y abiótico mientras que solo el 4,6% tienen la función de transporte dentro de la célula. Así vemos que, en el caso de NTL9 y de NAC017, la interpretación de lo que representa el Índice de Enriquecimiento no está siendo validada por los datos experimentales de otros grupos o por nuestros datos preliminares, los cuales, además, entregan información sobre grupos de genes regulados por ambos FTs que son distintos de aquellos presentes en la Red Transcripcional del Tráfico. Los datos experimentales de otros grupos publicados recientemente y nuestros datos sugieren que el rol preponderante de ambos FTs es efectivamente la respuesta a estrés (biótico, en el caso de NTL9, y oxidativo, en el caso de NAC017). No obstante, la Red Transcripcional del Tráfico permite vincular a ambos FTs al tráfico y al destinamiento vacuolar, lo cual ha sido corroborado en este trabajo. Dado que las mutantes presentan fenotipos esperados dentro de lo que es capaz de predecir la Red Transcripcional del Tráfico parece poco probable que la predicción del sitio de unión para ambos FTs sea errada. No obstante, podría ser un

sitio de unión distinto, alternativo al reportado experimentalmente, lo cual deberá ser evaluado revisando la metodología utilizada en la Red Transcripcional del Tráfico y sus datos crudos. La Red Transcripcional del Tráfico también predice un rol para NTL9 y NAC017 en el tráfico desde el retículo endoplasmático. En el caso de NAC017, sabemos que participa de la respuesta de estrés de retículo ya que *BZIP60* es regulado positivamente como parte de la respuesta a estrés promovida por el FT NAC (Ng et al., 2013). En conjunto, estos antecedentes sugieren que la Red Transcripcional del Tráfico sí permite predecir el rol en el tráfico para ambos FTs, pero es probable que los roles preponderantes de los FTs NTL9 y NAC017 correspondan a procesos más amplios en *Arabidopsis* que engloban o bien dependen del tráfico endocítico. Esto parece ser también el caso de otros FTs candidatos obtenidos utilizando la Red Transcripcional del Tráfico y la Red de Coexpresión del Tráfico como herramientas. Al respecto, cabe señalar como antecedente que, durante el trabajo de la tesis doctoral de Lorena Pizarro, se construyó también una tercera herramienta bioinformática que es la Red Regulatoria del Tráfico. Esta red posee como input las conexiones definidas en la Red Transcripcional del Tráfico y en la Red de Coexpresión del Tráfico. En la Red Regulatoria del Tráfico, un FT está conectado a un gen del SE cuando ambos coexpresan y además el promotor del gen del SE presenta cajas para el FT, es decir, cuando la conexión existe a la vez en la Red de Coexpresión del Tráfico y en la Red Transcripcional del Tráfico. Dado que *NTL9* y *NAC017* en general están conectados en la Red de Coexpresión del Tráfico con genes del SE distintos de los genes blancos que predice la Red Transcripcional del Tráfico, ambos FTs están conectados a muy pocos genes del SE en la Red Regulatoria del Tráfico, lo que hizo poco interesante en este trabajo observar la topología de los nodos de ambos FTs. No obstante, en ese análisis se seleccionaron candidatos reguladores del tráfico en base a diferentes criterios

incluidos en la construcción de dicha red, y ambos FT NAC se encuentran entre los 7 mejores candidatos. Estos 7 candidatos son: BZIP25, BZIP28, NAC017, NTL9, UNE12, MYC3 y AT1G03040. De ellos, ambos FTs bZIP y NAC017 están involucrados en el estrés de retículo. Los FTs UNE12 y AT1G03040 coexpresan consistentemente con NTL9, mientras que NTL9 y UNE12 se encuentran en la red de GO de "*regulación de respuesta de defensa*" (GO : 0031347) de acuerdo a la base de datos actualizada de microarreglos ATTED (versión 7.1, <http://atted.jp/>). Lo anterior sugiere que *NTL9* y *UNE12* estarían siendo corregulados compartiendo una función biológica. El FT MYC3/MZA15, por otro lado, activa la respuesta a jazmonato (Cheng et al., 2011), por lo que está involucrado en el estrés salino (Ismail et al., 2012; Wang et al., 2004), estrés mecánico y respuesta a herbívoros (McConn et al., 1997) y otros patógenos (Thomma et al., 1998). Estos antecedentes apuntan a fortalecer que mediante estas herramientas estamos seleccionando FT candidatos involucrados en distintas respuesta a estrés y que es en este contexto en que el tráfico estaría siendo modulado por reguladores maestros. Además, notamos que los datos de coexpresión son los que dan la mayor consistencia y valor predictivo a las herramientas bioinformáticas del laboratorio que han sido utilizadas para seleccionar candidatos que participen de la regulación del sistema de endomembranas. Esto es consistente con lo que se ha reportado previamente de que los módulos de coexpresión definen módulos funcionales conservados (Heyndrickx and Vandepoele, 2012) y sugieren que las redes de coexpresión, aunque pueden ser complementadas con datos transcripcionales, son suficientes para la predicción funcional de genes cuyo rol se desconoce.

Una vez mostrado el rol en el tráfico endocítico de ambos FTs, es de gran importancia evaluar las herramientas que llevaron a la predicción de este rol ya que la

principal proyección de este trabajo es la demostración de que dicho rol es ejercido mediante regulación transcripcional directa y el hallazgo de los blancos directos cuya regulación explique los fenotipos observados. Blancos candidatos pueden ser seleccionados mediante la búsqueda *in silico* de la caja de unión de cada FT, ya sea de la caja reportada por la literatura o de la caja predicha por la Red Transcripcional del Tráfico en el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Al optar por la segunda alternativa, no obstante, se debe tener en cuenta que la Red de Coexpresión del Tráfico señala una baja coexpresión, en general, entre los blancos putativos propuestos por la Red Transcripcional del Tráfico y ambos FTs, de modo que en este caso los datos de coexpresión validan escasamente los datos transcripcionales. Dado que, como se ha discutido, son los datos de coexpresión los que validan mayormente la predicción de roles funcionales, podría ser una buena estrategia dar prioridad al estudio de candidatos que coexpresen con cada FT, independiente de la caja que se utilice para seleccionar tales candidatos. En el caso de buscar la caja de la Red Transcripcional del Tráfico, estos candidatos serían los genes presentes en la Red Regulatoria del Tráfico: *ARA6*, *MYA2* y *AT1G26690* para el caso de *NAC017* y *AT1G26690* para el caso de *NTL9*. También podría construirse una nueva red regulatoria a partir de una red transcripcional basada en la caja reportada experimentalmente y de una red de coexpresión que utilice una base de datos más actualizada. Esto último podría ser de gran utilidad debido al gran crecimiento que han experimentado este tipo de bases de datos recientemente.

En este trabajo se mostró que los FTs de la familia *NAC* *NTL9* y *NAC017* participan del tráfico endocítico en *Arabidopsis thaliana*. Al estudiar el tráfico del trazador FM4-64 en mutantes de *NTL9* o de *NAC017*, se observaron 4 fenotipos

distintos: una menor internalización de componentes de la membrana plasmática en endosomas, endosomas de gran tamaño, endosomas alterados con forma de anillo y una disminución en la velocidad del tráfico entre la membrana plasmática y la vacuola. De tal manera, el trazador FM4-64 permitió identificar alteraciones a distintos niveles en el tráfico endocítico. Cuando evaluamos las dos mutantes de *NTL9*, observamos que ambas presentaban un retraso en el tráfico hacia la vacuola y la acumulación del trazador en endosomas de mayor tamaño y más rápidamente en comparación a la línea silvestre. Dado que estos fenotipos son apoyados en dos mutantes alélicas, la alteración de la función del FT sería responsable del fenotipo. En este caso, correspondería a una pérdida de función debido a que se comprobó en la genotipificación que la mutación insercional interrumpía la región que codifica el dominio de unión a DNA del FT, lo que impide la generación de un transcrito funcional en estas mutantes. Sin embargo, el fenotipo de agregación de endosomas parece más severo en la mutante *ntl9-1* que en la mutante *ntl9-2*. También se observa esta diferencia al realizar los tratamientos con Sortin2, donde *ntl9-1* presenta una sensibilidad reducida al compuesto, de modo que también el fenotipo en tratamientos con Sortin2 es más severo y esto podría asociarse al grado de alteración de la función del FT. Cuando analizamos el genoma de las mutantes para comprender esta diferencia, consideramos que el dominio NAC de unión a DNA posee 4 subdominios que se encuentran codificados en los 2 primeros exones de *NTL9* (Kim et al., 2012). De acuerdo al análisis de los tamaños de los fragmentos amplificados desde los alelos mutantes de *ntl9-2* y *ntl9-1*, en la mutante *ntl9-2* el inserto de T-DNA se ubica al inicio del marco de lectura de *NTL9*, mientras que en *ntl9-1* el inserto se ubica al final del exón 2. De acuerdo con ésto, *ntl9-1* podría generar un transcrito que presenta los 3 primeros subdominios del dominio NAC y *ntl9-2* sería incapaz de generar un dominio

NAC, aún parcialmente funcional. Esto se contrapone a lo observado inicialmente de que la mutante *ntl9-1* presenta un fenotipo más severo que la mutante *ntl9-2*. Por otro lado, sabemos que *ntl9-1* corresponde a una pérdida de función con respecto a su efecto transcripcional sobre genes de senescencia y que, consistentemente, este efecto es contrario al de una línea que sobreexpresa un transgén que codifica para una forma trunca, constitutivamente activa de NTL9 (Yoon et al., 2008). Además, hemos visto preliminarmente que *ntl9-1* sobreexpresa un transcrito de NTL9 de gran tamaño que incluye dentro de su secuencia el inserto de T-DNA. De este modo, proponemos que la diferencia entre los fenotipos observados en las mutantes se debe a que el alelo mutante de *ntl9-1* es dominante negativo con respecto al alelo *NTL9*. Dado que los FT NAC requieren unirse al DNA como heterodímeros u homodímeros para ejercer su rol transcripcional (Olsen et al., 2005), una explicación a la dominancia negativa de este alelo es que la mutante *ntl9-1*, además de presentar la pérdida de la función del FT NTL9, estaría generando una proteína que posee un dominio NAC incapaz de asociarse a la caja de unión de NTL9, pero que conservaría su capacidad de formar dímeros con algún otro FT de la familia NAC. De hecho, de acuerdo a la herramienta ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>), el inicio del primer exón de NTL9 codifica para una región similar a un dominio SANT (Prosite entry : PDOC51293), que permitiría la interacción proteína-proteína con FTs de la familia MYB. Finalmente, es muy improbable que en la mutante *ntl9-2* se esté generando un producto proteico anormal y, además, sabemos que los efectos de la mutación insercional en mutantes SALK se deben únicamente a la alteración de la función de los genes cercanos a las regiones que interrumpen (Eike, 2004; Ouakfaoui and Miki, 2005; Wang, 2008). Es por ello que concluimos que los fenotipos observados en ambas mutantes alélicas se

deben a la pérdida de la función del FT *NTL9* y que este FT efectivamente participa del tráfico endocítico hacia la vacuola.

Para entender mejor cómo el tráfico hacia la vacuola se encontraba alterado en las distintas mutantes, se utilizaron tratamientos con Sortin2, que es un compuesto que acelera de manera general el tráfico endocítico hacia la vacuola. En este contexto, la evaluación del desarrollo de raíces laterales permitía medir el efecto del compuesto en una etapa específica de la ruta endocítica, además de cumplir con el objetivo de buscar la importancia de ambos FTs de la familia NAC en un proceso fisiológico que depende en general de la ruta endocítica. Dada la naturaleza de los fenotipos encontrados al evaluar la internalización del trazador FM4-64, Sortin2 daría un indicio de qué tipo de endosomas están involucrados en las vías afectadas por la pérdida de función del FT. Como se observó en el estudio del tráfico endocítico, en los tratamientos con Sortin2 la mutante *ntl9-1* presenta un fenotipo más severo que la mutante *ntl9-2*. Es así que la reducida sensibilidad a una baja concentración de Sortin2 en la mutante *ntl9-1* podría ser parte del efecto de la expresión del alelo dominante negativo. Esto es similar a lo observado durante el análisis del tráfico endocítico por cuanto la mutante *ntl9-1* es similar a la mutante alélica *ntl9-2*, de modo que presenta fenotipos atribuibles a la pérdida de la función del FT *NTL9*, pero además presenta características que pueden deberse a la dominancia negativa del alelo *ntl9-1*. Tanto *ntl9-2* como *ntl9-1* presentan un menor número de primordios inducidos por Sortin2. No obstante, en la mutante *ntl9-2* notamos que esto se debe a que los primordios han emergido de la raíz principal. Dado que en tratamientos con Sortin2 no se observan primordios cuyo desarrollo se encuentra detenido (datos no publicados de nuestro grupo de laboratorio), las raíces



laterales emergidas aumentan significativamente en la mutante *ntl9-2* debido a que el desarrollo de las raíces laterales se encuentra acelerado con respecto al ecotipo silvestre. En la mutante *ntl9-1* también existe un aumento en el número de raíces laterales emergidas inducidas por Sortin2. Estos resultados también son sugerentes con respecto al mecanismo de acción de Sortin2, que todavía no se encuentra totalmente caracterizado. Sortin2 actúa tanto induciendo la iniciación como la emergencia de raíces laterales. Dado que, en presencia de Sortin2, la pérdida de función de NTL9 promueve la emergencia sin alterar el número de eventos de una raíz lateral, ambos efectos ocurren por vías independientes y NTL9 participa en la emergencia de raíces laterales. Además, dado que en la mutante *ntl9-2* se alcanza una densidad de raíces laterales similar a la del ecotipo silvestre a ambas concentraciones de Sortin2, concluimos que NTL9 participa de una ruta de tráfico distinta de aquella dependiente de PI3K que ocurre desde el endosoma tardío PVC. Por ejemplo, esta ruta podría ser un tráfico desde un endosoma temprano hacia la vacuola que no pasa por PVC.

Dado que este trabajo fue planteado en base a la evaluación del tráfico sensible a Sortin2 con el fin de entender qué rutas del tráfico endocítico se encuentran alteradas en las distintas mutantes, se evaluó primeramente el número de eventos de formación de una raíz lateral inducidos por el compuesto. No obstante, al observar el desarrollo de raíces laterales en condiciones control se obtiene que éste también se encuentra alterado en las mutantes de *NTL9*. En la condición control encontramos que la emergencia de las raíces laterales se encuentra disminuida en las mutantes de *NTL9*, de modo que el FT participa como un inductor de la emergencia de las raíces laterales. No obstante, la aplicación de Sortin2 sobrepasa la pérdida de función de *NTL9* y

revierte este fenotipo. Esto sugiere que la deficiencia en raíces laterales emergidas en las mutantes de NTL9 se debe efectivamente a un defecto en el tráfico endocítico. Dado que las mutantes no poseen de por sí una alteración de su IRL, reiteramos que el defecto que poseen en el tráfico es en una ruta distinta de aquella que ocurre desde PVC. De este modo, Sortin2 estaría involucrado en otra ruta de tráfico de la cual NTL9 participa y que es requerida para la emergencia de raíces laterales. Al respecto, este mecanismo de inducción de la emergencia dependiente del tráfico podría estar relacionado con la acumulación de endosomas observada en las mutantes de NTL9. Si este mecanismo requiere del tráfico de un componente desde estos endosomas a otro compartimento, la sobreinducción de la emergencia en respuesta a Sortin2 en estas mutantes podría explicarse a través de la acumulación de dicho componente al estar interrumpido el tráfico. La complementación de estos datos con el uso de otros compuestos químicos que alteren el tráfico podría permitir esclarecer el mecanismo involucrado en este proceso. No obstante, estas observaciones nos permiten afirmar que NTL9 posee un rol fisiológico en la emergencia de raíces laterales además de estar involucrado en el mecanismo que utiliza Sortin2 para promover la emergencia. Esto es interesante ya que se ha utilizado Sortin2 como una herramienta de genómica química que define una vía de inducción de raíces laterales que se encuentra presente en *Arabidopsis*, pero cabe preguntarse si esta vía forma parte del programa de desarrollo de la planta o si solamente se activa en respuesta a un estímulo externo, como es el mismo compuesto Sortin2. En particular, se ha visto que la vía de inducción de raíces laterales activada por Sortin2 es independiente del receptor de auxina SCF<sup>TIR</sup> (Pérez-Henríquez et al., 2012), componente esencial de la vía clásicamente descrita necesaria para el programa de desarrollo de las raíces laterales en *Arabidopsis thaliana* (Casimiro et al., 2001, 2003; Celenza et al., 1995; Fukaki et al., 2005; Péret et

al., 2009; Rogg et al., 2001; Xie et al., 2000). Vías independientes de este receptor han sido descritas como formación de raíces laterales en respuesta a estímulo mecánico (Ditengou et al., 2008) y a especies reactivas de oxígeno (Potters et al., 2007), lo que también vincula a las vías independientes de SCF<sup>TIR</sup> más a respuestas a estrés que al programa de desarrollo de la planta. Sin embargo, el hecho de que NTL9 es requerido durante la emergencia de raíces laterales en condiciones control y que Sortin2 es capaz de compensar la deficiencia provocada por la pérdida de función del FT sugiere que Sortin2 podría actuar río abajo de NTL9 sobre un mecanismo de emergencia de raíces laterales que es regulado durante el programa de desarrollo de *Arabidopsis thaliana*.

Cuando se observó la internalización del trazador de FM4-64 en las mutantes de *NAC017*, se observaron distintos fenotipos que debieron ser analizados en conjunto con la expresión relativa de *NAC017* en las mutantes y los tratamientos con Sortin2. En este sentido, fue de gran importancia lograr corroborar que *nac017-4* es una mutante "knock-down" de *NAC017* para interpretar el rol de este FT en el tráfico endocítico. También hay que notar que la disminución en los niveles de transcrito de *NAC017* provocados por la mutación insercional es muy significativa, permitiendo asegurar que representa una pérdida de función del FT. Una mutación similar pudo haber generado un transcrito codificante para una proteína trunca, constitutivamente localizada en el núcleo. Éste es el caso de la mutante *nac017-2*, una mutante insercional de tipo SALK que representa una ganancia de función del FT *NAC017* (Ng et al., 2013). La localización del inserto SALK en ambas mutantes es muy similar, no obstante, generan un cambio opuesto en los niveles de transcrito. Esto ya ha sido informado en el caso

de otros genes y los mecanismos que hacen esto posible aún no son dilucidados (Wang, 2008).

La pérdida de la función de *NAC017* en la mutante *nac017-4* generó la alteración de la morfología de ciertos endosomas, algunos de ellos presumiblemente endosomas tardíos, sin afectar el tiempo de llegada del trazador FM4-64 a la vacuola o la internalización de la membrana plasmática. Por otro lado, la alteración de la función de *NAC017* en la mutante alélica *nac017-3* generó la misma alteración en la morfología de los endosomas, pero además retrasó el tráfico hacia la vacuola y redujo la internalización de la membrana plasmática. También en ambas mutantes se observaron más endosomas de mayor tamaño, pero este fenotipo fue más severo en la mutante *nac017-3*. Aquí observamos que era difícil distinguir a priori de qué manera el FT participaba en el tráfico a través de los distintos endosomas. No obstante, los fenotipos de endocitosis de la membrana plasmática y llegada del trazador hacia la vacuola sugieren ya que en ambas mutantes se tiene una alteración opuesta del FT. Este punto, en conjunto con el antecedente de que en tratamientos con Sortin2 las mutantes también presentan un fenotipo antagónico, sugieren fuertemente que *nac017-3* es una mutante de ganancia de función del FT *NAC017*. Esta ganancia de función podría deberse a un aumento en los niveles de transcrito de *NAC017*. Al evaluar la expresión relativa de *NAC017*, en la mutante *nac017-3* detectamos un aumento que podría ser significativo biológicamente pero que carece de significancia estadística. En este caso, creemos que ello se debe principalmente al número de réplicas realizadas para este experimento y a que la variación es muy pequeña. De esta manera, los resultados observados en la mutante *nac017-3* mostrarían que *NAC017* sería capaz de reprimir la endocitosis del trazador FM4-64 desde la

membrana plasmática y la llegada del trazador hacia la vacuola, pero la ausencia del FT no provoca un aumento en la endocitosis en comparación con el ecotipo silvestre. Como se ha mencionado antes, los FTs de la familia NAC pueden actuar como heterodímeros al ejercer su rol transcripcional, por lo que es posible que *NAC017* sea capaz de regular el tráfico endocítico mediante la interacción con otros FTs de la misma familia, que pueden actuar como heterodímeros. En tal caso, además, estaríamos viendo que se requieren pequeñas variaciones de la expresión del FT para modular el efecto de su interacción con otros FTs. Por otro lado, el FT es requerido parcialmente para la inducción de raíces laterales por Sortin2 y, a la vez, es capaz de promover el efecto inductor de dicho compuesto. Esto sugiere que el FT es un componente del tráfico sensible a Sortin2 que induce raíces laterales y que depende de PI3K. Este tráfico lleva componentes desde PVC hacia la vacuola, pero hemos visto en las mutantes de *NTL9* y en la mutante *nac017-3* que una tasa reducida del tráfico endocítico hacia la vacuola en condiciones control no es suficiente para afectar el aumento en la densidad de raíces laterales inducido por Sortin2. Esto podría deberse a que el tráfico hacia la vacuola de FM4-64 esté limitado por otras rutas del tráfico endocítico que no dependan de PI3K. Por otro lado, nótese que otros inhibidores de la endocitosis inhiben la formación de raíces laterales. Wortmanina, en cambio, no posee de por sí un efecto en las raíces laterales pero anula el efecto inductor de Sortin2 (Pérez-Henríquez et al., 2012). Esto puede ser comparado a lo que se observa en la mutante *nac017-4*, que posee una densidad de raíces laterales equivalente a la de la planta silvestre en condiciones control y presenta una sensibilidad reducida a Sortin2. Este antecedente concuerda con que el tráfico dependiente de PI3K está enlentecido en la mutante *nac017-4*.

En cada paso del tráfico es muy importante el reciclaje de componentes para iniciar un nuevo ciclo de transporte de vesículas. Por ejemplo, se ha mostrado en levadura que Sortin2 induce la secreción de la proteína carboxipeptidasa Y (CPY), la cual normalmente es llevada hacia la vacuola, probablemente debido a que la proteína no es capaz de encontrarse con las moléculas de destinamiento necesarias para dicho tráfico ante las alteraciones en las tasas de tráfico provocadas por Sortin2 (Norambuena et al., 2008). Debido a lo anterior, es difícil afirmar en base a los fenotipos de las mutantes qué rutas podrían estar siendo reguladas directamente por *NAC017* y qué rutas sufren alteraciones debido a efectos pleiotrópicos o compensatorios. Considerando que en ambas mutantes de *NAC017* existe una alteración del tráfico endocítico que involucra un compartimento que puede ser el PVC y que el FT está involucrado en la endocitosis de la membrana plasmática, se debe tomar en cuenta que existe otra ruta que vincula estos dos procesos, que es la ruta en la que participa la GTPasa *ARA6*. El tráfico desde PVC puede llegar hasta la membrana plasmática a través de la ruta en que participa esta RAB-GTPasa (Ebine et al., 2011). Hemos visto preliminarmente que la mutante de pérdida de función de *ARA6* posee menos endocitosis y es cualitativamente hipersensible a Sortin2, en tanto que la mutante de *ARA6* que se encuentra permanentemente en su forma activa presenta mayor endocitosis de la membrana plasmática. Vemos que la mutante de pérdida de función, *ara6-1*, es similar a la mutante *nac017-3*, de modo que la acumulación de PVCs o la reducción de la tasa de la endocitosis de la membrana plasmática se correlaciona en estas mutantes con una sensibilidad aumentada al compuesto. La similitud en los fenotipos observados en mutantes de *ARA6* y de *NAC017*, en conjunto con la información de que *ARA6* y *NAC017* coexpresan consistentemente, tanto de acuerdo a la Red de Coexpresión del Tráfico como a bases actualizadas de datos de

coexpresión (<http://atted.jp/>) y que *ARA6* ha sido propuesto como un blanco transcripcional directo de *NAC017* a partir de la Red Transcripcional del Tráfico, sugieren fuertemente que la función entre estas dos proteínas se encuentra relacionada.

De manera similar a lo observado en las mutantes de *NTL9*, en las mutantes de *NAC017* también se encontró una correlación entre la acumulación de endosomas y la emergencia de raíces laterales en respuesta a *Sortin2*: a mayor acumulación de endosomas, mayor emergencia. Sin embargo, se pierde la correlación con la tasa de tráfico hacia la vacuola. En condiciones control, no obstante, la emergencia de raíces laterales en ambas mutantes es similar a la del ecotipo silvestre. Esto sugiere que el tráfico endosomas/vacuola del cual depende la emergencia de raíces laterales posee una compleja regulación y posee un componente requerido en el programa de desarrollo de la planta y que depende de *NTL9*, y, además, posee un componente que requiere de *NAC017*.

Como proyección de este trabajo, es de nuestro interés comprender cómo de manera general es regulado el tráfico en plantas a nivel transcripcional. En este trabajo se ha sugerido que dicha regulación ocurre como un subproceso de distintas respuestas de la planta. Hasta ahora no hemos encontrado una mutante de un FT en la cual el tráfico no esté alterado, por lo que es posible que en cada respuesta compleja de la planta el tráfico deba ser modulado. Comprobar esto es importante para validar la estrategia utilizada de seleccionar candidatos que conecten en general de genes del SE mediante coexpresión y regulación transcripcional directa.

Como se ha querido mostrar, el uso del compuesto Sortin2 durante este trabajo aportó gran información sobre la alteración del tráfico en las mutantes y viceversa. Al plantear este trabajo sabíamos que Sortin2 acelera el tráfico hacia la vacuola, que acelera la endocitosis de la membrana plasmática, que promueve la emergencia de raíces laterales y que promueve la iniciación de raíces laterales de manera dependiente del tráfico endocítico y PI3K. El o los blancos directos de Sortin2 no han sido caracterizados hasta la fecha, lo cual era una desventaja del uso del compuesto considerada desde un inicio. Por este motivo fue muy importante replantear los antecedentes de cómo actúa este compuesto durante el análisis final de los resultados dado que una mejor comprensión de este mecanismo también aportaría en comprender el mecanismo de acción de los FTs NTL9 y NAC017. Esto constituyó una dificultad adicional durante el análisis de este trabajo pero que, sin embargo, vincula inmediatamente los resultados con la importancia biotecnológica que posee el estudio del rol del tráfico endocítico en la arquitectura radicular. Por una parte, es de gran interés agronómico la caracterización de compuestos químicos que mejoren la capacidad de adaptación de la planta frente a distintos tipos de estrés y la arquitectura radicular es importantísima en la respuesta a carencia de nutrientes (Zhang and Forde, 2000), a metales (Lequeux et al., 2010), estrés hídrico (Xiong et al., 2006) y estrés salino (Burssens et al., 2000). Mientras Sortin2 es un buen candidato para su uso en agricultura debido a que aumenta las raíces laterales y, en consecuencia, la capacidad de la planta de captar nutrientes, aún no es claro si puede ser utilizado en producción agrícola destinada a consumo humano por razones de bioseguridad. No obstante, puede ser utilizado para encontrar genes que participan de los mecanismos que induce y para desarrollar variedades resistentes a distintos tipos de estrés. En definitiva, en este momento es esencial para el mejoramiento de la productividad agrícola entender



los procesos que posibilitan la adaptabilidad de la planta y el tráfico endocítico es uno de estos procesos. Investigar los genes involucrados en este tráfico y cómo éste es regulado a nivel transcripcional será de gran importancia en el futuro para el mejoramiento genético de especies vegetales.

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron las líneas mutantes homocigotas *ntl9-1* y *ntl9-2* del gen AT4G35580 y *nac017-3* y *nac017-4* del gen AT1G34190.

Las mutantes *ntl9-1* y *ntl9-2* presentan una pérdida de función de NTL9 debido a la interrupción de la región del genoma que codifica para el dominio de unión a DNA.

La mutante *nac017-4* presenta una pérdida de función de NAC017 a nivel transcripcional.

Las mutantes alélicas de NTL9, *ntl9-1* y *ntl9-2*, presentan una disminución del tráfico endocítico hacia la vacuola y sobreacumulación el trazador del tráfico endocítico en endosomas, sugiriendo que el tráfico entre endosomas y la vacuola se encuentra limitado en las mutantes con respecto a la línea silvestre.

Las mutantes alélicas de NAC017, *nac017-3* y *nac017-4*, presentan un fenotipo relacionado a la alteración del tráfico desde endosoma tardío hacia la vacuola. La mutante *nac017-3* presenta, además, un retraso del tráfico endocítico hacia la vacuola.

Dos mutantes alélicas del FT NTL9 y dos mutantes alélicas del FT NAC017 presentan alteraciones del tráfico endocítico, sugiriendo que ambos FT de la familia NAC participan de la regulación del tráfico endocítico en *Arabidopsis thaliana*.

Consistentemente con un rol en la regulación del tráfico endocítico hacia la vacuola, las mutantes *nac017-3* y *nac017-4* de *NAC017* presentan una sensibilidad alterada a la inducción de raíces laterales mediada por Sortin2, sugiriendo que *NAC017* interviene en el tráfico endocítico hacia la vacuola.

Mutantes de *NTL9* presentan alteraciones en la emergencia de raíces laterales, tanto en condiciones control como en tratamientos con Sortin2, indicando que el FT está involucrado en el desarrollo de raíces laterales.

Finalmente y en resumen, los FT *NTL9* y *NAC017* participan de la regulación del tráfico endocítico hacia la vacuola y en el desarrollo de raíces laterales en *Arabidopsis thaliana*.

## BIBLIOGRAFÍA

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M. (1997). Genes involved in organ separation in *Arabidopsis*: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *Plant Cell Online* 9, 841–857.

Alonso, J.M. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653–657.

Andersson, M.X., and Sandelius, A.S. (2004). A chloroplast-localized vesicular transport system: a bio-informatics approach. *BMC Genomics* 5, 40.

Avisar, D., Abu-Abied, M., Belausov, E., Sadot, E., Hawes, C., and Sparkes, I.A. (2009). A comparative study of the involvement of 17 *Arabidopsis* myosin family members on the motility of Golgi and other organelles. *Plant Physiol.* 150, 700–709.

Bar, M., Leibman, M., Schuster, S., Pitzhadza, H., and Avni, A. (2013). EHD1 functions in endosomal recycling and confers salt tolerance. *PloS One* 8, e54533.

Bassham, D.C., and Raikhel, N.V. (1998). An *Arabidopsis* VPS45p Homolog Implicated in Protein Transport to the Vacuole. *Plant Physiol.* 117, 407–415.

Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S., and Masle, J. (2008). Characterization of TCTP, the Translationally Controlled Tumor Protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Online* 20, 3430–3447.

Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B. (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* 433, 39–44.

Bollman, K.M., Aukerman, M.J., Park, M.-Y., Hunter, C., Berardini, T.Z., and Poethig, R.S. (2003). HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* 130, 1493–1504.

Bolte, S., Talbot, C., Boutte, Y., Catrice, O., Read, N.D., and Satiat-Jeunemaitre, B. (2004). FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *J. Microsc.* 214, 159–173.

Brown, D.A., and Rose, J.K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68, 533–544.

Bu, Q., Jiang, H., Li, C.-B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q., and Li, C. (2008). Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and

ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell Res.* 18, 756–767.

Burssens, S., Himanen, K., Cotte, B. van de, Beeckman, T., Montagu, M.V., Inzé, D., and Verbruggen, N. (2000). Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 211, 632–640.

Casimiro, I., Marchant, A., Bhalerao, R.P., Beeckman, T., Dhooge, S., Swarup, R., Graham, N., Inzé, D., Sandberg, G., Casero, P.J., et al. (2001). Auxin Transport Promotes *Arabidopsis* Lateral Root Initiation. *Plant Cell Online* 13, 843–852.

Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G., and Bennett, M.J. (2003). Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends Plant Sci.* 8, 165–171.

Celenza, J.L., Grisafi, P.L., and Fink, G.R. (1995). A pathway for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev.* 9, 2131–2142.

Cheng, Z., Sun, L., Qi, T., Zhang, B., Peng, W., Liu, Y., and Xie, D. (2011). The bHLH Transcription Factor MYC3 Interacts with the Jasmonate ZIM-Domain Proteins to Mediate Jasmonate Response in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 4, 279–288.

Deng, Y., Humbert, S., Liu, J.-X., Srivastava, R., Rothstein, S.J., and Howell, S.H. (2011). Heat induces the splicing by IRE1 of a mRNA encoding a transcription factor involved in the unfolded protein response in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 7247–7252.

Dhonukshe, P., Tanaka, H., Goh, T., Ebine, K., Mähönen, A.P., Prasad, K., Bllilou, I., Geldner, N., Xu, J., Uemura, T., et al. (2008). Generation of cell polarity in plants links endocytosis, auxin distribution and cell fate decisions. *Nature* 456, 962–966.

Ditengou, F.A., Teale, W.D., Kochersperger, P., Flittner, K.A., Kneuper, I., Graaff, E. van der, Nziengui, H., Pinosa, F., Li, X., Nitschke, R., et al. (2008). Mechanical induction of lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 18818–18823.

Ebine, K., Fujimoto, M., Okatani, Y., Nishiyama, T., Goh, T., Ito, E., Dainobu, T., Nishitani, A., Uemura, T., Sato, M.H., et al. (2011). A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nat. Cell Biol.* 13, 853–859.

Eike, M.C. (2004). Characterising transgene silencing in single-copy *Arabidopsis thaliana* lines: DNA methylation in view of genomic and transcriptional context.

Falchi, R., Cipriani, G., Marrazzo, T., Nonis, A., Vizzotto, G., and Ruperti, B. (2010). Identification and differential expression dynamics of peach small GTPases encoding genes during fruit development and ripening. *J. Exp. Bot.* 61, 2829–2842.

Fukaki, H., Nakao, Y., Okushima, Y., Theologis, A., and Tasaka, M. (2005). Tissue-specific expression of stabilized SOLITARY-ROOT/IAA14 alters lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J.* *44*, 382–395.

Garmier, M., Carroll, A.J., Delannoy, E., Vallet, C., Day, D.A., Small, I.D., and Millar, A.H. (2008). Complex I dysfunction redirects cellular and mitochondrial metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *148*, 1324–1341.

Gu, Y., and Innes, R.W. (2012). The KEEP ON GOING protein of *Arabidopsis* regulates intracellular protein trafficking and is degraded during fungal infection. *Plant Cell* *24*, 4717–4730.

Haga, N., Kato, K., Murase, M., Araki, S., Kubo, M., Demura, T., Suzuki, K., Müller, I., Voss, U., Jürgens, G., et al. (2007). R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 1101–1110.

Hao, Y.-J., Wei, W., Song, Q.-X., Chen, H.-W., Zhang, Y.-Q., Wang, F., Zou, H.-F., Lei, G., Tian, A.-G., Zhang, W.-K., et al. (2011). Soybean NAC transcription factors promote abiotic stress tolerance and lateral root formation in transgenic plants. *Plant J.* *68*, 302–313.

Hashiguchi, Y., Niihama, M., Takahashi, T., Saito, C., Nakano, A., Tasaka, M., and Morita, M.T. (2010). Loss-of-function mutations of retromer large subunit genes suppress the phenotype of an *Arabidopsis* zig mutant that lacks Qb-SNARE VT111. *Plant Cell* *22*, 159–172.

Hashimoto, K., Igarashi, H., Mano, S., Takenaka, C., Shiina, T., Yamaguchi, M., Demura, T., Nishimura, M., Shimmen, T., and Yokota, E. (2008). An isoform of *Arabidopsis* myosin XI interacts with small GTPases in its C-terminal tail region. *J. Exp. Bot.* *59*, 3523–3531.

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

Heyndrickx, K.S., and Vandepoele, K. (2012). Systematic identification of functional plant modules through the integration of complementary data sources. *Plant Physiol.* *159*, 884–901.

Holweg, C., and Nick, P. (2004). *Arabidopsis* myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 10488–10493.

Ismail, A., Riemann, M., and Nick, P. (2012). The jasmonate pathway mediates salt tolerance in grapevines. *J. Exp. Bot.* *63*, 2127–2139.

Iwata, Y., and Koizumi, N. (2012). Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Trends Plant Sci.*

Jaillais, Y., and Chory, J. (2010). Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 642–645.

Jancowski, S., Catching, A., Pighin, J., Kudo, T., Foissner, I., and Wasteneys, G.O. (2014). Trafficking of the myrosinase-associated protein GLL23 requires NUC/MVP1/GOLD36/ERMO3 and the p24 protein CYB. *Plant J.* 77, 497–510.

Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., Galberg, P., Petersen, K., O'Shea, C., and Skriver, K. (2010a). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure-function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochem. J.* 426, 183–196.

Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Petersen, K., and Skriver, K. (2010b). NAC genes: time-specific regulators of hormonal signaling in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 5, 907–910.

Kahn, R.A. (2004). *ARF Family GTPases* (Springer).

Kim, H.S., Park, B.O., Yoo, J.H., Jung, M.S., Lee, S.M., Han, H.J., Kim, K.E., Kim, S.H., Lim, C.O., Yun, D.-J., et al. (2007a). Identification of a calmodulin-binding NAC protein as a transcriptional repressor in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* 282, 36292–36302.

Kim, H.S., Park, H.C., Kim, K.E., Jung, M.S., Han, H.J., Kim, S.H., Kwon, Y.S., Bahk, S., An, J., Bae, D.W., et al. (2012). A NAC transcription factor and SNI1 cooperatively suppress basal pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res.* 40, 9182–9192.

Kim, S.-G., Kim, S.-Y., and Park, C.-M. (2007b). A membrane-associated NAC transcription factor regulates salt-responsive flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Planta* 226, 647–654.

Kim, S.-G., Lee, S., Seo, P.J., Kim, S.-K., Kim, J.-K., and Park, C.-M. (2010). Genome-scale screening and molecular characterization of membrane-bound transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Genomics* 95, 56–65.

Kim, S.-Y., Kim, S.-G., Kim, Y.-S., Seo, P.J., Bae, M., Yoon, H.-K., and Park, C.-M. (2007c). Exploring membrane-associated NAC transcription factors in *Arabidopsis*: implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Res.* 35, 203–213.

Kim, Y.-S., Sakuraba, Y., Han, S.-H., Yoo, S.-C., and Paek, N.-C. (2013). Mutation of the *Arabidopsis* NAC016 Transcription Factor Delays Leaf Senescence. *Plant Cell Physiol.*

Latora, V., and Marchiori, M. (2007). A measure of centrality based on network efficiency. *New J. Phys.* 9, 188.

Lequeux, H., Hermans, C., Lutts, S., and Verbruggen, N. (2010). Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone

distribution, lignin accumulation and mineral profile. *Plant Physiol. Biochem.* **48**, 673–682.

Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., and Dong, X. (1999). Identification and Cloning of a Negative Regulator of Systemic Acquired Resistance, SNI1, through a Screen for Suppressors of *npr1-1*. *Cell* **98**, 329–339.

Liu, J.-X., and Howell, S.H. (2010). bZIP28 and NF-Y transcription factors are activated by ER stress and assemble into a transcriptional complex to regulate stress response genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 782–796.

Liu, J.-X., Srivastava, R., Che, P., and Howell, S.H. (2007a). An Endoplasmic Reticulum Stress Response in *Arabidopsis* Is Mediated by Proteolytic Processing and Nuclear Relocation of a Membrane-Associated Transcription Factor, bZIP28. *PLANT CELL ONLINE* **19**, 4111–4119.

Liu, J.-X., Srivastava, R., Che, P., and Howell, S.H. (2007b). Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **51**, 897–909.

Lu, D.-P., and Christopher, D.A. (2008). Endoplasmic reticulum stress activates the expression of a sub-group of protein disulfide isomerase genes and AtbZIP60 modulates the response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Genet. Genomics* **280**, 199–210.

Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., Pařezová, M., Petrášek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J., et al. (2011). Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Dev. Cell* **21**, 796–804.

McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., and Browse, J. (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 5473–5477.

Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., and Ohme-Takagi, M. (2005). The NAC Transcription Factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* Regulate Secondary Wall Thickenings and Are Required for Anther Dehiscence. *Plant Cell Online* **17**, 2993–3006.

Montesinos, J.C., Langhans, M., Sturm, S., Hillmer, S., Aniento, F., Robinson, D.G., and Marcote, M.J. (2013). Putative p24 complexes in *Arabidopsis* contain members of the delta and beta subfamilies and cycle in the early secretory pathway. *J. Exp. Bot.* **64**, 3147–3167.

Mosher, R.A., Durrant, W.E., Wang, D., Song, J., and Dong, X. (2006). A Comprehensive Structure–Function Analysis of *Arabidopsis* SNI1 Defines Essential Regions and Transcriptional Repressor Activity. *Plant Cell Online* **18**, 1750–1765.

Nagashima, Y., Mishiba, K., Suzuki, E., Shimada, Y., Iwata, Y., and Koizumi, N. (2011). *Arabidopsis* IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor. *Sci. Rep.* **1**.



Ng, S., Ivanova, A., Duncan, O., Law, S.R., Van Aken, O., De Clercq, I., Wang, Y., Carrie, C., Xu, L., Kmiec, B., et al. (2013). A Membrane-Bound NAC Transcription Factor, ANAC017, Mediates Mitochondrial Retrograde Signaling in Arabidopsis. *Plant Cell*.

Norambuena, L., Zouhar, J., Hicks, G.R., and Raikhel, N.V. (2008). Identification of cellular pathways affected by Sortin2, a synthetic compound that affects protein targeting to the vacuole in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Chem. Biol.* 8, 1.

Olsen, A.N., Ernst, H.A., Leggio, L.L., and Skriver, K. (2005). DNA-binding specificity and molecular functions of NAC transcription factors. *Plant Sci.* 169, 785–797.

Ooka, H., Satoh, K., Doi, K., Nagata, T., Otomo, Y., Murakami, K., Matsubara, K., Osato, N., Kawai, J., Carninci, P., et al. (2003). Comprehensive Analysis of NAC Family Genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 10, 239–247.

Ouakfaoui, S.E., and Miki, B. (2005). The stability of the Arabidopsis transcriptome in transgenic plants expressing the marker genes *np111* and *uidA*. *Plant J.* 41, 791–800.

Péret, B., De Rybel, B., Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R., Laplaze, L., Beeckman, T., and Bennett, M.J. (2009). Arabidopsis lateral root development: an emerging story. *Trends Plant Sci.* 14, 399–408.

Pérez-Henríquez, P., Raikhel, N.V., and Norambuena, L. (2012). Endocytic Trafficking towards the Vacuole Plays a Key Role in the Auxin Receptor SCFTIR-Independent Mechanism of Lateral Root Formation in *A. thaliana*. *Mol. Plant*.

Pfeffer, S.R. (2013). Rab GTPase regulation of membrane identity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 25, 414–419.

Pizarro, L., and Norambuena, L. (2014). Regulation of protein trafficking: Posttranslational mechanisms and the unexplored transcriptional control. *Plant Sci.* 225, 24–33.

Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., Palme, K.J., and Jansen, M.A.K. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12, 98–105.

Reichardt, I., Slane, D., El Kasmi, F., Knöll, C., Fuchs, R., Mayer, U., Lipka, V., and Jürgens, G. (2011). Mechanisms of functional specificity among plasma-membrane syntaxins in Arabidopsis. *Traffic Cph. Den.* 12, 1269–1280.

Richter, S., Voss, U., and Jürgens, G. (2009). Post-Golgi traffic in plants. *Traffic Cph. Den.* 10, 819–828.

Robert, S., Kleine-Vehn, J., Barbez, E., Sauer, M., Paciorek, T., Baster, P., Vanneste, S., Zhang, J., Simon, S., Čovanová, M., et al. (2010). ABP1 Mediates Auxin Inhibition of Clathrin-Dependent Endocytosis in Arabidopsis. *Cell* 143, 111–121.

Rogg, L.E., Lasswell, J., and Bartel, B. (2001). A Gain-of-Function Mutation in IAA28 Suppresses Lateral Root Development. *Plant Cell Online* 13, 465–480.

Saito, C., Ueda, T., Abe, H., Wada, Y., Kuroiwa, T., Hisada, A., Furuya, M., and Nakano, A. (2002). A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 29, 245–255.

Samaj, J., Read, N.D., Volkmann, D., Menzel, D., and Baluska, F. (2005). The endocytic network in plants. *Trends Cell Biol.* 15, 425–433.

Sanderfoot, A.A., and Raikhel, N.V. The Secretory System of *Arabidopsis*. In *The Arabidopsis Book*, 2003. DOI: 10.1199/tab.0098.

Seo, P.J., Kim, M.J., Park, J.-Y., Kim, S.-Y., Jeon, J., Lee, Y.-H., Kim, J., and Park, C.-M. (2010). Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 61, 661–671.

Shirakawa, M., Ueda, H., Shimada, T., Koumoto, Y., Shimada, T.L., Kondo, M., Takahashi, T., Okuyama, Y., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I. (2010). *Arabidopsis* Qa-SNARE SYP2 proteins localized to different subcellular regions function redundantly in vacuolar protein sorting and plant development. *Plant J.* 64, 924–935.

Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., and Koes, R. (1996). The *no apical meristem* gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* 85, 159–170.

Tajima, H., Iwata, Y., Iwano, M., Takayama, S., and Koizumi, N. (2008). Identification of an *Arabidopsis* transmembrane bZIP transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374, 242–247.

Takác, T., Pechan, T., Richter, H., Müller, J., Eck, C., Böhm, N., Obert, B., Ren, H., Niehaus, K., and Samaj, J. (2011). Proteomics on brefeldin A-treated *Arabidopsis* roots reveals profilin 2 as a new protein involved in the cross-talk between vesicular trafficking and the actin cytoskeleton. *J. Proteome Res.* 10, 488–501.

Takáč, T., Pechan, T., Samajová, O., Ovečka, M., Richter, H., Eck, C., Niehaus, K., and Samaj, J. (2012). Wortmannin Treatment Induces Changes in *Arabidopsis* Root Proteome and Post-Golgi Compartments. *J. Proteome Res.*

Takáč, T., Pechan, T., Samajová, O., and Samaj, J. (2013). Vesicular trafficking and stress response coupled to PI3K inhibition by LY294002 as revealed by proteomic and cell biological analysis. *J. Proteome Res.* 12, 4435–4448.

Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15107–15111.

Törmäkangas, K., Hadlington, J.L., Pimpl, P., Hillmer, S., Brandizzi, F., Teeri, T.H., and Denecke, J. (2001). A vacuolar sorting domain may also influence the way in which proteins leave the endoplasmic reticulum. *Plant Cell* 13, 2021–2032.

Tran, L.-S.P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S.D., Maruyama, K., Fujita, Y., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. *Plant J.* 49, 46–63.

Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R.L., Nakano, A., Takeyasu, K., and Sato, M.H. (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct. Funct.* 29, 49–65.

Urade, R. (2009). The endoplasmic reticulum stress signaling pathways in plants. *BioFactors* 35, 326–331.

Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J., and Zhu, J.-K. (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 45, 523–539.

Viotti, C., Bubeck, J., and Schumacher, K. (2010). Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the Trans-Golgi Network/Early Endosome, an independent and highly dynamic organelle.

Walter, N., and Holweg, C.L. (2008). Head-neck domain of Arabidopsis myosin XI, MYA2, fused with GFP produces F-actin patterns that coincide with fast organelle streaming in different plant cells. *BMC Plant Biol.* 8, 74.

Wang, Y.H. (2008). How effective is T-DNA insertional mutagenesis in Arabidopsis? *J. Biochem. Technol.* 1, 11–20.

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

Wang, H., Huang, Z., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, H., Wu, Y., Huang, D., and Huang, R. (2004). Ectopic overexpression of tomato JERF3 in tobacco activates downstream gene expression and enhances salt tolerance. *Plant Mol. Biol.* 55, 183–192.

Wang, J., Cai, Y., Miao, Y., Lam, S.K., and Jiang, L. (2009). Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. *J. Exp. Bot.* 60, 3075–3083.

Wang, M., Xu, Q., and Yuan, M. (2011). The unfolded protein response induced by salt stress in Arabidopsis. *Methods Enzymol.* 489, 319–328.

Wick, P., Gansel, X., Oulevey, C., Page, V., Studer, I., Dürst, M., and Sticher, L. (2003). The expression of the t-SNARE AtSNAP33 is induced by pathogens and mechanical stimulation. *Plant Physiol.* 132, 343–351.

- Williams, B., Kabbage, M., Britt, R., and Dickman, M.B. (2010). AtBAG7, an Arabidopsis Bcl-2-associated athanogene, resides in the endoplasmic reticulum and is involved in the unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6088–6093.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D., and Chua, N.-H. (2000). Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev.* 14, 3024–3036.
- Xiong, L., Wang, R.-G., Mao, G., and Koczan, J.M. (2006). Identification of Drought Tolerance Determinants by Genetic Analysis of Root Response to Drought Stress and Abscisic Acid. *Plant Physiol.* 142, 1065–1074.
- Yoo, C.-M., Quan, L., Cannon, A.E., Wen, J., and Blancaflor, E.B. (2012). AGD1, a class 1 ARF-GAP, acts in common signaling pathways with phosphoinositide metabolism and the actin cytoskeleton in controlling Arabidopsis root hair polarity. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 69, 1064–1076.
- Yoon, H., Kim, S., Kim, S., and Park, C. (2008). Regulation of leaf senescence by NTL9-mediated osmotic stress signaling in Arabidopsis. *Mol. Cells* 25, 438.
- Zhang, H., and Forde, B.G. (2000). Regulation of Arabidopsis root development by nitrate availability. *J. Exp. Bot.* 51, 51–59.
- Zheng, X., Chen, B., Lu, G., and Han, B. (2009). Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 379, 985–989.
- Zouhar, J., Rojo, E., and Bassham, D.C. (2009). AtVPS45 is a positive regulator of the SYP41/SYP61/VT112 SNARE complex involved in trafficking of vacuolar cargo. *Plant Physiol.* 149, 1668–1678.